



T.C.

DİCLE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

**KADMİYUMLA İNDÜKLENEN RATLARDA
HEPATOTOKSİSİTE HASARINA KARŞI BORİK
ASİTİN KORUYUCU ETKİNLİĞİNİN
İNCELENMESİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. FAİK VEYSEL AKPULAT

Diyarbakır -2023



T.C.

DİCLE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

**KADMİYUMLA İNDÜKLENEN RATLARDA
HEPATOTOKSİSİTE HASARINA KARŞI BORİK
ASİTİN KORUYUCU ETKİNLİĞİNİN
İNCELENMESİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. FAİK VEYSEL AKPULAT

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. ULAŞ ADAY

Diyarbakır -2023

BEYAN

Bu tezin tamamen tarafıma ait olduğunu, tezin yazımındaki tüm aşamalarda etik dışı yazımın olmadığını ve telif haklarına uygun davrandığımı, edindiğim tüm verileri bilimsel çerçevede temin ettiğimi, belirtmiş olduğum tüm bilgi ve yorumlara da referans gösterdiğimi beyan ederim.

Mart 2023

Faik Veysel AKPULAT



TEŞEKKÜR

Eğitim sürecinde kendisiyle birlikte olmaktan büyük mutluluk duyduğum, destek ve emeklerini esirgemeyen, ihtiyaç duyduğum zamanlarda beni bilgilendiren, örnek akademik bilgeliği, yeteneği ve kişiliği ile cerrahi hekimlik deneyimime çok büyük katkılar sağlayan ve tüm tıp camiasına örnek teşkil edecek hekimlik duruşu sayesinde, asistanı olmaktan her zaman onur ve kıvanç duyacağım saygıdeğer Doç. Dr. Ulaş ADAY 'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Güvenini her zaman yanımda hissettiğim, bana yol gösteren ve beni hep yüreklendiren, cerrahi eğitimimde engin katkıları olan, yaşadığım her türlü sorun karşısında yardımını esirgemeyen, ömrüm boyunca hürmetle ve minnetle hep saygı duyacağım, saygıdeğer Prof. Dr. Abdullah OĞUZ'a şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmamda yapmış olduğu katkılardan ve sonsuz desteğinden ötürü saygıdeğer Prof. Dr. Burak Veli ÜLGER hocama çok teşekkür ederim.

Cerrahi asistanlığım boyunca uzman görüşleri ile bana her zaman destek olan değerli tüm öğretim üyeleri hocalarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen Histoloji Anabilim Dalında görevli saygıdeğer Dr. Eda YILDIZHAN 'a sonsuz şükranlarımı sunarım.

Eğitim ve kişisel hayatım süresince tüm imkanlarını benim için seferber etmiş, varlığıyla bana hep güç vermiş, genel cerrahi uzmanlığını almamın temel vesilesi, hasretle andığım, bugünümü görmediği için derin üzüntü duyduğum başta saygıdeğer annem Sultan AKPULAT'a ve tüm aile fertlerime minnettarım, sonsuz şükran ve hürmetlerimi sunarım.

Beni motive eden, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, doğacak biricik kızım Ahsen AKPULAT'ın annesi, çok değerli hayat arkadaşım Neval AKPULAT'a minnettarım.

Uzmanlık eğitimim süresince çalışmaktan büyük onur ve kıvanç duyduğum, çalışma ortamımızın mükemmel olmasında temel vesile tüm araştırma görevlisi doktor arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yine beraber çalışmaktan gurur duyduğum tüm hemşire ve diğer sağlık personeli arkadaşlarıma, ameliyathane ekibine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığınca **TIP.22.008** numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	v
TABLolar LİSTESİ.....	vi
ÖZET.....	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1.Kadmiyum.....	2
2.2. Borik Asit.....	3
2.3. Karaciğerin embriyolojisi, Histolojisi ve Anatomisi	4
2.3.1. Karaciğerin embriyolojik gelişimi	4
2.3.2. Karaciğerin histolojisi	5
2.1.3. Karaciğerin anatomisi	6
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	15
3.1. Kadmiyum'un Uygulanması	16
3.2. Borik Asit'in Uygulanması	16
3.3. Deney Hayvanları Gruplarının Oluşturulması ve Deney Protokolü	16
3.4. Rutin Histolojik Takip	17
3.5. Histokimyasal Metodlar	18
3.5.1. Hematoksilen& Eozin (H&E) Boyama Protokolü.....	19
3.5.2. Periyodik Asit Schiff (PAS) Boyama Protokolü.....	19
3.6. İmmunohistokimyasal Metodlar	19
3.6.1.Tümör Nekrotizan Faktör- α (TNF- α) İmmunohistokimyası.....	20
3.6.2. APAF-1 İmmunohistokimyası	21
3.7.Total Antioksidan Kapasitesi (TAS).....	22
3.8.Total Oksidan Kapasitesi (TOS)	23

3.9. Oksidatif Stres İndeksinin (OSI) Ölçümü	23
3.10. Kan Serum Malondialdehit (MDA) Değerlerinin Ölçülmesi	23
3.11. Karaciğer Fonksiyon Testleri.....	24
3.12.Morfolojik ve İstatistiksel Analiz	24
4. BULGULAR	24
5. TARTIŞMA	44
6. SONUÇ	47
7. KAYNAKLAR	48



SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

Cd:	Kadmiyum
H₃BO₃:	Borik Asit
HDL:	High-Density Lipoprotein
LDL:	Low-Density Lipoprotein
CdCl₂:	Kadmiyum Klorür
MDA:	Malondialdehid
AST:	Aspartat Aminotransferaz
ALP:	Alkalen Fosfatazlar
ALT:	Alanin Aminotransferaz
PAS:	Periyodik Asit Schiff
H&E:	Hematoksilen & Eozin
TAS:	Toplam Antioksidan Kapasitesi
TOS:	Toplam Oksidan Kapasitesi

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1: Hepatik arter anatomi tipleri ve görülme oranları.

Tablo 2: Karaciğer hastalıklarında laboratuvar parametreleri

Tablo 3: Histolojik takibinin aşamaları

Tablo 4: Karaciğer Enzimleri (AST, ALT, LDH)'nin Ortalama $\pm$ Standart Sapma Değerleri.

Tablo 5: TAS, TOS ve MDA Düzeylerinin Ortalama $\pm$ Standart Sapma Değerleri.

Tablo 6: Karaciğer Hasarı Skorlaması, TNF- α ve APAF-1 Histoskorlaması Alınan Dokuların İstatistiksel Analizinin Tespitiyle Belirlenmiş Ortalama $\pm$ Standart Sapma Değerleri.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Karaciğeri sabitleyen ligamentler.

Şekil 2: Karaciğerin anatomik görünümü.

Şekil 3: Karaciğer segmentleri ve sektörleri.

Şekil 4: Hepatik arter anatomisi.

Şekil 5: Hepatik arter varyasyonları.

Şekil 6: Portal venin anatomisi.

Şekil 7: Portal venin dallanması.

Şekil 8: Hepatik mikroanatomi ve zonlar

Şekil 9: Sıçanlarda karaciğer anatomisi

Şekil 10: İstatistiksel analizi yapılan AST değerlerinin ortalama analizi.

Şekil 11: İstatistiksel analizi yapılan ALT değerlerinin ortalama analizi.

Şekil 12: İstatistiksel analizi yapılan LDH değerlerinin ortalama analizi

Şekil 13: İstatistiksel analizi yapılan TAS değerlerinin ortalama analizi.

Şekil 14: İstatistiksel analizi yapılan TOS değerlerinin ortalama analizi.

Şekil 15: İstatistiksel analizi yapılan MDA değerlerinin ortalama analizi.

Şekil 16: İstatistiksel analizi yapılan karaciğer hasarı skorlamasının ortalama grafiği.

Şekil 17: Normal görünümde hepatik doku mikrofafi.

Şekil 18: BA grubuna ait karaciğer dokusu mikrofafi. Kontrol grubu ile benzer, normal görünümde hepatik doku

Şekil 19: KDM grubuna ait karaciğer dokusu mikrofafi. Sinüzoidal dilatasyon (kırmızı ok), vena sentraliste dejenerasyon (sarı ok), hepatosit çekirdeklerinde piknozis (siyah ok).

Şekil 20: KDM+BA grubuna ait karaciğer dokusu mikrofafi. Konjesyonun devam ettiğı (yeşil ok), vena sentralisteki dejenerasyonun rejenere olmaya başladığı (sarı ok), sinüzoidal dizilimdeki dilatasyonun iyileştiğı ve normale yakın bir görünüm aldığı izlendi (kırmızı ok).

Şekil 21: Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu mikrofafi. PAS pozitif (+) hepatositler, normal görünümlü glikojen yoğunluğu (kırmızı ok).

Şekil 22: BA grubuna ait karaciğer dokusu mikrofafi. PAS (+) hepatositler, kontrolle aynı yoğunlukta glikojen yoğunluğu (kırmızı ok).

Şekil 23: KDM grubuna ait karaciğer dokusu mikrofafi. Hepatositlerde glikojen kaybı (kırmızı ok)

Şekil 24: KDM+BA grubuna ait karaciğer dokusu mikrofafi. PAS (+) hepatositler (kırmızı ok).

Şekil 25: İstatistiksel analizi yapılan karaciğer dokusu TNF- α pozitif immün reaktivitenin ortalama grafiğı.

Şekil 26: İstatistiksel analizi yapılan karaciğer dokusu APAF-1 pozitif immün reaktivitenin ortalama grafiğı.

Şekil 27: Kontrol grubunun hepatik dokusunun immunohistokimya mikrofafi. TNF- α pozitif ekspresyonların yaygınlığı oldukça hafif ve şiddeti ise çok az olarak izlendi. Boyama: TNF- α immunohistokimya.

Şekil 28: Kontrol grubunun hepatik doku immunohistokimya mikrofafi. APAF-1 pozitif ekspresyonların yaygınlığı oldukça hafif ve şiddeti ise çok az olarak izlendi. Boyama: TNF- α immunohistokimya.

Şekil 29: BA grubuna ait karaciğer dokusu immunohistokimya mikrofafi. TNF- α pozitif ekspresyonların yaygınlığı oldukça hafif ve şiddeti ise çok az olarak izlendi. Boyama: TNF- α immunohistokimya.

Şekil 30: BA grubuna ait karaciğer dokusu immunohistokimya mikrofafi. APAF-1 pozitif ekspresyonların yaygınlığı oldukça hafif ve şiddeti ise çok az olarak izlendi. Boyama: TNF- α immunohistokimya.

Şekil 31: KDM grubuna ait karaciğer dokusu immunohistokimya mikrofafi. TNF- α pozitif ekspresyonların şiddeti ve yaygınlığı yaygın düzeyde izlendi (sarı ok). Boyama: TNF- α immunohistokimya.

Şekil 32: KDM grubuna ait karaciğer dokusu immunohistokimya mikrofafi. APAF-1 pozitif ekspresyonların şiddeti ve yaygınlığı orta düzeyde izlendi (sarı ok). Boyama: APAF-1 immunohistokimya.

Şekil 33: KDM+BA grubuna ait karaciğer dokusu immunohistokimya mikrofrafı. TNF- α pozitif ekspresyonların şiddeti ve yaygınlığı az düzeyde izlendi. Boyama: TNF- α immunohistokimya.

Şekil 34: KDM+BA grubuna ait karaciğer dokusu immunohistokimya mikrofrafı. APAF-1 pozitif ekspresyonların şiddeti ve yaygınlığı az düzeyde izlendi (sarı ok). Boyama: APAF-1 immunohistokimya.



ÖZET

Kadmiyumla İndüklenen Ratlarda Hepatotoksisite Hasarına Karşı Borik Asit'in Koruyucu Etkinliğinin İncelenmesi

Kadmiyum (Cd), her yerde bulunan ve biyolojik olarak parçalanamayan, insan sağlığı için büyük tehlikeler barındıran kirleticilerden biridir. Endüstrinin gelişmesi ile birlikte bu metalin doğadaki yoğunluğu önemli oranda artmıştır. Borik asit meyvelerde, sebzelerde ve bazı yiyeceklerde doğal olarak bulunan temel bir mikro besin veya mineraldir.

Bu çalışmada ortalama 8-10 haftalık, 28 adet Wistar Albino cinsi dişi rat kullanıldı. Ratlar, özel olarak hazırlanmış kafeslerde 7'li gruplar halinde 4 grup olarak ayrıldı. Grup 1: Kontrol grubu olup, deney süresince herhangi bir işlem uygulanmadı. Grup 2: Cd grubu olup, deneyin ilk günü tek doz Cd 15 mg/kg'dan gavajla oral olarak verildi ve deneyin 7. gününe kadar başka hiçbir ilaç verilmeden beklenildi. Grup 3: Borik Asit (BA) grubu olup, günlük 200 mg/kg doz ile i.p. olarak 7 gün süreyle yapıldı. Grup 4: Cd+BA grubu olup, Cd 15 mg/kg tek doz verilip, hemen arkasından borik asit 7 gün süreyle günlük 200 mg/kg doz ile i.p. verildi.

Oksidatif stres belirteçlerinden olan Malondialdehit (MDA) ve Total Oksidan Seviyelerine (TOS) serum düzeyinde baktığımızda Cd+BA grubunun bu değerlerin Cd grubuna kıyasla anlamlı olarak daha düşük olduğu izlendi. İmmunohistokimyasal incelemelerde karaciğer dokusunda Tümör nektrotizan faktör alfa (TNF- α) ve APAF-1 ekspresyonlarına bakıldığında ise Cd+BA grubundaki ekspresyonların Cd grubuna kıyasla anlamlı olarak daha az olduğu görüldü ($p<0.05$).

Bu deneysel çalışmada, Cd'un neden olduğu hepatotoksisitede borik asitin antioksidan olduğu ve immunhistokimyasal değerlendirmede sitokin salınımını azaltarak hepatoprotektif olduğu saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kadmiyum, Borik asit, Hepatotoksisite, İnflamasyon, Oksidatif Stres

ABSTRACT

Investigation of the Protective Efficacy of Boric Acid Against Hepatotoxicity Damage in Cadmium-Induced Rats

Cadmium (Cd) is one of the ubiquitous and non-biodegradable pollutants that pose great dangers to human health. With the development of industry, the density of this metal in nature has increased significantly. Boric acid is an essential micronutrient or mineral found naturally in fruits, vegetables and some foods

In this study, 28 Wistar Albino female rats with an average of 8-10 weeks were used. Rats were divided into 4 groups in groups of 7 in specially prepared cages. Group 1: It is the control group and no action was applied during the experiment. Group 2: Cd group, on the first day of the experiment, a single dose of 15 mg/kg of Cd was given orally by gavage and no other drug was given until the 7th day of the experiment. Group 3: Boric acid (BA) group, with a daily dose of 200 mg/kg i.p. was done for 7 days. Group 4: Cd+BA group, Cd was given a single dose of 15 mg/kg, and boric acid was administered i.p. at a daily dose of 200 mg/kg for 7 days. given.

When we look at the serum levels of Malondialdehyde (MDA) and Total Oxidant Levels (TOS), which are oxidative stress markers, it was observed that these values of the Cd+BA group were significantly lower than the Cd group. Tumor necrotizing factor alpha (TNF- α) and APAF-1 expressions in liver tissue in immunohistochemical examinations were examined, it was observed that the expressions in the Cd+BA group were significantly lower than in the Cd group ($p<0.05$).

Conclusion: In this experimental study, it was determined that boric acid is an antioxidant in hepatotoxicity caused by Cd, and it is hepatoprotective by reducing cytokine release in immunohistochemical evaluation.

Keywords: Cadmium, Boric acid, Hepatotoxicity, Inflammation, Oxidative Stress

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kadmiyum (Cd), canlı sağlığı için büyük tehlikeler uyandıran kirleticilerden bir tanesidir. Endüstrinin gelişmesi ile birlikte bu metalin doğadaki yoğunluğu önemli oranda artmıştır (1-3). Eritme ve madencilik ile ilgili endüstriler, piller, pigment ve seramik imalatı, Cd' nin dağılmasına neden olan yayıcılar. Bu metalin çevrede artan emisyonu ve biyolojik olarak parçalanamaması, insan maruziyeti riskini arttırmıştır. Cd maruziyetinin başlıca yolları, gıda, hava ve tütün yapraklarından da bulunmasından kaynaklı yutma ve solunumdur (1-4). Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Cd' u insan sağlığını ilgilendiren 10 kimyasal veya kimyasal grup listesine dahil etmiştir (5). Ayrıca, ABD Toksik Maddeler ve Hastalık Kayıt Dairesi (ATSDR), tehlikeli maddeler listesinde Cd yedinci sırada yer alır (6). Bu metaller Fenton metali olmasa da toksisite mekanizmaları, oksidatif stresin kritik faktörlerinden biridir (7-10). Toksikite mekanizması oksijen, nitrojen ve kükürt ligandlarına bağlanarak çok sayıda enzim ve proteini etkileyebilir (7,11), biyoelementlerle etkileşim kurabilir (12-14), apoptozis inhibisyonu (15), DNA yapısındaki değişiklikler ve hasarlı DNA onarımının inhibisyonu ve anormal gen ekspresyonuna yol açar (16-18). Yapılan bir subkronik oral toksisite çalışmasında farklı dozlarda Cd alınması durumunda ana hedef organların kan, karaciğer ve böbrekler olduğu gösterilmiştir (19).

Borik asit (H_3BO_3) doğada ve besinlerde yaygın olarak bulunabilen bir mineraldir (20, 21). Bor gastrointestinal sistem tarafından tamamen emilerek (20, 22), suda çözündüğünde zayıf olan borik asit formuna dönüşür (23). Borik asit, insanlarda düşük konsantrasyonlarda toksik etkiler göstermez (24-27) ve düşük mutajenik ve sitotoksik aktiviteye sahiptir (28-31). Bor şeklinde çeşitli alanlarda kullanıldığı gibi tıpta da geleneksel olarak kullanılmaktadır (32). Bor içeren maddelerin hem canlı hem de canlı dışındaki biyokimyasal aktiviteleri uzun süredir bilinmektedir (33) ve anti-kanser veya anti-inflamatuar tedavide kullanımları sürekli artmaktadır (34-38). Daha önce yapılan çalışmalarda borik asitin inflamatuvar hastalık riskini azalttığı görülmüştür (39, 40). Ayrıca borik asitin antioksidan (41), hepatoprotektif (32) ve anti-genotoksik etkileri (42) olduğuda bilinmektedir.

Bu çalışmada Cd ile indüklenen ratlarda oluşacak hepatotoksite hasarında borik asitin koruyucu özelliğinin araştırmaktırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Kadmiyum

Kadmiyum periyodik tabloda IIb grubunda bulunan, günümüzde çevresel, endüstriyel kirleticilerden dolayı sıkça maruz kaldığımız modern ağır toksik bir metaldir (45). Cd ve bileşikleri, insanlarda ve deney hayvanlarında karsinojen olarak değerlendirilmiş ve Grup-1 kanserojenler sınıflandırılması içerisinde gösterilmiştir (44,45).

Günümüzdeki bilinçsiz sanayileşme ve çevre kirliliği sebebiyle ağır bir metal olan Cd'un gıdalar vasıtasıyla insan sağlığı üzerinde tehlike oluşturmaktadır (46,47). Sanayide ise Ni-Cd pillerde, bazı boya tiplerinde, plastiklerde ve daha birçok alanda bulunmaktadır (48,49).

Hayvan deneylerinde hepatotoksik amaçlı kullanılan Cd, dünyamızın kirlenen coğrafyasında deneysel bir amaç olmadan da doğal kaynaklar ve antropojenik aktivitelerden salınıp insanlara zarar verebilmektedir (50). Bunun bir örneği olarak bir maden faaliyetinden kaynaklı Cd ile kirlenmiş toprakta yetişen pirinçle beslenen ve kirlenmiş suları içen Jinzu Nehri yakınlarında yaşayan halkı etkileyen Itai-Itai hastalığıdır. Ağır osteomalazinin sonucu olarak uzun kemik kırıkları ve şiddetli ağrı ile seyreden bu hastalık sıklıkla kadınları etkilemektedir (51).

Kadmiyumun %10-50'si akciğerlerden emilir. Bu emilim miktarı, Cd bileşiklerinin partikül büyüklüğü, çözünürlüğü, kişinin maruz kalma süresi ile değişiklik gösterir (52,53). Oral olarak maruz kalınan Cd da ise % 6 gibi bir oran emilir ancak yapılan çalışmalar demir eksikliği olan bireylerde bu emilim miktarının %9 'a kadar çıkabildiğini göstermiştir. Oral alınan Cd diyetdeki su emilimini artırır. Ciltten emilimi oldukça minimal olup % 0.5 civarında olduğu tahmin edilmektedir

(54). Kadmiyumun emilim türü ister cilt, ister diğer yollar olsun emilim sonrası en fazla kadmiyumu alan organ karaciğerdir. Barsaklardan emilen kadmiyum portal dolaşım ile karaciğere gelip sinüzoidal kılcıl damarlardan hepatositler aracılığı ile alınır (55). Cd'un doza bağlı akut toksikasyonunda hemoraji, fulminant hepatit ve akciğer ödemi gelişirken, kronik maruziyette nefrotoksisite ve immünotoksisite ön plana çıkar (56).

2.2. Borik Asit

Ametallerden daha iyi iletken özelliğe sahip periyodik tabloda 3A grubunda bulunan ve yarı metal özellikli bor elementi B ile gösterilmektedir (57). Bor sıkça karşımıza çıkan azot, oksijen, karbon ve hidrojen elementlerine nazaran nadir bir element olmasına karşın doğamızda yaygındır; kayalarda, suda ve toprakta mevcuttur (58,59). Element olarak bor doğada sodyum ve oksijen içeren oranoboron kompleksleri şeklinde bulunur ve bu kompleksler B-O veya B-N bağları içerip bitki, hayvan ve insan dokularında oluşturulurlar (60-62). Dünyada en fazla ülkemizde ve ABD de bulunmakla birlikte pek çok ülkede bor yatakları mevcuttur. Türkiye ilk olarak 18. Yüzyıl ortalarında bor madenlerini keşfetmiştir ve borun dünyadaki rezervlerinin %72'sini bulundurmaktadır. Bu dünya bor rezervlerinin en yüksek oranının ülkemizde olduğunu göstermektedir (63). Borik asit ise bor elementinin en sık görülen çözünebilir formudur; renksiz, kokusuz ve şeffaf kristal yapıdadır. Emiliminden sonra inaktif dağılım ile tüm vücuda dağılır. Bor bazı hayvan ve bitkiler için önemlidir, insan ve hayvanların vücudunda düşük konsantrasyonlarda bulunur. Borik asit vücutta yumuşak dokularda birikmez ancak kemik dokuda borik asit birikimi gözlenmiştir. Yarı ömrü 1 gün kadardır ve üriner sistem yoluyla vücuttan atılır (64). Bor diyetle alındıktan sonra barsak mukozasında borik aside dönüşür, bor elementinin çok büyük bir kısmı borik asit formunda vücuda dağılır ve pasif difüzyon ile emilip dolaşıma katılır. Üriner sistem aracılığıyla atılacak olan borik asidin tamamının vücuttan uzaklaştırılması yaklaşık 4 gün sürer (65).

Bazı hayvan ve bitki türleri için esansiyel olan bor elementi insanlar için de faydalı özelliklere sahiptir. Bor antioksidan sistemde etkinlik gösterir (66). Ayrıca bor elementinin kolesterol üzerinde de olumlu etkisi olduğu kanısına varılmıştır (67).

Yapılan araştırmalar toksikasyonlarda borun yararlı etkilerinin olduğunu göstermiştir. Ratlarda Taşdemir ve ark.'nın yaptıkları çalışmada CdCl₂ uygulamasının kontrol grubuna kıyasla kan MDA seviyelerinin yükseldiğini göstermiştir (68). Ayhancı ve çalışma ark.'nın 2019'da yaptıkları çalışmada ratlarda siklofosfamid ile oluşturulan mesane hasarında borun mesane dokusunda protektif olduğu gösterilmiştir. Buna karşın siklofosfamid grubunda ise; mesane epitelinde incelme, ödem, belirgin inflamatuvar yanıt ve kanama oluştuğu saptanmıştır (69).

İnce ve çalışma grubunun yaptıkları çalışmada; borik asidin koruyucu etkisini araştırmak için, karbon tetraklorür (CCl₄) ile hepatotoksisite oluşturdukları farelere borik asit uygulayarak incelemişlerdir. Bu çalışmada hepatotoksisite oluşturulan farelere verilen borik asidin karaciğer fonksiyon testleri (KCFT) ve MDA düzeyindeki artışı önemli oranda azaltarak karaciğer koruyucu olduğunu raporlamışlardır. Ayrıca bu çalışmada borik asidin glutatyon içeriğini de arttırdığı gösterilmiştir (70).

2.3. Karaciğerin embriyolojisi, Histolojisi ve Anatomisi

2.3.1. Karaciğerin embriyolojik gelişimi

Karaciğer duodenumun distal endodermal çıkıntısı şeklinde fetal gelişimin erken evrelerinde ve üçüncü gebelik haftasında hepatik divertikül olarak ortaya çıkar (71). Hızla çoğalan hepatik divertikül yolk salk ile perikard boşluğu arasına uyan ve bu alanda mevcut septum transversum olarak adlandırılan mezoderm plağını penetre eder (72).

Karaciğer hücreleri septum transversum'un içine girmesi sırasında, safra kanallarının oluşması, hepatik divertikül ile duodenum arasındaki bağlantının daralması ile meydana gelir (73). Epitelial gelişimin daha sonraki dönemlerinde, hepatik sinüzoidler oluşur. Karaciğer kordonlarının, karaciğer parankimine dönüşmesi sonrası, safra kanallarının iç yüzü döşenir. Septum transversum'dan gelişen diğer yapılar hematopoetik hücrelerdir (74,75).

Hepatik hücrelerin septum transversum'a yerleştikten sonra, organlar karın boşluğunda kaudale doğru büyümeye devam eder. Membranöz bir yapı haline gelen septum transversum sırasıyla omentum minus ve ligamentum falciforme hepatis'i oluşturur. Bu iki yapı birlikte ventral mezogastriumu oluşturur (76).

Hepatik yüzeydeki mezoderm, septum transversum ile karaciğerin temasını devam ettiren peritonsuz saha olan, area nuda dışında visseral peritona dönüşür. Yoğun mezenşimal barındıran bu alan, diaphragmanın centrum tendineum'unu meydana getirir (76).

Yenidoğanda karaciğer toplam vücut ağırlığının %4-5'i kadardır ve ortalama olarak 120 gr ağırlığına ulaşmaktadır. Erişkinlik döneminde karaciğer, doğumdaki ağırlığının 12 ile 13 katına ulaşmakla birlikte, bu toplam vücut ağırlığının %2.5 - %3,5'una denk gelir (75). On ikinci haftadan itibaren safra yolları oluşur ve artık karaciğer safra üretmeye başlar. Üretilen safra duodenuma drene olur (71,76,77,). Karaciğer hücreleri ile vasküler duvarlar arasında, beyaz ve kırmızı kan hücrelerinin üretiminden sorumlu geniş proliferatif bir hücre ağı bulunur. Karaciğerin kütlesinin fazla olması, hematopoetik işlevinin bu dönemde çok yüksek olması ve içerdiği sinüzoid sayısının yüksekliğine bağlıdır. Son trimesterde azalan hematopoietik aktivite, doğum sonrası, birkaç hematopoietik hücre adası ile sınırlı kalır (71,77-79).

2.3.2. Karaciğerin histolojisi

Tunica fibrosa hepatis, karaciğeri dıştan sardıktan sonra, içerisine girerek karaciğeri küçük lobüllere ayırır ve portal alanda capsula fibroza olan Glisson kapsülü olarak devam eder. Bu yapıyla portal alanda bulunan yapıları daha yoğun sarılır. Karaciğer lobüllerinin hegzagonal yapısından ötürü, longitudinal kesitlerde karaciğer dokusu poligonal şekilde görülür (80,81)

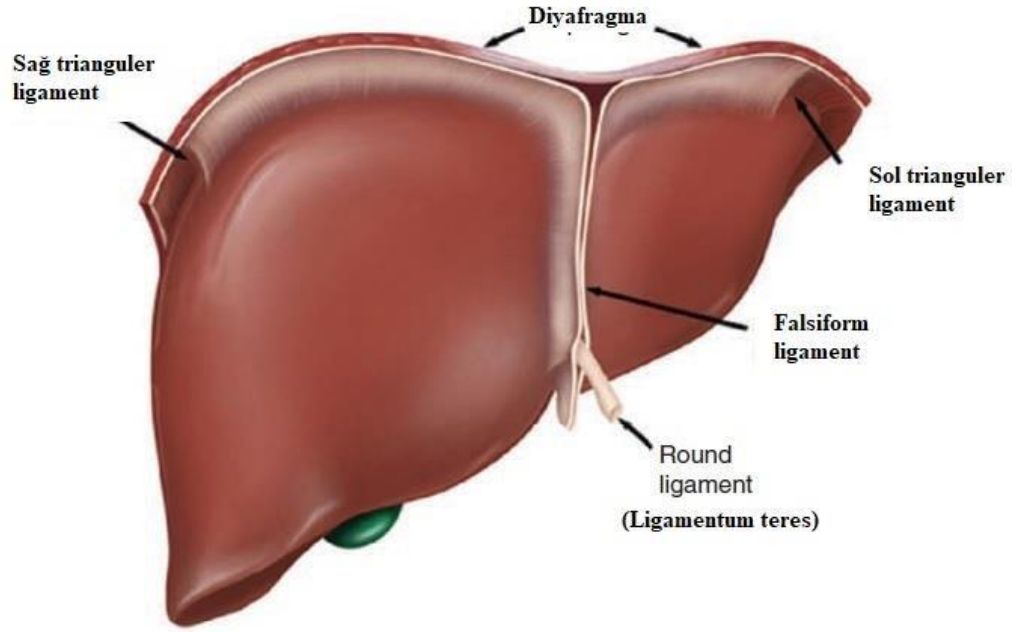
Yüksekliği ve çapı yaklaşık 2 mm olan her bir lobülün birbiri ile temas ettiği alanda, Glisson üçgeni adı verilen, bağ dokusundan oluşan sahalar bulunur. Altıgen şekilli lobülün köşeleri portal alanı barındırır. Buradaki, a. hepatica propria'nın dalı, v. porta hepatis'in dalı, safra kanalı, sinir ve lenf damarını içeren beşli yapıya da portal pentat adı verilir (82). Bunlar, v. porta'nın dalı olan olan vv. interlobulares, a. hepatica propria'nın uç dalları olan aa. interlobulares ve safra kanallarının bir kısmını

oluşturanın ductus interlobularis'tir. Portal alandaki sinüzoidler hücre kordonları (hepatik kord, muralium) arasındaki mesafeyi doldurur. Bu sinüzoidler vv. interlobulares ile v. centralis arasını lobuluslar içerisinde ilerleyerek birleştirir. Retikuloendotelial sistemin elemanları olan endotel ve Kupffer hücreleri sinüzoidlerin iç duvarında bulunur. "Disse aralığı" ise kollajen fibrillerin olduğu ve daha az yoğun hücre dışı matriks içeren alan olup, hepatosit membranı ile sinüzoid endotelisi arasındaki mesafe denir ve yaklaşık 0,3- 0,5 µm genişliğindedir (83-86).

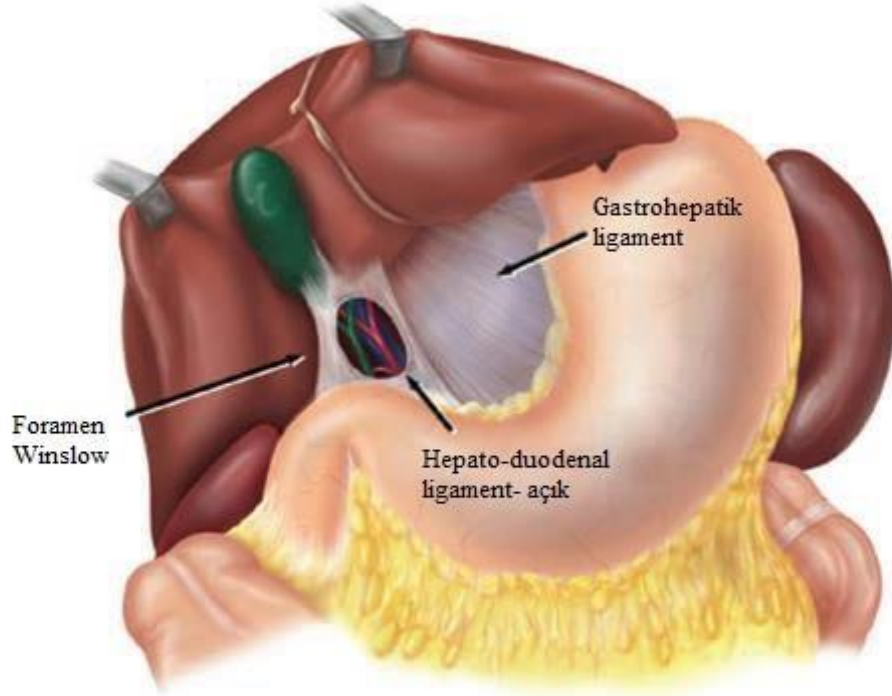
2.1.3. Karaciğerin anatomisi

Gastrointestinal sistemin bir parçası olan karaciğer, yaklaşık 1.2-1.6 kg ağırlığında, batında sağ üst kadranda yerleşimli, solid bir organdır. Sağ kostal sınır, karaciğerin alt hizasının iz düşümüne denk gelir. Diyafragma ise karaciğerin apikal yüzeyini çevreler. Karaciğer, posteriorda ise inferior vena kavanın (İVK) üzerinde seyreder. Sonuç olarak, sağ lobun büyük bir kısmı ile sol lob, kot kafesi içerisinde yerleşir ve etrafı fibröz bir bant olan Glisson kapsülü ile çevrelenir (87,88).

Karaciğer yüzeyini kaplayan periton, arka hepatik yüz, kese yatağı ve porta hepatis dışındaki alanları örterek oluşturduğu katlantılar ile karaciğer yüzeyindeki ligamentleri oluşturur. Lateral sınırlarda ise sağ ve sol triangular ligamentler de koroner liament olarak adlandırılan diyafragmatik peritoneal katlantıyla oluşur. Karaciğer anteriorunda diyafragmadan abdominal duvar boyunca umblikusa doğru uzanan falsiform ligament , ince bir membran olarak koroner ligamandan çıkarak meydana gelir. Oblitere umblikal ligament olan Ligamentum Teres hepatis (lig. Rotundum), umblikustan umblikal fissüre doğru falsiformun inferiorundan devam eder. Karaciğerin sol alt yüzeyine denk gelen umblikal fissür ve sol portal pedikülü içerir. Karaciğerin sol posterior yüzünde yer alan ligamentum venozum ise, sol portal venden İVK'ye doğru uzanan bir fissür içerisinde bulunur. Bu saydığımız ligamentler, karaciğeri batin içerisinde sabitlemektedir (Şekil 1 ve 2). Karaciğer, duodenuma doğru uzanan hepatoduodenal ligament ve mide küçük kurvaturuna doğru uzanan gastrohepatik ligament aracılığı ile de merkezde yerleşir. Porta hepatisin sağında, omentum minusa açılan boşluk foramen Winslowi (epiploik foramen) olarak adlandırılır. Bu yapının önemi, pringle manevrasına olanak tanıyarak ve karaciğerin kan akımının kontrol edilmesini sağlamasıdır (87,88).



Şekil 1 : Karaciğeri sabitleyen ligamentler

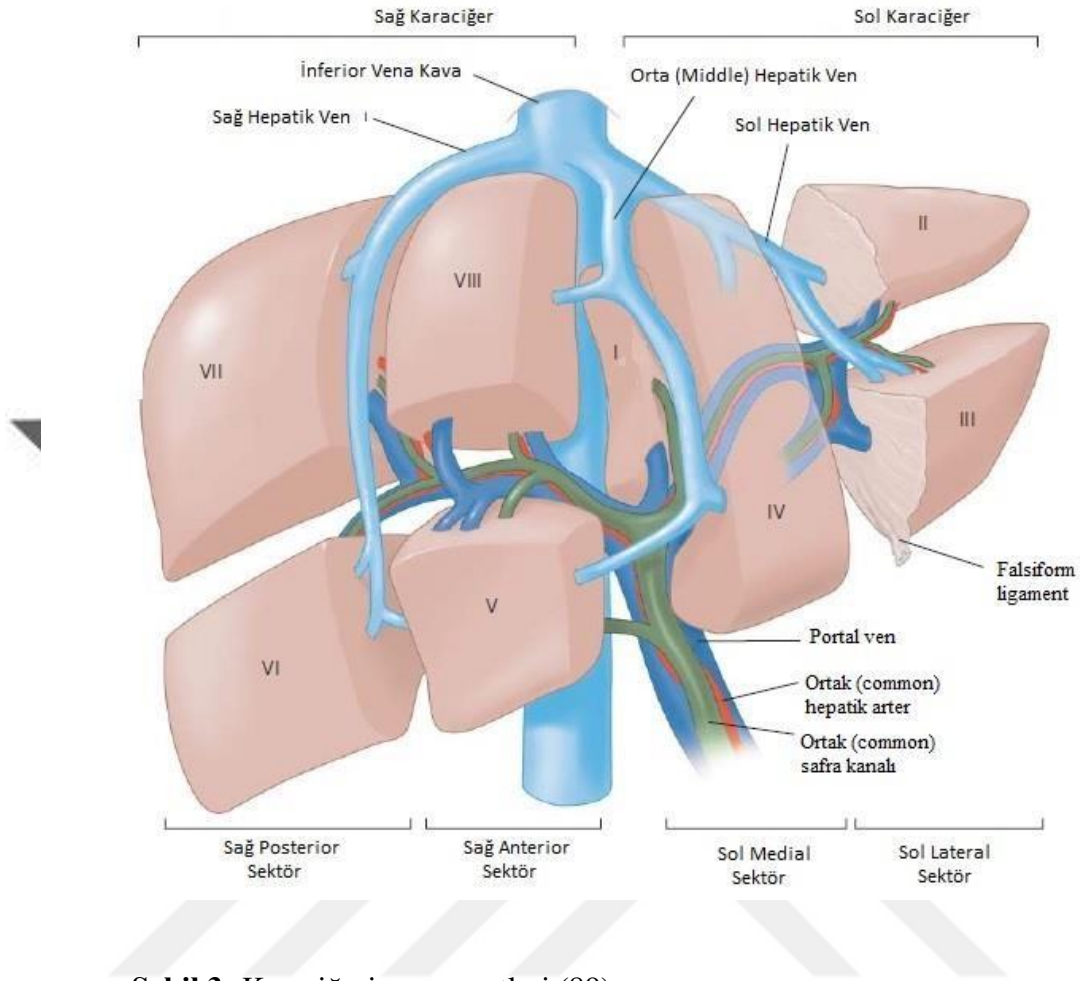


Şekil 2: Karaciğerin anatomik görünümü, hepatogastrik ve hepatoduodenal ligamanlar (87)

2000 yılında yapılan Brisbane toplantısında evrensel terminoloji için hazırlanan öneri, Uluslararası Hepato-Pankreato-Biliyer Birliği (IHPBA) öncülüğünde kabul edildi. Brisbane 2000 terminolojisi olarak bilinen bu sistem ve vasküler-biliyer anatomiye dayalı ayrımları içermektedir (82). Karaciğerin anatomisi fonksiyonel olarak portal tiradlar ile beslenen sekiz segmentten oluşmaktadır. İlk olarak 1957'de Goldsmith, Woodburne ve Couinaud tarafından tanımlanan sağ karaciğer ve sol karaciğer terimleri ise, sağ ve sol lob terimleri yerine kullanılmıştır (88). Sağ ve sol karaciğer ayırımına ana klavuz; Cantle çizgisi olarak ta bilinen, orta hepatik ven izdüşümüne denk gelen; safra kesesi yatağından vena kavanın soluna doğru ön-arka olarak uzanan çizgidir (88).

Sağ karaciğer, anterior sektör (segment V ve VII) ve posterior sektör (segment VI ve VII) olarak sağ hepatik venden geçen ayırım hattı ile ikiye bölünür (Şekil 3). Anterior ve posterior pediküllere ayrılan sağ portal pedikül de sektörlerle ulaşır (88). Sol karaciğerin inferior yüzünde ligamentum teres hepatisin ilerlediği, falciform liamentinde birleştiği, umbilikal fissür adı verilen bir sulkus bulunmaktadır. Umbilikal fissür içerisinden, sol karaciğere dallar veren sol portal pedikül (sol portal ven, hepatik arter ve safra kanalı) geçer. Bu ayırım hattı ile sol karaciğer dokusu anterior (segments III ve IV) ve posterior (segment II, yalnızca bir segment içeren tek sektör) sektörlerle ayrılmış olur (87,88).

Karaciğerin dorsal parçası olan Segment I'e denk gelen kaudat lobun ise, safra drenajı ve vasküler girişleri hem sağ hem de sol pediküllerden olur. Venöz dönüşte direkt İVK'ya olmaktadır (88).



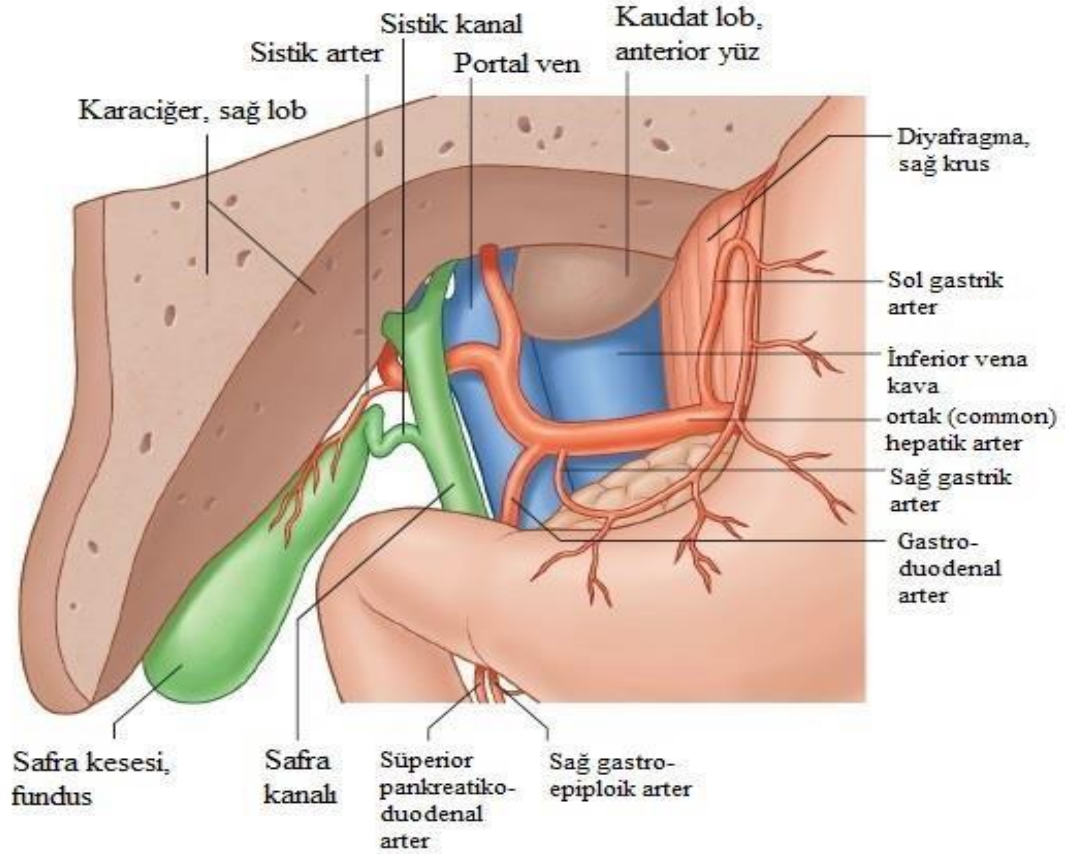
Şekil 3: Karaciğerin segmentleri (89)

Karaciğer kan akımının yaklaşık %75'i portal venden, %25'i ise hepatik arterden olur (87). Klasik hepatik arter çoğu zaman çölyak trunkustan köken alır (Şekil 4) ancak bu anatomi çeşitli varyasyon içerebilmektedir. Süperior mezenterik arterden köken alabileceği gibi her ikisinden de köken alabilmektedir (90).

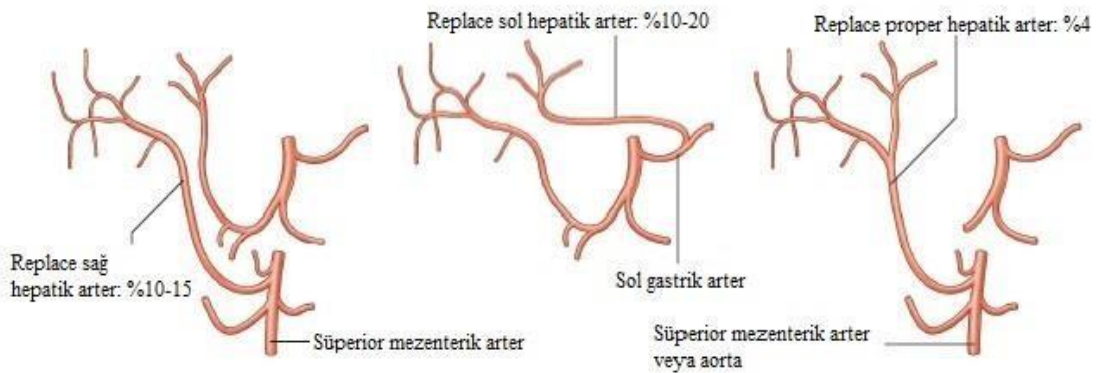
Ana hepatik arter pankreas üst sınırından anterolateral sağa doğru seyrederek ve pankreas boyun hizasından inferiora doğru gastroduodenal arteri (GDA) verir. Buranın distali arteria hepatica propria olarak adlandırılır. Çeşitli varyasyonları olan sağ gastrik arter de, sıklıkla arteria hepatica propriadan ayrılır (87,90).

Hepatik hilus düzeyinde arteria hepatica propria dallanmaktadır. Sistik arter ise %95 oranda sağ hepatik arterden hiler alana giriş yapmadan çıkar, ana hepatik kanalın posteriorunda Calot üçgenine doğru bir seyir izler ve burada safra kesesine gelir (90).

Varyant hepatik arteriyel anatomi, klasik anatomiye rağmen %24-45 oranı ile oldukça yaygındır (Şekil 5 ve Tablo 1). Haliyle optimal cerrahi teknik için aberran vasküler yapıları ve bunların anatomik seyrini bilmek gerekmektedir. Aksesuar hepatik arterler ise, klasik beslenmeye ek olarak karaciğer bölümlerine ek arteriyel beslenme sağlamaktadır. Normal anatomik beslenme olmadan karaciğere tek arteriyel beslenmeyi ifade eden replace arterlerin de cerrahi anatomide tanınması elzemdir (90).



Şekil 4: Hepatik arter anatomisi (90).



Şekil 5: Hepatik arter varyasyonları (83).

Hiatt ve arkadaşları, karaciğer nakil donörlerinin oluşturduğu 1000 vakalık çalışmalarında, hepatic arteriyel anatomiye altı tip olarak (Tablo 1) tanımlamışlardır (91).

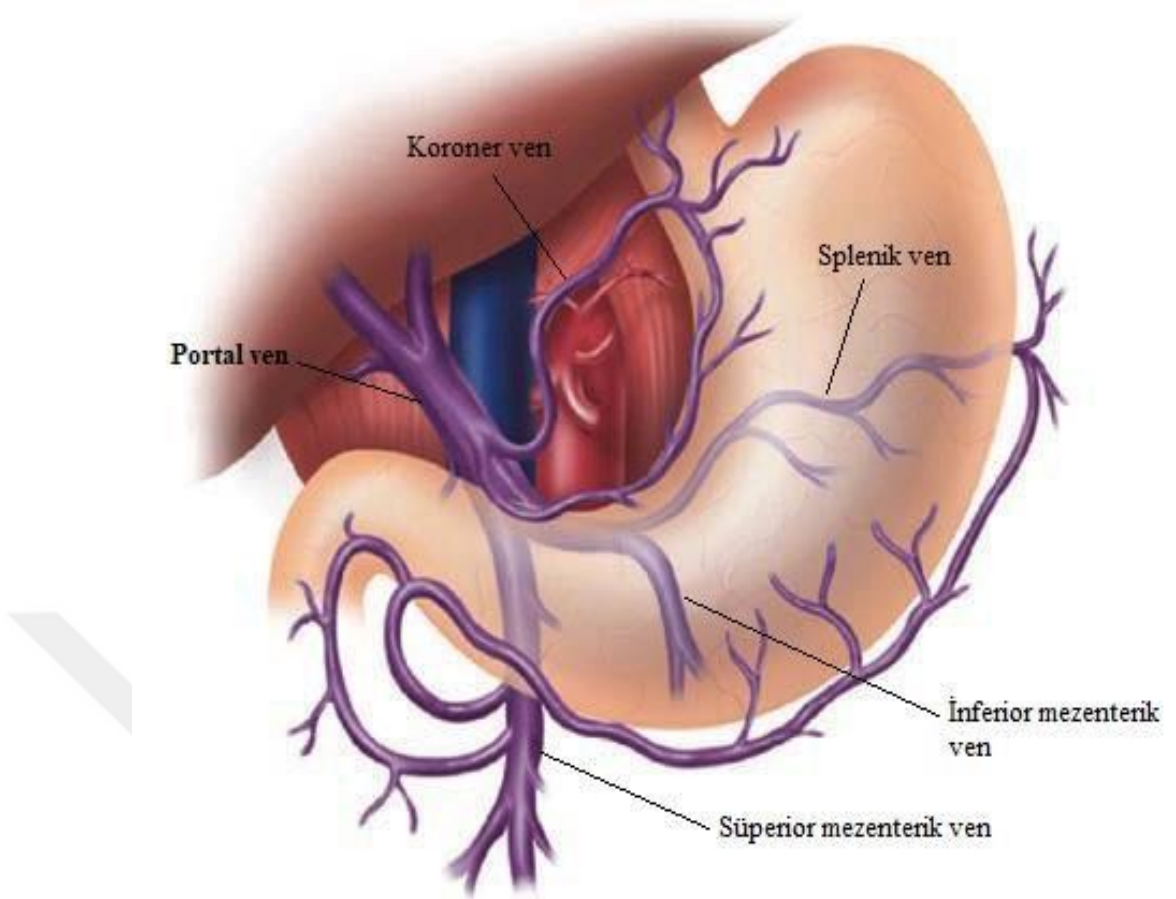
Tip	Arteriyel Anatomi	Sıklığı
1	Klasik anatomi	% 55-76
2	Aberran sol hepatic arter	% 10-20
3	Aberran sağ hepatic arter	% 10-15
4	Hem sağ hem sol aberran arterler	% 2
5	Replace ortak hepatic arter	% 1.5-4
6	Aortadan ayrılan ortak hepatic arter veya diğer	% 0.2-0.5

Tablo 1: Hepatic arter anatomi tipleri ve görülme oranları (90,91).

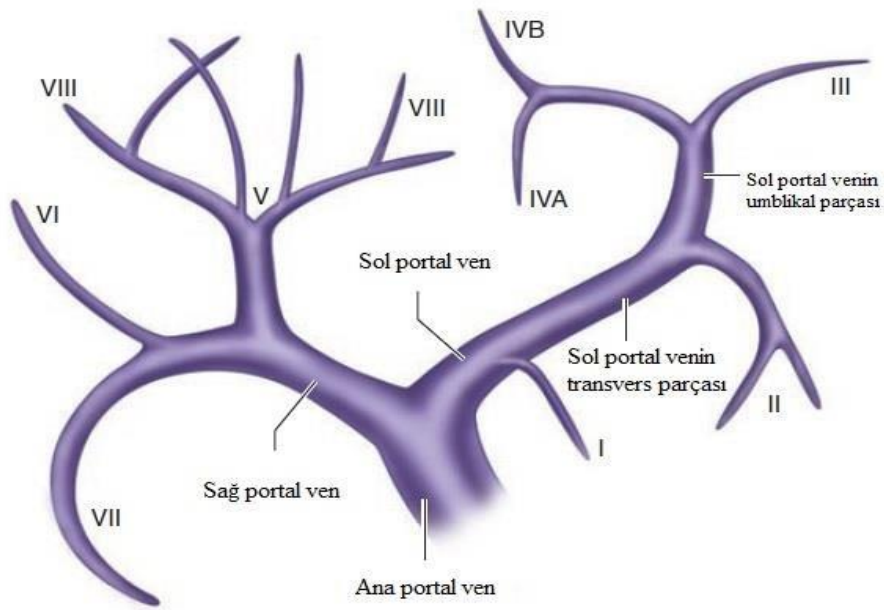
Yüksek akış hızı sayesinde, postkapiller ve büyük ölçüde oksijensiz olmasına rağmen, portal akım oksijenizasyonun %50 ile %70'ini sağlar. Portal venöz sistemde valv olmaması, düşük basınçta yüksek akım sağlamaktadır. Bu sayede, sistem boyunca herhangi bir noktada portal ven basıncının ölçülebilmektedir (88).

Sağlıklı bireylerde 3-5 mmHg olan portal ven basıncının artması durumunda özefageal ve gastrik varisler oluşturabilmekte ve hayatı tehdit edici ciddi kanamalara yol açabilmektedir (87).

SMV ve splenik venin birleşimi ile pankreas boyun posterior düzeyinde portal ven oluşur. Koroner ven ise, portal vene, splenik vene veya her ikisinin birleşim düzeyine açılabilir (Şekil 6 ve 7). Portal venin uzunluğu ortalama 5.5-8 cm, çapı da yaklaşık 1 cm civarındadır (88).



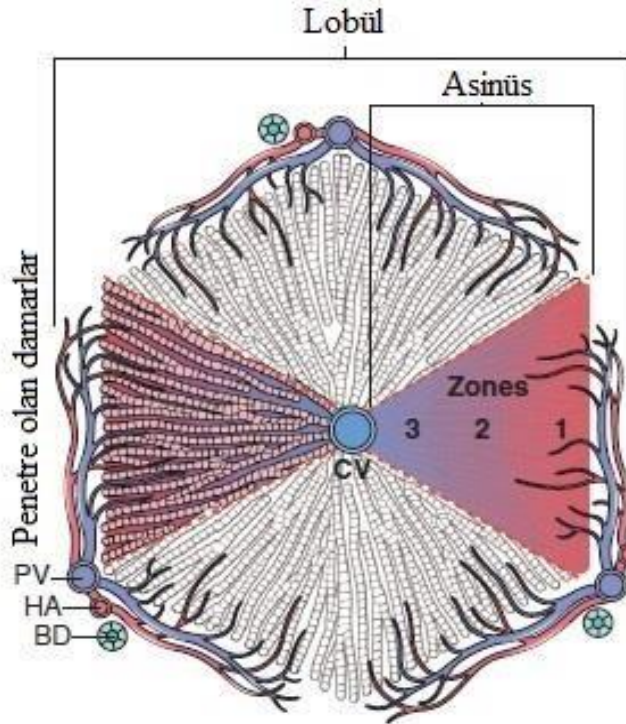
Şekil 6: Portal venin anatomisi (87).



Şekil 7: Portal venin dallanması (87).

Karaciğerin hepatik venleri, sağ, orta (middle) ve sol hepatik venler olmak üzere, oblik bir seyir izleyerek suprahepatik olarak İVK' ya ve sağ atriuma döner. Karaciğer alt yüzünden de tıpkı kaudat lob gibi direkt İVK'ya drene olan ayrı, kısa, küçük hepatik venler bulunmaktadır (87). Karaciğerin lenfatik drenajının %80'lik kısmını portal olmak üzere, sublobar ve yüzeyel lenfatikler ile olmaktadır (90).

Genel olarak lobuler model üzerinden yapılan karaciğerin mikroanatomik tarifinde (Şekil 8), lobüller 1-2 mm çapında, hekzagonal yapıda çevresi portal triad ile sınırlı, merkezinde hepatik venin terminal dalının bulunduğu alan olarak tanımlanmıştır (91,92).



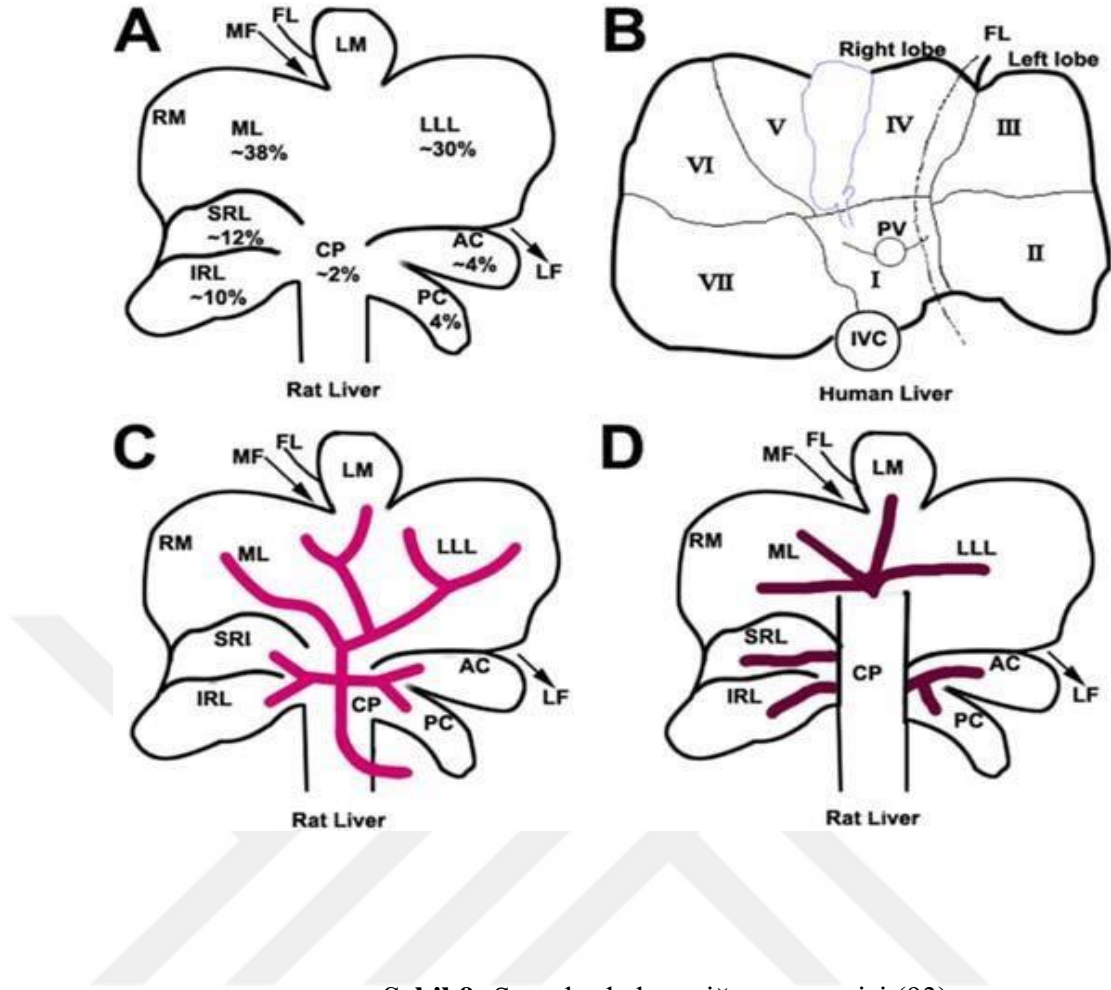
Şekil 8: Hepatik mikroanatomik ve zonlar (92).

Karaciğer enzimlerinin serum düzeyi ve bazı parametreler karaciğerin; hasar durumunu, sentez durumunu ve fonksiyonu hakkında bizlere bilgi verebilir (Tablo 2). Başlıcalarından hepatosellüler hasar hakkında fikir veren KCFT, sentez fonksiyonu gösteren albümine ve protrombin zamanıdır (87).

Karaciğer hastalıklarında laboratuvar değerlendirme	
Test Kategorisi	Kan Ölçümü
Hepatosit bütünlüğü	Sitozolik hepatosellüler enzimler Serum aspartat aminotransferaz (AST) Serum alanin aminotransferaz (ALT) Serum laktat dehidrojenaz (LDH)
Biliyer salgı fonksiyonu	Safrada normalde salgılanan maddeler Serum bilirubin Total: konjuge ve unkonjuge Direkt: sadece konjuge İdrar bilirubini Serum safra asitleri Plazma membran enzimleri (safra kanalikül hasarında) Serum alkalın fosfataz (ALP) Serum gama-glutamil transpeptidaz (GGT)
Hepatosit fonksiyonu	Kana salgılanan proteinler Serum albümin Protrombin zamanı (PT) Parsiyel tromboplastin zamanı (PTT) Hepatosit metabolizması Serum amonyak Aminopirin solunum testi (hepatik demetilasyon)

Tablo 2: Karaciğer hastalıklarında laboratuvar parametreleri (92).

Diğer memeliler gibi multilobüle yapıda olan sıçan karaciğerleri dört ana lobdan oluşur ve insanlardaki gibi portal beslenmeye göre adlandırılır (Şekil 9) ve tıpkı insanlardaki gibi vasküler varyasyonlar içerir ancak bilier kese yoktur (93).



Şekil 9: Sıçanlarda karaciğer anatomisi (93).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Dicle Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu (DÜHADEK)'nda 24/02/2022 tarih ve 1 sayılı karar ile etik yönden uygun bulunarak 2021/38 protokol numarasıyla yapılmıştır.

Çalışmada Dicle Üniversitesi Sabahattin Payzın Araştırma Merkezi'nden temin edilen (DÜSAM) 8-10 haftalık, 320-400 gramlık, 28 tane Wistar Albino türü dişi ratlar kullanıldı. Çalışmanın deneysel bölümü DÜSAM hayvan bakım merkezinde; histolojik doku takipleri ve analizler Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve

Embriyoloji Araştırma Laboratuvarında, biyokimyasal incelemeler ise Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Biyokimya Laboratuvarında yapıldı.

3.1. Kadmiyum'un Uygulanması

Kadmiyum klorür ($\text{CdCl}_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}$) (Türkiye, İstanbul), 15 mg/kg doz ile gavaj yardımıyla tek doz olarak oral (p.o.) verildi (94).

3.2. Borik Asit'in Uygulanması

Borik asit (Türkiye, Bursa) satın alınarak günlük 200 mg/ kg doz ile 7 gün süreyle intraperitoneal (i.p.) verildi. Uygulanan borik asit dozunun ölümcül veya toksik olmadığı bilinmektedir. Ayrıca oral, subkutan ve intravenöz olarak uygulanabilmektedir (95-97).

3.3. Deney Hayvanları Gruplarının Oluşturulması ve Deney Protokolü

Çalışma, ortalama 8-10 haftalık, yukarıda özellikleri belirtilen sıçanlar üzerinde yapıldı. Paslanmaz çelik kafeslerde 22 ± 2 °C de, % 50 nemli ortamda onikişer saatlik günışığı-karanlık döngüsünde normal diyet ile herhangi bir hareket kısıtlaması yapılmaksızın ad libitum beslendi. Yemler; çelik kaplarda, suları ise; cam biberonlarda çeşme suyu olarak verildi. Ratlar havalandırılmalı ve özel kafeslerde 7'li gruplar halinde 4 grup olarak ayrıldı. Davranışsal değişiklikleri, fiziksel görünüşleri günlük olarak gözlemlenip kaydedildi. Her bir sıçan ayrı ayrı tartılıp ağırlıkları belirlenerek, literatürlere uygun hesaplanan ilaç dozları uygulandı.

Grup 1 (n=7): Kontrol grubu, haliyle takip edilip işleme tabi tutulmadı. Deneyin 7. gününde hayvanlar ekzanguinasyon ile sakrifiye edilip, karaciğer dokusu ve kan örnekleri inceleme amacıyla alındı.

Grup 2 (n=7): Kadmiyum (Cd) grubu olup, deneyin ilk günü tek doz Cd 15 mg/kg'dan gavajla oral verildi. Deneyin 7. gününe kadar başka hiçbir ilaç verilmeden beklenildi ve deney sonunda ratlar ekzanguinasyon ile sakrifiye edilip, kalpten alınan kan örnekleri ve karaciğer doku örnekleme yapıldı.

Grup3 (n=7): BA grubu olup, borik asit günlük 200 mg/kg doz ile i.p. olarak 7 gün süreyle yapıldı. Bu s renin sonunda hayvanlar ekzanguinasyon ile sakrifiye edilip, kalpten alınan kan örnekleri ve karaciğer dokusu inceleme amacıyla alındı.

Grup 4 (n=7): Kadmiyum + Borik asit grubu (Cd+BA) olup, Cd 15 mg/ kg p.o. gavajla tek doz olarak verilip, hemen arkasından tedavi amaçlı BA ba landı. Borik asitte 7 gün süreyle günlük 200 mg/kg doz ile i.p. verildi. Deneyin 7. gününde hayvanlar ekzanguinasyon ile sakrifiye edilip, karaciğer dokusu ve kan örnekleri alındı. Oluşan atıklar, tıbbi atık protokolüne uygun toplanarak imha edildi.

 ntrakardiyak olarak alınan kan  rnekleri EDTA'lı tüplere aktararak, 3000 rpm hızda 10 dakika (dk) santrifüj edildi. Elde edilen serum kısımları iki ependorf tüpüne ayrıldı. Tüplerden birinden ELİSA kitler çalıştırılarak Toplam Antioksidan Kapasitesi (TAS), Toplam Oksidan Kapasitesi (TOS) ve Malondialdehit (MDA) düzeylerine bakıldı.  kinci ependorf tüpünden ise karaciğer fonksiyon testleri olan Aspartat aminotransferaz (AST), Alanin aminotransferaz (ALT) ve Laktat dehidrogenaz (LDH) düzeylerine bakıldı. Çıkarılan karaciğer dokuları ise % 10 tamponlanmış formaldehit solüsyonuna alınarak histoloji laboratuvarına gönderildi.

3.4. Rutin Histolojik Takip

Sakrifikasyon sonrası alınan karaciğer dokuları %10 formalin içerisinde 24 saat fikse edildikten sonra, dokular uygun boyutlara getirilerek k   t ld  ve 24 saat daha fikse edildi. Fiksasyon sonrası 12 saat akar sudan geçirildikten sonra dehidrasyon için artan alkol serilerinden geçirildi (Tablo 3).

Tablo-3. Histolojik takibinin aşamaları

Sıra	��lem	S�resi
1	% 70 'lık Alkol	120 dk
2	% 80 'lık Alkol	90 dk
3	% 96 'lık Alkol I	30 dk
4	% 96 'lık Alkol II	30 dk

5	% 100 'lük Alkol I	30 dk
6	% 100 'lük Alkol II	30 dk
7	Alkol + Xylol	15 dk
8	Xylene I	25 dk
9	Xylene II	25 dk
10	Yumuşak parafin + Xylene	45 dk
11	Yumuşak parafin	60 dk
12	Yumuşak parafin – Sert parafin	90 dk
13	Sert Parafin	180 dk
14	Gömme	

3.5. Histokimyasal Metodlar

Pozitif şarjlı lamlara alınan doku örneklerine boyama öncesi 1 saat 58°C'deki etüvde parafin depolimerizasyonu sağlanmıştır. Etüvden alınan kesitlere, histolojik değerlendirme için Hematoksilen & Eozin (H&E), bazal membran değişiklikleri için Periyodik asit Schiff (PAS) boyama protokolleri uygulandı.

Hasar skorlaması olarak Camargo ve ark.'nın tanımladığı skala kullanıldı (98). Bu sıralı skalaya göre karaciğer hasarı 5 alt gruba ayrıldı;

- **Grade 0:** Minimal hasar veya hasar yok.
- **Grade 1:** Piknozis ve stoplazmik vakuoller; az miktar hasar.
- **Grade 2:** Nekroz olmadan şişen hepatositler, düzensizleşen interselüler sınırlar, sinüzoidlerin konjesyonu ve genişlemesi; orta miktarda hasar.
- **Grade 3:** Nekroz gelişimi, hipereozinofilik sitoplazma, sinüzoidlerde artmış konjesyon ve genişleme; orta veya şiddetli hasar.
- **Grade 4:** Nekroz gelişimi, kanamalı ve parçalanmış hepatik kordlar, bozulmuş doku bütünlüğü; şiddetli hasar.

3.5.1. Hematoksilen& Eozin (H&E) Boyama Protokolü

Kalınlığı 5 µm olan kesitler Xylolde 20 dakikalık aralarla iki defa geçirilerek parafinden arındırıldı. Ardından azalan alkol serilerinin her birinde (%100, %100, %96, %90, %80, %70) 5 dakika geçirilerek distile suya kadar getirildi. Çekirdek boyaması için Harris Hematoksilen solüsyonunda 6 dakika boyunca bekletildi. Çeşme suyunda 5 dakika kadar yıkanan kesitler %1 alkolik Eozin de 3 dakika boyunca boyandı. Boya fazlasından arındırılıp temizlendikten sonra artan alkol serilerinden (%70, %80, %90, %96, %100) geçirildi. Tekrar Xylolde 20 dakikalık aralarla iki defa bekletilerek şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi ve Entellan ile kapatıldı. Işık mikroskobu altında incelendi.

3.5.2. Periyodik Asit Schiff (PAS) Boyama Protokolü

Kalınlığı 5 µm olan kesitler Xylolde 20 dakikalık aralarla iki defa geçirilerek parafinden arındırıldı. Ardından azalan alkol serileriyle beşer dakika bekletilerek distile suya kadar getirildi. Kesitler PAS (BioOptica) kit prosedürü takip edilerek boyandı. Kesitlerin üzerini örtecek kadar A solüsyonundan dökülerek 10 dakika bekletildi ve ardından distile suya alındı. Daha sonra B solüsyonundan damlatılarak 20 dakika beklendi. Kesitler distile suda yıkandıktan sonra C solüsyonu damlatılıp 2 dakika beklenildi ve V solüsyonu dökülerek yıkamadan D solüsyonu da damlatılıp 2 dakika bekletildi ve distile suyla çalkalandı. Son olarak E solüsyonu damlatılıp 3 dakika daha beklendikten sonra akar suya alındı ve 5 dakika akar suda takip edildi. Kesitler artan alkol serilerinden geçirilip, 2x15 dakika xylol serilerinden geçirilerek şeffaflaştırıldı ve entellan ile kapatıldı.

3.6. İmmunohistokimyasal Metodlar

Rutin histolojik doku takibi sonrasında karaciğerden alınan kesitler APAF-1 ve TNF-α antikorları ile boyandı.

3.6.1.Tümör Nekrotizan Faktör- α (TNF- α) İmmunohistokimyası

1. Kalınlığı 5 μ m olan kesitler pozitif şarjlı lamlara alındı.
2. Xylolde 2x15 dakika bekletilerek deparafinize edildi.
3. Daha sonra xylolden temizleme işlemi ve dehidrasyon için azalan alkol serilerinin her birinde 5 dakika bekletilip distile suya kadar getirildi.
4. Kesitler, antiijen retrieval işlemi için etilen daimin tetraasetik asit (EDTA) solüsyonuna alındı ve mikrodalga fırında 3x6 dakika ısıtıldı.
5. Kesitler mikrodalga fırından alınarak 15 dakika oda sıcaklığında soğuma işlemine alındı.
6. Kesitler 3x5 dk tamponlanmış fosfat salin (PBS) çözeltisi içine alınarak yıkama işlemi gerçekleştirildi.
7. Yıkama işlemi sırasında kesitlerin kurumaması için immunohistokimya barı hazırlanıp nemli bir ortam sağlandı. Ardından hidrofobik kalem ile kesitlerdeki dokular çizilip bara dizildi.
8. Kesitlerin üzerine metanol ile hazırlanmış %3' lük hidrojen peroksit damlatılarak 20 dakika süreyle endojen peroksit blokajı gerçekleştirildi.
9. Kesitler PBS'e alınarak 3x5 dakika süreyle yıkandı.
10. Kesitlere Ultra V Block solusyonunda (Thermo) damlatılarak 7 dakika boyunca inkübe edildi. Ardından Blocking solüsyonu kesitlerden uzaklaştırıldı.
11. Yıkama işleminden geçirilmeden örnekler antibody diluent ile 1/250 oranında dilüe edilen primer antikör TNF- α (Santa Cruz) ile +4 °C'de gece boyunca inkübasyona bırakıldı.
12. Ertesi gün kesitler oda ısısında (28 °C) 1 saat ek inkübasyona tabi tutuldu. Daha sonra kesitler PBS ile 3x5 dakika yıkandı.
13. Anti rabbit sekonder antikör ile kesitler (Thermo) 30 dakika süreyle inkübe edildi.
14. Sekonder antikörden alınan kesitler PBS ile 3x5 dakika süreyle yıkandı.
15. Kesitler streptavidin peroksidaz (Thermo) yardımıyla oda ısısında 30 dk boyunca enzimi bağlamak amacıyla inkübasyona tabi tutuldu.
16. Streptavidin peroksidaz inkübasyonu sonrası PBS ile 3x5 dk yıkandı.
17. Kesitler 3,3'diaminobenzidine (DAB) kromojen (Thermo) ile reaksiyona tabi tutuldu.

18. Reaksiyonun gözlemlendiği ve spesifik tutunumun izlendiği mikroskopik incelemede kesitler PBS'e alınarak reaksiyon sonlandırıldı.
19. Kesitler 40 saniye süreyle Mayer Hematoksilen ile zıt boyamaya yapıldı.
20. Çeşme suyunda 5 dakika kadar yıkama işlemi gerçekleştirildi.
21. Kesitler beşer dakikalık artmış alkol serilerinde bekletildi.
22. Kesitler Xylol'de 2x15 dakika bekletilerek şeffaflandırma işlemi gerçekleştirildi.
23. Ardından entellanla kapatılan kesitler ve kurumaya bırakılmış oda ısısındaki kesitler sonrasında analiz amacıyla üstü kapatılmış lam kutularında saklandı.

3.6.2. APAF-1 İmmunohistokimyası

1. Pozitif şarjlı lamlara alınan 5 µm lik kesitler Xylolde 2x15 dakika bekletilerek deparafinize edildi.
2. Kesitler xylolden temizleme işlemi ve rehidrasyon için azalan alkol serilerinin her birinde 5 dakika bekletilip distile suya getirildi.
3. Kesitler, 6.0 ph a sahip sitrik asit tamponu (2100 mg sitrik asit+ 0,9 l distile sudan oluşan) içine antijen retrieval işlemi için alınarak 750 watt'lık mikrodalga fırında 10 dk boyunca bekletildi.
4. Kesitler mikrodalga fırından alınarak 20 dakika oda sıcaklığında soğuma işlemine alındı.
5. Kesitler 3x5 dakika tamponlanmış fosfat salin (PBS) çözeltisi içine alınarak yıkama işlemi gerçekleştirildi.
6. Yıkama işlemi sırasında kesitlerin kurumaması için immunohistokimya barı hazırlanıp nemli bir ortam sağlandı. Ardından hidrofobik kalem ile kesitlerdeki dokular çizilip bara dizildi.
7. Kesitlerin üzerine metanol ile hazırlanmış %3' lük hidrojen peroksit damlatılarak 25 dakika süreyle endojen peroksit blokajı gerçekleştirildi
8. Kesitler PBS'e alınarak 3x5 dakika süreyle yıkandı
9. Kesitlere Ultra V Blocksolusyonunda (Thermo) damlatılarak 7 dakika boyunca inkübe edildi. Ardından Blocking solüsyonu kesitlerden uzaklaştırıldı.
10. Örnekler yıkamaya alınmadan antibodydiluent (Thermo) ile 1/100 oranında dilüe edilen APAF-1 antikoru (Santa Cruz) ile +4 °C'de gece boyu inkübe edildi.
11. Ertesi gün kesitler oda ısısında (28 °C) 1 saat ek inkübasyona tabi tutuldu.
12. Daha sonra kesitler PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

13. Kesitler biyotinli rabbit sekonder antikoru ile 1 saat oda ısısında inkübe edildi.
14. Sekonder antikordan alınan kesitler PBS ile 3x5 dakika süreyle yıkandı.
15. Kesitler streptavidin peroksidaz yardımıyla oda ısısında 40 dakika boyunca enzimi bağlamak amacıyla inkübasyona tabi tutuldu.
16. Streptavidin peroksidaz inkübasyonu sonrası PBS ile 3x5 dakika yıkandı.
17. Kesitler 3,3'diaminobenzidine (DAB) kromojen ile reaksiyona tabi tutuldu.
18. Reaksiyonun gözlendiği ve spesifik tutunumun izlendiği mikroskopik incelemede kesitler PBS'e alınarak reaksiyon sonlandırıldı.
19. Kesitler 40 saniye süreyle Mayer Hematoksilen ile zıt boyamaya yapıldı.
20. Çeşme suyunda 5 dakika kadar yıkanan kesitler beşer dakikalık artmış alkol serilerinde bekletildi.
21. Kesitler Xylol'de 2x10 dakika bekletilerek şeffaflandırma işlemi gerçekleştirildi.
22. Ardından entellanla kapatılan kesitler ve kurumaya bırakılmış oda ısısındaki kesitler sonrasında analiz amacıyla üstü kapatılmış lam kutularında saklandı.

İmmunohistokimyasal incelemelerde oluşan karaciğer dokusu hasarı Histoskorlama ile skorlanıp, oluşan hasarın derecesi belirlendi.

İmmünreaktivitenin yaygınlığı; **0.1:** <%25, **0.4:** %26-50, **0.6:** %51-75, **0.9:** %76-100.

İmmünreaktivitenin şiddeti; **0:** yok, **+0.5 :** çok az, **+1 :** az, **+2:** orta, **+3 :** şiddetli olarak belirlendi.

Histoskor = Yaygınlık ile şiddetin çarpımı ile belirlendi (99).

3.7.Total Antioksidan Kapasitesi (TAS)

Bu metod serbest radikaller karşısında canlının antioksidan marjını ölçer. Bu çalışmada tüm gruplardaki ratlardan alınan venöz kan örnekleri EDTA'lı tüplere alınarak, 3000/dak devirde 10 dakika boyunca +4°C'de santrifüjlendi. Ayrılmış plazma örnekleri -80°C'de çalışma zamanına dek bekletildi. Serum örnekleri ve kitler de çalışma öncesi oda sıcaklığına gelene kadar bekletildi. Örneklerde TAS $\mu\text{mol/L}$ miktarları Rel Assay Diagnostic Türkiye kitiyle çalışıldı. TAS $\mu\text{mol/L}$

(mikromolar/litre) ölçü birimi olarak $\mu\text{mol/L}$ ve okuma cihazı olarak Beckman Coulter marka AU5800 model cihaz kullanıldı. Geliştirilmesi Erel aracılığıyla yapılmış tam otomatik metod kullanıldı (100).

3.8.Total Oksidan Kapasitesi (TOS)

Bu çalışmada tüm gruplardaki ratlardan alınan venöz kan örnekleri EDTA'lı tüplere alınarak, 3000/dak devirde 10 dakika boyunca $+4^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüjlendi. Ayrılmış plazma örnekleri -80°C 'de çalışma zamanına dek bekletildi. Çalışma başlamadan önce kitlerin ve serum örneklerinin oda ısısına ($+25^{\circ}\text{C}$) gelmesi bekledi. Örneklerde TOS miktarları Rel Assay Diagnostic Türkiye kitiyle çalışıldı. TOS'un ölçü birimi olarak mmol/L (milimolar/litre) ve okuma cihazı olarak Beckman Coulter marka AU5800 model cihaz kullanıldı. Geliştirilmesi Erel aracılığıyla yapılmış tam otomatik metod kullanıldı (101).

3.9. Oksidatif Stres İndeksinin (OSI) Ölçümü

Oksidatif Stres İndeksinin ölçümü, aşağıdaki formüle göre hesaplandı (102).

$$\text{OSI} = \text{TOS} (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ eqv/l}) / \text{TAS} (\text{mmol Trolox eqv/l}) \times 100.$$

3.10. Kan Serum Malondialdehit (MDA) Değerlerinin Ölçülmesi

İntrakardiyak alınan kan örnekleri 15 dakika boyunca 3000 rpm'de santrifüjlendi. Oluşan plazma farklı tüpe alınarak MDA analizi amacıyla -80°C de muhafaza edildi. MDA analizi yapılırken; 2.5 ml % 20'lik trikloroasetik asit (TCA) eklenmiş 0.5 ml plazma örneği vortexle karıştırıldı. Müteakiben, 1 ml % 0.6'lık tiyobarbitürik asit (TBA) eklenmiş örneğin 10 dakikalık vorteks ile karıştırılması sonrası yarım saatlik süreyle kaynamış suda tutuldu. Soğumuş karışımdaki absorbans miktarları, spektrofotometrede 532 nm olarak ölçüldü. Veriler seyreltme faktörleri ve ekstinksiyon katsayısı (1.56×10^5) ile işleme alınarak ($\mu\text{mol/l}$) olarak değerlendirildi.

3.11. Karaciğer Fonksiyon Testleri

Ayrılmış serum örneklerinde ALT, AST ve LDH düzeylerine bakıldı.

3.12. Morfolojik ve İstatistiksel Analiz

İstatistiği SPSS for Windows version 20 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA) programında yapılan veriler Shapiro Wilk testi ile değerlendirildi. Sonuca göre kriter olarak basıklık (kurtosis) ve çarpıklık (skewness) sonuçlarının -1,5 ve +1,5 arasında bulunması ve Shapiro-Wilk testinin $p > 0,05$ olması normal dağılım olarak baz alındı. Normal dağılım göstermeyen verilere ise Kruskal Wallis-H testi uygulandı. Anlamli çıkan değişkenler arasındaki farklılıkların tespiti için Mann Whitney-U testi yapıldı. Değerin $p < 0,05$ olması anlamlı olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

Karaciğer Enzimlerinin Analizi

AST değerlerinin istatistiksel analizinde Kruskal Wallis-H testi anlamlı olduğundan ($p = 0,07$), karşılaştırma için Mann Whitney-U testi yapıldı. Testin sonuçlarına baktığımızda Cd grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel farkın anlamlı olduğu ($p = 0,004$), Cd ile Cd+BA grubu ($p = 0,006$) arasındaki istatistiksel farkında anlamlı olduğu ve ortalamanın en yüksek ortalamanın Cd grubunda olduğu izlendi ($p < 0,05$, Tablo2, Şekil 12). Cd grubunun AST değeri 194.42 U/L olarak bulunurken, Cd+BA grubunda bu değer 110.57 U/L olarak izlendi (Tablo4, Şekil 10).

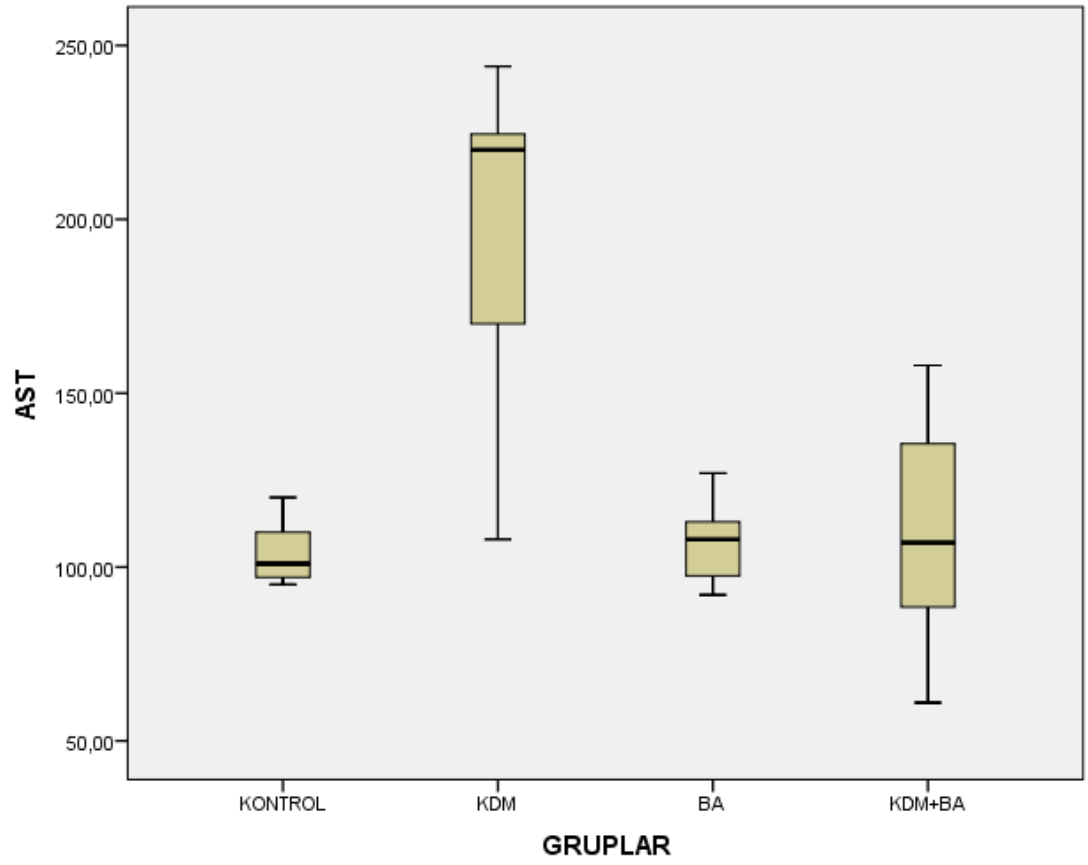
ALT değerlerinin istatistiksel analizinde Kruskal Wallis-H testi anlamlı olmadığından ($p = 0,258$) gruplar arası karşılaştırma yapılmadı ($p > 0,05$, Tablo4, Şekil 11).

LDH değerlerinin istatistiksel analizinde ise; Kruskal Wallis-H testi anlamlı bulundu ($p=0,01$). Mann Whitney-U testi sonuçlarına baktığımızda Cd grubunun LDH değeri kontrol grubundan daha yüksek olduğu görülürken ($p=0.002$), kontrol grubu ile BA ($p=0.949$) ve kontrol grubu ile Cd+BA ($p=0.064$) grubu arasında anlamlı fark olmadığı görüldü. Ayrıca Cd grubunun LDH değerleri Cd+BA grubundan anlamlı derecede yüksek izlendi ($p=0.003$). Cd grubunda LDH değeri 1355.85 U/L iken Cd+BA grubunda bu değer 543.00 U/L olarak görüldü (Tablo4, Şekil 12).

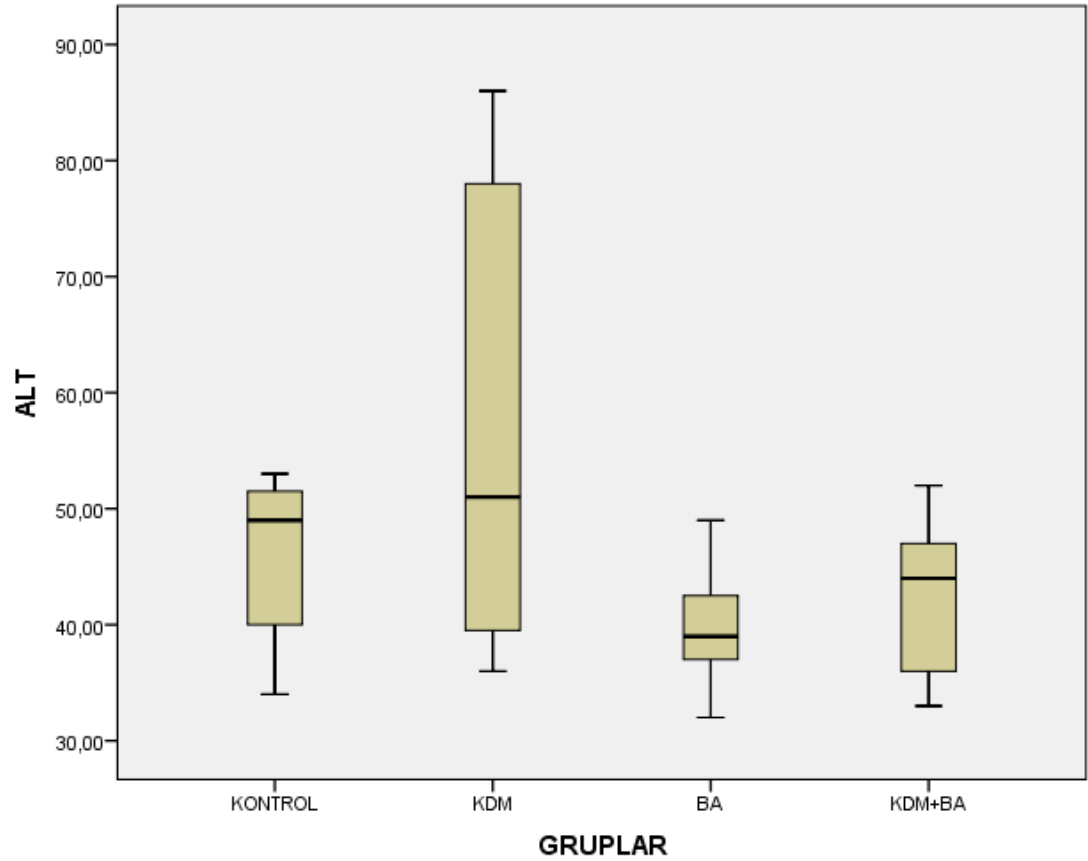
Tablo 4. Karaciğer Enzimleri (AST, ALT, LDH)'nin Ortalama± Standart Sapma Değerleri.

Gruplar	AST (U/L)	ALT (U/L)	LDH (U/L)
Kontrol	104.28±9.44 ^b	45.57±7.48 ^{AD}	393.57±131.58 ^b
Cd	194.42±47.66 ^{a,c,d}	58.28±21.63 ^{AD}	1355.85±377.75 ^{a,c,d}
BA	106.85±12.10 ^{a,b}	39.85±5.45 ^{AD}	429.71±229.60 ^b
Cd+BA	110.57±34.36 ^b	42.14±7.19 ^{AD}	543.00±116.89 ^b

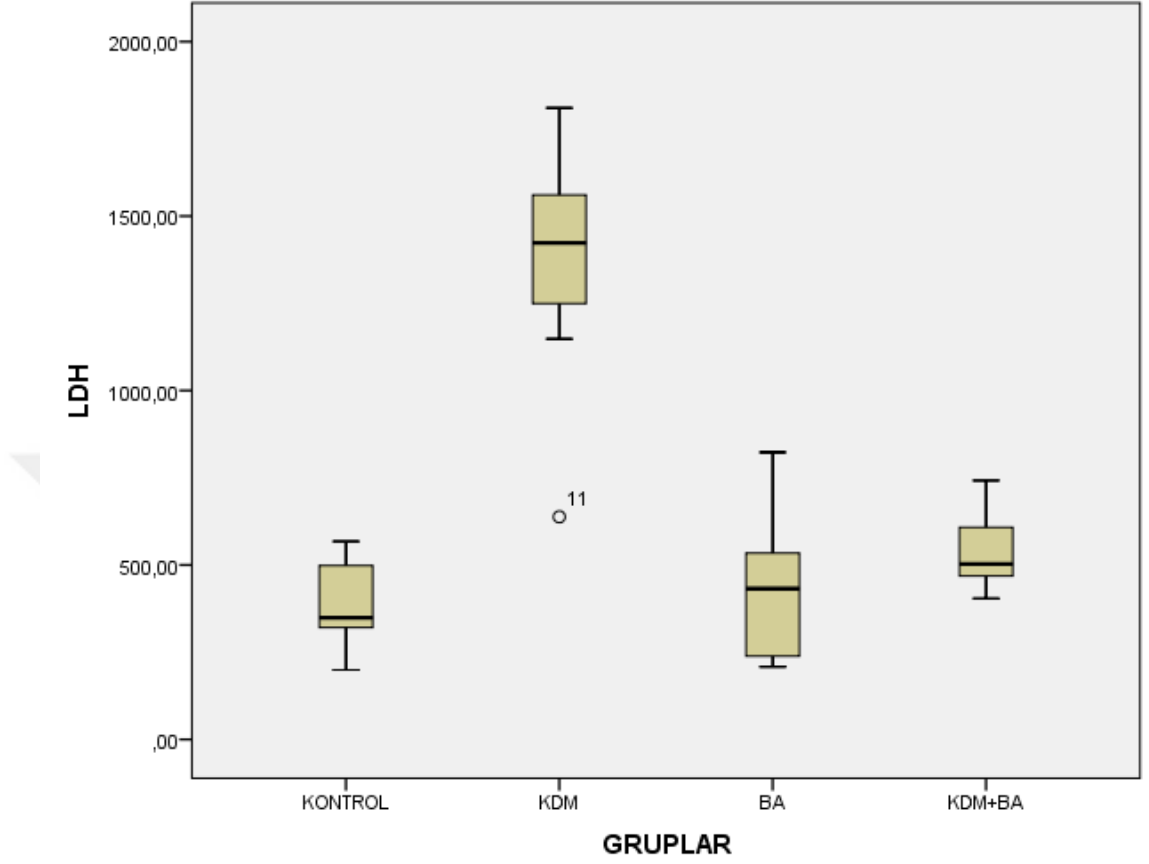
Cd; Kadmiyum grubu, BA; Borik asit grubu. AD; Anlamlı değil, a; Kontrol grubundan farklı, b; Cd grubundan farklı, c; BA grubundan farklı, d; Cd+BA grubundan farklı ($p<0.05$).



Şekil 10: İstatistiksel analizi yapılan AST değerlerinin ortalama analizi.



Şekil 11: İstatistiksel analizi yapılan ALT değerlerinin ortalama analizi.



Şekil 12: İstatistiksel analizi yapılan LDH değerlerinin ortalama analizi.

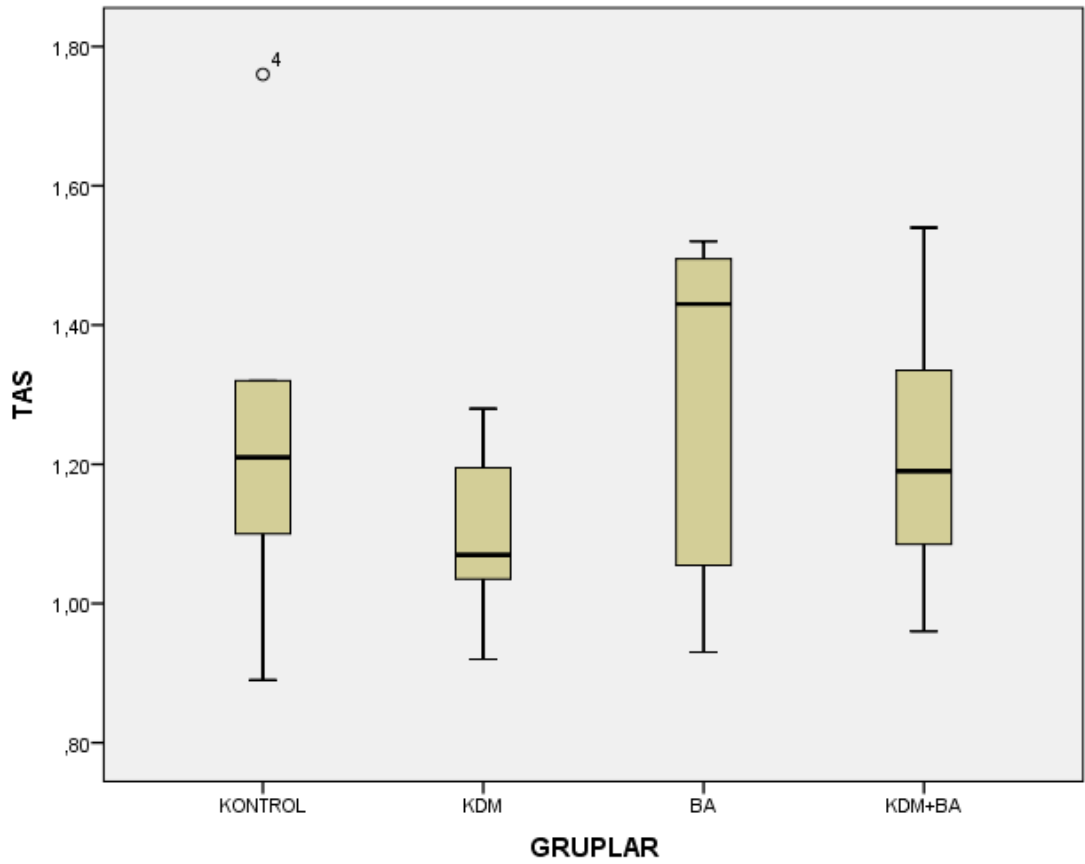
TAS ve TOS ve OSI Analizi

İstatistiksel analizi yapılan TAS değerlerinin normallik incelemesinde Shapiro Wilk testi normal dağılım gösterdi. Bunun sonucundan ANOVA testi yapıldı fakat testin sonucunda TAS değerlerinin istatistiği anlamlı bulunamadı ($p>0.05$, Şekil 13, Tablo 5).

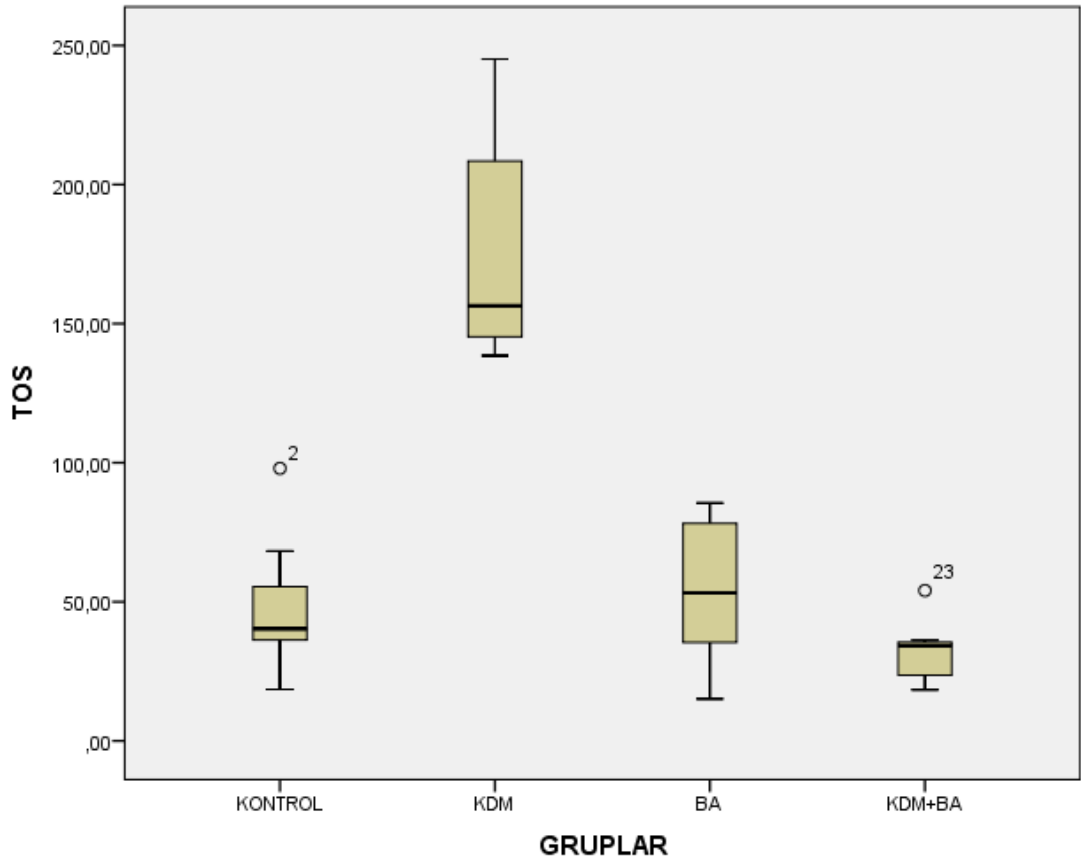
TOS değerlerine bakıldığında ise; TOS değerleri normal dağılım göstermediğinden Kruskal Wallis- H testi uygulandı ($p=0.001$). Gruplar arası karşılaştırmada ise; en yüksek ortalamanın Cd grubunda olduğu görülürken, Cd grubu ile Cd+BA grubu kıyaslandığında anlamlı fark gözlemlendi ($p=0.002$). Cd grubunun TOS değeri 178.21(mmol) iken Cd+BA grubunun TOS değeri 32.10

(mmol) olarak hesaplandı. Cd+BA grubu ile kontrol ve BA grubu kıyaslandığında ise anlamlı fark görülmedi ($p=0.142$, Şekil 14, Tablo 5).

OSI değerlerine bakıldığında ise; TOS: $TAS \times 100$ formülü baz alınarak hesaplandı. Bunun sonucunda ise; Kruskal Wallis-H testi ($p=0.001$) anlamlı olduğundan gruplar arası karşılaştırmada Cd grubu ile kontrol grubu, BA grubu ve Cd+BA grubu kıyaslandığında istatistiksel anlamlı fark gözlemlendi ($p=0.002$). Cd sonrası uygulamış olduğumuz BA, TAS değerlerine olumlu etki göstermese de OSI olumlu yönde etkilemişti. Cd grubunun OSI değeri iken Cd+BA grubunda ($p>0.05$, Tablo 5).



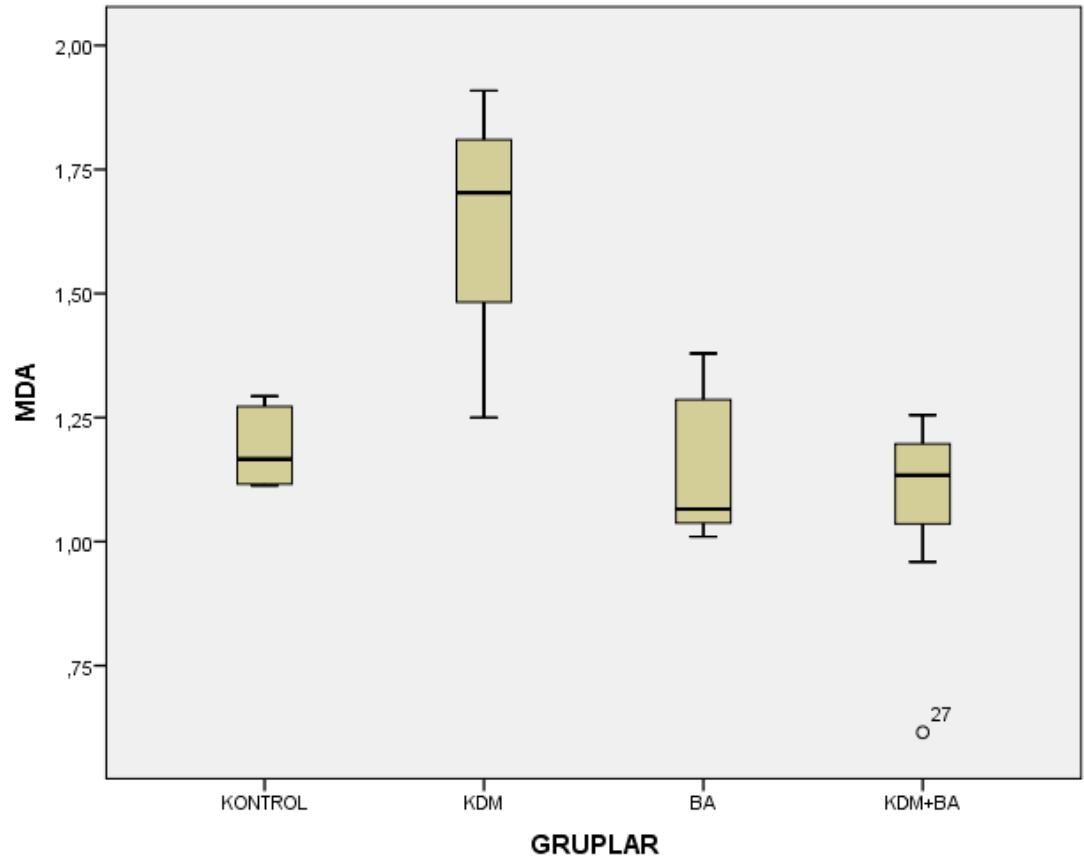
Şekil 13: İstatistiksel analizi yapılan TAS değerlerinin ortalama analizi.



Şekil 14: İstatistiksel analizi yapılan TOS değerlerinin ortalama analizi.

MDA Analizi

MDA değerlerinin istatistiksel analizinde; en yüksek ortalamanın 1.63 ile Cd grubunun sahip olduğu görülürken, diğer çalışılmış gruplara kıyasla aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu izlendi ($p < 0.05$). Kontrol grubu ile BA grubu arasındaki istatistiksel farkın ($p = 0.442$) olduğu ve yine kontrol grubu ile Cd+BA grubunun arasındaki istatistiksel farkın ise ($p = 0.565$) olduğu görüldü ($p > 0.05$, Tablo 5, Şekil 15). Cd grubunun MDA ortalaması Cd+BA grubundan anlamlı olarak daha yüksekti ($p < 0.05$). Cd sonrası uygulamış olduğumuz borik asit, ratların MDA değerlerine olumlu etki göstermişti.



Şekil 15: İstatistiksel analizi yapılan MDA değerlerinin ortalama analizi.

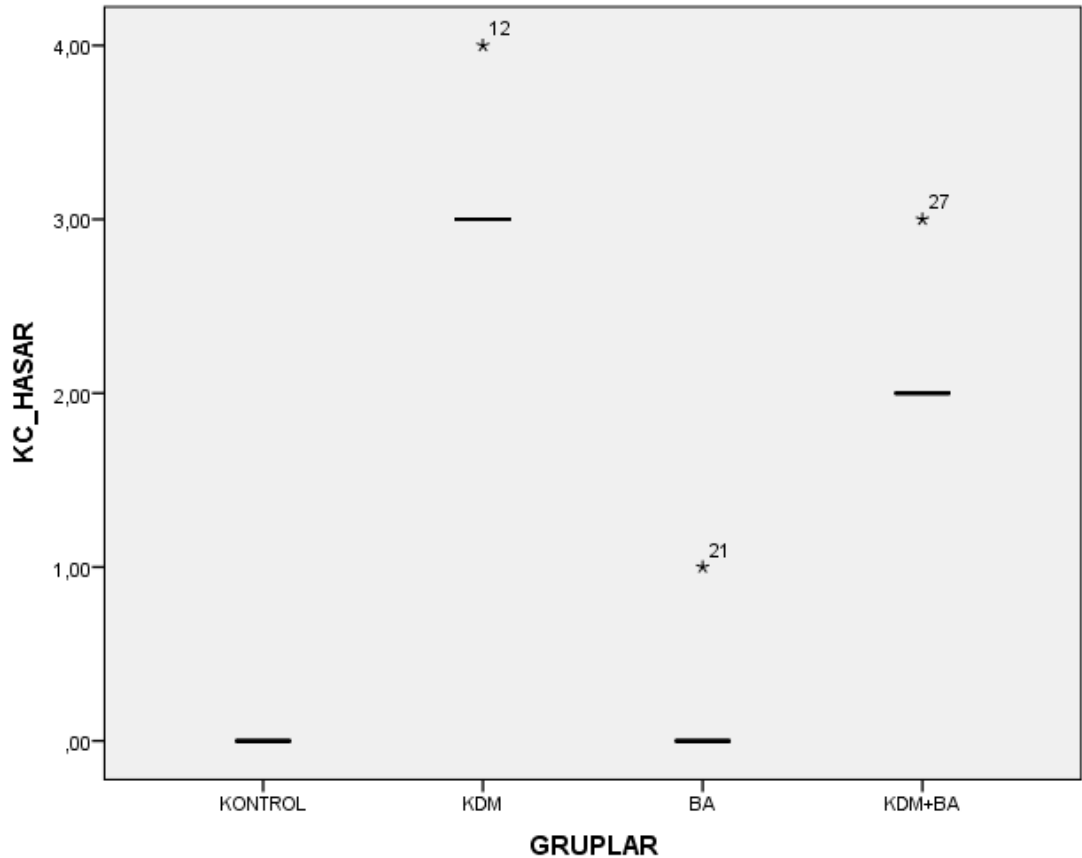
Tablo 5. TAS, TOS ve MDA Düzeylerinin Ortalama± Standart Sapma Değerleri.

Gruplar	TAS (µmol)	TOS (mmol)	OSI TOS (mmol)	MDA (µmol/l)
Kontrol	1.24±0.27 ^{AD}	48.63±26.34 ^b	3929.66±2058.89 ^b	1.19±0.08 ^b
Cd	1.10±0.12 ^{AD}	178.21±46.45 ^{a,c,d}	16436.02±5306.42 ^{a,c,d}	1.63±0.24 ^{a,c,d}
BA	1.28±0.25 ^{AD}	54.45±27.09 ^b	4224.44±2112.54 ^b	1.15±0.15 ^b
Cd+BA	1.21±0.21 ^{AD}	32.10±11.91 ^b	2654.42±905.59 ^b	1.06±0.22 ^b

TAS – Total antioksidan kapasitesi ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equivalent/L); TOS – Total oksidan kapasitesi (mmol Trolox equivalent/L); MDA; Malondialdehit ($\mu\text{mol/l}$), Cd; Kadmiyum grubu, BA; Borik asit grubu. AD; Anlamli değil, a; Kontrol grubundan farklı, b; Cd grubundan farklı, c; BA grubundan farklı, d; Cd+BA grubundan farklı ($p<0.05$).

Histopatolojik Değerlendirme

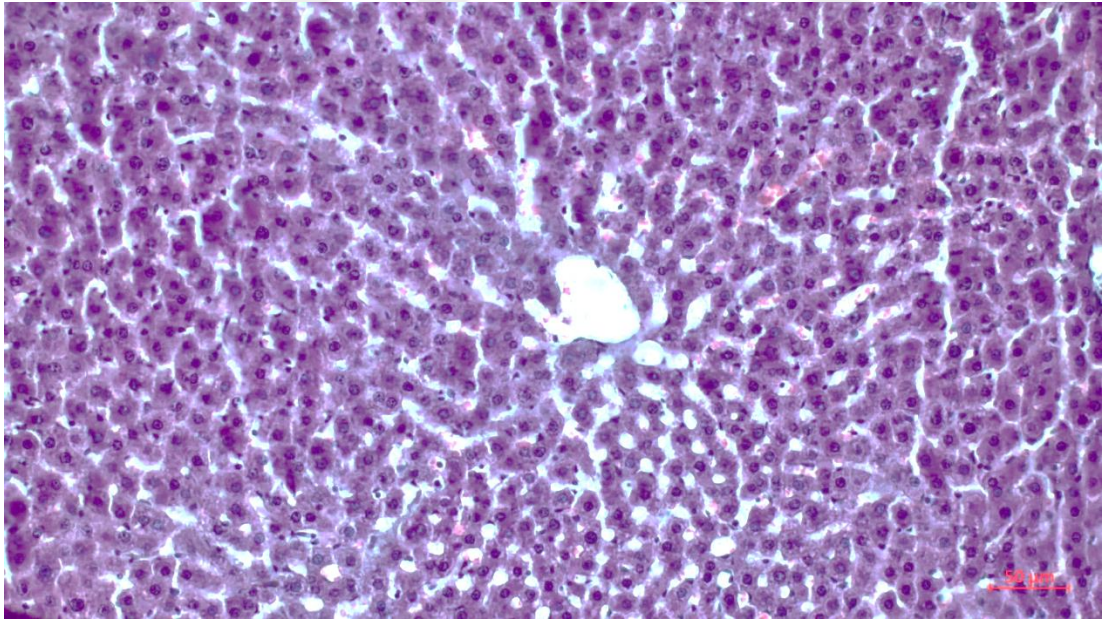
Karaciğer dokuları bütün gruplar için tek tek ışık mikroskobu altında incelendiğinde meydana gelen hasarın istatistiksel analizi sonucu; Kruskal Wallis- H testi anlamlı çıktığından kıyaslama için Mann Whitney- U testine geçildi ($p<0.05$). Bunun sonucunda Cd grubunun histopatolojik skorlamasının Cd+BA grubundan anlamlı derecede yüksek oluğu izlendi ($p=0.002$). Cd verilen grupta KC hasar skoru 3.14 iken Cd+BA brubunda 2.14 olup aralarındaki fark anlamlıydı ($p<0.05$). Cd+BA grubunun karaciğer hasar skorlaması ile kontrol ve BA grupları arasında anlmalı fark kıyaslanınca belirgin fark gözlenmedi ($p=0.001$) ($p>0.05$, Tablo 6, Şekil 16).



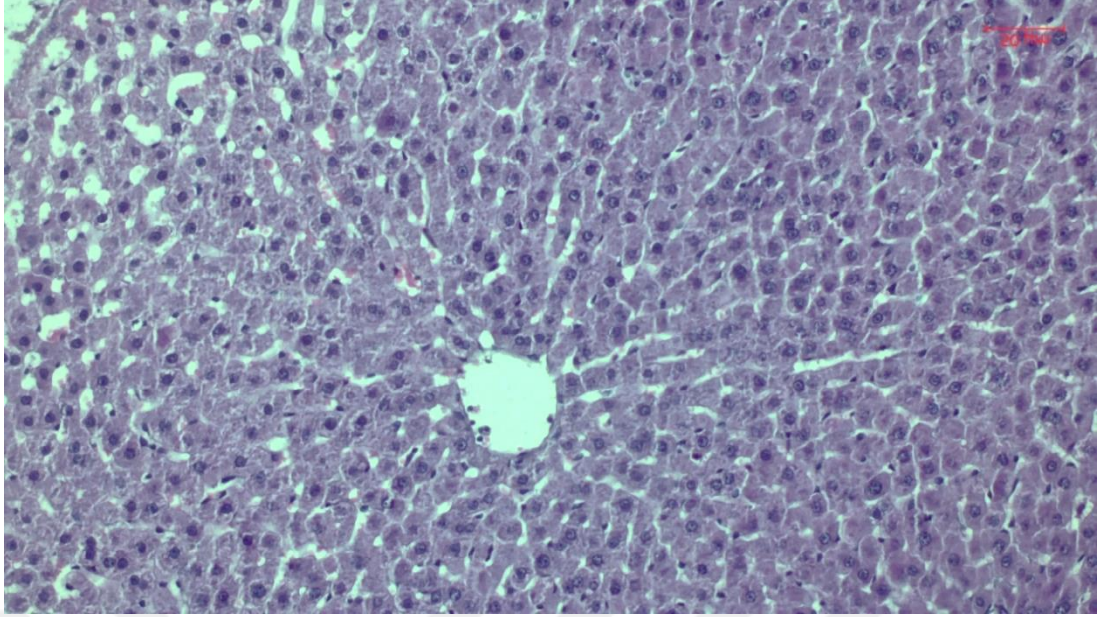
Şekil 16: İstatistiksel analizi yapılan karaciğer hasarı skorlamasının ortalama grafiği.

Karaciğer dokularının H&E boyamasının ardından yapılan mikroskopik incelemede; kontrol (Şekil 17) ve BA (Şekil 18) gruplarında karaciğer dokuları normal histolojik görünümde olduğu izlendi. Kontrol ve BA grupları ile kıyaslanınca Cd (Şekil 19) grubunun karaciğer dokularında hemoraji, konjesyon, mononükleer hücre infiltrasyonu, vena sentraliste dejenerasyon, hepatosit çekirdeklerinde piknozis, sinüzoidal aralıkta dilatasyon benzeri histopatolojik bulgular izlendi. Cd+BA (Şekil 20) grubunda ise oluşan patolojik değişikliklerin düzelmeye başladığı fakat konjesyonun devam ettiği, kontrol ve BA grubuna benzer görünümde bir hal almaya başladığı izlendi.

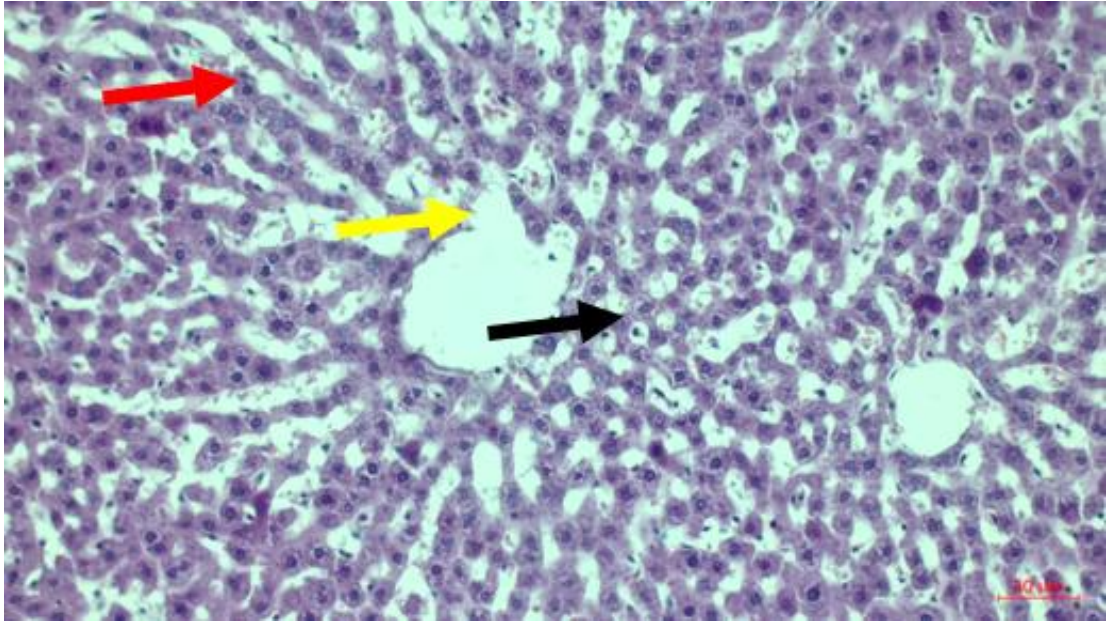
Karaciğer dokularının PAS boyamasının ışık mikroskopuyla değerlendirilmesi sonucunda; kontrol ve BA grubundaki glikojen yoğunluğu hemen hemen aynı iken (Şekil 21, 22), hepatosit glikojen yoğunluğu Cd grubunda diğer çalışma gruplarına kıyasla belirgin oranda azaldığı izlendi (Şekil 23). Cd+BA grubunda Cd grubuna kıyasla glikojen kaybı daha az izlendi (Şekil 24).



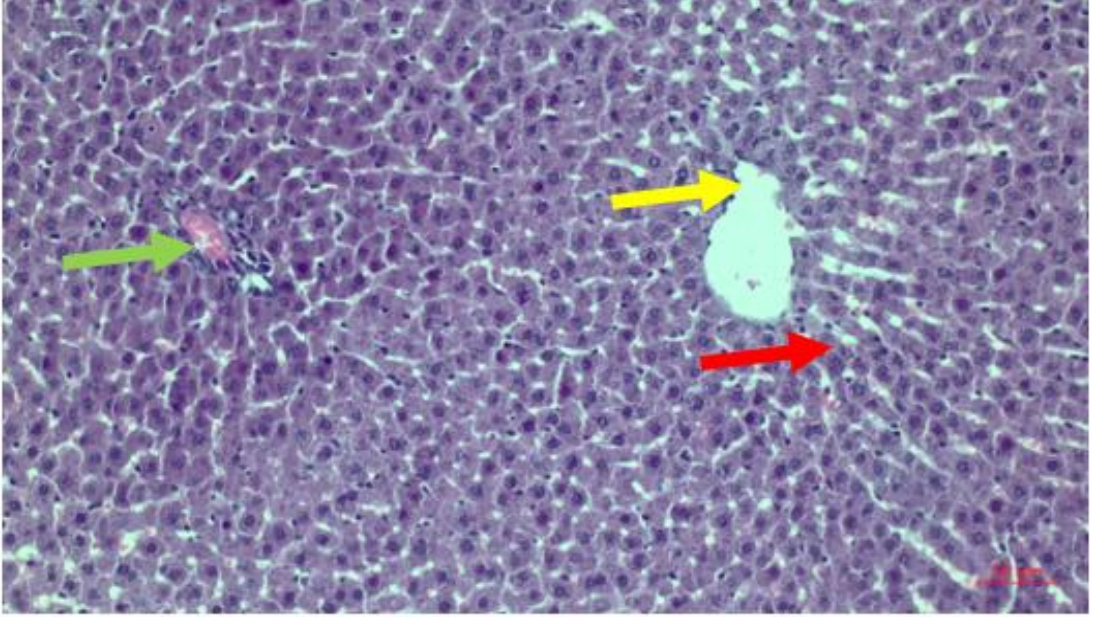
Şekil 17: Normal görünümde hepatik doku mikrografı (H&E, Bar 50 µm).



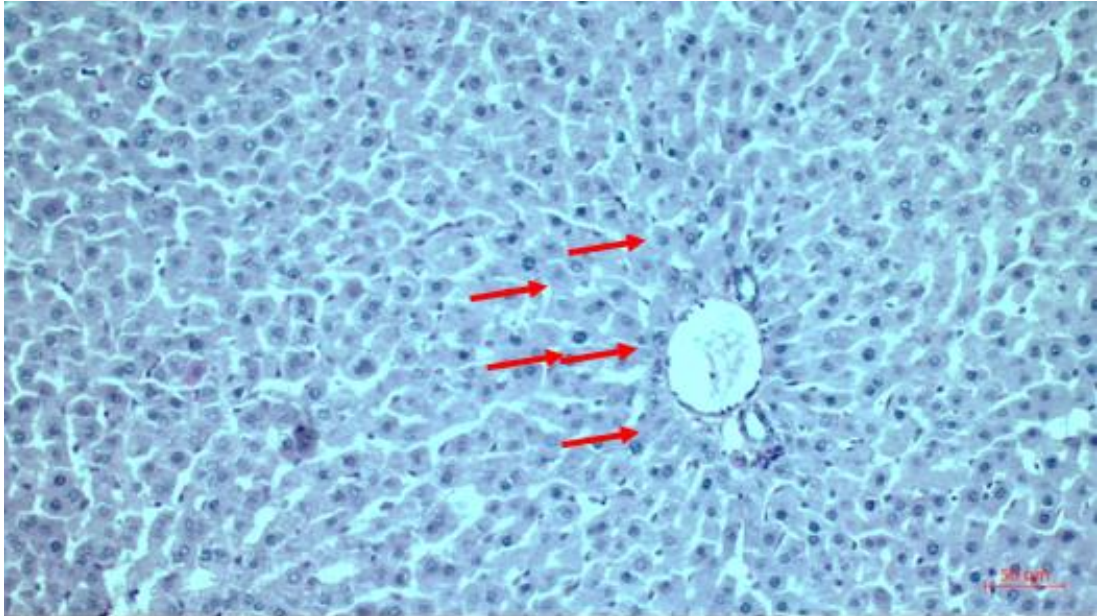
Şekil 18: BA grubuna ait karaciğer dokusu mikrografı. Kontrol grubu ile benzer, normal görünümde hepatik doku (H&E, Bar 50 µm).



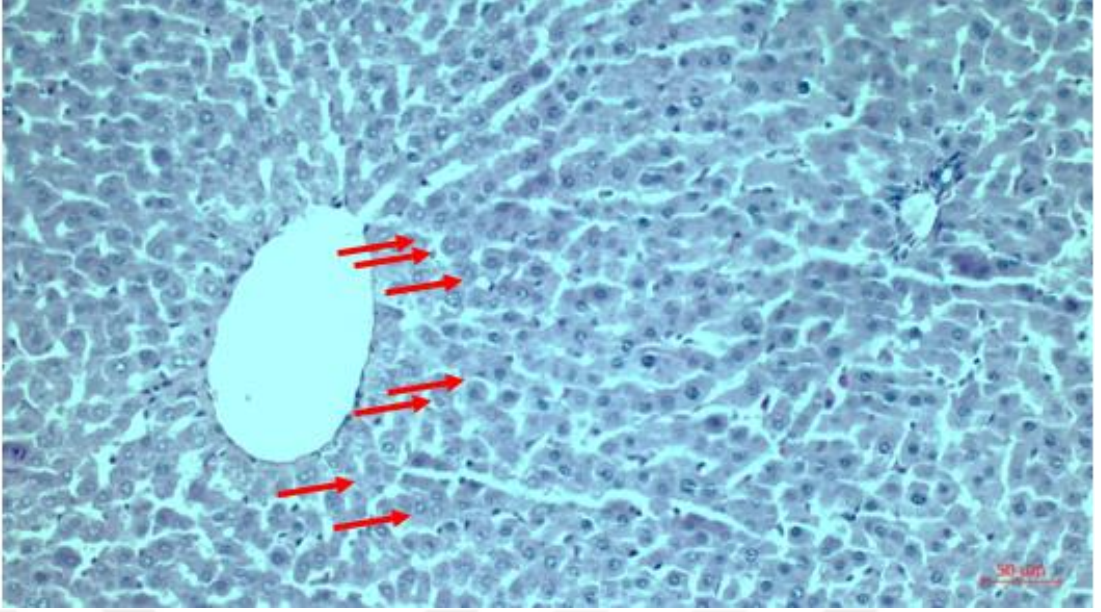
Şekil 19: Cd grubuna ait karaciğer dokusu mikrografı. Sinüzoidal dilatasyon (kırmızı ok), vena sentraliste dejenerasyon (sarı ok), hepatosit çekirdeklerinde piknozis (siyah ok) (H&E, Bar 50 µm).



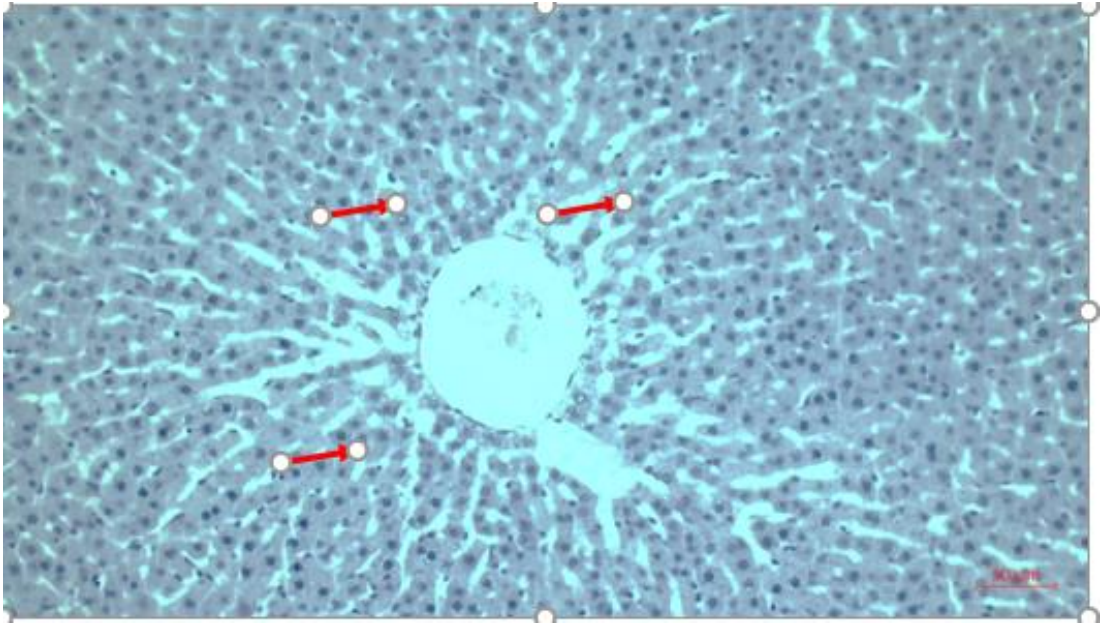
Şekil 20: Cd+BA grubuna ait karaciğer dokusu mikrografı. Konjesyonun devam ettiği (yeşil ok), vena sentralisteki dejenerasyonun rejenere olmaya başladığı (sarı ok), sinüzoidal dizilimdeki dilatasyonun iyileştiği ve normale yakın bir görünüm aldığı izlendi (kırmızı ok) (H&E, Bar 50 µm).



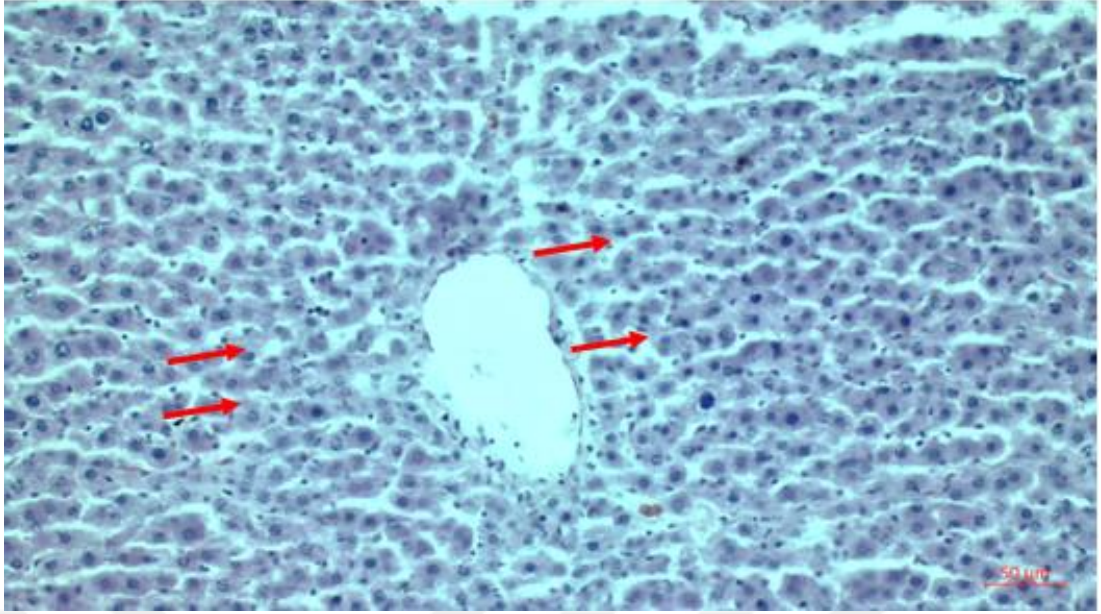
Şekil 21: Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu mikrografı. PAS pozitif (+) hepatositler, normal görünümlü glikojen yoğunluğu (kırmızı ok) (PAS, Bar: 100 µm).



Şekil 22: BA grubuna ait karaciğer dokusu mikrografı. PAS (+) hepatositler, kontrolle aynı yoğunlukta glikojen yoğunluğu (kırmızı ok) (PAS, Bar: 100 µm).



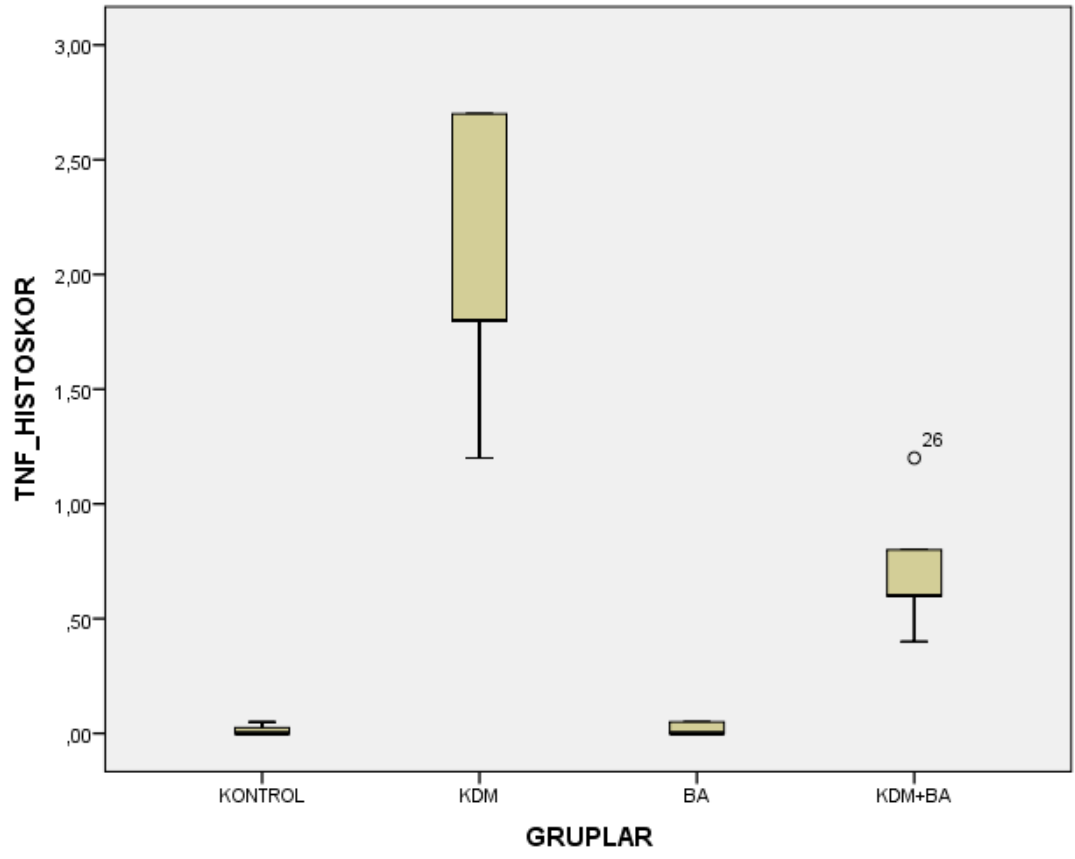
Şekil 23: Cd grubuna ait karaciğer dokusu mikrografı. Hepatositlerde glikojen kaybı (kırmızı ok) (PAS, Bar: 100 µm).



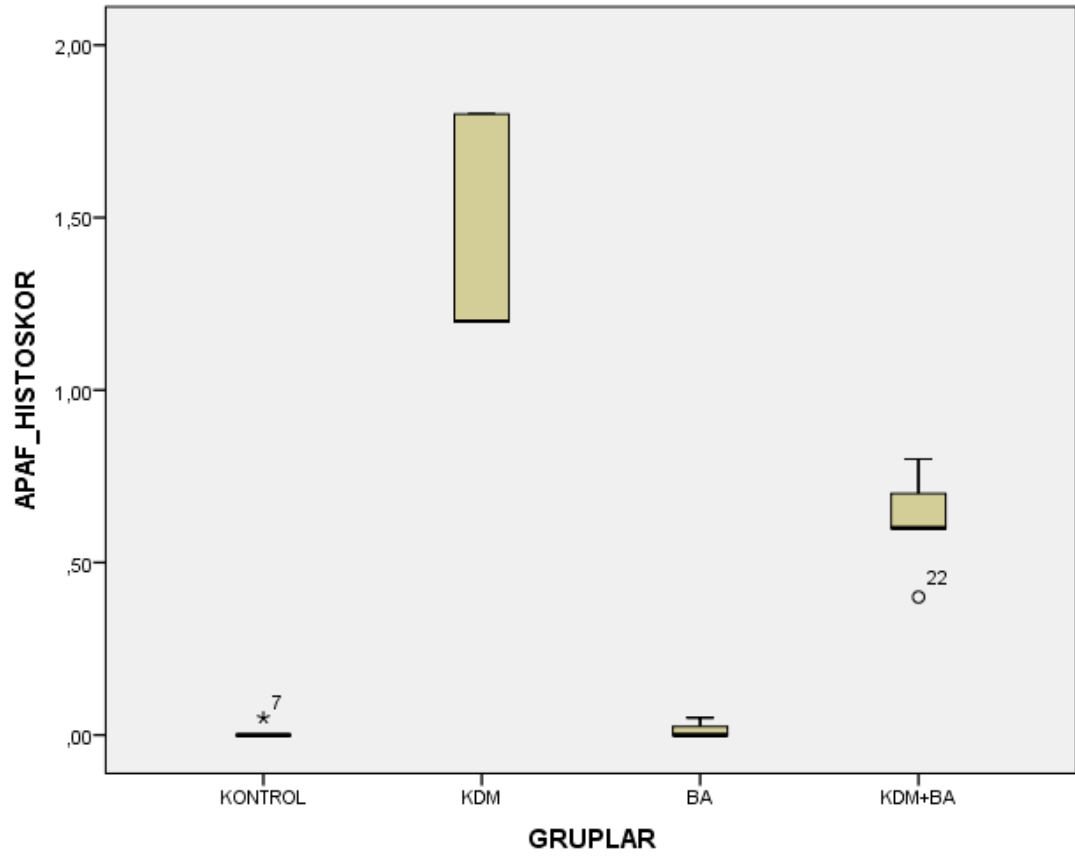
Şekil 24: Cd+BA grubuna ait karaciğer dokusu mikrografı. PAS (+) hepatositler (kırmızı ok) (PAS, Bar: 100 µm).

İmmunohistokimyasal Değerlendirme

Karaciğer dokusunda meydana gelen immünolojik değişiklikler histoskor olarak hesaplandığında; Kruskal Wallis- H testi anlamlı çıktığından Mann Whitney- U testine geçildi ($p<0.05$). Gruplar arası karşılaştırmada oluşan istatistiksel farklılıklar Tablo 6’ de özetlendi. En şiddetli hasarın Cd grubunda (hasar skoru; 3.14 ± 0.3) olduğu izlenirken, Cd+ BA grubunda oluşan hasarın (hasar skoru; 2.14 ± 0.3) yaygınlığı ve şiddeti ise Cd grubuyla kıyaslandığında anlamlı oranda düşük izlendi ($p=0.002$) (Tablo 6, Şekil 25 ve 26).



Şekil 25: İstatistiksel analizi yapılan karaciğer dokusu TNF- α pozitif immün reaktivitenin ortalama grafiği.



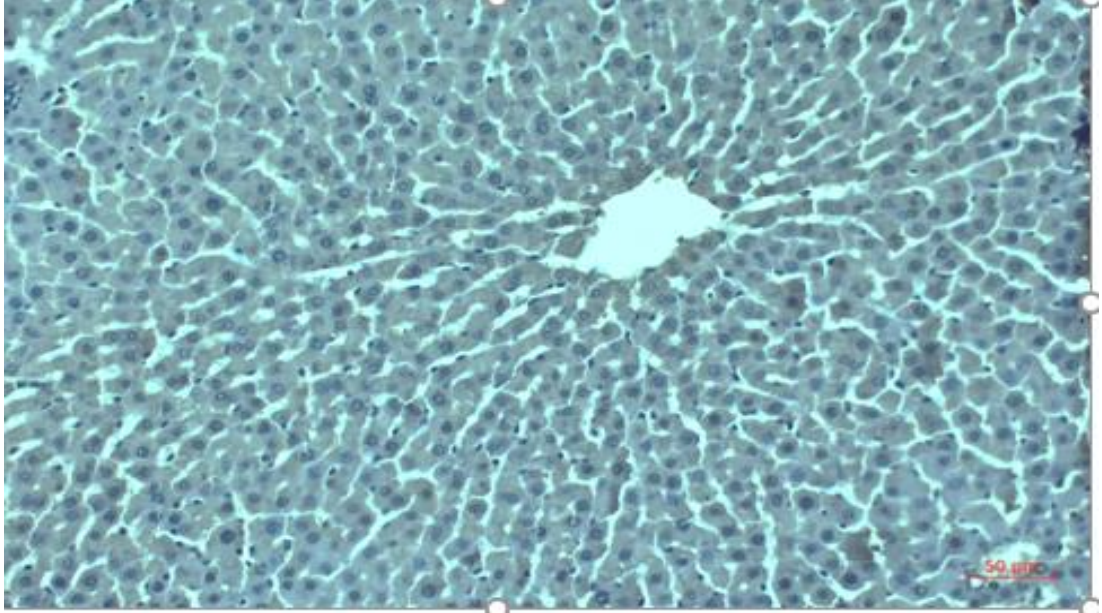
Şekil 26: İstatistiksel analizi yapılan karaciğer dokusu APAF-1 pozitif immün reaktivitenin ortalama grafiği.

Dokular ışık mikroskobu altında incelendiğinde; hem TNF- α hem de APAF-1 reaksiyonlarının kontrol (Şekil 27 ve 28) ile BA (Şekil 29 ve 30) grubunda oldukça az sayıda pozitif ekspresyonlar verdiği görüldü. Cd (Şekil 31 ve 32) grubunda ise yoğun pozitif TNF- α ve APAF-1 ekspersyonları izlendi, Cd+BA (Şekil 33 ve 34) grubunda ekspresyonların Cd grubuna kıyasla hafiflediği fakat, kontrol veya BA grubu kadar da hafiflemediği görüldü.

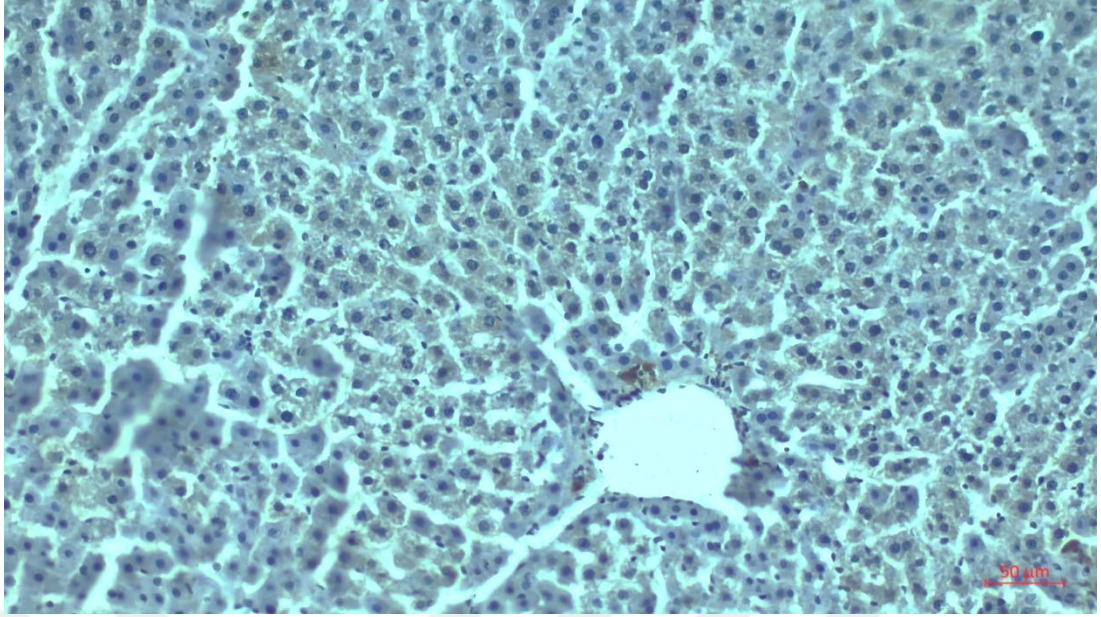
Tablo 6. Karaciğer Hasarı Skorlaması, TNF- α ve APAF-1 Histoskorlaması Alınan Dokuların İstatistiksel Analizinin Tespitiyle Belirlenmiş Ortalama $\pm$ Standart Sapma Değerleri.

GRUPLAR	KC HASARI SKORLAMASI	TNF- α HİSTOSKORLAMA	APAF-1 HİSTOSKORLAMA
Kontrol	0.00 $\pm$ 0.00 ^{b,d}	0.01 $\pm$ 0.02 ^{b,d}	0.01 $\pm$ 0.00 ^{b,d}
Cd	3.14 $\pm$ 0.37 ^{a,c,d}	2.10 $\pm$ 0.60 ^{a,c,d}	0.32 $\pm$ 1.45 ^{a,c,d}
BA	0.14 $\pm$ 0.37 ^{b,d}	0.02 $\pm$ 0.02 ^{b,d}	0.02 $\pm$ 0.01 ^{b,d}
Cd+BA	2.14 $\pm$ 0.37 ^{a,b,c}	0.71 $\pm$ 0.25 ^{a,b,c}	0.13 $\pm$ 0.62 ^{a,b,c}

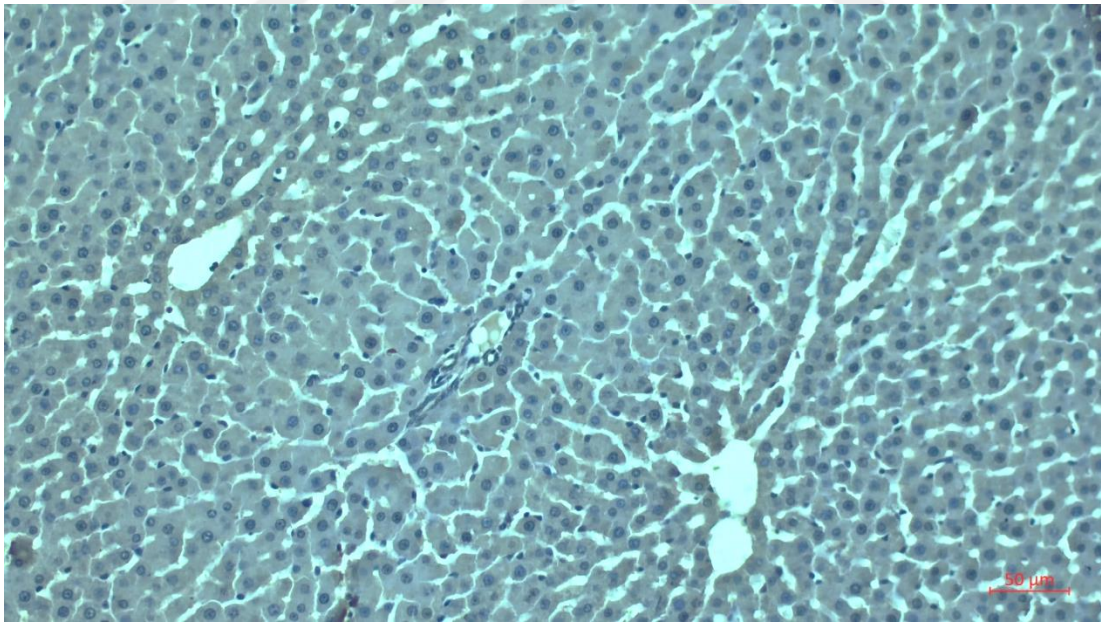
Cd; Kadmiyum grubu, BA; Borik asit grubu.a; Kontrol grubundan farklı, b; Cd grubundan farklı, c; BA grubundan farklı, d; Cd+BA grubundan farklı (p<0.05).



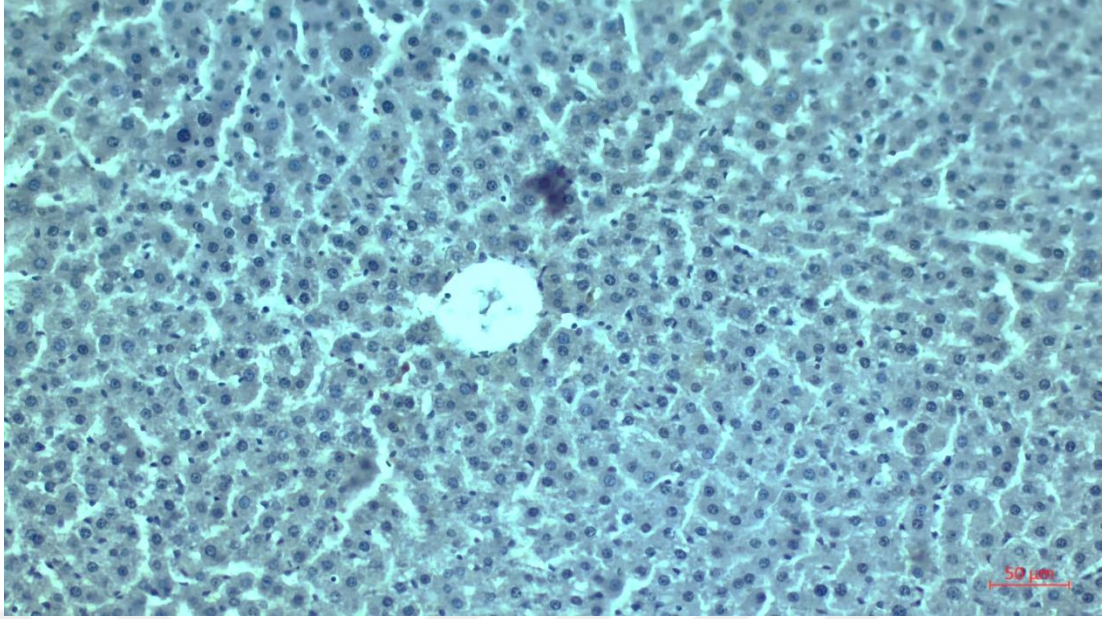
Şekil 27: Kontrol grubunun hepatik dokusunun immunohistokimya mikrografı. TNF- α pozitif ekspresyonların yaygınlığı oldukça hafif ve şiddeti ise çok az olarak izlendi. **Boyama:** TNF- α immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 μ m.



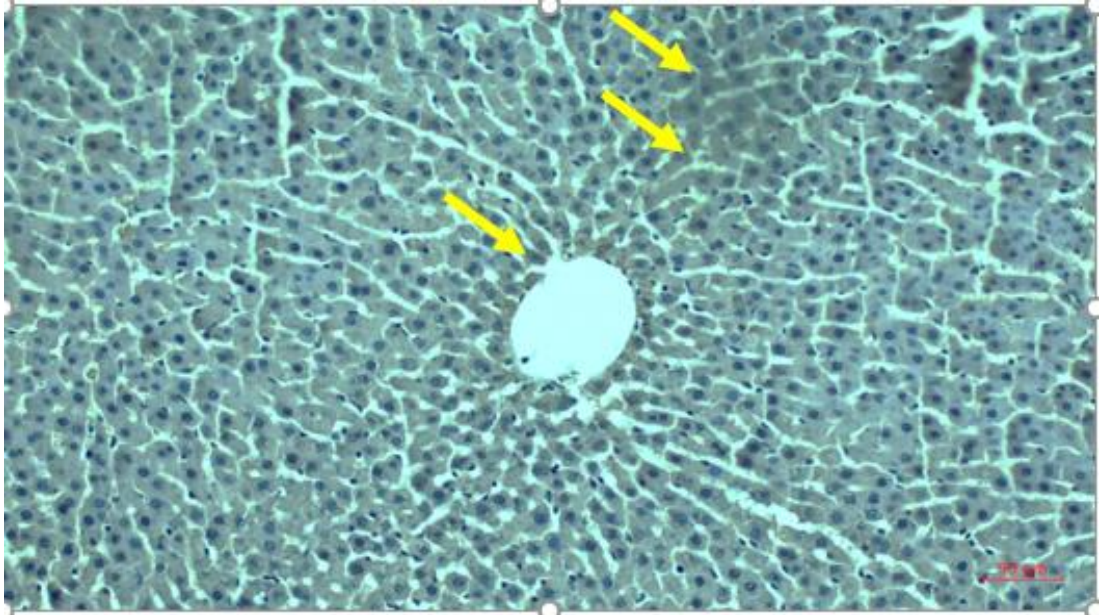
Şekil 28: Kontrol grubunun hepatic doku immunohistokimya mikrogramı. APAF-1 pozitif ekspresyonların yaygınlığı oldukça hafif ve şiddeti ise çok az olarak izlendi. **Boyama:** TNF- α immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 μ m.



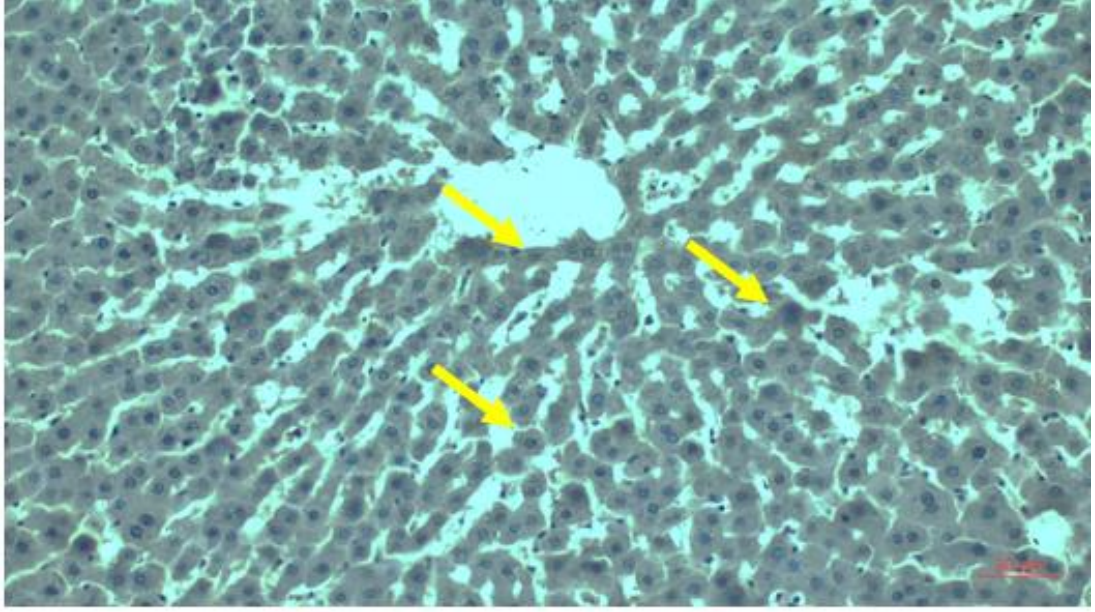
Şekil 29: BA grubuna ait karaciğer dokusu immunohistokimya mikrogramı. TNF- α pozitif ekspresyonların yaygınlığı oldukça hafif ve şiddeti ise çok az olarak izlendi. **Boyama:** TNF- α immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 μ m.



Şekil 30: BA grubuna ait karaciğer dokusu immunohistokimya mikrofrafı. APAF-1 pozitif ekspresyonların yaygınlığı oldukça hafif ve şiddeti ise çok az olarak izlendi. **Boyama:** TNF- α immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 μ m.



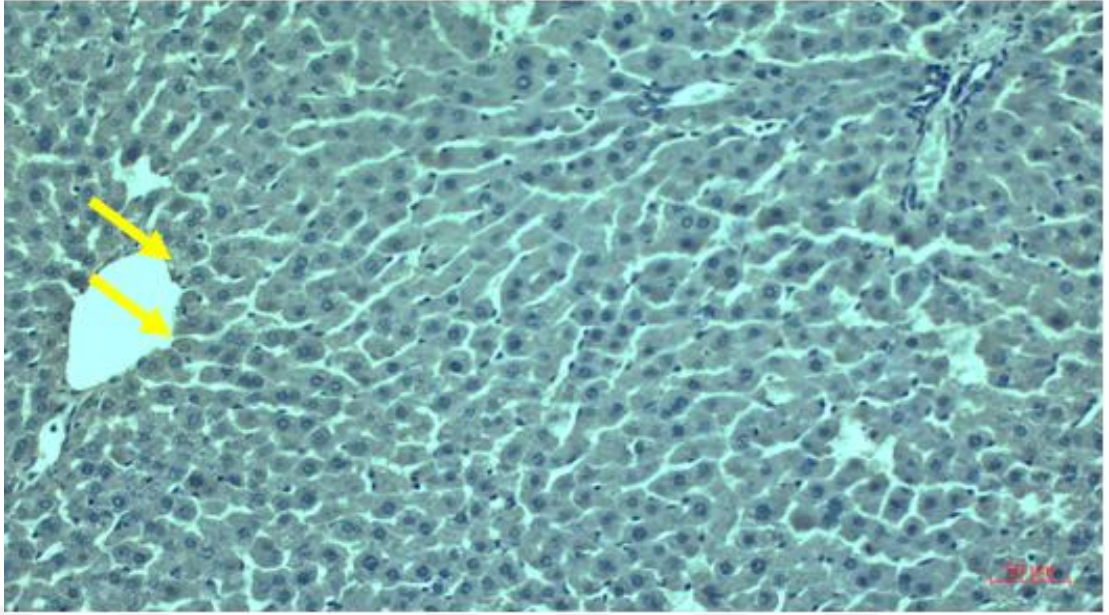
Şekil 31: Cd grubuna ait karaciğer dokusu immunohistokimya mikrofrafı. TNF- α pozitif ekspresyonların şiddeti ve yaygınlığı yaygın düzeyde izlendi (sarı ok). **Boyama:** TNF- α immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 μ m.



Şekil 32: Cd grubuna ait karaciğer dokusu immunohistokimya mikrofrafı. APAF-1 pozitif ekspresyonların şiddeti ve yaygınlığı orta düzeyde izlendi (sarı ok). **Boyama:** APAF-1 immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 µm.



Şekil 33: Cd+BA grubuna ait karaciğer dokusu immunohistokimya mikrofrafı. TNF- α pozitif ekspresyonların şiddeti ve yaygınlığı az düzeyde izlendi. **Boyama:** TNF- α immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 µm.



Şekil 34: Cd+BA grubuna ait karaciğer dokusu immunohistokimya mikrofrafı. APAF-1 pozitif ekspresyonların şiddeti ve yaygınlığı az düzeyde izlendi (sarı ok).
Boyama: APAF-1 immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 µm.

5. TARTIŞMA

Cd oldukça yaygın bir çevresel kirleticidir ve atmosfere ve su ortamına yayılır, bu ağır metal toksisitesi 20. Yüzyıldan sonra çarpıcı bir şekilde artmıştır (103). Cd'nin bu geniş çevresel dağılımı, yüksek toksisitesi ve zararlı çevresel etkileri, karaciğer, böbrek ve farklı organların dokularında aşırı derecede birikmesine ve ciddi hücrel hastalıklara neden olabilmektedir (104,105).

Literatür, Cd'nin indirekt oksidatif hasarı tetikleme yeteneğine dair açık kanıtlar sunmaktadır. DNA üzerinde, şunlara yol açar: (a) hücrel proliferasyonun indüklenmesi, (b) inhibisyonu apoptotik mekanizmalar ve (c) DNA onarım mekanizmalarının bloke edilmesi (106).

Oksidatif stresin temel molekülü olduğu varsayılan Cd'nin neden olduğu bu sitotoksitenin altında yatan temel temel neden ,Cd tiol gruplarına sıkı bir şekilde bağlanarak hepatotoksiteyi arttırmasıdır (107)

Bor içeren maddelerin hem canlı hem de canlı dışındaki biyokimyasal aktiviteleri uzun süredir bilinmektedir (33) ve anti-kanser veya anti-inflamatuar tedavide kullanımları sürekli artmaktadır (34-38). Daha önce yapılan çalışmalarda borik asidin inflammatuar hastalık riskini azalttığı görülmüştür (39,40). Borik asidin ayrıca antioksidan (41), hepatoprotektif (32) ve anti-genotoksik etkileri (42) olduğuda bilinmektedir.

Türkez ve ark tarafından serum enzimleri incelenerek alüminyum ile indüklenmiş hepatotoksiste üzerine borik asidin hepatoprotektif etkilerinin olduğu bildirilmiştir (108).

İnce ve ark da ratlarda karbon tetraklorür CCl₄ kaynaklı karaciğer hasarı üzerinde borik asidin histopatolojik ve biyokimyasal olarak güçlü hepatoprotektif etkiler sergilediğini tespit etmişlerdir (109).

Neşelioğlu ve ark tarafından da metotreksat ile oluşturulan hepatotoksiste üzerine borik asit etkinliğini araştırmış ve karaciğer üzerine koruyucu olduğunu bildirilmiştir (110).

Söğüt ve ark tarafından da sıçan karaciğerinde kronik alkol maruziyetine bağlı hepatotoksisite üzerine borik asidin olası hepatoprotektif etkileri araştırılmıştır. Alkol hasarı belirteçleri olarak bilinen malondialdehit (MDA), toplam sialik asit (TSA), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) düzeylerini ölçülmüş; ve ayrıca apoptoz belirteçleri olarak kaspaz-3, tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) düzeyi çalışılmıştır. Etanol grubunda kontrol grubuna göre MDA, TSA ve TNF- α seviyeleri artarken SOD ve CAT seviyelerinin azaldığı görülmüştür. Etanol+borik asit grubu MDA, Etanol grubuna göre TSA, kaspaz-3 ve TNF- α seviyeleri düşerken SOD ve CAT seviyeleri arttığı tespit edilmiş, ışık mikroskobu görüntülerinin histopatolojik değerlendirmesinde de etanol+borik asit grubunda immünohistokimyasal kaspaz-3 ve TNF- α aktivitesinin etanol grubuna göre azaldığı gösterilmiştir (111).

Biz, Cd nedenli hepatotoksisite üzerine BA'nın etkinliğini araştırdığımız bu çalışmada; numunelerimizi biyokimyasal (AST,ALT,LDH), histolojik (H&E,PAS), immünohistokimyasal (APAF-1,TNF- α) olarak değerlendirdik. Ayrıca oksidatif stresi de göstermek için TAS ve TOS değerlerini çalışarak OSI değerini elde ettik, ek olarak MDA çalışarak çalışmamızı güçlendirdik ve bu detaylı çalışma sonucu borik asidin etkin olduğunu gördük.

AST ve LDH karaciğer hasarını gösteren parametrelerdir (112).

AST değerlerinin istatistiksel analizinde belirgin farklılık görüldü ayrıca en yüksek ortalamanın Cd grubunda olduğu izlendi.

LDH değerlerinin istatistiksel analizinde ise Cd grubunun LDH değerleri Cd+BA grubuyla kıyaslanınca belirgin yüksek izlendi. Cd sonrası uygulamış olduğumuz BA, karaciğer fonksiyon testlerinden AST ve LDH düzeylerine olumlu yönde etki etmişti.

Serbest radikaller karşısında total oksidan seviyesinin gösteren TOS değerlerine de baktığımızda; Cd grubu ile Cd+BA grubu arasında anlamlı fark olduğu izlendi. (100,101)

Total oksidan seviyesinin, total antioksidan seviyesine bir çarpan eşliğinde oranı ile elde edilen; oksidatif stres indeksi olarak değerlendirilen OSI değerlerine

bakıldığında ise karşılaştırmada Cd grubu ile kontrol grubu, BA grubu ve Cd+BA grubu arasında istatistiksel anlamlı fark mevcuttu ve BA kullanımı OSI'yi olumlu yönde etkilemişti. Borik asidin oksidatif stres üzerine de olumlu etkisinin olduğu tespit edildi.

Lipid peroksidasyonuna bağlı olarak ortaya çıkan MDA organizma için oldukça zararlı bir maddedir ve oluşan bu MDA hücre membranlarındaki iyon değişimine etki ederek geçirgenliğin bozulması, DNA bazlarıyla reaksiyona girerek mutajenik bir karakter kazanması gibi pek çok olumsuz etkilere sahiptir (113). MDA değerlerinin istatistiksel analizinde; en yüksek skorlamaya Cd grubunun sahip olduğu görüldü. Cd grubu ile diğer çalışma grupları arasında anlamlı fark mevcuttu.

Histopatolojik ve immüno histokimyasal parametrelerde de bu olumlu durumu tam olarak destekledi. Karaciğer dokularının H&E boyamasının ışık mikroskobu altında incelenmesi sonucu Cd (Şekil 21) grubunun karaciğer dokularında hemoraji, konjesyon, mononükleer hücre infiltrasyonu, vena sentraliste dejenerasyon, hepatosit çekirdeklerinde piknozis, sinüzoidal aralıkta dilatasyonun meydana geldiği görüldü. Cd+BA (Şekil 22) grubunda ise oluşan patolojik değişikliklerin düzelmeye başladığı, kontrol ve BA grubuna benzer görünümde bir hal almaya başladığı izlendi.

PAS boyamasının ışık mikroskobu altında incelenmesi sonucunda, Cd+BA grubunda Cd grubuna kıyasla glikojen kaybı daha az izlendi. Borik asidin glikojen kaybını azaltarak, hepatotoksisite üzerine olumlu etkisi olduğu tespit edildi.

İmmunohistokimyasal değerlendirmede de dokular ışık mikroskobu altında incelendiğinde; nekroz ve hasar belirteçleri olarak hem TNF- α hem de APAF-1 reaksiyonlarının, Cd+BA (Şekil 35 ve 36) grubunda ekspresyonların Cd grubuna kıyasla hafiflediği görüldü. En şiddetli hasarın Cd grubunda olduğu izlenirken, Cd+BA grubunda oluşan hasarın yaygınlığı ve şiddeti ise Cd grubuyla kıyaslandığında belirgin daha az izlendi. Borik asidin nekroz ve karaciğer hasarı üzerine olumlu etkisinin olduğu görüldü.

6. SONUÇ

Yapılan bu deneysel çalışmanın sonucunda; kadmiyum ile karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda Borik asitin malondialdehit, total oksidan seviyesi gibi oksidatif stres belirtçelerini önemli oranda düşürdüğü izlendi. Karaciğer enzimleri ve fonksiyon testlerine baktığımızda ise benzer sonuçların olduğu, kadmiyum sonrası borik asit uygulamasının bu değerler üzerinde olumlu etkilerinin olduğu gözlemlendi. Histopatolojik ve immunohistokimyasal olarak değerlendirdiğimizde ise; kadmiyuma bağlı ciddi histopatolojik dejenerasyonların olduğu gözlenirken, kadmiyum sonrası borik asit uygulandığında , inflamasyon yollarını güçlü bir şekilde baskılandığı ve proapoptik sinyallerin ekspresyonunu azaltarak histolojik dokuları yeniden onarıldığı, hem histopatolojik hem de immunohistokimyasal düzelmelerin olduğu gözlemlendi.

7. KAYNAKLAR

1. Järup, L., & Åkesson, A. (2009). Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicology and applied pharmacology*, 238(3), 201-208.
2. Casas, J. S., & Sordo, J. (Eds.). (2011). *Lead: chemistry, analytical aspects, environmental impact and health effects*. Elsevier.
3. Satarug, S., Garrett, S. H., Sens, M. A., & Sens, D. A. (2010). Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. *Environmental health perspectives*, 118(2), 182-190.
4. Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., & Sutton, D. J. (2012). Heavy metal toxicity and the environment. *Molecular, clinical and environmental toxicology: volume 3: environmental toxicology*, 133-164.
5. WHO Action Is Needed on Chemicals of Major Public Health Concern.(2010) *Public Health Environmental* ,pp. 1–4.
6. The Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR)(2017). *ATSDR Substance Priority List*. Pp.1-3
7. Matović, V., Buha, A., Đukić-Ćosić, D., & Bulat, Z. (2015). Insight into the oxidative stress induced by lead and/or cadmium in blood, liver and kidneys. *Food and Chemical Toxicology*, 78, 130-140.
8. Flora, S. J., & Agrawal, S. (2017). Arsenic, cadmium, and lead. *In Reproductive and developmental toxicology* (pp. 537-566). Academic Press.
9. Matović, V., Buha, A., Bulat, Z., & Đukić-Ćosić, D. (2011). Cadmium toxicity revisited: focus on oxidative stress induction and interactions with zinc and magnesium. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 62(1), 65-75.

10. Flora, G., Gupta, D., & Tiwari, A. (2012). Toxicity of lead: a review with recent updates. *Interdisciplinary toxicology*, 5(2), 47-58.
11. Nieboer, E., & Richardson, D. H. (1980). The replacement of the nondescript term 'heavy metals' by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environmental Pollution Series B, Chemical and Physical*, 1(1), 3-26.
12. Djukić-Ćosić, D., Ninković, M., Maličević, Ž., Plamenac-Bulat, Z., & Matović, V. (2006). Effect of supplemental magnesium on the kidney levels of cadmium, zinc, and copper of mice exposed to toxic levels of cadmium. *Biological trace element research*, 114, 281-291.
13. Bulat, Z. P., Djukić-Ćosić, D., Maličević, Ž., Bulat, P., & Matović, V. (2008). Zinc or magnesium supplementation modulates Cd intoxication in blood, kidney, spleen, and bone of rabbits. *Biological trace element research*, 124, 110-117.
14. Vallee, B. L., Ulmer, D.D. (1972). Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead. *Annu. Rev. Biochem.* 41, 91-128.
15. Rani, A., Kumar, A., Lal, A., & Pant, M. (2014). Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: a review. *International journal of environmental health research*, 24(4), 378-399.
16. Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B., & Beyersmann, D. (2003). Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*, 192(2-3), 95-117.
17. Joseph, P. (2009). Mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology and applied pharmacology*, 238(3), 272-279.
18. Ahmed, Y. F., Eldebaky, H. A. A., Mahmoud, K. G. M., & Nawito, M. (2012). Effects of lead exposure on DNA damage and apoptosis in reproductive and vital organs in female rabbits. *Global veterinaria*, 9(4), 401-408.

19. Yuan, G., Dai, S., Yin, Z., Lu, H., Jia, R., Xu, J., ... & Zhao, X. (2014). Toxicological assessment of combined lead and cadmium: acute and sub-chronic toxicity study in rats. *Food and chemical toxicology*, 65, 260-268.
20. Uluisik, I., Karakaya, H. C., & Koc, A. (2018). The importance of boron in biological systems. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 45, 156-162.
21. Sogut, I., Oglakci, A., Kartkaya, K., Ol, K. K., Sogut, M. S., Kanbak, G., & Inal, M. E. (2015). Effect of boric acid on oxidative stress in rats with fetal alcohol syndrome. *Experimental and therapeutic medicine*, 9(3), 1023-1027.
22. Hacıoglu, C., Kar, F., Kacar, S., Sahinturk, V., & Kanbak, G. (2020). High concentrations of boric acid trigger concentration-dependent oxidative stress, apoptotic pathways and morphological alterations in DU-145 human prostate cancer cell line. *Biological Trace Element Research*, 193, 400-409.
23. Dinca, L., & Scorei, R. (2013). Boron in human nutrition and its regulations use. *J Nutr Ther*, 2(1), 22-29.
24. Soriano-Ursúa, M. A., Das, B. C., & Trujillo-Ferrara, J. G. (2014). Boron-containing compounds: chemico-biological properties and expanding medicinal potential in prevention, diagnosis and therapy. *Expert opinion on therapeutic patents*, 24(5), 485-500.
25. Sanjoh, M., Miyahara, Y., Kataoka, K., & Matsumoto, A. (2014). Phenylboronic acids-based diagnostic and therapeutic applications. *Analytical Sciences*, 30(1), 111-117.
26. Fu, H., Fang, H., Sun, J., Wang, H., Liu, A., Sun, J., & Wu, Z. (2014). Boronic acid-based enzyme inhibitors: a review of recent progress. *Current Medicinal Chemistry*, 21(28), 3271-3280.
27. Bolt, H. M., Başaran, N., & Duydu, Y. (2012). Human environmental and occupational exposures to boric acid: reconciliation with experimental reproductive toxicity data. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 75(8-10), 508-514.

28. Akdeniz, G. T., & Bildik, A. (2017) Ovariektomize Ratlarda Borik Asit Uygulamasının Kemik Metabolizması Üzerine Olası Etkisi. *Animal Health Production and Hygiene*, 6(2), 526-530.
29. Hansen, M. M., Jolly, R. A., & Linder, R. J. (2015). Boronic Acids and Derivatives- Probing the Structure–Activity Relationships for Mutagenicity. *Organic Process Research & Development*, 19(11), 1507-1516.
30. Pellizzaro, M. L., Covey-Crump, E. M., Fisher, J., Werner, A. L. D., & Williams, R. V. (2015). Investigating a relationship between the mutagenicity of arylboronic acids and ¹¹B NMR chemical shifts. *Chemical Research in Toxicology*, 28(7), 1422-1426.
31. Scott, H., & Walmsley, R. M. (2015). Ames positive boronic acids are not all eukaryotic genotoxins. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 777, 68-72.
32. Sogut, I., Paltun, S. O., Tuncdemir, M., Ersoz, M., & Hurdag, C. (2018). The antioxidant and antiapoptotic effect of boric acid on hepatotoxicity in chronic alcohol-fed rats. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 96(4), 404-411.
33. Benderdour, M., Bui-Van, T., Dicko, A., & Belleville, F. (1998). In vivo and in vitro effects of boron and boronated compounds. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 12(1), 2-7.
34. Adams, J., Behnke, M., Chen, S., Cruickshank, A. A., Dick, L. R., Grenier, L., ... & Stein, R. L. (1998). Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 8(4), 333-338.
35. Paramore, A., & Frantz, S. (2003). FRESH FROM THE PIPELINE. *NATURE REVIEWS| DRUG DISCOVERY*, 2, 611.
36. Ciani, L., & Ristori, S. (2012). Boron as a platform for new drug design. *Expert opinion on drug discovery*, 7(11), 1017-1027.

37. Das, B. C., Thapa, P., Karki, R., Schinke, C., Das, S., Kambhampati, S., ... & Evans, T. (2013). Boron chemicals in diagnosis and therapeutics. *Future medicinal chemistry*, 5(6), 653-676.
38. Tom, W. L., Van Syoc, M., Chanda, S., & Zane, L. T. (2016). Pharmacokinetic profile, safety, and tolerability of crisaborole topical ointment, 2% in adolescents with atopic dermatitis: an open-label phase 2a study. *Pediatric Dermatology*, 33(2), 150-159.
39. Devirian, T. A., & Volpe, S. L. (2003). The physiological effects of dietary boron.
40. Kar, F., Hacıoglu, C., Senturk, H., Donmez, D. B., & Kanbak, G. (2020). The role of oxidative stress, renal inflammation, and apoptosis in post ischemic reperfusion injury of kidney tissue: the protective effect of dose-dependent boric acid administration. *Biological trace element research*, 195, 150-158.
41. Cengiz, M. (2018). Boric acid protects against cyclophosphamide-induced oxidative stress and renal damage in rats. *Cellular and Molecular Biology*, 64(12), 11-14.
42. Ince, S., Kucukkurt, I., Demirel, H. H., Acaroz, D. A., Akbel, E., & Cigerci, I. H. (2014). Protective effects of boron on cyclophosphamide induced lipid peroxidation and genotoxicity in rats. *Chemosphere*, 108, 197-204.
43. Waalkes, M. P. (2003). Cadmium carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 533(1-2), 107-120.
44. Goyer, R. A., & Clarkson, T. W. (1996). Toxic effects of metals. *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*, 5, 691-736.
45. International Agency for Research on Cancer. (2006). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>.

46. Olsson, I. M., Bensryd, I., Lundh, T., Ottosson, H., Skerfving, S., & Oskarsson, A. (2002). Cadmium in blood and urine--impact of sex, age, dietary intake, iron status, and former smoking--association of renal effects. *Environmental health perspectives*, 110(12), 1185-1190.
47. Council, N. (2003). Nordic Council of Ministers Cadmium review Nordic Council of Ministers cadmium review. WHO, Geneva.
48. De Vries, W., & McLaughlin, M. J. (2013). Modeling the cadmium balance in Australian agricultural systems in view of potential impacts on food and water quality. *Science of the Total Environment*, 461, 240-257.
49. Rahimzadeh, M. R., Rahimzadeh, M. R., Kazemi, S., & Moghadamnia, A. A. (2017). Cadmium toxicity and treatment: An update. *Caspian journal of internal medicine*, 8(3), 135.
50. Ono, K. (2013). Past and future cadmium emissions from municipal solid-waste incinerators in Japan for the assessment of cadmium control policy. *Journal of hazardous materials*, 262, 741-747.
51. Nordberg, G. F. (2009). Historical perspectives on cadmium toxicology. *Toxicology and applied pharmacology*, 238(3), 192-200.
52. Dissanayake, C. B., & Chandrajith, R. (2009). Phosphate mineral fertilizers, trace metals and human health. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 37(3), 153-165.
53. Järup, L. (2002). Cadmium overload and toxicity. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 17(suppl_2), 35-39.
54. Nawrot, T. S., Staessen, J. A., Roels, H. A., Munters, E., Cuypers, A., Richart, T., ... & Vangronsveld, J. (2010). Cadmium exposure in the population: from health risks to strategies of prevention. *Biometals*, 23, 769-782.
55. Liu, Y., Liu, J., & Klaassen, C. D. (2001). Metallothionein-null and wild-type mice show similar cadmium absorption and tissue distribution following oral cadmium administration. *Toxicology and applied pharmacology*, 175(3), 253-259.

56. Klaassen, C. D., Liu, J., & Diwan, B. A. (2009). Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicology and applied pharmacology*, 238(3), 215-220.
57. Ishii, Y., Fujizuka, N., Takahashi, T., Shimizu, K., Tsuchida, A., Yano, S., ... & Chishiro, T. (1993). A fatal case of acute boric acid poisoning. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 31(2), 345-352.
58. Gallardo-Williams, M. T., Maronpot, R. R., Turner, C. H., Johnson, C. S., Harris, M. W., Jayo, M. J., & Chapin, R. E. (2003). Effects of boric acid supplementation on bone histomorphometry, metabolism, and biomechanical properties in aged female F-344 rats. *Biological trace element research*, 93, 155-169.
59. Yamauchi, T., Hara, T., & Sonoda, Y. (1986). Effects of boron deficiency and calcium supply on the calcium metabolism in tomato plant. *Plant and Soil*, 93, 223-230.
60. Borel, J. P., & Maquart, F. X. (1998, January). Molecular mechanisms of wound healing. In *Annales de Biologie Clinique* (Vol. 56, No. 1, pp. 11-9).
61. Demirci, S., Doğan, A., Karakuş, E., Halıcı, Z., Topçu, A., Demirci, E., & Sahin, F. (2015). Boron and poloxamer (F68 and F127) containing hydrogel formulation for burn wound healing. *Biological trace element research*, 168, 169-180.
62. Nielsen, F. H. (1990). Studies on the relationship between boron and magnesium which possibly affects the formation and maintenance of bones [electronic resource].
63. Sızmaz, Özge., Yıldız, G. (2014). Effects of Dietary Boric Acid and Ascorbic Acid Supplementation on Performance, Some Blood and Bone Parameters in Broilers. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*. 20(1),55-61
64. Qureshi, S., Al-Shabanah, O. A., Al-Harbi, M. M., Al-Bekairi, A. M., & Raza, M. (2001). Boric acid enhances in vivo Ehrlich ascites carcinoma cell proliferation in Swiss albino mice. *Toxicology*, 165(1), 1-11.

65. Henderson, K. A., Kobylewski, S. E., Yamada, K. E., & Eckhert, C. D. (2015). Boric acid induces cytoplasmic stress granule formation, eIF2 α phosphorylation, and ATF4 in prostate DU-145 cells. *Biometals*, 28, 133-141.
66. Ince, S., Kucukkurt, I., Cigerci, I. H., Fidan, A. F., & Eryavuz, A. (2010). The effects of dietary boric acid and borax supplementation on lipid peroxidation, antioxidant activity, and DNA damage in rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 24(3), 161-164.
67. Scorei, R., Ciubar, R., Ciofrangeanu, C. M., Mitran, V., Cimpean, A., & Iordachescu, D. (2008). Comparative effects of boric acid and calcium fructoborate on breast cancer cells. *Biological trace element research*, 122, 197-205.
68. Taşdemir, M., Çelikezen, F. Ç., Oto, G., & Özbey, F. (2020). The effects of pretreatment with lithium metaborate dihydrate on lipid peroxidation and Ca, Fe, Mg, and K levels in serum of Wistar albino male rats exposed to Cd. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(7), 7702-7711.
69. Ayhanci, A., Tanriverdi, D. T., Sahinturk, V., Cengiz, M., Appak-Baskoy, S., & Sahin, I. K. (2020). Protective effects of boron on cyclophosphamide-induced bladder damage and oxidative stress in rats. *Biological trace element research*, 197, 184-191.
70. Ince, S., Keles, H., Erdogan, M., Hazman, O., & Kucukkurt, I. (2012). Protective effect of boric acid against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. *Drug and chemical toxicology*, 35(3), 285-292.
71. Severn, C. B. (1971). A morphological study of the development of the human liver. I. Development of the hepatic diverticulum. *American Journal of Anatomy*, 131(2), 133-158.
72. Sadler, T. W. (2005, May). Embryology of neural tube development. In *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics* (Vol. 135, No. 1, pp. 2-8). Hoboken: Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company.
73. Gilbert, S. F. (1994). *Developmental biology*. Sinauer, Massachusetts.

74. Lade, A. G., & Monga, S. P. (2011). Beta-catenin signaling in hepatic development and progenitors: Which way does the WNT blow?. *Developmental Dynamics*, 240(3), 486-500..
75. Straznicky, C. (1987). *Anatomy atlas: Anatomy: a regional atlas of the human body*.
76. Sadler, T. W. (2022). *Langman's medical embryology*. Lippincott Williams & Wilkins.
77. Severn, C. B. (1972). A morphological study of the development of the human liver. II. Establishment of liver parenchyma, extrahepatic ducts and associated venous channels. *American Journal of Anatomy*, 133(1), 85-107.
78. Yıldız, H. T., & Kalkan, K. T. (2022). Organların embriyolojik gelişimi. *Sağlık & Bilim : Genel Embriyoloji-1*, 137.
79. Moore, K., Persaud, T.V.N.(2002). Clinically oriented embryology. Okar İ, Dalcık H, İnsan Embriyolojisi, Nobel Tıp Kitabevleri. 323–33.
80. Eisendrath, D. N. *A Textbook of Clinical Anatomy. For Students and Practitioners*. By Daniel N. Eisendrath, AB, MD, Clinical Professor of Anatomy in the Medical Department of the University of Illinois (College of Physicians and Surgeons); Attending Surgeon to the Cook County Hospital, Chicago. Handsome octavo of 515 pages, with 153 illustrations, a number.
81. Monkhouse, W. S. (2001). *Terminologia Anatomica. International Anatomical Terminology*. By the Federative Committee on Anatomical Terminology (FCAT).(Pp. x+ 292. with CD-Rom; EUR 40.39 hardback; ISBN 3 13 115251 6.) Stuttgart: Georg Thieme. 1998. *The Journal of Anatomy*, 199(6), 741-742.
82. Karcaaltincaba, M., Haliloglu, M., Akpınar, E., Akata, D., Özmen, M., Ariyurek, M., & Akhan, O. (2007). Multidetector CT and MRI findings in periportal space pathologies. *European journal of radiology*, 61(1), 3-10.
83. Merrillees N. *Basic Histology*.(1976) *Med J Aust*. 2(17):653–653.

84. Schraegle, A.E., Millard, N.D., King, B.G. (1951) Human Anatomy and Physiology. Vol. 51, The American Journal of Nursing. Pearson Education.. p. 40.
Tarihi eser bu
85. Trefts, E., Gannon, M., & Wasserman, D. H. (2017). The liver. *Current biology : CB*, 27(21), R1147–R1151.
86. Friedman, S. L. (2008). Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiological reviews*, 88(1), 125-172.
87. Schwartz, S. I., Brunickardi, F. C., Andersen, D. K., Billiar, T. R., Dunn, D. L., Hunter, J. G., ... & Pollock, R. E. (2015). *Schwartz's principles of surgery*. McGraw-Hill Education,.
88. Townsend, C. M., & Sabiston, D. C. (2004). *Textbook of surgery: the biological basis of modern surgical practice* (pp. 110-113). Philadelphia, PA: Elsevier Saunders.
89. Ashley, Stanley W. (2014). "ACS Surgery: Principles and Practice, 2 Vol Set (7th ed.)" Faculty Bookshelf. 37.
90. Gray's Surgical Anatomy.(2020) Gupta A DE. Liver. In: A BP, editor. first edition. p. 453-7.
91. Hiatt, J. R., Gabbay, J., & Busuttil, R. W. (1994). Surgical anatomy of the hepatic arteries in 1000 cases. *Annals of surgery*, 220(1), 50.
92. Robbins basic pathology.(2018) V K. Liver and Gallbladder. In: V K, editor. Tenth ed. Philadelphia: Elsevier. p. 637-77.
93. Shi, H., Yang, G., Zheng, T., Wang, J., Li, L., Liang, Y., ... & Liu, L. (2015). A preliminary study of ALPPS procedure in a rat model. *Scientific reports*, 5(1), 17567.
94. Andjelkovic, M., Buha Djordjevic, A., Antonijevic, E., Antonijevic, B., Stanic, M., Kotur-Stevuljevic, J., ... & Bulat, Z. (2019). Toxic effect of acute

cadmium and lead exposure in rat blood, liver, and kidney. International journal of environmental research and public health, 16(2), 274.

95. Konca, M. (2018). Ratlarda oral ve lokal olarak uygulanan borun yara iyileşmesi ve oksidatif stres üzerine etkisinin karşılaştırılması (Master's thesis, Sağlık Bilimleri Enstitüsü).

96. Pfeiffer, C. C., Hallman, L. F., & Gersh, I. (1945). Boric acid ointment: a study of possible intoxication in the treatment of burns. Journal of the American Medical Association, 128(4), 266-274.

97. Weir Jr, R. J., & Fisher, R. S. (1972). Toxicologic studies on borax and boric acid. Toxicology and Applied Pharmacology, 23(3), 351-364.

98. Camargo Jr, C. A., Madden, J. F., Gao, W., Selvan, R. S., & Clavien, P. (1997). Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent. Hepatology, 26(6), 1513-1520.

99. Erdogan, M. A., & Yalcin, A. (2020). Protective effects of benfotiamine on irisin activity in methotrexate-induced liver injury in rats. Archives of Medical Science, 16(1), 205-211.

100. Erel, O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. Clinical biochemistry, 38(12), 1103-1111.

101. Erel, O. (2004). A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. Clinical biochemistry, 37(2), 112-119.

102. Tüfek, A., Tokgöz, O., Aliosmanoglu, İ., Alabalik, U., Evliyaoglu, O., Çiftçi, T., ... & Yıldırım, Z. B. (2013). The protective effects of dexmedetomidine on the liver and remote organs against hepatic ischemia reperfusion injury in rats. International journal of surgery, 11(1), 96-100.

103. Genchi, G., Sinicropi, M. S., Lauria, G., Carocci, A., & Catalano, A. (2020). The effects of cadmium toxicity. International journal of environmental research and public health, 17(11), 3782.

104. Thévenod, F. (2003). Nephrotoxicity and the proximal tubule. *Nephron Physiology*, 93(4), p87-p93.
105. Fukumoto, M., Kujiraoka, T., Hara, M., Shibasaki, T., Hosoya, T., & Yoshida, M. (2001). Effect of cadmium on gap junctional intercellular communication in primary cultures of rat renal proximal tubular cells. *Life sciences*, 69(3), 247-254.
106. Zarros A, Skandali N, Al-Humadi H, Liapi C. 2008. Cadmium (Cd) as a carcinogenetic factor and its participation in the induction of lung cancer. *Pneumon*. 21:172–177.
107. Dudley RE, Klaassen CD. 1984. Changes in hepatic glutathione concentration modify cadmiuminduced hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 72(3):530–538.
108. Türkez, H., Geyikoğlu, F., & Colak, S. (2011). The protective effect of boric acid on aluminum-induced hepatotoxicity and genotoxicity in rats. *Turkish Journal of Biology*, 35(3), 293-301.
109. Ince, S., Keles, H., Erdogan, M., Hazman, O., & Kucukkurt, I. (2012). Protective effect of boric acid against carbon tetrachloride–induced hepatotoxicity in mice. *Drug and chemical toxicology*, 35(3), 285-292
110. Neşelioğlu, A. K., Akcan, G., Nakkaş, H., Neşelioğlu, S., Özcan, E. R. E. L., Evirgen, O., & Özgüner, M. (2020). Histological changes in methotrexate hepatotoxicity after boron application and evaluation of serum thiol-disulfide balance. *Journal of Health Sciences and Medicine*, 4(3), 277-282.
111. Sogut, I., Paltun, S. O., Tuncdemir, M., Ersoz, M., & Hurdag, C. (2018). The antioxidant and antiapoptotic effect of boric acid on hepatotoxicity in chronic alcohol-fed rats. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 96(4), 404-411.
112. Ersoy, O. (2012). Karaciğer enzim yüksekliğinin değerlendirilmesi. *Ankara Medical Journal*, 12(3), 129-135.

113. Moslen, M.T. (1994). Reactive Oxygen Species in Normal Physiology, Cell Injury and Phagocytosis, Free Radicals in Diagnostic Medicine, Ed. D Armstrong, 1–15

