

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

SİKLOFOSFAMİD UYGULANAN SIÇANLARIN
KARACİĞER DOKUSUNDA ASPROSİN
İMMÜNREAKTİVİTESİ ÜZERİNE VİTAMİN D'NİN
ETKİLERİ

DOKTORA TEZİ

AHMET TÜRK

2021

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mesut AKSAKAL

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans/Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Dürrin Özlem DABAK

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek
Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

.....

Doç. Dr. Tuncay KULOĞLU

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Neriman ÇOLAKOĞLU _____

Prof. Dr. Nigar VARDI _____

Prof. Dr.Mehmet GÜL _____

Prof. Dr.Ebru ÖNALAN _____

Doç. Dr.Tuncay KULOĞLU _____



ETİK BEYAN

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

Ahmet TÜRK

Tarih

İmza

Doç. Dr. Tuncay KULOĞLU
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
ELAZIĞ

İTHAF SAYFASI

Sevgili aileme...

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tez konumun seçimi, yürütülmesi ve değerlendirilmesinde tecrübelerinden yararlandığım değerli danışman hocam Doç. Dr. Tuncay KULOĞLU'na,

Eğitimim süresince beni yönlendiren, manevi desteğini esirgemeyen Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalına yıllarca çok değerli katkılarda bulunan emekli öğretim üyesi Prof. Dr. İ. Enver OZAN'a,

Deneyimlerinden yararlandığım çok değerli öğretim üyesi hocalarım Prof. Dr. Leyla CANPOLAT KOYUTÜRK'e, Prof. Dr. Özlem Durrin DABAK'a, Prof. Dr. Neriman ÇOLAKOĞLU'na, Doç. Dr. Nevin KOCAMAN'a, Arş. Gör. Dr. Nalan KAYA TEKTEMURA'a,

Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında değerli arkadaşım Arş. Gör. Dr. İbrahim BOZGEYİK'e, Fizyoloji Anabilim Dalında görevli Arş. Gör. Dr. Abdullah KARADAĞ'a, Anatomi Anabilim Dalında görevli değerli arkadaşım Arş. Gör. Büşra ZENCİRCİ'ye ve manevi desteğini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KAPAK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
ETİK BEYAN	iii
İTHAF SAYFASI	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLO LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	x
KISALTMALAR LİSTESİ	xii
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	6
3.1. Karaciğer Embriyolojisi	6
3.2. Karaciğer Anatomisi	7
3.2.1. Karaciğer Kanlanması	10
3.2.2. Karaciğerin Lenf Sistemi	11
3.2.3. Karaciğerin İnnervasyon Sistemi	11
3.3. Karaciğer Histolojisi	11
3.3.1 Karaciğerin Yapısal Organizasyonu	12
3.3.1.1. Parankim	12
3.3.1.2. Bağ Dokusu Stroma	16
3.3.1.3. Sinüzoidal Kapillerler (Sinüzoidler)	17
3.3.1.4. Perisinüzoidal Aralıklar (Disse aralıkları)	18
3.3.1.5. Safra Yolları	20
3.4. Karaciğer Fizyolojisi	20
3.4.1. Karaciğerin Depo İşlevi	20
3.4.2. Karaciğerin Kan Temizleme İşlevi	21
3.4.3. Karaciğerin Metabolik İşlevleri	21
3.4.5. Safranin Sentezlenip Salgılanması	21
3.4.5.1. Karaciğerin Diğer Metabolik Fonksiyonları	22

3.5. Siklofosfamid	22
3.6. Adipoz Doku	23
3.6.1. Adipoz Dokunun Kanser Gelişimi ve İlerlemesi Üzerine Etkileri	24
3.6.2. Adipokinler	25
3.6.3. Asprosin	26
3.6.3.1. Asprosin ve Oksidatif Stress	27
3.7. Vitamin D Yapısı ve Özellikleri	28
3.7.1. Vitamin Dnin fonksiyonları	29
4. GEREÇ VE YÖNTEM	31
4.1. Etik kurul kararı	31
4.2. Deney Hayvanlarının Temini ve Beslenmeleri	31
4.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması	31
4.2.2. Deney Sonunda Kan Örnekleri ve Dokuların Alınması	32
4.3. Biyokimyasal Analizler	32
4.3.1. Malondialdehid (MDA) Analizi	32
4.3.2. Total Antioksidan Seviyesi (TAS) Analizi	33
4.3.3. Total Oksidan Seviyesi (TOS) Analizi	33
4.3.4. Asprosin Analizi	34
4.4. Histolojik Analizler	34
4.4.1. Histolojik Çalışma	36
4.4.2. TUNEL Metodu	34
4.4.3. İmmünohistokimyasal Metod	37
4.5. İstatistiksel analiz	38
5. BULGULAR	39
5.1. Klinik Bulgular	39
5.2. Biyokimyasal Bulgular	39
5.2.1. Doku MDA Düzeyi	39
5.2.2. Serum TAS Düzeyi	40
5.2.3. Serum TOS Düzeyi	40
5.2.4. Serum Asprosin Düzeyi	41
5.3.1. Histolojik Bulgular	41
5.3.2. TUNEL Bulgular	48

5.3.3. İmmünohistokimyasal Bulgular	51
6. TARTIŞMA	54
7. KAYNAKLAR	62
8. ÖZGEÇMİŞ	70

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Histolojik Takip Serileri	35
Tablo 2. TUNEL Boyama Prosedürü.	36
Tablo 3. Deney hayvanlarının başlangıç ve final vücut ağırlıkları	39
Tablo 4. Doku MDA Düzeyi	40
Tablo 5. Serum TAS Düzeyi	40
Tablo 6. Serum TOS Düzeyi	41
Tablo 7. Serum asprosin Düzeyi	41
Tablo 8. Histopatolojik skarlama	42
Tablo 9. Apoptotik indeks (%)	48
Tablo 10. Asprosin histoskoru	51

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	Karaciğerin alttan görünümü.	9
Şekil 2.	Karaciğer segmentleri. I: Lobus caudatus, II: Segmentum laterale superior, III: Segmentum laterale inferior, IV: Segmentum mediale superior-inferior, V: Segmentum anterior inferior, VI: Segmentum posterius inferior, VII: Segmentum posterius superior, VIII: Segmentum anterior superior.	9
Şekil 3.	Karaciğer lobülünün histolojik sınıflandırılması.	13
Şekil 4.	Karaciğer lobülünün fonksiyonel sınıflandırılması.	14
Şekil 5.	Karaciğer lobülünün yapılanması.	17
Şekil 6.	Karaciğerdeki kan ve safra akış yönleri.	18
Şekil 7.	Kolekalsiferol (D3 vitamini) kimyasal yapısı.	29
Şekil 8.	Kontrol grubu normal görünümlü karaciğer dokusu, H&E X200.	42
Şekil 9.	Kontrol grubu normal görünümlü karaciğer dokusu, Masson trikrom X200.	43
Şekil 10.	Kontrol grubu PAS(+) hepatositler (siyah yıldız), PAS X200	43
Şekil 11.	Vitamin D grubu normal görünümlü karaciğer dokusu, H&EX200	44
Şekil 12.	Vitamin D grubu normal görünümlü karaciğer dokusu, Masson trikromX200	44
Şekil 13.	Vitamin D grubu PAS(+) hepatositler (siyah yıldız), PASX200	45
Şekil 14.	SP grubunda hemoraji (siyah ok), inflamatuvar hücre artışı (siyah yıldız), sinüzoidal dilatasyon (kırmızı ok), H&EX200	45
Şekil 15.	SP grubunda bağ dokusu artışı (siyah yıldız), Masson trikromX200	46
Şekil 16.	SP grubunda hepatositlerde glikojen kaybı (kırmızı ok), PASX200	46
Şekil 17.	SP+ Vitamin D grubunda kontrol grubuna benzer karaciğer dokusu görünümü, belirgin azalan hemoraji (siyah ok), H&EX200	47
Şekil 18.	SP+ Vitamin D grubu normal görünümlü karaciğer dokusu, Masson trikromX200	47
Şekil 19.	SP+ Vitamin D grubu PAS(+) hepatositler (siyah yıldız), PASX200	48
Şekil 20.	Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu, TUNEL pozitif hücre (siyah yıldız)X400	49

Şekil 21.	Vitamin D grubuna ait karaciğer dokusu, TUNEL pozitif hücre (siyah ok)X400	49
Şekil 22.	SP grubuna ait karaciğer dokusu, TUNEL pozitif hücreler (siyah ok)X400	50
Şekil 23.	SP+Vitamin D grubuna ait karaciğer dokusu, TUNEL pozitif hücreler (siyah ok)X400	50
Şekil 24.	Kontrol grubuna ait karaciğer dokusunda asprosin immünreaktivitesi, (siyah ok) immünohistokimya X200.	52
Şekil 25.	Vitamin D grubuna ait karaciğer dokusunda asprosin immünreaktivitesi, (siyah ok) İmmünohistokimyaX200.	52
Şekil 26.	SP grubuna ait karaciğer dokusunda asprosin immünreaktivitesi. (siyah ok), immünohistokimyaX200.	53
Şekil 27.	SP + vitamin D grubuna ait karaciğer dokusunda asprosin immünreaktivitesi, (siyah ok),immünohistokimyaX200.	53

KISALTMALAR LİSTESİ

1, 25(OH)D3	: Kalsitriol
2C19	: 2, alt aile polipeptid 9,
2C9	: 2, alt polipeptid 9,
ADP-riboz1	: Poli (ADP-riboz) polimeraz-1
AdipoR1	: adiponektin reseptörü 1
AdipoR2	: adiponektin reseptörü 2
AgRP	: Agouti ilişkili Nöropeptid
Akt	: Serin / treonin-protein kinazlar
ALP	: Alkalen fosfatazlar
ALT	: Alanin aminotransferaz
AMP	: Adenozin 5'-monofosfat
AMPK	: AMP ile aktive olan protein kinaz
AMPK	: Protein Kinaz Fosforilasyonunu
AST	: Aspartat aminotransferaz
ATPaz	: Adenozin trifosfataz
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
CAT	: Katalaz
CDK	: Sikline bağımlı kinaz
ChemR	: Kemerin reseptörü
c-JNK	: c-Jun N-terminal kinazlar,
CYP 3A4	: Sitokrom P4503A4
CYP24	: 25-hidroksivitamin D3-24-hidroksilaz
CYP24A1	: 1, 25-dihidroksivitamin D (3) 24-hidroksilaz
CYP27B1	: 25-Hidroksivitamin D 1-alfa-hidroksilaz
CYPR1	: Sitokin Üretimi 1
DAB	: Diaminobenzidine
DBP	: Vitamin D bağlayıcı protein kaynaklı makrofaj aktive edici faktör
DNA	: Deoksiribo nükleik asit

ERK1	: Mitojenle aktive olan protein kinaz 1
ERK2	: Mitojenle aktive olan protein kinaz 2
FBN1	: Fibrillin 1
FFA	: Serbest yağ asidi
FGF21	: Fibroblast büyüme faktörü-21
FGW	: Fibroblast Growt Faktör
FÜDAM	: Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi
G6PDH	: Glikoz-6-fosfat-dehidrogenaz
Gc-MAF	: Vitamin D bağlayıcı protein kaynaklı makrofaj aktive edici faktör
GPX	: Glutasyon peroksidaz
GPX1	: Glutasyon peroksidaz 1
GPX3	: Glutasyon peroksidaz 3
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Glutasyon
HCl	: Hidroklorik asit
HSC	: Hematopoietik kök hücre
IGF-1	: İnsüline benzer Büyüme Faktörü-1
IL6	: İnterlökin 6
IL8	: İnterlökin 8
i.p.	: İntraperitoneal
JNK	: c-Jun NH2
JNKs	: c-Jun N-terminal kinaz
LDH	: Laktat dehidrojenaz
MCP1	: Monosit kemoatraktan protein 1
MDA	: Malondialdehid
MCP1	: Monosit Kemotaktik Protein 1
mRNA	: Mesajcı RNA,
MSS	: Merkezi sinir sistemi
MTP	: Mikrozomal trigliserit transfer proteini
NAYKH	: Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı
NF-κB	: Nükleer Faktör κB'yi (NF-κB)

OR4M1	: Olfaktör Reseptör 4M1
PAI1	: Plazminojen aktivator inhibitörü
PARP	: Poli (<i>ADP-riboz</i>) polimeraz-1
PAQR-2	: Adiponektin reseptörü
PI3K	: Fosfoinositid 3-kinaz
PKA	: Protein kinaz A
P-MAPK	: Fosforile mitojenle aktive olan protein kinaz
PPAR -α	: Peroksizom-proliferatör aktive Reseptör- α
PPS	: Phosphate buffered saline
RELms	: Resistin benzeri molekül
RNA	: Ribo Nükleik asit
ROS	: Reaktif oksijen türleri (ROS)
Sirt1	: Sirtuin 1
SOD	: Süperoksit dismutaz
SOD1	: Süperoksit dismutaz1
SOD2	: Süperoksit dismutaz2
SP	: Siklofosfamid
T2D	: Tip 2 diyabet
TAS	: Total antioksidan seviyesi
TBA	: Tiyobarbitürik asit,
TCA	: Trikloroasetik asit,
TNFα	: Tümör nekroz faktörü alfa
TOS	: Total oksidan seviyesi
UCP 1	: Uncoupling Protein 1
UCP 2	: Uncoupling Protein 2
UCP 3	: Uncoupling Protein 3
VDR	: Vitamin D Reseptörü
VLDL	: Çok Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler
WAT	: Beyaz yağ dokusu

1.ÖZET

Siklofosfamid, uzun yıllardan beri çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılmasına rağmen doku ve organlar üzerinde ciddi yan etkilerinden dolayı kullanımı sınırlanmaktadır. Siklofosfamid'in neden olduğu oksidatif stres hepatotoksisiteye ve enerji metabolizmasına etki etmektedir. Yakın dönemde keşfedilen asprosin adipoz dokudan salgılanan ve karaciğerde enerji metabolizması etki eden bir adipokindir. Bir antioksidan olarak kabul edilen vitamin D, oksidatif strese karşı koruyucu karakterde olan glikoz-6-fosfat-dehidrogenaz (G6PDH) ekspresyonunu artırmaktadır.

Vitamin D'nin, antiproliferatif, prodiferansiyatif, immunmodülatör ve antioksidan özelliklere sahip olması doku hasarlarında önemli bir redüktan olarak işlev görmesini sağlamaktadır. Bu çalışmada siklofosfamid uygulanan sıçanların serum ve karaciğer dokusunda asprosin düzeyleri üzerine vitamin D'nin etkilerin incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, 28 adet 8-10 haftalık Wistar albino cinsi erkek sıçanlar kullanıldı. Deney hayvanları her grupta 7 hayvan olacak biçimde 4 gruba ayrıldı.

Deney başlangıcında tüm sıçanların vücut ağırlıkları ölçüldü. Kontrol grubuna deney süresi olan 15 gün boyunca herhangi bir uygulama yapılmadı. Vitamin D grubuna 200 IU/gün vitamin D her gün oral yol ile verildi. siklofosfamid grubuna deney başlangıcında 200 mg/kg olacak şekilde tek doz Siklofosfamid intraperitoneal (i.p) olarak uygulandı. Siklofosfamid +vitamin D grubuna tek doz 200mg/kg siklofosfamid i.p olarak uygulanması ile beraber 15 günlük deney süresi boyunca her gün 200 IU/gün vitamin D oral yol ile verildi.

Deney sonunda sonunda tüm sıçanların vücut ağırlıkları ölçüldükten sonra sıçanlar anesteziye alındıktan sonra kan ve karaciğer dokuları alındı. Serum total

antioksidan seviyesi (TAS), total oksidan seviyesi (TOS) ve asprosin seviyesi ile doku malondialdehit (MDA) düzeylerinin belirlenmesi için biyokimyasal analizler yapıldı. Ayrıca karaciğer dokuları histopatolojik, TUNEL ve immünohistokimyasal teknikler ile incelenmek üzere hazırlandı. Çalışmanın bulguları araştırma mikrosbunda incelenip fotoğraflandı.

Kontrol grubuna göre siklofosfamide maruz kalan sıçanların son vücut ağırlıkları ile başlangıç ağırlıkları arasında anlamlı bir azalmanın olduğu görüldü. Ayrıca histopatolojik incelemelerde belirgin hemoraji, inflamatuvar hücre artışı, sinüzoidal dilatasyon, bağ dokusu artışı ile hepatositlerde glikojen kaybının olduğu tespit edildi. Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamasının ışık mikroskobunda incelenmesi sonucunda siklofosfamid grubunda TUNEL pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış olduğu görüldü. Bununla birlikte TOS ve MDA düzeylerinin arttığı TAS ve asprosin seviyesinin ise azaldığı görüldü.

Siklofosfamid grubuna göre vitamin D tedavisi uygulanan gruptaki sıçanların vücut ağırlıkları başlangıç ağırlıklarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştı. Ayrıca tedavi grubunda histopatolojik hasarın azaldığı ve TUNEL pozitif hücre sayının siklofosfamid grubuna göre düştüğü görüldü. Bununla birlikte siklofosfamid grubuna göre tedavi grubunda TOS ve MDA düzeylerinin azaldığı, TAS ve asprosin seviyelerinin ise arttığı tespit edildi.

Sonuç olarak siklofosfamid ile oluşturulan karaciğer hasarına karşı vitamin D'nin oksidatif stresi baskılayarak doku hasarını azalttığı ve asprosin seviyesini yükselttiği görülmüştür. Kemoterapötik cevabla birlikte oluşan oksidatif hasarda asprosin'in rolünün aydınlatılması için daha kapsamlı ve ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Asprosin, Vitamin D, Siklofosfamid, Karaciğer, Rat

2. ABSTRACT

Effects of Vitamin D on Asprosin Immunoreactivity in Liver Tissues of Cyclophosphamide-Administered Rats

Although cyclophosphamide (CP) has been used in the treatment of various types of cancer for many years, its use is limited due to its severe adverse effects on tissues and organs. CP induces oxidative stress and affects hepatotoxicity and energy metabolism. Recently discovered, asprosin is an adipokine secreted from adipose tissue and affects energy metabolism in the liver. Vitamin D, considered an antioxidant, increases the expression of glucose-6-phosphate-dehydrogenase (G6PDH), which is protective against oxidative stress.

Vitamin D's antiproliferative, prodifferentiative, immunomodulatory and antioxidant properties enable it to function as an important reductant in tissue damage. In this study, it was aimed to investigate the effects of Vitamin D on asprosin levels in serum and liver tissue of rats administered with CP. 28 male Wistar albino rats aged 8-10 weeks were used in this study. The experimental animals were divided into 4 groups with 7 animals in each group. Body weights of all rats were measured at the beginning of the experiment.

No application was administered to the control group during the experiment period of 15 days. To the Vitamin D group, 200 IU/day Vitamin D was given orally every day.

A single dose of CP (200 mg/kg) was administered intraperitoneally (i.p) to the CP group at the beginning of the experiment. CP+Vitamin D group was administered as a single dose of 200 mg/kg CP i.p and 200 IU / day Vitamin D was administered orally every day during the 15-day experiment period. At the end of the experiment, after measuring the body weights of all rats, blood and liver tissues were

taken after the rats were anesthetized. Biochemical analyzes were performed to determine total antioxidant level (TAS), total oxidant level (TOS), Asprosin level and tissue malondialdehyde (MDA) levels.

In addition, liver tissues were prepared for examination by Histopathological, TUNEL and Immunohistochemical techniques. The findings of the study were examined and photographed under the research microscope. Compared to the control group, the body weights of the rats exposed to Cyclophosphamide were found to be statistically significantly reduced compared to their initial weights.

In addition, histopathological examinations revealed significant hemorrhage, increase in inflammatory cells, sinusoidal dilatation, increase in connective tissue, and loss of glycogen in hepatocytes. As a result of the examination of TUNEL staining for the detection of apoptotic cells under light microscope, it was seen that TUNEL positivity increased statistically in the Cyclophosphamide group. However, it was observed that TOS and MDA levels increased, while TAS and asprosin levels decreased. Compared to the cyclophosphamide group, the body weights of the rats in the vitamin D treated group increased statistically significantly compared to their initial weights.

In addition, it was observed that histopathological damage decreased in the treatment group and the number of TUNEL positive cells decreased compared to the Cyclophosphamide group. However, it was determined that TOS and MDA levels decreased, while TAS and asprosin levels increased compared to the Cyclophosphamide group.

As a result, it was observed that vitamin D suppressed oxidative stress and decreased tissue damage and increased asprosin level against liver damage induced by

cyclophosphamide. It was concluded that more comprehensive and advanced studies are needed to elucidate the role of asprosin in oxidative damage associated with chemotherapeutic response.

Key Words: Asprosin, Vitamin D, Cyclophosphamide, Liver, Rat

3. GİRİŞ

3.1. Karaciğer Embriyolojisi

Fetal gelişimin başlangıcında yaklaşık gebeliğin üçüncü haftasının ikinci kısmında hepatik divertikül ön bağırsağın kaudal kısmından ventral bir çıkıntı olarak gelişmekte olup aynı zamanda kalp belirli bir seviyede fibroblast growth faktör (FGF) salgılayarak bipotent hücreleri etkileyip hepatik divertikül oluşumunu uyarmaktadır

(1). Karaciğer tomurcuğu olan bu çıkıntı, gelişmekte olan kalp ile orta bağırsak arasındaki splanchnik mezoderm kitlesine, septum transversum'a doğru uzanarak, ventral mezenter ve diyaframın bir parçası olan septum transversum'u oluşturur (2). Ventral mezenter karaciğer divertikulumu yardımıyla zamanla gelişmeye bağlı olarak iki kısma ayrılır (1,2). Divertikulum'un kranial bölgedeki parçası daha büyük olup endodermal hücreler zamanla çoğalarak hücre kordonları ağını ve safra sisteminin intrahepatik kısmının epitel tabakasını meydana getirir (2). Bu hepatik hücre kordonları, endotel kaplı hücrelerinin etrafını çevreleyerek karaciğer sinüzoidlerinin ilkel halini meydana getirirler (1). Karaciğerin fibroz ve hematopoetik kısmı mezenchimal dokudan köken almaktadır (2). Karaciğer ventral çıkıntı olarak gelişip daha sonra 5. Haftadan itibaren daha hızlı gelişim göstermekte ve 10. haftada karın boşluğunun büyük bir kısmını kaplamaktadır (2). Karaciğerin gelişimi için gerekli kan umbilikal venden karşılanmaktadır (1). 6. haftadan itibaren hematopoez başlamaktadır ve 9 haftanın ortalarında karaciğer fetusun toplam ağırlığının yaklaşık %10 oluşturur.

12. haftada karaciğerde safra üretimi başlar (2).

Başlangıçta karaciğer loplarının büyüklükleri aynı olmasına rağmen zamanla sağ lop daha büyük olur (2). 12. haftada başlayan safra üretimiyle birlikte oluşan kanallar divertikülün küçük kaudal parçası safra kesesini, divertikülün sapıda sistik

kanalı meydana getirir (1). Bu kanalları duodenuma bağlayan kordonlardan safra kanalı (koledok) gelişir (2). Duodenum halkasının ön yüzüne bağlı olan bu kanal duodenumun büyümesiyle zamanla arka yüze doğru ilerleyerek 13. haftanın sonlarına doğru duodenuma koyu yeşil bir renk verir (1). Ligamentler karaciğerden midenin küçük kurvaturuna (hepatogastrik lig.) ve karaciğerden duodenuma (hepatoduodenal lig.) daha sonra karın ön duvarına falsiform ligament şeklinde uzanmaktadır (2). Ayrıca umblikal ven, umblikal kordondan (göbek kordonu) çıkıp karaciğere ulaşırken falsiform ligamentin serbest kenarı boyunca seyrederek (2). Mezogastriumdan kaynaklanan ventral mezenter karaciğerin visseral peritonunu da oluşturmaktadır olup karaciğer, area nuda hariç peritonla örtülüdür (1).

3.2. Karaciğer Anatomisi

Deriden sonra vücudun en büyük organı olan karaciğer, kırmızımsı veya hafif kahverengi renkte ve gevrek yapıdadır. Dışta tunica serosa (peritoneum) ve onun iç kısmında sağlam fibröz bir zar olan tunica fibrosa (Glisson kapsülü) ile sarıdır. Sağlam ve elastiki olmasına rağmen kolaylıkla parçalanabilir ve çok damarlı olması nedeniyle yaralanmaları büyük kanamalara yol açmaktadır (3).

Karaciğer insan vücudunda regio hypochondriaca dextra, regio epigastrica ve biraz da regio hypochondriaca sinistra'ya yerleşmiş ve diaphragmanın alt yüzüne gevşek bağ dokusu ile tutunmuş şekilde bulunur. Uzunluğu 20-25 cm, genişliği 12-14 cm, yüksekliği 15-16 cm'dir. Yetişkinlerde ağırlığı yaklaşık 1000-2500 gr olabilen karaciğer, erkeklerde kadınlara göre daha ağırdır. Fetüste karaciğerin vücut ağırlığına oranı, erişkinlerdekinden daha fazladır. Erişkinde vücut ağırlığının %2'si, yeni doğanlarda ise %5'i kadardır.

Yeni doğanda hemen hemen tüm abdomeni dolduran karaciğerin biraz palpe edilmesi normaldir ancak yetişkin bireylerde palpe edilirse, kişide karaciğer büyümüş demektir (4). Vücuttaki en büyük bez olan karaciğer; zararlı maddeler ve ilaçların detoksifikasyonu, vitaminlerin depolanması, kanın depolanması ve filtrasyonu, safra ile heparin salgısı, karbonhidrat-yağ ve protein metabolizmasıyla ilgili fonksiyonları gerçekleştirmektedir (5).

Karaciğer, facies diaphragmatica ve facies visceralis adında iki yüzden oluşmakta ve margo inferior adında bir kenarı bulunmaktadır. Facies diaphragmatica, daha parlak ve konvektir ayrıca bu yüzün lig. coronarium yaprakları arasında kalan area nuda (pars affixa) dışındaki kısmı peritonla örtülüdür (4). Bu yüzün üst kısmında impressio cardiaca görülür. Facies visceralis ise iç organlara bakan konkav bir yüzüdür. Hemen hemen her tarafı peritonla örtülü olan bu yüz, bazı yapılarla “H” harfine benzer şekilde 4 kısıma ayrılır. H harfinin sağ kısmını sulcus sagittalis dexter, sol kısmını fissura sagittalis sinister, horizontal kısmını ise porta hepatis oluşturur. Sulcus sagittalis dexter’in üst kısmını sulcus venae cavae, alt kısmını fossa vesica biliaris oluşturur (6). Fissura sagittalis sinister’in üst kısmını fissura ligamenti venosi, alt kısmını fissura ligamenti teretis yapar. Bunun dışında bu yüzde komşuluğu bulunan organların izleri olan impressio gastrica, impressio oesophagea, impressio colica, impressio suprarenalis, impressio duodenalis, impressio renalis görülür (5,6).

Karaciğer anatomik olarak 4 lobdan oluşur;

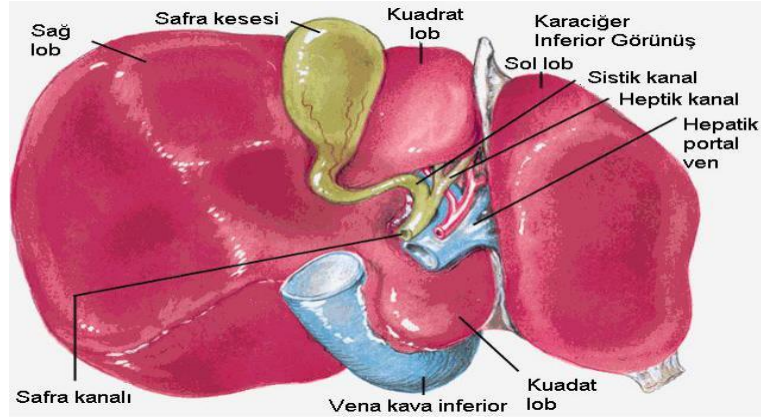
1. Lobus hepatis dexter: Altında safra kesesi bulunan en büyük kısımdır.

Regio hypochondriaca dextra’da bulunur. Tüm karaciğerin 5/6 sını oluşturur.

2. Lobus hepatis sinister: Karaciğerin ikinci büyük parçası olan bu kısım regio hypochondriaca sinistra ve regio epigastrica’da bulunur. Karaciğerin 1/6 sını oluşturur.

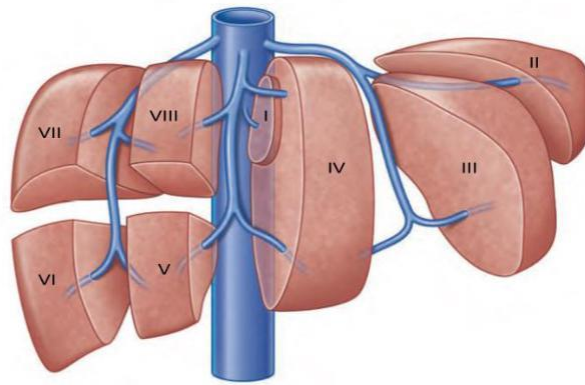
3. *Lobus caudatus*: Sağ lobun visseral yüzünde ve porta hepatis'in arka tarafında bulnur.

4. *Lobus quadratus*: Sağ lobun visseral yüzünde ve porta hepatis'in ön tarafında bulunur (6).



Şekil 1. Karaciğerin alttan görünümü (7).

Karaciğerin fonksiyonel anatomisi Couinaud tarafından parankimdeki portal venöz dalların dağılımına dayalı olarak, fonksiyonel sekiz segmente ayırmasına dayanmaktadır (8). Karaciğer, portal venin dört ana dalı tarafından dört portal bölgeye ayrılmıştır. Lobus caudatus ilk segment olarak kabul edilir ve bu segmentler Romen rakamıyla gösterilir (9, 10).



Şekil 2. Karaciğer segmentleri. I: Lobus caudatus, II: Segmentum laterale superior, III: Segmentum laterale inferior, IV: Segmentum mediale superior-inferior, V: Segmentum anterior inferior, VI: Segmentum posterius inferior, VII: Segmentum posterius superior, VIII: Segmentum anterior superior (8).

Porta hepatis, karaciğerin alt yüzeyinde derin bir transvers fissürdür. Önde lobus quadratus ile arkada processus caudatus arasında yer alır ve karaciğer parankimine ilerleyen v. portae hepatis, a. hepatica propria ve plexus hepaticus ile karaciğerden çıkan ductus hepaticus dexter, ductus hepaticus sinister ve bazı lenf damarlarını içerir. Tüm bu yapılar, fibröz Glisson kapsülünün devamı olan ve karaciğer parankimi boyunca ilerlerken damarları ve safra kanallarını çevreleyen gevşek bağ dokusundan oluşan perivasküler bir kılıf içinde sarılıdır (4,7).

3.2.1. Karaciğer Kanlanması

1 -V. portae hepatis (%70)

2- A. hepatica propria (%30) ile olmaktadır.

V. lienalis ile v. mesenterica superior'un L2 seviyesinde pankreas başı arkasında birleşmesi ile v. porta hepatis oluşur. Porta hepatis, barsaklardan absorbe edilen besin maddeleri ve toksik maddeleri, dalakta harap olmuş kan hücrelerini ve pankreasın endokrin salgısı ile gastrointestinal kanalın enteroendokrin hücrelerinin salgısını içerir ve gastrointestinal sistemin abdomino pelvik bölümünden aldığı oksijenden fakir kanı karaciğere taşır (9). A. hepatica communis'in bir dalı olan a. hepatica propria ise aorta'dan aldığı oksijenden zengin kanı karaciğere taşır (10).

A. hepatica ve v. porta hepatis, karaciğer içerisinde birlikte dallanarak karaciğerin segmentasyonuna uyarlar ancak v. hepatica'lar bu segmentasyona uymazlar. Karaciğerde, portal venin dalları, hepatik arter ve safra kanal sisteminin dalları 'portal triad' olarak adlandırılan bir oluşumda bir arada bulunurlar (9, 10). Hepatik arter, hepatositleri kanlandıran sinüzoidal kapillerleri desteklemekte ve ayrıca sinüzoidler, hepatositlerle sıkı ilişki içinde olup kan ve karaciğer hücreleri arasında maddelerin değişimi sağlanmaktadır (11). Sinüzoidlerde bulunan kan santral vene,

santral ven ise sublobüler venlere boşalarak daha sonra hepatik venler aracılığı ile organı terkeder. Karaciğerin v. centralis'lerinin birleşmesiyle oluşan v.hepatica'lar diaphragmanın hemen altında v. cava inferior'a açılırlar (12).

3.2.2. Karaciğerin Lenf Sistemi

Karaciğer lenf üreten büyük bir organ olup, ductus thoracicus'a gelen lenfa'nın yaklaşık 1/4-1/2'si arasındaki kısmı karaciğer tarafından sentezlenir (12,13). Karaciğerin her iki yüzünün ön bölümünün lenf damarları, nodi lymphatici coeliaci'ye oradanda cisterna chyli'ye drene olup her iki yüzünün arka bölümlerinin lenf drenajı ise nodi lymphatici phrenici'ye ya da nodi lymphatici mediastinales posteriores'e drene olurlar (13).

3.2.3. Karaciğerin İnnervasyon Sistemi

Karaciğerin innervasyonu, plexus coeliacus'dan köken alan sempatik ve parasempatik liflerle meydana gelmekte olup safra kesesi ise mideden duodenuma yağlı besinlerin geçisi sırasında, duodenum mukozasında üretilen kolesistokinin hormonun etkisiyle kasılmaktadır (14). Sinir lifleri torasik ganglia, çölyak plexus, vagus, safra yolu, portal ven ve hepatik arter pleksusunu oluşturan sağ frenik sinirden meydana gelmektedir (14,15). Arterler daha çok sempatik liflerle, safra yolları ise hem sempatik hem de parasempatik liflerle innerve olurlar ayrıca miyelinsiz sempatik lifler hepatositlerle ilişkilidir (15).

3.3. Karaciğer Histolojisi

Diyaframın altında, sağ üst bölgede lokalize olan karaciğer deriden sonra gelen en büyük organdır (15). Üretilen safranın safra kanalları yoluyla duodenuma

boşaltması nedeniyle, ekzokrin nitelikte olmasına ve sentezlediği bazı ajanları doğrudan kana vermesi özelliğiyle de endokrin bir bez özelliği göstermektedir (17). Peritonla çevrelenmiş olan karaciğer, dış kısmında fibroz karakterde, Glisson kapsülü adı verilen bir tabakayla kaplıdır (18).

3.3.1 Karaciğerin Yapısal Organizasyonu

3.3.1.1. Parankim

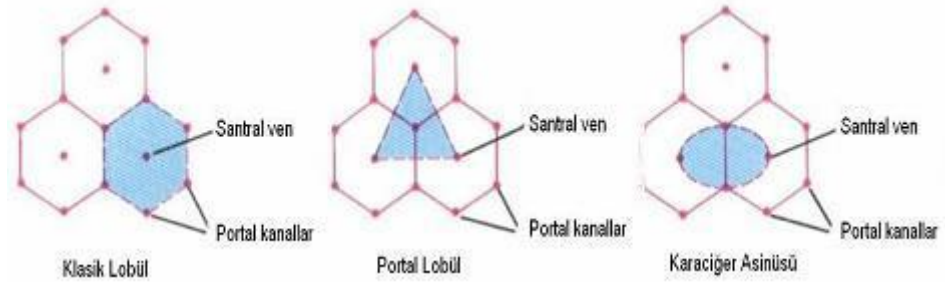
Karaciğer, esas hücreleri olan hepatositlerden meydana gelir (18). Hepatositler birbirleriyle bağlantılı olup karaciğer parankimini oluşturan hepatositlerin düzenleniş şekillerine bağlı olarak üç karaciğer lobül modeli vardır (19).

1. Klasik lobül; Klasik hepatik lobül, kabaca altıgen şeklindedir (18). Her bir lobülün merkezinde, santral ven bulunmakta olup santral ven içine sinüzoidlerden kan direne olur (9). Santral venden çevreye doğru hücre tabakaları ve sinüzoidler ışınsal şekilde uzanır (17). Lobüllerin köşeleri portal alanlar olarak isimlendirilir ve portal triad olarak isimlendirilen gevşek bağ dokusunu içerir (16). Bu bağ dokusu, karaciğerin dışına doğru ilerleyerek fibröz kapsül (Glisson) ile devam eder (19). Portal alan, lobüllerin en dışındaki hepatositler ile sınırlıdır (17). Lobülün periferinde'ki hepatositler ile bağ dokusu elemanları arasındaki alana Mall aralığı denir (16). Bu aralığın, karaciğerde lenfatiklerin orijin aldığı aralıklardan biri olduğu düşünülmektedir (17).

2. Portal lobül; Üç santral ven arasında yer alan üçgen şekilli alandır. Ortada portal alan bulunur. Dış kenarları, portal triada yakın üç santral ven arasındaki alandır. Karaciğerin esas ekzokrin fonksiyonu, safra salınımı olup, portal lobül modeli daha

çok karaciğerin ekzokrin fonksiyonunu vurgulamaktadır. Bu modelde lobülün bu parçalarında safra salgılanır ve aksiyal safra kanalına direne edilir (16,17).

3. Karaciğer asinusu; Kan perfüzyonu, metabolik aktivite ve karaciğer patolojisi arasında en iyi korelasyonu sağlayan yapısal ünittir. Karaciğer asinusu, hepatik parankimin en küçük fonksiyonel birimi olup asinusun kısa eksen, iki portal alan arasında, uzun eksen ise iki santral ven arasında bulunan çokgen alandır. Kısa eksene en yakın bölüm zon 1, en uzak bölüm zon 3 olarak bilinir. 2. zon karaciğer asinüsünün santral bölgesidir (16,17).

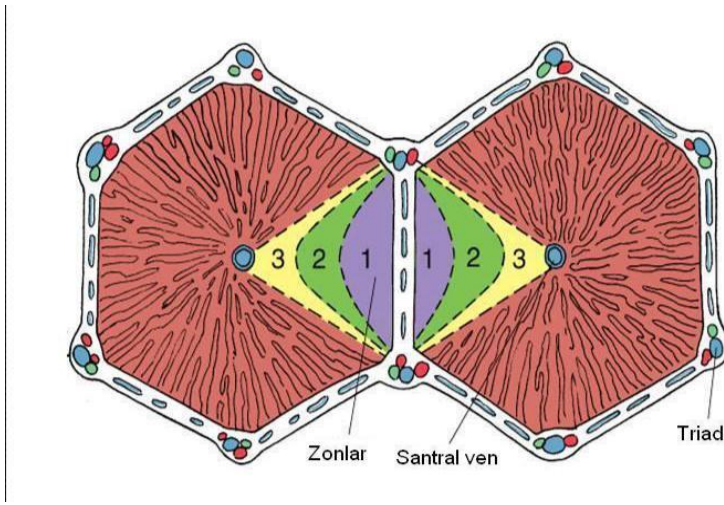


Şekil 3. Karaciğer lobülünün histolojik sınıflandırılması (12).

Zonlara ayırma, karaciğer parankiminde hepatik hücrelerin vasküler perfüzyonunun derece ve kalitesiyle ilgili dejenerasyon, rejenerasyon ve spesifik toksik etkilerin tanımlanması ve yorumlanması açısından önemlidir (17). Sinüzoidal kan akışının bir sonucu olarak, hepatositlerin oksijen basıncı, metabolik aktivitesi ve hepatik enzimlerin dağılımı her üç zonda değişiklik göstermektedir. İskemi ve toksik maddelere maruz kalmaya bağlı oluşan karaciğer hasarının dağılımı, bu zonal yorumlamayı kullanarak açıklanabilir (16,18).

Zon I'deki hücreler, sinüzoidal kandan gelen oksijen, toksik maddeler ve besin maddelerini ilk alan hücrelerdir ve safra kanalı stazını takiben oluşan morfolojik değişiklikleri ilk gösteren bir bölgedir. Bu hücreler, aynı zamanda bozulan dolaşımda

ilk ölen hücreler olup aynı zamanda ilk rejenere olan hücrelerdir (15). Diğer yandan, zon III'teki hücreler azalmış perfüzyon durumunda iskemik nekrozu ilk olarak gösteren hücrelerdir. Yağ birikimini de ilk olarak bu hücreler gösterirler. Bu hücreler, toksik maddelere ve safra stazına ise en son yanıt verirler. Zon I ve III arasında, aynı zamanda enzim aktivitesi, sitoplazmik organellerin sayı ve boyutları ve sitoplazmik glikojen depozitlerinin boyutları arasında değişiklikler bulunmaktadır. Zon II'deki hücrelerin fonksiyonel ve morfolojik karakteristikleri, zon I ve III arasındadır (17).



Şekil 4. Karaciğer lobülünün fonksiyonel sınıflandırılması (18).

Santral venden itibaren periferie doğru ışınal kordonlar halinde hücre kordonları lobülünün yapısında rol oynar. Hepatosit çekirdeği, büyük ve sferik olup hücre merkezinde bulunur. Erişkin karaciğerinde pek çok hücre çift çekirdeklidir. Heterokromatin, nükleoplazmada dağınık demetler şeklinde ve nüklear zar altında ayrı bir bant şeklinde bulunur. Her bir çekirdekte iki veya daha fazla iyi gelişmiş çekirdekçik bulunur(19).

Her hücrenin 3 tip yüzü vardır

1. Perisinüzoidal aralığa bakan yüz,
2. Komşu karaciğer hücresiyle arasında tübüler bir aralık (safra kanalikülü) bırakıp safra kanalikülünü oluşturan yüz,
3. Komşu karaciğer hücresiyle sıkıca temas eden yüz.

Perisinüzoidal aralığa bakan yüzde çok sayıda, düzensiz şekil ve büyüklükte uzun mikrovilluslar bulunur. Böylece bu yüz 6 kat genişleyerek, sekresyon ve absorpsiyon için geniş bir yüzey oluşturulabilir (19). Hepatosit yüzeyinden kanaliküle doğru uzanan mikrovilluslar ATPaz gibi enzimleri taşıyan membran alanlarını barındırırlar (20). Safra kanalikülleri lobülün periferinde yer alan tek katlı kübik epitel ile döşeli Herring kanalları ile devam eder ve herring kanallarının epitel hücrelerinin yüzeyinde de mikrovilluslar bulunur (19, 20).

Hepatositler aktif sentez ve sekresyon yapan hücreler olduklarından dolayı organelden zengindirler. Ökromatik nükleus yapısı, hücre aktivitesinin önemli bir göstergesidir. Agranüler endoplazmik retikulumları sayesinde zararlı toksik maddelerin detoksifikasyonunu gerçekleştirebilirler. Toksik ürünler veya ilaçların yıkımı ve konjugasyonu için gerekli enzimler agranüler endoplazmik retikulumu membranlarında bulunmaktadır. Toksik ajanlara maruz kalındığında, alkol, ilaç kullanımı sonrasında agranüler endoplazma retikulumu genişler. Agranüler endoplazma retikulumu kolesterol ve lipid sentezinden sorumlu enzimleri içerir (16).

Düz endoplazmik retikulumunun membranlarında yerleşik enzimler şu fonksiyonlardan sorumludur.

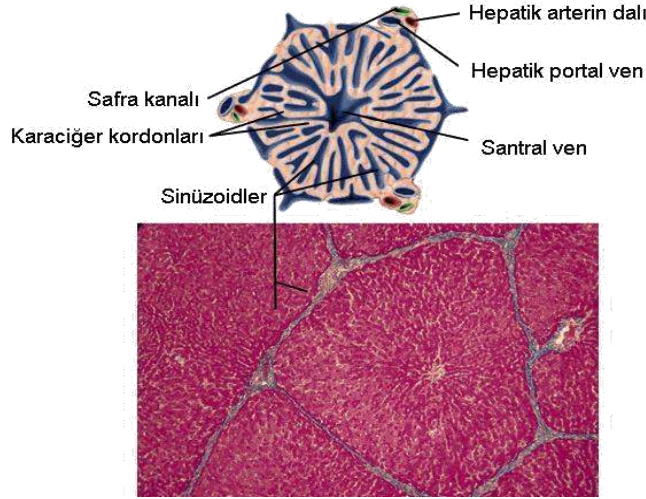
1. Kolesterol ve safra tuzlarının sentezi
2. Bilurubin, steroidler ve ilaçların glukronik asit ile konjugasyonu,

3. Glikojenin glikoza yıkımı,
4. Serbest yağ asitlerinin trigliseritlere yıkılımı,
5. Tiroid hormonlarından iyodun uzaklaştırılması,
6. Lipid de eriyebilen ilaçların detoksifikasyonu.

Golgi aparatının safra kanallarına yakın yerleşmesi safra sekresyonunda rolü olduğunu gösterir (16). Peroksizomlar; Hepatositler yaklaşık 200 ile 300 peroksizom içerir. Her peroksizom yaklaşık bir peroksizom, farklı metabolik yollarda kullanılacak olan yaklaşık olarak 50 adet enzimi içermektedir (19). Oksijen kullandıklarından dolayı serbest radikal oluşumuna neden olmakta ve hidrojen peroksiti, su ve oksijene ayıran katalaz enzimini ihtiva etmektedirler. Peroksizomlar, yağ asitlerinin β oksidasyonu, glukoneogenez ve purin metabolizmasında da görev almaktadırlar (16).

3.3.1.2. Bağ Dokusu Stroma

Visseral periton karaciğeri en dıştan çevrelemektedir. Visseral periton mezotelyum ve hemen altında çok ince bir bağ dokusundan oluşur. Hilumdan Glisson kapsülü içeriye doğru invajine olup porta hepatisten başlayıp organ içine doğru dallanır ve hepatik arterle portal venin damar yolu ile safra kanallarına desteklik sağlayan bağ doku şeklinde devam eder. Bu durum karaciğerde lob ve lobülleri meydana getirir (14).



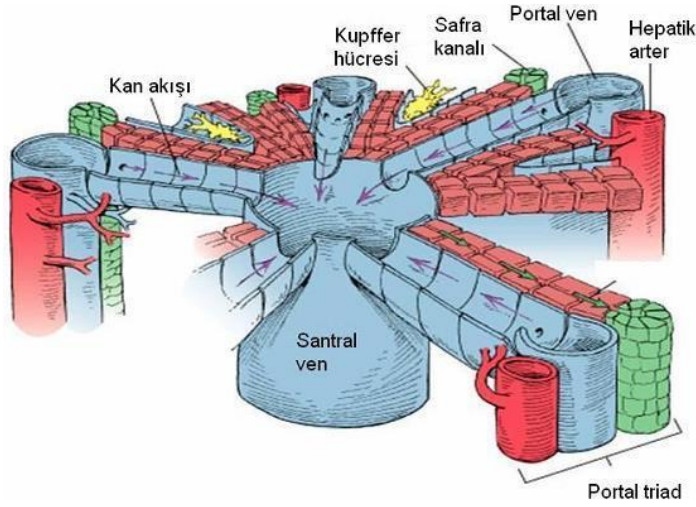
Şekil 5. Karaciğer lobülünün yapılanması (18).

3.3.1.3. Sinüzoidal Kapillerler (Sinüzoidler)

Portal alan çevresindeki hepatositler bağ dokusuyla desteklenmiş zayıf bir tabaka halinde bulunmaktadırlar. Portal aralıkta bulunan portal venin ve hepatik arterin dalları, hepatositlerin oluşturduğu sinüzoidler yardımıyla kan boşalımı gerçekleşir (19). Hepatik sinüzoidler ince, devamlı olmayan bir endotelle kaplı olup sinüzoidal endotel, devamlı olmayan bir bazal laminaya sahiptir (20). Komşu endotelyal hücreler arasında büyük pencereler bulunur. Hepatik sinüzoidler, diğer sinüzoidlerden farklı bir hücre tipi olan sinüzoidal makrofajlar (Kupffer hücreleri)'dir. Kupffer hücreleri, mononükleer fagositik sisteme aittir (21). Bu hücrelerin gelişimi kemik iliğinde sırası ile promonosit, monoblast ve monosit farklılaşması ile başlar (22). Monositler kanda kupffer hücrelerine dönüşerek karaciğere göç ederler uzantılı yıldız şekilli bu hücrelerin gövdelerinin büyük bölümü lümende olup sitoplazmik uzantıları ile sinüzoid duvarına tutunurlar (22).

Bu hücreler kan yolu ile gelen antijenleri ve hasarlanmış eritrositlerden kaynaklanan sitoplazmik parçaları ve demiri fagosit etmekle birlikte ferritini

hemosiderin granülleri şeklinde depolarlar (23, 22). Bu hücreler dışında karaciğerde pit hücreleri olarak isimlendirilen bir lenfosit subpopülasyonu bulunur. Parankimal olmayan hücrelerin yaklaşık %1'ini oluşturan bu büyük granüler lenfositler diğer organlarda yerleşen natural killer hücrelerin karşılığıdır. Bu hücrelerde kupffer hücreleri gibi kemik iliği kökenlidirler. Karaciğerde kalma süreleri yaklaşık iki hafta kadardır. Hayatta kalmaları kupffer hücrelerine bağımlıdır (24).



Şekil 6. Karaciğerdeki kan ve safra akış yönleri (18).

3.3.1.4. Perisinüzoidal Aralıklar (Disse aralıkları)

Sinüzoid endoteli ile hepatositler arasında bulunur. Perisinüzoidal aralık, kan ve karaciğer hücreleri arasında materyallerin değişim alanı olup perisinüzoidal aralık (Disse aralığı), hepatositlerin bazal yüzeyi ile sinüzoidleri çevreleyen endotelial hücrelerin ve kupffer hücrelerinin bazal yüzeyi arasında bulunmaktadır (25).

Bu aralığa, hepatositlerin bazal yüzeyinden, küçük ve düzensiz mikrovilluslar uzanır (20).

Endotelial tabakadaki büyük yarıklardan ve devamlı bir bazal laminanın yokluğundan dolayı, sinüzoidlerdeki kan plazması ve hepatosit plazma membranı

arasında önemli bir engel oluşmaz (20). Hepatosit tarafından sentezlenen protein ve lipoproteinler, perisinüzoidal aralık yardımıyla kana verilir (20,25). Fetal karaciğerde, kan damarları ve hepatositler arasındaki aralık, kan oluşturan hücre adalarını içermekte olup erişkinlerde kronik anemi durumlarında, perisinüzoidal aralıkta kan oluşturan hücreler tekrar görülebilir (25).

Sinüzoidal alanda yerleşen liposit veya ito hücresi olarak (yağ depolayan hücre, stellat hücre) bilinen hücrelerde bulunur (17). Mezenkimal orjinli olan bu hücreler stoplazmik lipid damlalarında retinil esterleri şeklinde A vitamini depolarlar (20). Altın kloridle de belirlenebilen bu hücreler rutin yöntemlerle sitoplazmalarında yer alan lipid damlaları nedeniyle kolay tanınırlar (17). Bu hücrelerden retinol olarak salınan A vitamini proteinlere bağlanarak retinaya taşınırlar. İto hücrelerinin ekstrasellüler matriks proteinlerini ve proteoglikanları, büyüme faktörleri ve sitokinleri salgılayabildikleri ve prostoglandin ve tromboksan A₂ gibi regülatuar maddelere cevap olarak sinüzoid lümeninin çapını ayarlayabildikleri bilinmektedir. Normal şartlarda karaciğer hücrelerinin %5-8'ini oluşturan ito hücrelerinin lipid depolamaları yanı sıra lipid yapısındaki antijenleri Natural Killer hücrelerine sunarak onların proliferasyonunu stimüle eden antijen sunan hücreler olabilecekleri bildirilmiştir. Karaciğer hasarını takiben ito hücreleri aktive olabilmekte ve hücrelerde proliferasyon, kontraktilite ve kemotaksis görülmektedir. İçerdikleri desmin ve α aktin sayesinde kasılarak sinüzoidin vasküler rezistansını artırır (23).

Kronik inflamasyon, siroz gibi belirli patolojik şartlarda, ito hücreleri lipit ve A vitamini depolama yeteneklerini kaybederler ve miyofibroblast karakteristikleri olan hücrelere dönüşürler. Bu hücrelerin hepatik fibrojeneziste önemli rol oynadıkları gözlenmiştir. Bunlar, Tip I ve tip III kollajeni sentezler ve perisinüzoidal aralıklarda

depolarlar ve karaciğer fibrozisine yol açarlar. Bu kollajen, portal aralığın bağ dokusu ile ve santral veni çevreleyen bağ dokusu ile devam eder. Perisinüzoidal fibröz stromadaki artış, karaciğerin toksik maddelere karşı erken bir sinyaldir. İlaveten, ito hücreleri karaciğer hasarından sonra ekstrasellüler matriksin yeniden yapılanmasında da rol oynarlar (24).

3.3.1.5. Safra Yolları

Safra kanalikülleri, hepatositlerin yüzeyinde bitişik oluklardan oluşan küçük kanallar olup safra kanalikülleri, 6 yüzlü hepatositlerin 4 yüzünde tam bir halka oluştururlar (22). İki bitişik hepatositin mikrovillusları, kanaliküler şeklinde lümene yayılır. Kanaliküllerin plazma membranında Adenozin tri fosfataz (ATPaz) ve diğer alkalen fosfatazlar (ALP) lokalize olması safra sekresyonunda, aktif bir işlev görmesini sağlamaktadır. Safra akımı, santral ven bölgesinden portal alana doğrudur (kan akışının tersi yönde).

Portal alan yakınında fakat hala lobülün içindeyken safra kanalikülleri birleşerek kısa intrahepatik kanalları oluşturur. Bunlar Hering kanallarıdır ve kübik non-hepatik hücrelerle döşelidir. Bu kanal epiteli, safra yollarının distal bölümü gibi devamlı bir bazal lamina ile sınırlıdır. İntrahepatik safra kanalları safrayı, hepatik kanallara taşırlar. Ekstrahepatik safra kanalları ise safrayı safra kesesi ve duodenuma taşırlar (24).

3.4. Karaciğer Fizyolojisi

3.4.1. Karaciğerin Depo İşlevi

Hepatik venlerde ve hepatik sinüslerdeki bulunan ortalama kan miktarı total kan hacminin yaklaşık %10'nu ihtiva etmektedir. Çeşitli patolojik durumlarda bu oran

değişmektedir. Örneğin; sağ atriyumda artan basınç artışına bağlı olarak 0,5 ile 1 lt ekstra kan hepatik venler ve sinüslerde depo edilmekte ve kısa dönemde kan hacminin azalması veya ihtiyaç duyulduğunda artmasını sağlayan venöz bir organ olarak işlev görmesini sağlamaktadır (21).

3.4.2. Karaciğerin Kan Temizleme İşlevi

Karaciğerde venöz sinüslerde bulunan Kupffer hücreleri kanda bulunan zararlı patojenleri fagositoz yoluyla filtre etmektedir. Bundan dolayı barsaklardan karaciğere gelen kanın, sistemik dolaşıma katılmadan önce kanın temizlenmesini sağlamaktadır (22).

3.4.3. Karaciğerin Metabolik İşlevleri

Oldukça karmaşık anabolik ve katabolik reaksiyonların gerçekleştiği bir organ olan karaciğer, karbonhidrat metabolizmasında glikojen sentezi ve depolanmasının yanı sıra glikoneogenez ile ara ürünlerin dönüşümlerini gerçekleştirerek metabolizmaya katkı sunmaktadır (23). Ayrıca aminoasit ve plazma proteinlerinin sentezi ile üre oluşumunda etkili olduğu için protein metabolizmasına katılmaktadır (22-23). Son olarak karaciğerin metabolik işlevleri, lipid metabolizmasında yağ asitlerinin oksidasyonu, lipoproteinlerin sentezi, kolesterol ile fosfolipid sentezi, karbonhidrat ve proteinlerin lipidlere dönüştürülmesi, şeklinde özetlenebilir (24).

3.4.5. Safranin Sentezlenip Salgılanması

Karaciğerde sentezlenen safra; yağların sindirim ve emiliminde, bilirubin ve kolesterol sentezlenmesinde etkili olup ayrıca yapısında inorganik tuzlar, su

elektrolitler, safra tuzları, yağ asitleri, safra pigmentleri, lesitin ve esansiyel komponentlere sahiptir (23).

3.4.5.1. Karaciğerin Diğer Metabolik Fonksiyonları

Karaciğerin depo ve birden fazla metabolik işlevi bilinmekle birlikte tam olarak görevleri aydınlatılamamış olsa bile yağda eriyen vitaminlerin depolandığı ve ihtiyaç halinde salınımının gerçekleştiği, aynı zamanda apoferritin-ferritin sisteminin düzenlendiği depo bir organ olarak işlev görmektedir (24). Sentezlediği safra ile çeşitli ajanların etkisizleştirilmesi ya da metabolizmaya katılmasında etkili olmasının yanı sıra kortizol, aldosteron, steroid hormonlar gibi çeşitli endokrin bezlerden salgılanan sekratuar ürünlerin modifikasyonunda, fibrinojen, protrombin, globulin, faktör V, faktör VII, faktör IX ve faktör X' gibi koagülasyon da rol oynayan birçok maddenin sentezlenmesinde işlev aldığı bilinmektedir (21).

3.5. Siklofosfamid

50 yıldan fazla bir süredir siklofosfamid (SP), lenfoma, meme kanseri ve lösemi dâhil olmak üzere çeşitli kanser türlerini tedavi etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (26). Bununla birlikte, SP'nin klinik uygulamasında, hepatotoksisite gibi görülen ciddi yan etkiler kullanımını sınırlandırmaktadır (27). SP'nin toksik etkileri temel olarak iki ana metaboliten kaynaklanmaktadır (28). Antineoplastik kısım olan fosforamid mustard ve toksik ajan olan akrolein metabolitidir (29).

Bu metabolitler, CYP 3A4, 2B6, 2C9 ve 2C19 dahil olmak üzere sitokrom P450 izoenzimleri tarafından oluşturulur (30). Akrolein oldukça reaktif bir α , β -doymamış grupta sahip bir aldehittir ve lipid peroksidasyonunun başlatıcısı olarak tanımlanmıştır (29, 30). Bundan dolayı, klinik uygulamada SP kullanımını sınırlayan

akrolein maruziyeti tüm hücrelerdeki sitotoksitenin ana nedenidir (30). Oksidatif stres ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi, SP'nin neden olduğu hepatotoksisitede yer alan ana mekanizmalar olup reaktif oksijen türleri, hücre zarının lipid peroksidasyonuna ve dolayısıyla bütünlüğünün kaybına neden olmaktadır (31).

Histopatolojik incelemede SP'nin hepatositlerde dejenerasyon ve vakuolizasyona neden olduğu, hepatosit hücrelerinde nekroz, periportal lökosit infiltrasyonu, sinüzoidal dilatasyon, tıkanıklık ve kanama gibi patolojik değişiklikler meydana getirdiği daha önceki çalışmalarda ifade edilmiştir (32). Aynı zamanda SP'nin metabolitlerinden biri olan fosforamidlerin ise apoptoza neden olduğu ve akrolein gibi DNA üzerinde hasar oluşturduğu bildirilmiştir (33). DNA'ya etki eden artan serbest radikaller, kaspaz-3 sinyallemesini aktive edip hücre ölümünü teşvik etmektedir (34).

SP, proinflamatuvar sitokinlerin seviyesini yükseltmesi ve anti-inflamatuvar sitokinleri azaltması nedeniyle karaciğerde apoptozu indüklemektedir (35). Çeşitli çalışmalarda, diyetle alınan antioksidan desteğinin, SP dâhil anti-kanser ilaçlarla ilişkili yan etkilerin gelişimini azaltabileceğini ileri sürmektedir (35,36). Ayrıca eksojen antioksidanların, toksik maddelerin neden olduğu oksidatif stresi azaltmada faydalı olduğu gösterilmiştir (37,38).

3.6. Adipoz Doku

Yağ dokusu, enerji homeostazının düzenlenmesinde merkezi bir organdır (39). Beyaz yağ dokusu, diğer organlar için önemli bir enerji deposu işlevi görürken, kahverengi yağ dokusu, soğğun neden olduğu adaptif termojenez için lipidleri depo etmektedir (40). Yağ dokuları, merkezi sinir sisteminden gelen iştah sinyallerini ve periferik dokulardaki metabolik aktiviteleri düzenleyerek sistemik enerji dengesinin

kontrolünü gerçekleştirmek için çeşitli hormonlar, sitokinler ve metabolitler sentezler (41). Beslenme durumundaki değişikliklere yanıt olarak, adipoz doku hücrelerde kantitatif ve kalitatif değişiklikler dahil olmak üzere sürekli değişime uğramaktadır (40). Artan kanıtlar, obezitede artan yağ dokusunun yeniden şekillenmesinin, yağ dokusu işlevi ile yakından ilişkili olduğunu göstermektedir (41). Adipositlerin sayısındaki ve boyutundaki değişiklikler, adipokin salgılanmasını, adiposit ölümünü, lokal hipoksi ve yağ asidi akışlarındaki değişikliklerle birlikte genişlemiş yağ dokusunun mikro ortamını etkilemektedirler (41,42). Eşzamanlı olarak, mikro ortamda bağışıklık hücreleride dâhil olmak üzere adipoz dokudaki stromal vasküler hücreler, tüm adipoz dokunun yeniden modellemesinde ve düzensiz olan ölü adiposit klirensi, adipogenez ve anjiyogenez gibi çok sayıda adaptif süreçte yer almasına neden olmaktadır (39). Aşırı beslenme, kontrolsüz enflamatuar tepkileri tetikleyerek, düşük dereceli inflamasyona ve insülin direnci gibi metabolik bozukluklara neden olurlar (42,43).

3.6.1. Adipoz Dokunun Kanseri Gelişimi ve İlerlemesi Üzerine Etkileri

Adipoz dokudan sentezlenen adipositler, adipoz dokunun ana bileşenleridir (43). Adipoz doku homeostatik kontrol üzerinde önemli etkileri olmakla birlikte çok sayıda lipid ve protein sentez ürünlerinin sentezinden sorumlu olduğu için majör endokrin bir organ olarak kabul edilmekte olup başlıca karaciğer, kas, beyin ve pankreas gibi dokular üzerinde oldukça etkilidir (44). Uzun süre devam eden aşırı kalori alımı adipoz dokunun esas hücreleri olan adipositlerde disfonksiyon, hipertrofi ve negatif fizyolojik cevapların oluşumuna zemin hazırlamaktadır. Dolayısıyla hipoksiyle birlikte oksidatif stres ve apoptoz yollarının tetiklenmesine neden olmaktadır (45). Tümörler hem otokrin hem de parakrin sinyallerden etkilenirler, bu

sinyaller heterotipik sinyal olarak adlandırılırlar (46). Hem Obez hemde meme kanseri olan hastalar üzerinde yapılan bir çalışmalarda çeşitli adipokinlerin onkojenik sinyal yollarının tetiklendiği ve tümör ilerlemesini desteklediğini ifade etmişlerdir (47).

Stromal adipositlerin fizyolojik rolleriyle ilgili bir dizi çalışmalarda adiposit düzeylerinin tümör ilerlemesinde, hücre sağ kalımında, hücrelerin büyümesi ve metastatik davranışlarında etkili olduğu gösterilmiştir (48,49). Ek olarak stromal adipositlerden üretilen parakrin sinyaller ve endokrin sinyaller doğrudan tümör davranışına dolayısıyla tüm vücut metabolizmasına etki etmektedir (49). Adipositler ve sentez ürünleri glikoz ve lipid metabolizmasında, kronik enflamatuvar sinyallerde ve immün cevaplarda etkilidirler (50). Kanser hücrelerinin metabolik aktiviteleri son derece yüksek olduğundan dolayı büyüme ve hayatta kalmaları için enerji tüketimleri oldukça fazladır (49,50). Kanser hücreleri yeterli ATP sentezlemek için aerobik glikolize oksidatif fosforilasyon birincil enerji kaynağı olmasına rağmen yüksek enerji gereksimi koşullarında ortamda sınırlı glikoz mevcudiyeti, varsa glutamin veya yağ asitlerini yakalayabilmektedir (50,51). Bundan dolayı kanser hücrelerinin lipogenez üzerine ve kanser hücrelerinin metabolizması üzerine düşük yağlı diyetlerin tümör büyümesi ve nüksünde etkili olabileceği ifade edilmiştir (51).

3.6.2. Adipokinler

Adipoz doku, adipokin olarak adlandırılan çok sayıda sitokin salgılayan karmaşık, oldukça aktif endokrin bir organdır (52).

Steroid hormonlarının metabolizmasında rol oynayan metabolitler ve enzimler tarafından uyarılarak salgılanan proteinler yağ dokusunun endokrin fonksiyonlarını, indükler (53). Adipokinler beyin, karaciğer, kas, pankreas, bağışıklık sistemi ve diğer dokular üzerine direkt veya dolaylı yollardan etkileri vardır. Adipokinlerin bir kısmı

glikoz ve lipid metabolizması ile insülin sinyalizasyonunun modülasyonu etkilediği bilinmektedir (54). Adipokinler tarafından sentezlendiği 1994 yılında keşfedilen leptin yağ dokusunun ilk sitokini olarak tanımlanmıştır (55). 1995'te adiponektin ve daha sonra resistin, chemerin, apelin, visfatin, plazminojen aktivatör inhibitörü 1 (PAI1), monosit kemoatraktan protein 1 (MCP1), tümör nekroz faktörü alfa (TNF α) ve interlökin 6 (IL6) dahil diğer birçok yeni adipokin keşfedildi (55,56). Son olarak ise 2016 yılında keşfedilen asprosin adipokinler grubuna dahil edildi (57).

3.6.3. Asprosin

Asprosin esas olarak açlık sırasında beyaz yağ dokusu tarafından sentezlenen ve salınan yeni bir glukojenik adipokin olup fibrilin 1 (FBN1) geninin (ekson 65 ve ekson 66) iki eksonu tarafından kodlanır. İlk oluşturulan proprotein, C terminal bölgesinde aktive edilmiş proteaz furin tarafından bölünür, böylece olgun fibrillin-1 ve 140-amino asit uzunluğunda asprosin sentezlenir (57).

Asprosin glikoz metabolizması, insülin direnci, apoptoz ve iştah düzenlenmesinde etkili olup ayrıca merkezi sinir sistemi ile periferik doku ve organlar üzerinde birçok etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (58). Asprosin, açlık ile indüklenenmekte ve uzun süreli açlıklarda kanda yüksek seviyeye ulaşabilmektedir (57). Asprosin karaciğerde glikoz üretimini teşvik etmesi ve G proteinine bağlı reseptör aracılığıyla siklik adenosin monofosfat (cAMP) sinyal yolunu aktivleştirmesi hipotalamusta iştah reseptörlerinin uyarılmasına neden olmaktadır (59).

Ayrıca asprosin karaciğerde, homeostazı sürdürmek için glikozun salınımını uyarak açlık sırasında metabolik bir rol üstlenir (58, 59). Bunun yanı sıra gıda tüketimini ve vücut ağırlığını artırmak için agouti ile ilişkili protein (AgRP) nöronlarını aktive eden oreksijenik bir hormon görevi görür (60). Farelerde, tek toz

asprosin enjeksiyonu, kan şekeri ve insülin seviyelerinde hızlı bir artışa neden olurken, asprosin seviyesinin azalması ve asprosine özgü bir monoklonal antikor ile tedavide, insülin duyarlılığının arttığı görülmüş olup bu durum sonucunda iştah ve vücut ağırlığının azaldığı bildirilmiştir (60, 61).

Yapılan çalışmalarda asprosin eksikliği olan hastaların, öglisemi ile ilişkili olduğu ve plazma insülini ile birlikte subkutan beyaz yağ dokusu'da bir azalma ile kısmi lipodistrofi dâhil olmak üzere bir metabolik bozukluğun olduğu görülmüştür (57). Asprosin konsantrasyonları obezite ve tip 2 diyabet koşullarında artmasının açlık glikozu ve trigliserid seviyeleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (62). Bununla birlikte asprosin inhibisyonunun obezite ve tip 2 diyabet için etkili bir tedavi olup olmayacağı belirsizliğini korumakta ve henüz asprosin reseptörünün rol oynadığı ve salgılanmasını düzenleyen faktörlerin net olarak anlaşılmadığı için daha fazla araştırma gerekmektedir.

3.6.3.1. Asprosin ve Oksidatif Stress

Metabolik sendrom ile ilişkili çalışmaların çoğunda, asprosin düzeylerinin arttığını ortaya koymaktadır. Yine de, az sayıda araştırmacı, özellikle çocuklarda obezite ile ilişkili sendromlarda düşük düzeyler bulmuştur. Ayrıca erken dönemde artan enerji ihtiyacına bağlı olarak aşırı tüketimin olabileceğinden dolayı oksidatif stresin akut döneminde düşebileceği bildirilmiş olup doku ve hücrelerde koruyucu etkilerinin olabileceği bildirilmiştir. (63)

Miyokard enfarktüsü üzerine yapılan bir hücresel çalışmada rekombinat olarak verilen asprosin, mezenkimal stromal hücrelerin işlevini ve sağ kalımını düzenlediği ve kardiyak fibrozisi azaltarak kardioprotektif ve sitoprotektif etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (64). Bununla birlikte asprosin'nin, Mitojenle aktive olan protein kinaz

1/ Mitojenle aktive olan protein kinaz 2 (ERK1/2) ve Fosfoinositid 3-kinaz (PI3K)/AKT yollarını aktive ederek, süperoksit dismutaz 2 (SOD-2) antioksidatif enziminin ekspresyonunu düzenleyerek antioksidan etkilerinin olabileceği belirtilmiştir (64, 65).

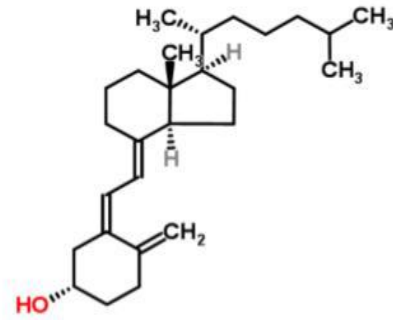
Asprosin, ikinci bir haberci olarak cAMP kullanmakta ve G protein-cAMP-protein kinaz (PKA) yolunu aktive ederek glikoz üretimini teşvik etmesi nedeniyle glikozun dolaşıma hızlı bir şekilde katılmasına neden olmaktadır(57). Bozulmuş oksidan-antioksidan dengesinin bir sonucu olarak sistemik inflamasyona ve kanser gelişimine katılan nükleer faktör κB 'yi (NF- κB) aktive etmektedir (52).

Tanısal ve/veya terapötik bir hedef olarak potansiyelini ortaya çıkarmak için asprosinin altında yatan mekanizmalar hakkındaki bilgiyi geliştirmek için ortak bir fikir birliğine ihtiyaç vardır

3.7. Vitamin D Yapısı ve Özellikleri

Vitamin D hormon sisteminin önemli bileşeni olup vitamin D, bir kolesterol ön madde olan 7-dehidrokolesterol vitamin D hormonu öncüsüdür (66). Daha sonra ultraviyole ışığın etkisi altında deride başlayan bir dizi reaksiyondan sonra kolekalsiferol (vitamin D₃) olarak sentezlenir (67). Daha sonra karaciğerde hidroksilasyona uğrayıp böbreklerde, bu bileşiklerin en aktif hormon formunu, 1, 25-dihidroksikolekalsiferol veya kalsitriolü dönüşür (66). Kalsitriol ve diğer vitamin D bileşiklerinin "inaktivasyonu", temel olarak 24-hidroksilasyon yoluyla gerçekleşmektedir; bu adım aynı zamanda ağırlıklı olarak böbreklerde meydana gelmektedir (68). Bu hidroksilasyonlara esas olarak sitokrom P450 sitokin üretimi 1 (CYP1), ve çeşitli enzimatik reaksiyonlara aracılık eder (69). Vitamin D hormonları, albümin ailesinde çok işlevli bir protein olan vitamin D bağlayıcı proteine (DBP veya

Gc-MAF) bağılı dolaşımda taşınır. Bu proteini kodlayan gen için farklı izoformları kodlayan alternatif olarak eklenmiş transkript varyantları bulunmuştur ve bu izoformların ekspresyon prevalansı, farklı ırk ve etnik gruplar arasında değişiklik gösterir (67, 68). Bu farklılıkların fizyolojik önemi hala belirsizliğini korumaktadır (68). vitamin D'nin ana kaynağı derideki endojenlerin sentezi şeklinde olmasına rağmen, diyet ilede alınıp dolaşıma katılıp daha sonra karaciğer ve böbrekte aktif şekline dönüştürülerek taşınması steroid yapılı bir hormon olarak değerlendirilmesine neden olmaktadır (69,70). vitamin D'nin biyolojik aktif şekli olan kalsitriol (1,25(OH)D3) etkisini vitamin D'nin hedef organları olan kemik, böbrek, bağırsak ve paratiroid bezlerinde bulunan hücre içi VDR (vitamin D Reseptörü)'ye bağlanarak gösterir (68,70). VDR bağırsak, kemik, böbrek'ten başka cilt, meme, hipofiz, pankreas beta hücreleri, gonadlar, beyin, iskelet kası, dolaşımdaki monositler ve T ve B lenfositlerde de vardır (68).



Şekil 7. Kolekalsiferol (D3 vitamini) kimyasal yapısı (71).

3.7.1. Vitamin D'nin fonksiyonları

Vitamin D reseptörü olan VDR birçok doku ve organda bulunması nedeniyle çeşitli fizyolojik yollarda etkili olmaktadır. Bu durum VDR reseptörünün patofizyolojik mekanizmalarda aktivasyonunun değişmesinin kanser dahil birçok

metabolik hastalıklarda ilişkisini olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Ayrıca immün sistem üzerinde olumlu etkilerinden dolayı bir düzenleyici olarak işlev görmektedir (72,73).

Son araştırmalarda, vitamin D'nin yağ dokusu fonksiyonunda belirgin olarak etkili olduğu ifade edilmiştir (74). CYP24 geni, 1,25(OH)2D3'ü katalize eden enzimi kodlamakta olup aynı zamanda adipositler ve preadipositlerin ekspresyonunda rol oynadığı ve adipositlerin sentezin yanı sıra aktivasyonunda rolü olduğu belirtilmiştir (75). Yağ dokusunda lipid mobilizasyonu ve tüketiminde 1,25(OH)2D3'ün lipoprotein lipaz aktivitesini ve adipositlerde mesajcı RNA (mRNA) seviyesini artırdığı ifade edilmiştir. Adipositlerin sentez ve fonksiyonunda vitamin D reseptörü olan VDR, nin preadiposit farklılaşması ve adipositlerde modülasyonu düzenlemektedir (76).

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Etik kurul kararı

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu'nun 18.09.2019 tarih ve 172 Sayılı kararı ile etik yönden uygun bulunarak Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (FÜDAM) biriminde ve Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji laboratuvarında yapıldı. Çalışma bütçesinin tamamı münferid olarak karşılandı.

4.2. Deney Hayvanlarının Temini ve Beslenmeleri

Deneylerde kullanılan 28 adet 8-10 haftalık erişkin Wistar albino cinsi erkek sıçanlar, FÜDAM biriminden temin edildi. Hayvanlar FÜDAM hayvan laboratuvarında bulundukları ortamın sıcaklığı 22–25°C arasında sabit tutularak 12 saat ışık (07:00-19:00) ve 12 saat (19:00-07:00) karanlıkta takip edildi. Sıçanlar özel olarak yaptırılan kafeslerde beslendi ve her gün altları temizlendi. Tüm hayvanlara aynı standart sıçan yemi verilerek add libitum su ve yiyecek alımları sağlandı. Yemler; çelik kaplarda, su; cam biberonlarda normal çeşme suyu olarak verildi. Hayvan yemleri Elâzığ Yem Sanayi A.Ş. Yem Fabrikası'nda hazırlandı.

4.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması

Ağırlıkları 200-230 gr arasında değişen 8-10 haftalık 28 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçanlar her grupta 7 adet olacak şekilde 4 gruba ayrıldı.

Grup I (Kontrol grubu); Deney süresi olan 15 gün boyunca herhangi bir işlem yapılmadı.

Grup II (Vitamin D grubu); 200 IU/gün vitamin D (50.000 I.U./ 15 ml Devit-3 oral damla Deva ilaç San. ve Tic. A.Ş Türkiye) deney süresi boyunca her gün oral yol ile verildi (77).

Grup III (SP grubu); Deney başlangıcında 200mg/kg olacak şekilde tek doz siklofosfamid (500mg (E.İ.P) Endoksan Eczacıbaşı İlaç Pazarlama A.Ş. Türkiye) intraperitoneal (i.p) olarak uygulandı (78).

Grup IV (SP+Vitamin D grubu); Tek doz 200 mg/kg siklofosfamid i.p olarak uygulanması ile beraber 15 günlük deney süresi boyunca her gün vitamin D 200 IU/gün oral olarak uygulandı.

4.2.2. Deney Sonunda Kan Örnekleri ve Dokuların Alınması

Deneyin sonunda tüm gruptaki sıçanlara ketamin (75 mg/kg) ve xylazine (10 mg/kg) i.p olarak uygulandı. Anestezi altında kan ve karaciğer dokuları alındı. Kan örnekleri 1500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen serum örnekleri ile karaciğer dokuları biyokimyasal ve histolojik çalışmalar için uygun koşullarda saklandı.

4.3. Biyokimyasal Analizler

4.3.1. Malondialdehid (MDA) Analizi

250 ml distile su içine sırasıyla 0, 42 gr Tris-Base + 1.43 gr Tris-HCl + 3 gr KCl ve 0.5 ml tween 20, eklenerek analizde kullanılmak üzere tampon solüsyon hazırlandı. Doku örneklerinin tartımı yapıldıktan sonra homojenizatör yardımıyla tampon solüsyonu içinde parçalandı. Daha sonra elde edilen homojenat homojenat 16000 rpm de 4 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant kısımdan 1 ml başka bir tüpe alındı.

Üzerine 1 ml %10'luk trikloroasetik asit, (TCA) (10 gr TCA 100 ml distile suda hazırlandı.) ve 1ml %0.6 tiyobarbitürik asit, (TBA) (0.6 gr TBA 100 ml distile suda hazırlandı.), 1ml distile su ve son olarak 0.5 ml %4 hidroklorik asit (4ml HCl 100 ml distile suda) ilave edildi. Hazırlanan karışım 90-95°C de 120 dakika inkübasyon edildi. Daha sonra tüpler oda ısısında 30 dk bekletilerek soğutuldu. Her bir tüpün üzerine 3 ml bütanol ilave edilip 5 dk 5000 rpm de santrifüj edildi. Oluşan süpernatant kısım spektroküvetine alınıp bütanole karşı 532 nm de okundu. Sonuçlar (Okunan absorbands değeri x: okunanABS +0.0344/0.0492) nmol/gr olarak hesaplandı.

4.3.2. Total Antioksidan Seviyesi (TAS) Analizi

Serum örneklerinde total antioksidan seviyesi (TAS) düzeyi rel assay marka ticari kit (Rel Assay Kit Diagnostics, Türkiye) kataloğunda belirtilen prosedürlere uygun olarak ölçüldü. Plate yıkamalarında otomatik yıkayıcı Bio-Tek ELX50 (BioTek Instruments, USA), absorbands okumalarında chroMate, microplate reader P4300 cihazı (AwarenessTechnology Instruments, USA) kullanıldı. Sonuçlar mmol Trolox equiv./lt olarak ifade edildi.

4.3.3. Total Oksidan Seviyesi (TOS) Analizi

Serum örneklerinde total oksidan seviyesi (TOS) düzeyi rel assay marka ticari kit (Rel Assay Kit Diagnostics, Türkiye) kataloğunda belirtilen prosedürlere uygun olarak ölçüldü. Plate yıkamalarında otomatik yıkayıcı Bio-Tek ELX50 (BioTek Instruments, USA), absorbands okumalarında chroMate, microplate reader P4300 cihazı (AwarenessTechnology Instruments, USA) kullanıldı. Sonuçlar $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equiv./lt olarak ifade edildi.

4.3.4. Asprosin Analizi

Serum örneklerinde asprosin düzeyi Sunred marka ticari kitin (Shanghai Sunred Biyolojik Teknoloji Co, Ltd China) kataloğunda belirtilen prosedürlere uygun olarak ölçüldü. Plate yıkamalarında otomatik yıkayıcı Bio-Tek ELX50 (BioTek Instruments, USA), absorbans okumalarında chroMate, microplate reader P4300 cihazı (AwarenessTechnology Instruments, USA) kullanıldı. Sonuçlar ng/ml olarak ifade edildi

4.4. Histolojik Analizler

4.4.1.Histolojik Çalışma

Her gruptan alınan karaciğer dokuları, % 10'luk formaldehit tespit solüsyonunda 24 saat süresince tespit edildikten sonra musluk suyu altında yıkamaya alındı. Musluk suyunda 24 saat yıkanan dokular daha sonra rutin histolojik takip serilerinden geçirildi (Tablo 1). Daha sonra dokular parafin bloklara gömüldü. Bu parafin bloklardan 4–6 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler Hematoksilen-eozin (H&E), Masson trikrom ve periodic asit schiff (PAS) ile boyandı. Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskopunda incelenip fotoğraflandı.

Tablo 1. Histolojik Takip Serileri

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

4.4.2. TUNEL Metodu

Parafin bloklardan 5-6 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon, cat no: S7101, USA) kullanılarak apoptoza giden hücreler belirlendi.

Xylene ile deparafinize edilen dokular, dereceli alkol serilerinden geçirilerek phosphate buffered saline (PBS) ile yıkandı. 0.05 % 'lik proteinase K ile 10 dakika inkübe edilen dokular, endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için % 3 hydrogen peroxide ile 5 dakika inkübe edildi. PBS ile dokular yıkandıktan sonra, 6 dakika equilibration buffer ile inkübe edilip, 37° C' de nemli ortamda çalışma solüsyonu (%70 µl Reaction Buffer+%30 TdT Enzyme) ile 60 dakika inkübe edildi. Stop/Wash Buffer da 10 dakika bekletilen dokular, anti-digoxigenin-perosidaz ile 30 dakika muamele edildi. Diaminobenzidine (DAB) substratı ile apoptotik hücreler görüntülendi. Harris

hematoksilen ile zıt boyası yapılan kesitler uygun kapatma solüsyonu ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Leica DM500 mikroskobunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı (Leica DFC295). TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde Harris hematoksilen ile maviye boyanmış çekirdekler normal, kahverengi nükleer boyanma gösteren hücreler apoptotik olarak değerlendirildi. Kesitlerde 10'luk büyütmede rastgele seçilen alanlarda, normal ve apoptotik en az 500 hücre sayıldı. Apoptotik hücrelerin, toplam (normal + apoptotik) hücelere oranlanması ile apoptotik indeks (AI)'i hesaplanarak istatistiksel analizleri yapıldı. Boyama metodu aşağıdaki tabloda ayrıntılı olarak verilmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. TUNEL Boyama Prosedürü.

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

4.4.3. İmmünohistokimyasal Metod

Parafin bloklardan 4–6 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alınıp deparafinize edildi. Ardından dereceli alkol serilerinden geçirilen kesitler sitrat tampon solüsyonunda pH: 6'da mikrodalga fırında (750W) 12 dakika kaynatıldı. Kaynatmanın ardından soğutmak için oda ısısında bekletilen dokular PBS (Phosphate Buffered Saline) ile yıkandıktan sonra endojen peroksidaz aktivitesinin engellenmesi için 6 dakika hidrojen peroksid solüsyonu uygulandı. PBS ile 3x5 dakika yıkanana dokulara 5 dakika blok solüsyonu uygulandıktan sonra 1/250 oranında dilue edilen asprosin primer antikor (anti- asprosin antibody, FNab09797, Fine Test, China) ile 60 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildi. Dokular, primer antikor uygulanmasından sonra PBS ile 3x5 dakika yıkandıktan sonra primer antikor ile uyumlu sekonder antikor ile 30 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildi. Dokular, sekonder antikor uygulanmasından sonra PBS ile 3x5 dakika yıkayıp Streptavidin Peroxidase (TS–125-HR, Lab Vision Corporation, USA) ile 30 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildikten sonra PBS içerisine alındı. Dokulara 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) Substrate + AEC Chromogen solüsyonu damlatılıp ışık mikroskopunda görüntü sinyali alındıktan sonra eş zamanlı olarak tüm gruplar PBS ile yıkamaya alındı. Mayer's hematoxilen ile zıt boyaması yapılan dokular PBS ve distile sudan geçirilerek uygun kapatma solüsyonu (Large Volume Vision Mount, TA-125-UG, Lab Vision Corporation, USA) ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Leica DM500 mikroskopunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı (Leica DFC295). Boyamada immünreaktivitenin yaygınlığı (0.1: <%25, 0.4: %26-50, 0.6: %51-75, 0.9: %76-100) ve şiddeti (0: yok, +0.5: çok az, +1: az, +2: orta, +3: şiddetli) esas alınarak histoskor oluşturuldu. Histoskor= yaygınlıkxşiddet (79).

4.5. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için SPSS version 22 programı kullanıldı. Sayısal ölçümler median ve minimum - maksimum olarak özetlendi. İki den fazla grup arasında genel karşılaştırmada Kruskal Wallis testi kullanıldı. İki grup arasında karşılaştırmasında Mann Whitney U testi kullanıldı. Bununla birlikte bonferroni düzeltmesi yapılarak tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi 0, 01 olarak alındı. Bağımlı değişkenlerin analizinde ise paired samples t test kullanıldı ve istatistiksel önem düzeyi 0, 05 olarak alındı.

5. BULGULAR

5.1. Klinik Bulgular

Tüm gruplara ait sıçanların başlangıç ve final vücut ağırlıkları değerlendirildiğinde; kontrol ($p<0,001$), vitamin D ($p<0,001$) ve SP+ Vitamin D ($p=0,009$) gruplarındaki sıçanların vücut ağırlıkları başlangıca göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış olarak izlendi. Bununla birlikte, SP grubundaki sıçanların vücut ağırlıkları başlangıca göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış olarak gözlemlendi ($p<0,001$). (Tablo 3)

Tablo 3. Deney hayvanlarının başlangıç ve final vücut ağırlıkları

	Kontrol	Vitamin D	SP	SP+ Vitamin D
Başlangıç vücut ağırlığı (gr)	212,88±11,99	207,72±6,50	223,34±10,93	222,87±7,03
Final vücut ağırlığı (gr)	218,60±12,04 ^a	215,84±6,42 ^a	200,34±8,96 ^a	224,86±6,61 ^a

Değerler ortalama±standart hata olarak verilmiştir.

^a Başlangıç vücut ağırlığı ile karşılaştırıldığında, ($p<0,05$).

5.2. Biyokimyasal Bulgular

5.2.1. Doku MDA Düzeyi

Spektrofotometrik olarak ölçülen doku MDA düzeyleri, kontrol ve vitamin D gruplarında benzerdi ($p=0,209$). Kontrol grubu ile kıyaslandığında SP grubunda, MDA düzeyi istatistiksel olarak anlamlı artmıştı ($p<0,001$). SP grubu ile kıyaslandığında, SP + vitamin D grubunda karaciğer dokularında MDA düzeyi istatistiksel olarak anlamlı azalmıştı ($p<0,001$) (Tablo 4).

Tablo 4. Doku MDA Düzeyi

	MDA (nmol/g protein) Median (min-maks)
Kontrol	72, 24 (66, 91-75, 87)
Vitamin D	69, 56 (67, 42-76, 23)
SP	105, 83 (102, 57-109, 33) ^a
SP+Vitamin D	78, 65 (66, 25-96, 25) ^b

Değerler median (min-maks) olarak verilmiştir.

^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

^b SP grubuna göre karşılaştırıldığında, (p<0,01)

5.2.2. Serum TAS Düzeyi

Tüm gruplara ait serum TAS düzeylerinin değerlendirilmesi için yapılan biyokimyasal çalışmada; TAS düzeyleri, kontrol ve vitamin D gruplarında benzerdi (p=0,805). Kontrol grubu ile kıyaslandığında SP grubunda, TAS düzeyi istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştı. (p<0,001). SP grubu ile kıyaslandığında SP+vitamin D grubunda TAS düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştı (p<0,001) (Tablo.5).

Tablo 5. Serum TAS Düzeyi

	TAS (mmol Trolox equiv./lt) Median (min-maks)
Kontrol	1, 85 (1, 57-1, 95)
Vitamin D	1, 81 (1, 74-1, 97)
SP	1, 32 (1, 23-1, 52) ^a
SP+Vitamin D	1, 78 (1, 56-1, 95) ^b

^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

^b SP grubu ile karşılaştırıldığında, (p<0,01).

5.2.3. Serum TOS Düzeyi

Tüm gruplara ait serum TOS düzeylerinin değerlendirilmesi için yapılan biyokimyasal çalışmada; TOS düzeyleri, kontrol ve vitamin D gruplarında benzerdi (p=0,209). Kontrol grubu ile kıyaslandığında SP grubunda, TOS düzeyi istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştı (p<0,001). SP grubu ile kıyaslandığında, SP+vitamin D

grubunda TOS düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştı ($p<0,001$) (Tablo 6).

Tablo 6. Serum TOS Düzeyi

	TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equiv./lt) Median (min-maks)
Kontrol	14, 25(13, 42-14, 65)
Vitamin D	13, 81(13, 25-14, 52)
SP	19, 44(18, 35-20, 61) ^a
SP+Vitamin D	14, 25(11, 23-17, 45) ^b

^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

^b SP grubu ile karşılaştırıldığında, ($p<0,01$).

5.2.4. Serum Asprosin Düzeyi

Serum Asprosin düzeyi; Kontrol ve Vitamin D gruplarında benzerdi ($p=0,456$).

Kontrol grubuyla kıyaslandığında; SP grubunda Asprosin düzeyi istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştı ($p<0,001$). SP grubu ile kıyaslandığında ise SP+Vitamin D grubunda, Asprosin düzeyi istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştı ($p<0,001$) (Tablo 7).

Tablo 7. Serum asprosin Düzeyi

	Asprosin (ng/ml) Median (min-maks)
Kontrol	1, 05(0, 95-1, 18)
Vitamin D	1, 11(0, 12-1, 19)
SP	0, 55(0, 41-0, 79) ^a
SP+Vitamin D	1, 08(0, 85-1, 25) ^b

^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

^b SP grubu ile karşılaştırıldığında, ($p<0,01$).

5.3.1. Histolojik Bulgular

Hematoksilen&eozin, Masson trikrom ve PAS boyamanın boyamanın ışık mikroskobu altında incelenmesi sonucu; kontrol (Şekil 8, 9, 10) ve vitamin D (Şekil 11,12,13) gruplarında karaciğer dokusu normal histolojik yapısında gözlemlendi. Kontrol grubuyla kıyaslandığında SP grubunda belirgin hemoraji (siyah ok) ($p<0,001$), inflamatuvar hücre artışı (siyah yıldız) ($p<0,001$), sinüzoidal dilatasyon (kırmızı ok)

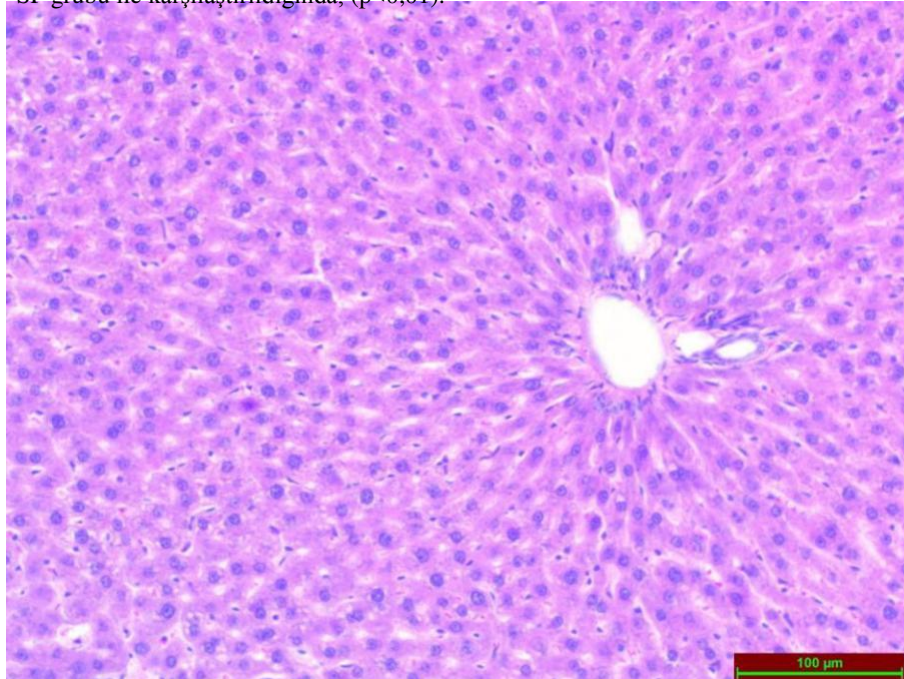
($p<0,001$) (Şekil 14), bağ dokusu artışı (siyah yıldız) (Şekil 15) ($p<0,001$) ve hepatositlerde glikojen kaybı (siyah ok) (Şekil 16) ($p<0,001$) izlendi. SP grubu ile karşılaştırıldığında ise SP+vitamin D grubunda karaciğer dokusunda hemoraji (siyah ok) ($p<0,001$), inflamatuvar hücre artışı ($p<0,001$), sinüzoidal dilatasyon ($p<0,001$) (Şekil 17), bağ dokusu artışı (Şekil 18) ($p<0,001$) ve hepatositlerde glikojen kaybında (Şekil 19) ($p<0,001$) istatistiksel olarak belirgin bir azalma ile kontrol dokusuna benzer şekilde görüldü, (Tablo 8).

Tablo 8. Histopatolojik skorlama

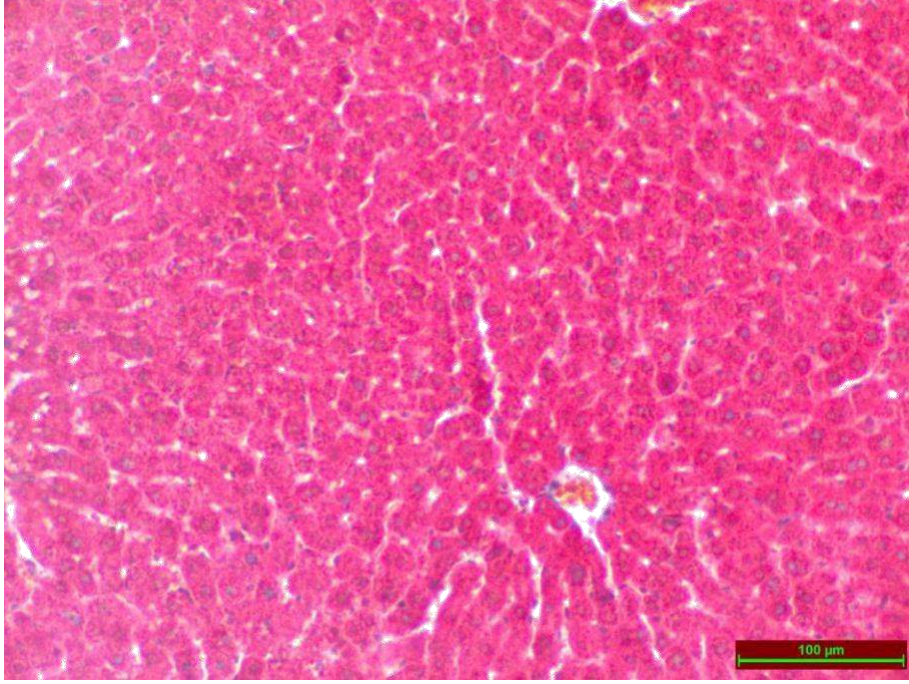
	Hemoraji Median (min-maks)	İnflamatuvar hücre artışı Median (min-maks)	Sinüzoidal dilatasyon Median (min-maks)	Bağ dokusu artışı Median (min-maks)	Hepatositlerde glikojen kaybı Median (min-maks)
Kontrol	0,00 (0,00-1,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-1,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)
Vitamin D	0,00 (0,00-1,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-1,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)
SP	3,00 (2,00-3,00) ^a	2,00 (2,00-3,00) ^a	2,00 (1,00-3,00) ^a	3,00 (1,00-3,00) ^a	2,00 (1,00-3,00) ^a
SP+Vitamin D	0,00 (0,00-1,00) ^b	0,00 (0,00-0,00) ^b	0,00 (0,00-1,00) ^b	0,00 (0,00-0,00) ^b	0,00 (0,00-0,00) ^b

^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

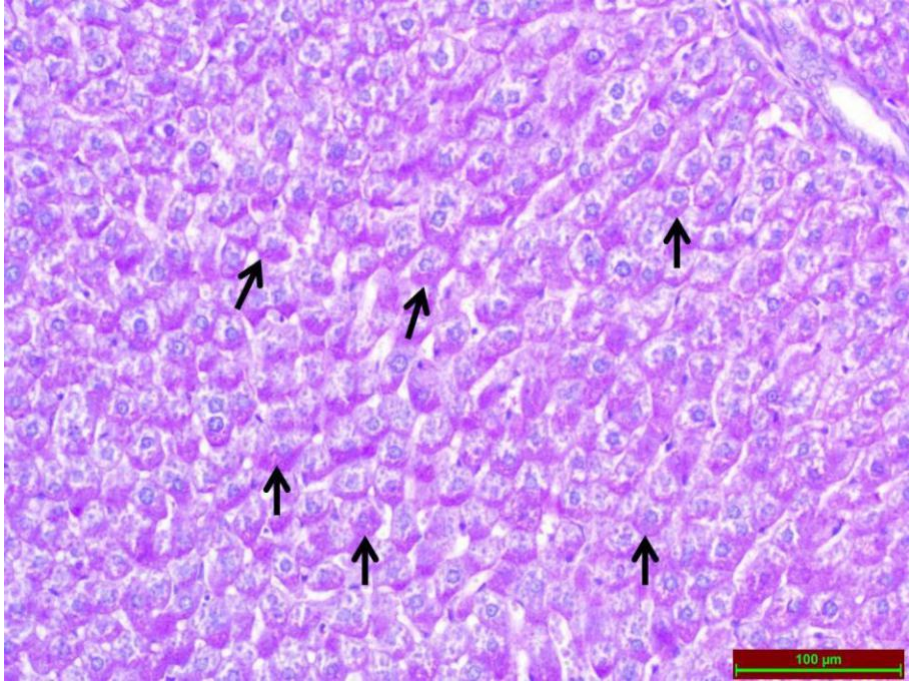
^b SP grubu ile karşılaştırıldığında, ($p<0,01$).



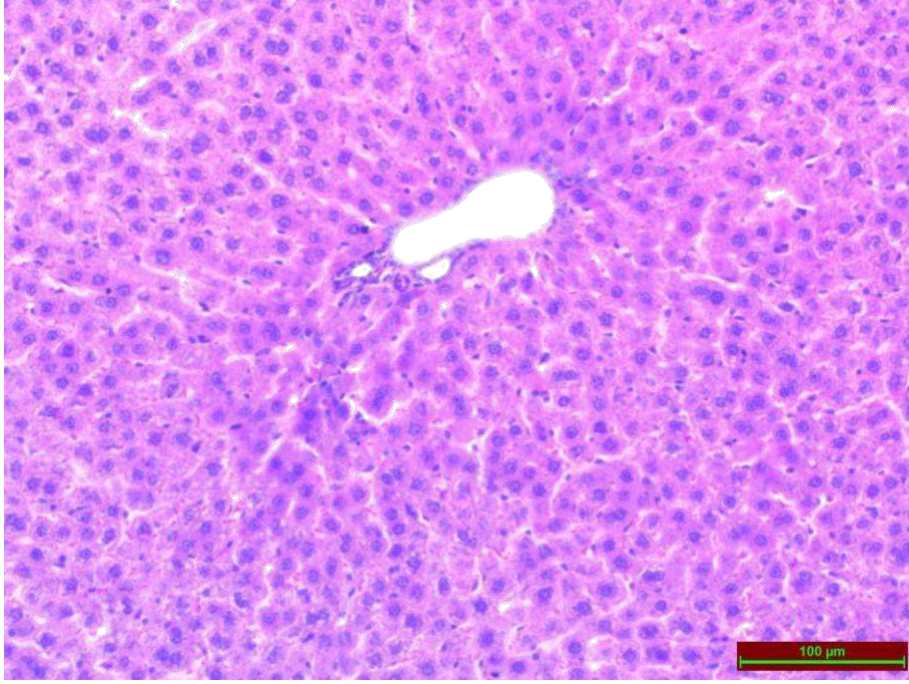
Şekil 8. Kontrol grubu normal görünümlü karaciğer dokusu, H&E X200.



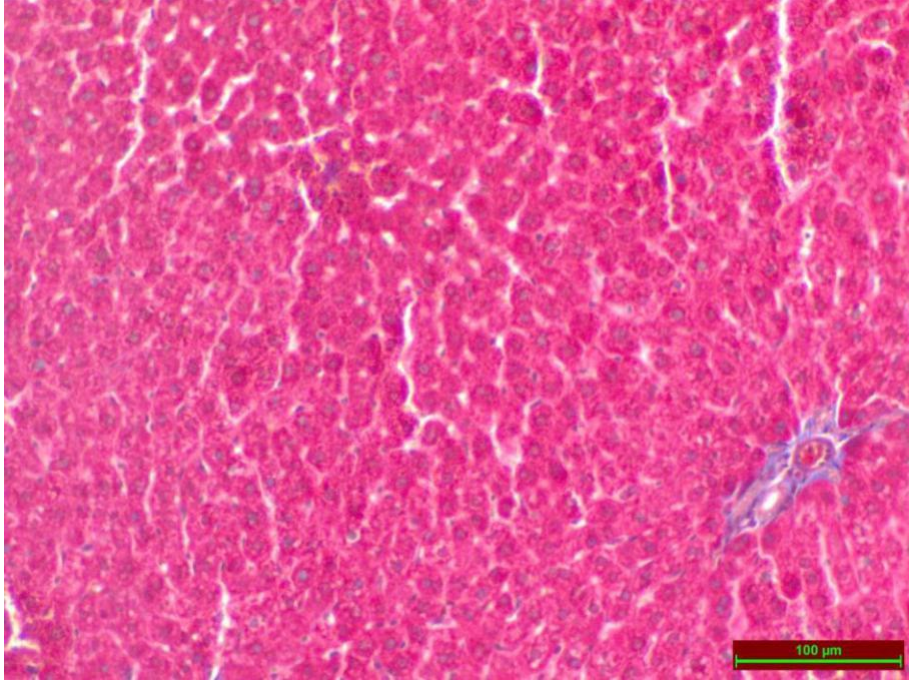
Şekil 9. Kontrol grubu normal görünümlü karaciğer dokusu, Masson trikrom X200.



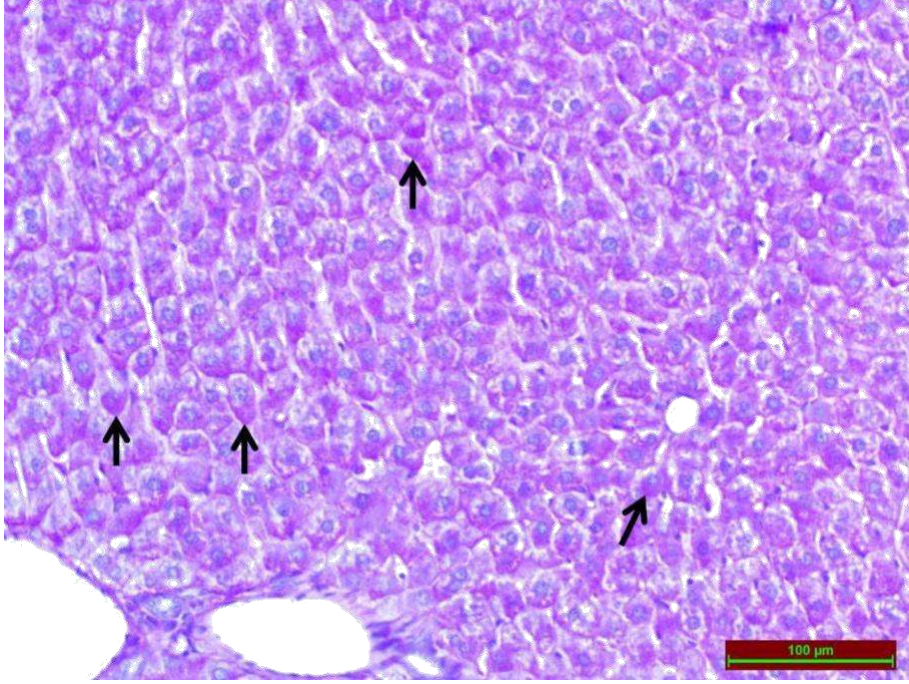
Şekil 10. Kontrol grubu PAS(+) hepatositler (siyah yıldız), PAS X200



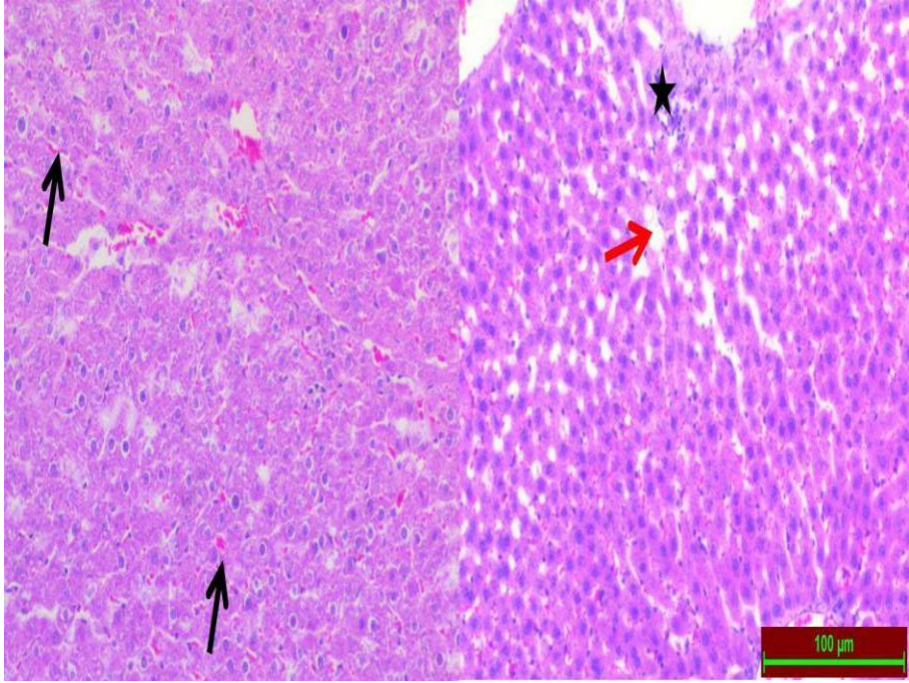
Şekil 11. Vitamin D grubu normal görünümlü karaciğer dokusu, H&EX200



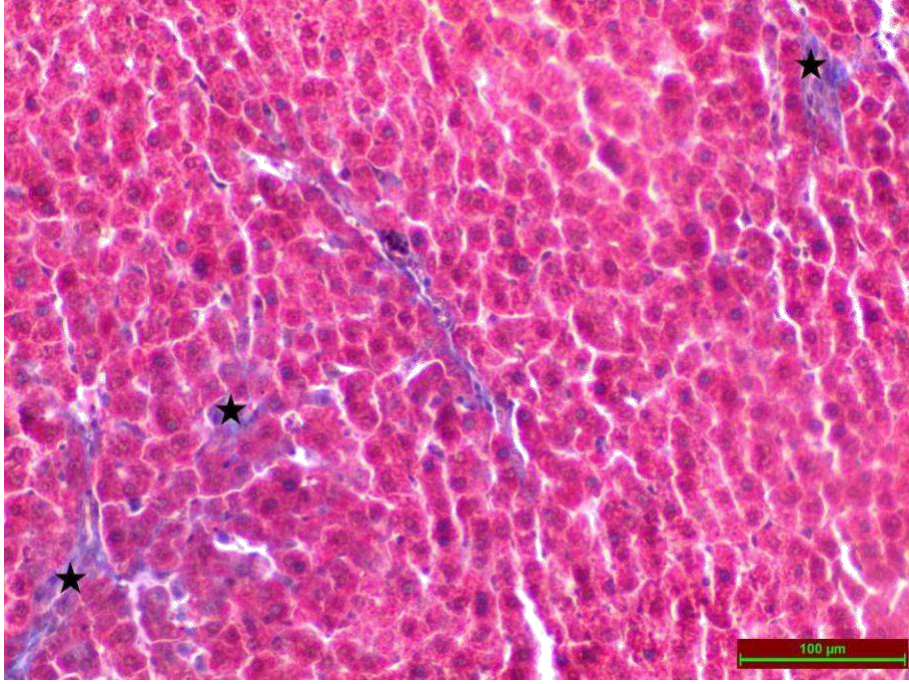
Şekil 12. Vitamin D grubu normal görünümlü karaciğer dokusu, Masson trikromX200



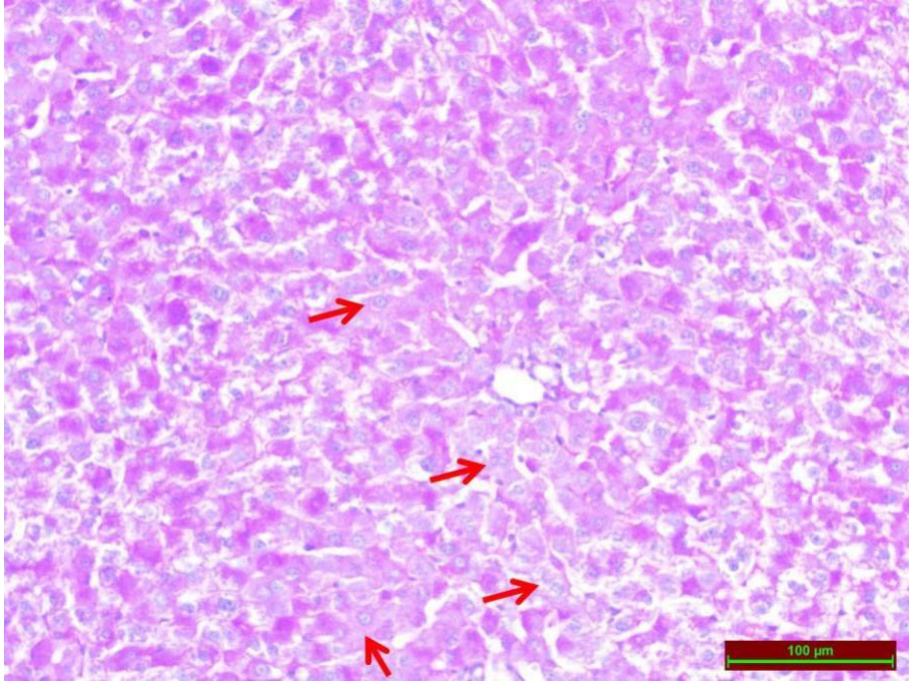
Şekil 13. Vitamin D grubu PAS(+) hepatositler (siyah yıldız), PASX200



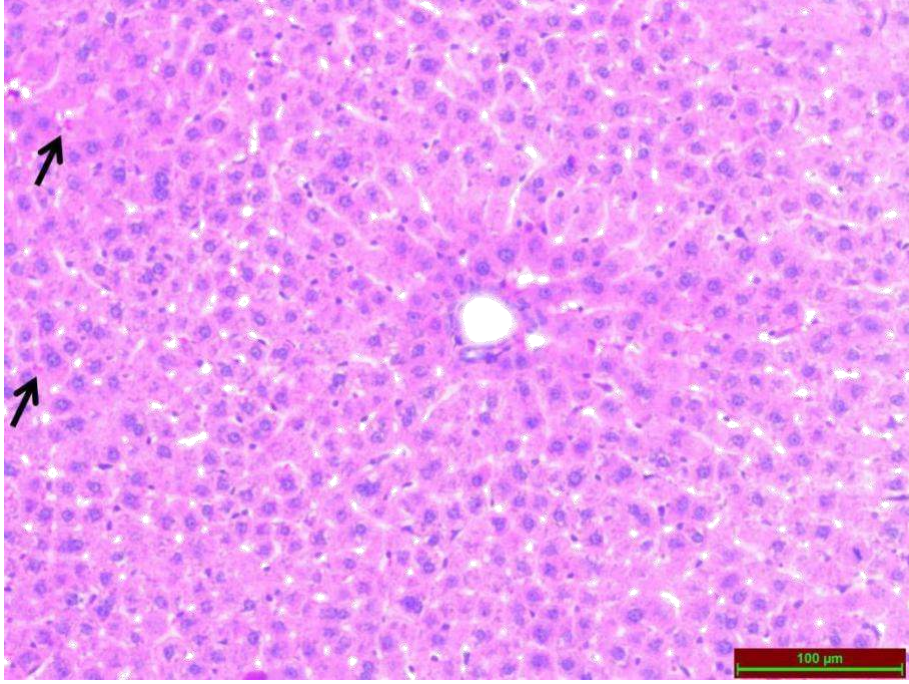
Şekil 14. SP grubunda hemoraji (siyah ok), inflamatuvar hücre artışı (siyah yıldız), sinüzoidal dilatasyon (kırmızı ok), H&EX200



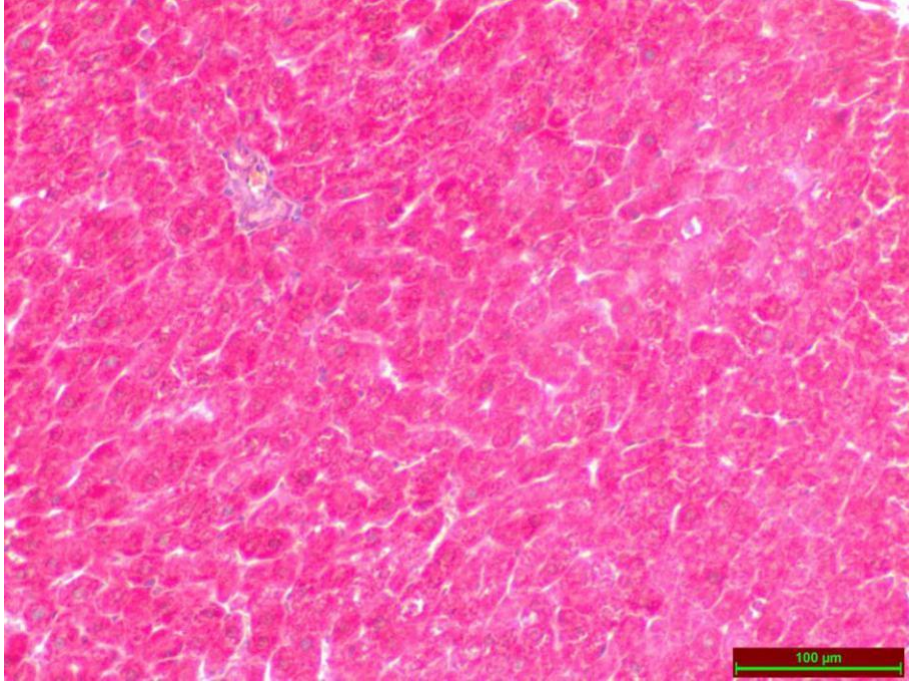
Şekil 15. SP grubunda bağ dokusu artışı (siyah yıldız), Masson trikromX200



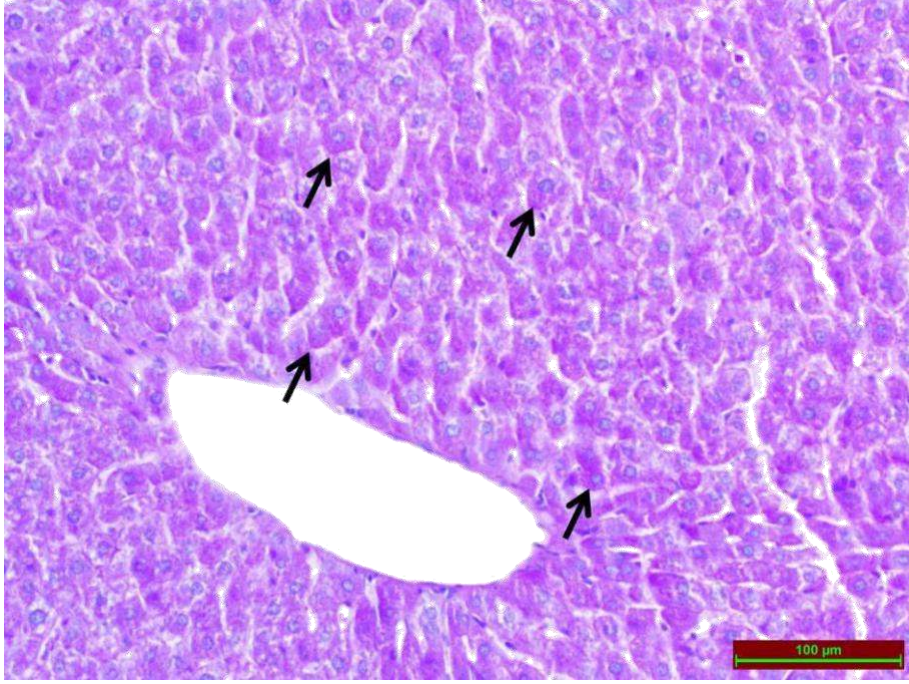
Şekil 16. SP grubunda hepatositlerde glikojen kaybı (kırmızı ok), PASX200



Şekil 17. SP+ Vitamin D grubunda kontrol grubuna benzer karaciğer dokusu görünümü, belirgin azalan hemoraji (siyah ok), H&EX200



Şekil 18. SP+ Vitamin D grubu normal görünümlü karaciğer dokusu, Masson trikromX200



Şekil 19. SP+ Vitamin D grubu PAS(+) hepatositler (siyah yıldız), PASX200

5.3.2. TUNEL Bulgular

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; TUNEL pozitifliği; kontrol (Şekil 20) ve vitamin D (Şekil 21) gruplarında benzerdi ($p=0,710$). Kontrol grubuyla kıyaslandığında SP (Şekil 22) grubunda TUNEL pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış bulundu ($p<0,001$). SP grubu ile kıyaslandığında ise TUNEL pozitifliği SP+vitamin D (Şekil 23) grubunda belirgin olarak azalmıştı ($p<0,001$). apoptotik indeks (%) (Tablo 9).

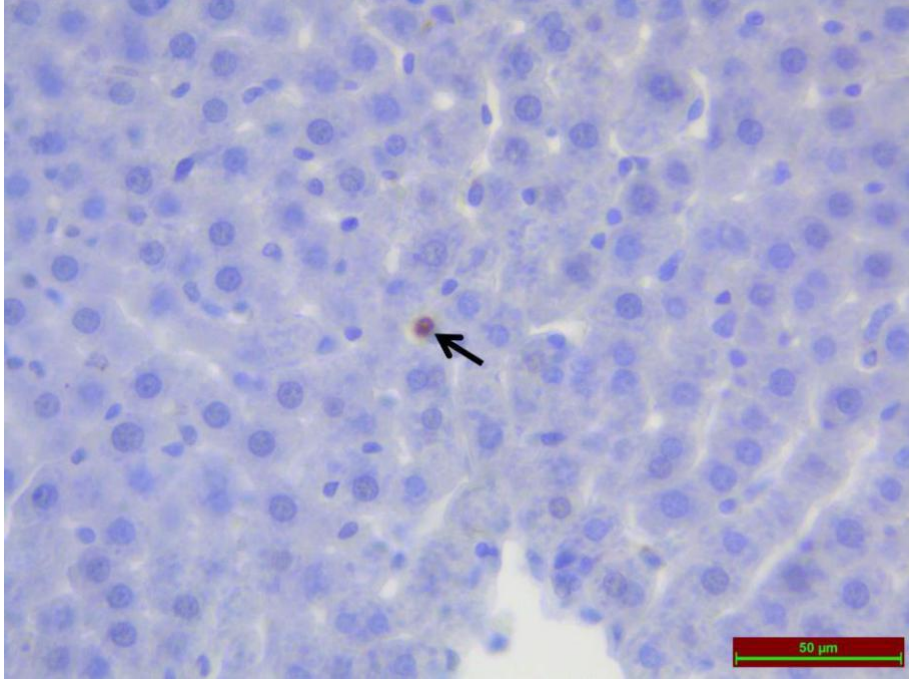
Tablo 9. Apoptotik indeks (%)

	Apoptotik indeks (%)
Kontrol	1,00 (1,00-2,00)
Vitamin D	1,00 (1,00-2,00)
SP	21,00 (16,00-29,00) ^a
SP+Vitamin D	1,00 (1,00-3,00) ^b

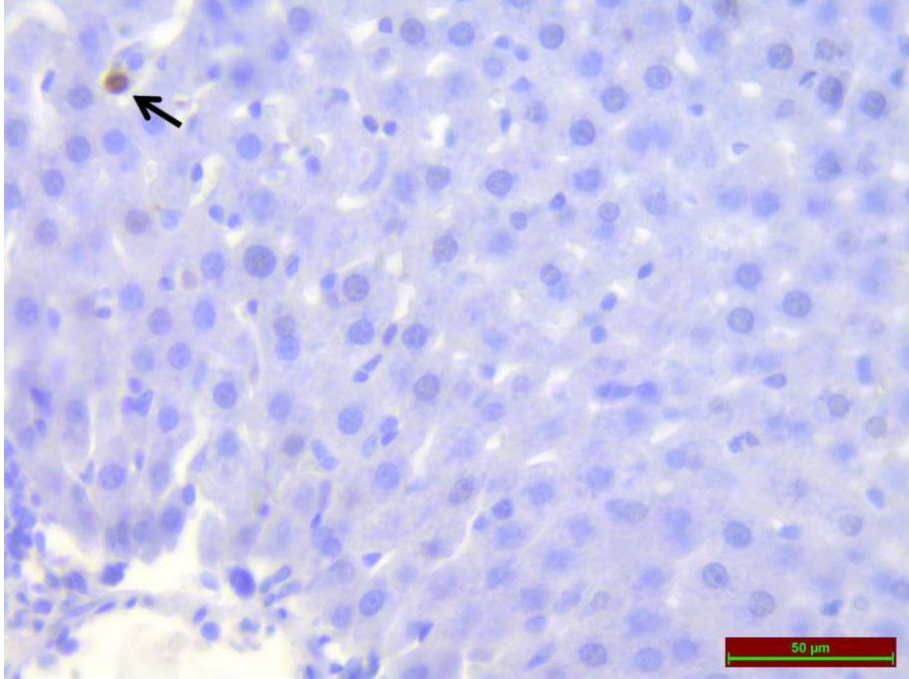
Değerler median (min-maks)olarak verilmiştir.

^aKontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

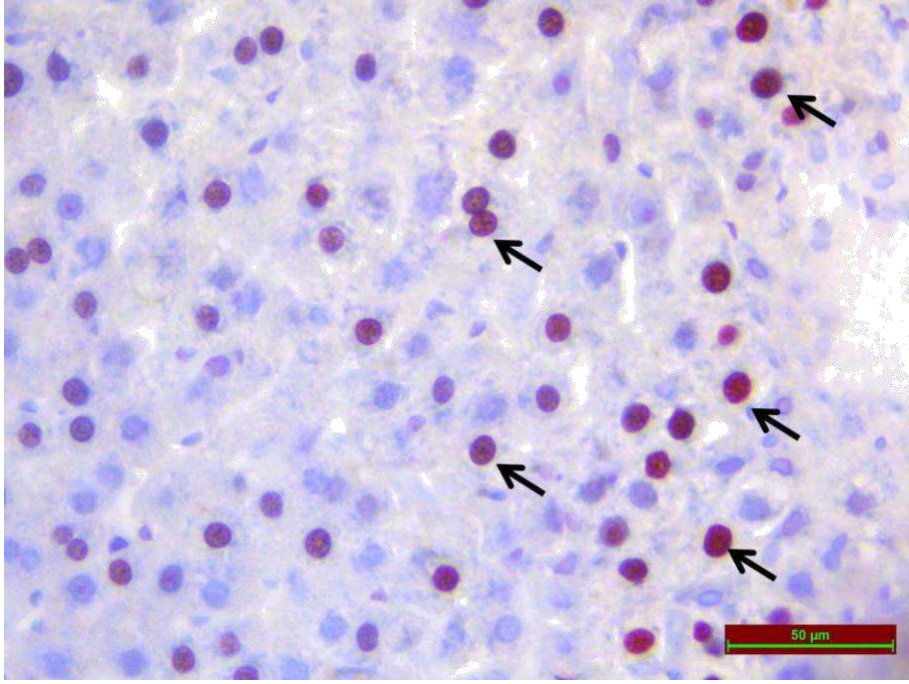
^bSP grubu ile karşılaştırıldığında, ($p<0,01$).



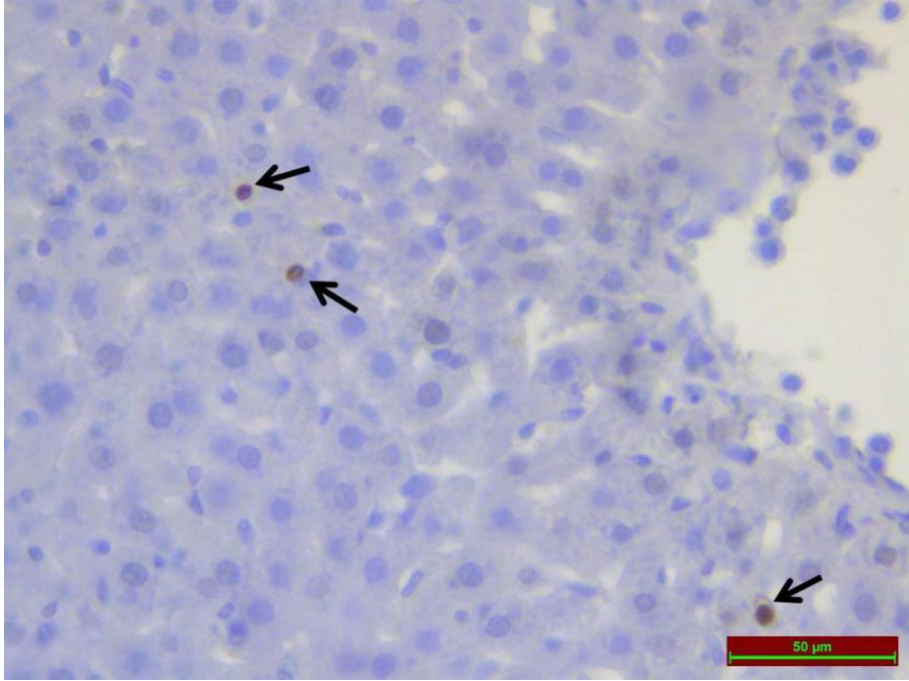
Şekil 20. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu, TUNEL pozitif hücre (siyah yıldız)X400



Şekil 21. Vitamin D grubuna ait karaciğer dokusu, TUNEL pozitif hücre (siyah ok)X400



Şekil 22. SP grubuna ait karaciğer dokusu, TUNEL pozitif hücreler (siyah ok)X400



Şekil 23. SP+Vitamin D grubuna ait karaciğer dokusu, TUNEL pozitif hücreler (siyah ok)X400

5.3.3. İmmünohistokimyasal Bulgular

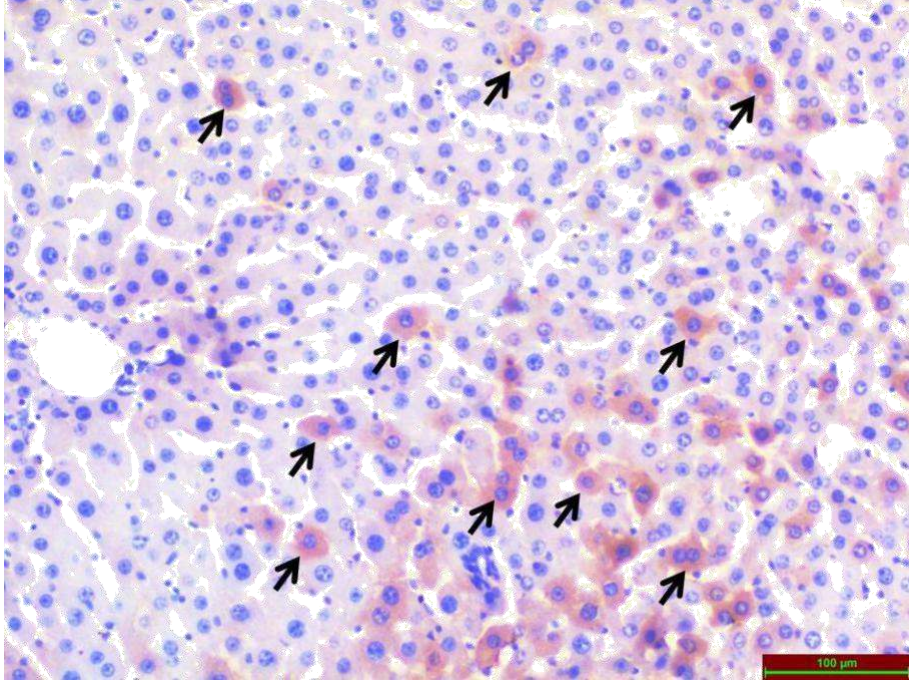
Asprosin immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskobu altında incelenmesi sonucu; asprosin immünreaktivitesi karaciğer dokusunda hepatositlerde (siyah ok) gözlemlendi. Asprosin immünreaktivitesi kontrol (Şekil 24) ve vitamin D (Şekil 25) gruplarında benzerdi ($p=0,259$). Kontrol ile karşılaştırıldığında SP grubunda asprosin immünreaktivitesi (Şekil 26) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştı ($p<0,001$). SP grubu ile kıyaslandığında ise SP+vitamin D (Şekil 27) grubunda asprosin immünreaktivitesi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış görüldü ($p<0,001$), (Tablo 10). **Tablo 10.** Asprosin histoskoru

	Asprosin histoskoru Median (min-maks)
Kontrol	0, 80(0, 60-1, 20)
Vitamin D	0, 60(0, 45-1, 20)
SP	0, 30(0, 10-0, 60) ^a
SP+Vitamin D	0, 80(0, 60-0, 90) ^b

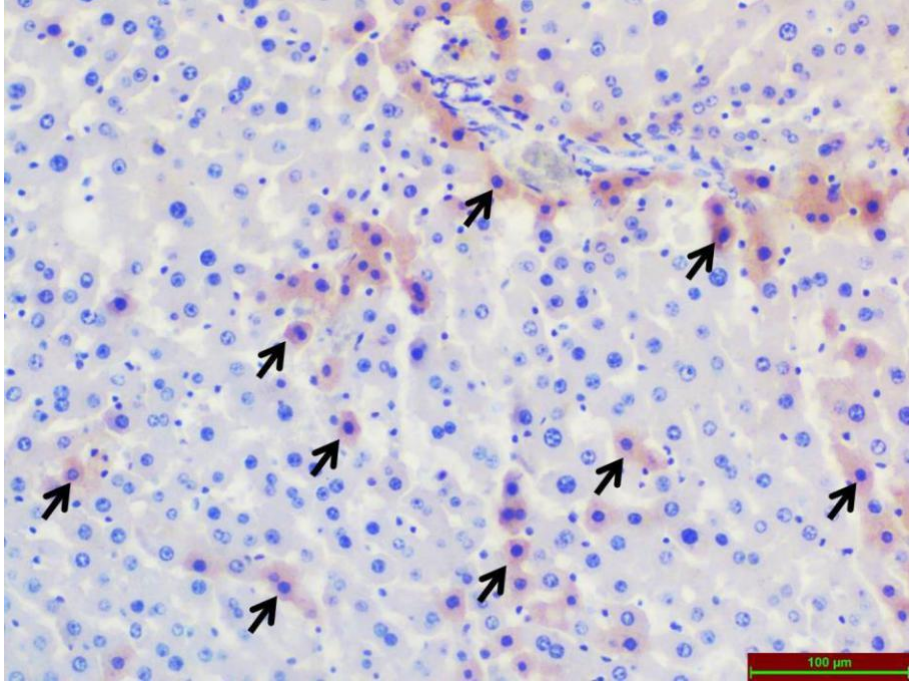
Değerler ortalama $\pm$ Median (min-maks)olarak verilmiştir.

^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

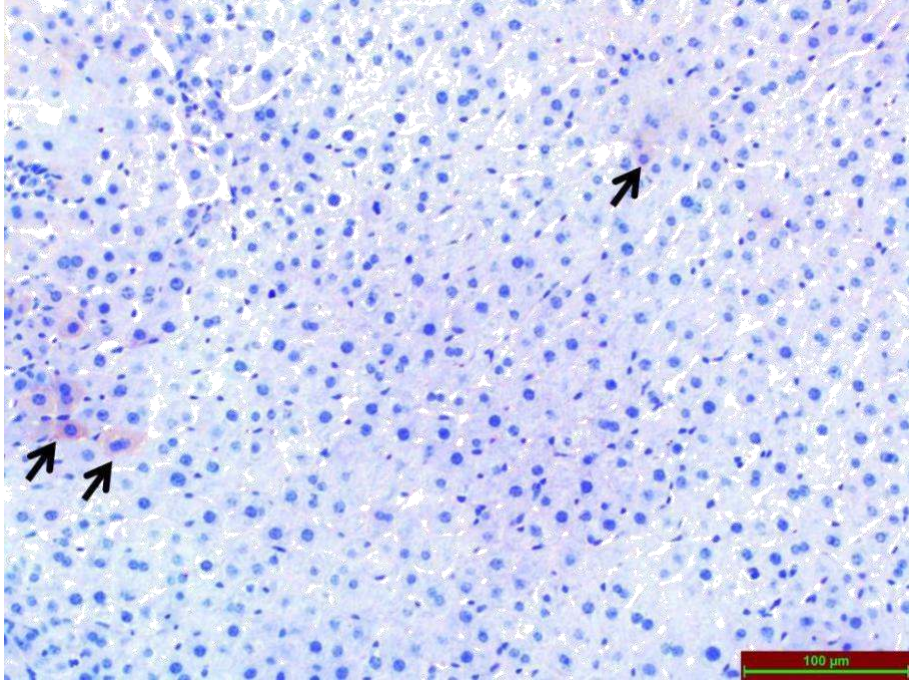
^b SP grubu ile karşılaştırıldığında, ($p<0.05$).



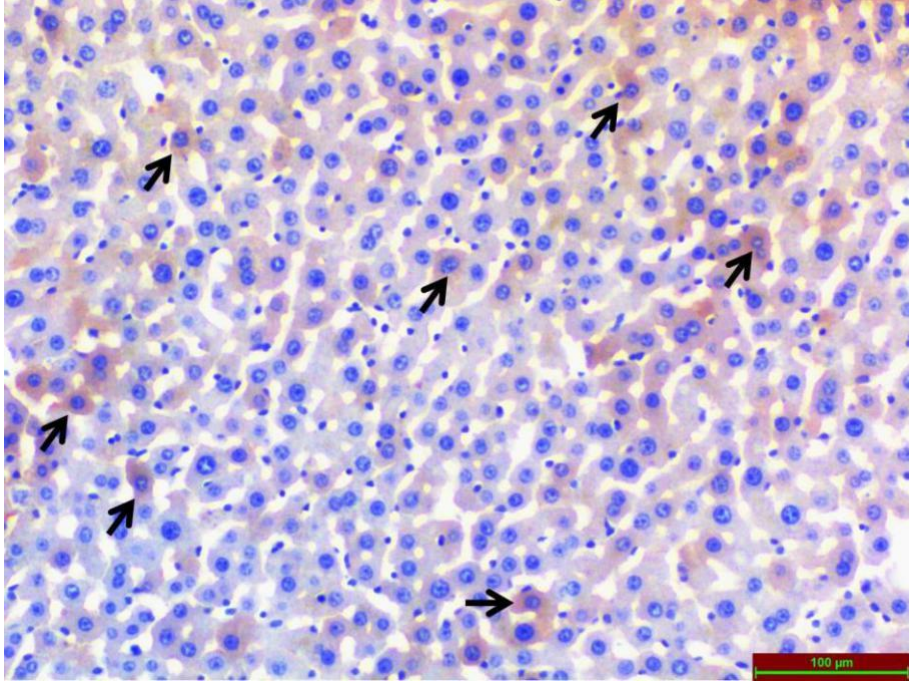
Şekil 24. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusunda asprosin immünreaktivitesi, (siyah ok) immünohistokimya X200.



Şekil 25. Vitamin D grubuna ait karaciğer dokusunda asprosin immünreaktivitesi, (siyah ok) İmmünohistokimyaX200.



Şekil 26: SP grubuna ait karaciğer dokusunda asprosin immünreaktivitesi. (siyah ok), immünohistokimyaX200.



Şekil 27. SP + vitamin D grubuna ait karaciğer dokusunda asprosin immünreaktivitesi, (siyah ok),immünohistokimyaX200.

6. TARTIŞMA

Bu çalışmada siklofosfamid uygulanan sıçanların serum ve karaciğer dokusunda asprosin düzeyleri üzerine vitamin D'nin etkilerin incelenmesi amaçlanmıştır. 50 yıldan fazla bir süredir siklofosfamid, lenfoma, meme kanseri ve lösemi dâhil olmak üzere çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılan sitotoksik özellikte kemoterapötik bir ajandır (26). Bununla birlikte, düşük dozlarda bile kalp, böbrek ve karaciğer gibi dokularda ciddi yan etkilere neden olduğu için klinikte kullanımı sınırlandırılmaktadır (33, 34). Siklofosfamid'in ana aktif metabolitleri fosforamid hardal ve akroleindir (34).

Bu metabolitler dokularda oksidatif strese neden olmaktadır. Siklofosfamid'in neden olduğu hepatotoksisitede yer alan ana mekanizmalar reaktif oksijen türleri olup, hücrelerde lipid peroksidasyonuna neden olmaktadır(80).Histopatolojik incelemelerde siklofosfamid'in hepatositlerde dejenerasyon, vakuolizasyon, nekroz, periportal lökosit infiltrasyonu, sinüzoidal dilatasyon, tıkanıklık ve kanama gibi patolojik değişiklikler ile bağ dokusunda artış meydana getirdiği ifade edilmiştir (81-83).

Ayrıca yapılan çalışmalarda siklofosfamid ile indüklenen sıçanların karaciğer dokusunda, hepatositlerde glikojen depolarının azaldığı tespit edilmiştir (84). Siklofosfamid metabolitlerinden fosforamid hardalın, apoptoz ile kanser hücrelerine etki ettiği, akroleinin ise hücrelerin DNA'sı üzerinde hasar oluşturduğu ve kaspaz-3 sinyallemesini aktive ederek apoptoz ve nekroz yolları ile sağlıklı hücrelerin ölümüne neden olduğu rapor edilmiştir (85). Saandeep ve ark. (87), siklofosfamid uygulamasının, hepatositlerde vaküolizasyon, sitoplazmada dejenerasyon, piknotik çekirdekli hücrelerde artış ve nötrofil infiltrasyonuna neden olduğunu, tespit etmişlerdir.

Ayrıca apoptozu belirlemek için yaptıkları TUNEL analizinde ise siklofosfamid'nin apoptozu anlamlı olarak artırdığını göstermişlerdir (86). Yapılan başka bir çalışmada ise tek doz 200mg/kg uygulanan siklofosfamid'nin TUNEL pozitif hücre sayısını anlamlı olarak artırdığı görülmüş olup bu durumun hücrelerde artan oksidatif stresin, DNA hasarına neden olmasından dolayı kaynaklandığını belirtmişlerdir (87).

Yapılan bu çalışmada kontrol grubuna göre, 200 mg/kg tek doz siklofosfamid verilen sıçanların karaciğer dokusunda, inflamatuvar hücre artışı, sinüzoidal dilatasyon, kanama ile bağ dokusunda artışın olduğu ve ayrıca hepatositlerde glikojen depolarının azaldığı görülmüştür. Apoptozisin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamada ise kontrol grubuna göre siklofosfamid uygulanan grupta belirgin olarak apoptotik hücre sayısında artış olduğu tespit edilmiştir.

Bu durum geçmiş literatür bilgileriyle paralellik göstermekte olup siklofosfamid indüksiyonuna bağlı olarak artan oksidatif stresin hepatotoksititeyi indüklediği görülmüştür. Oksidatif stres; doku proteini denatürasyonuna, DNA hasarına ve lipid peroksidasyonuna neden olduğu için kanser oluşumunu veya gelişimini indüklemektedir (88). Zarei ve ark. (89) yaptıkları bir çalışmada, siklofosfamid uygulanan grupta lipid peroksidasyonunun belirteçlerinden olan tiyobarbitürik asit, düzeyinin arttığı ve dolayısıyla karaciğerde hasar meydana geldiğini belirtmişlerdir. Ayrıca karaciğerde artan lipid peroksidasyonu süperoksit dismutaz 1 (SOD1), glutatyon peroksidaz 1 (GPx1) ve katalaz (CAT) mRNA'larının transkripsiyon seviyelerini düşürdüğünü tespit etmişlerdir (89). Yapılan farklı çalışmalarda, siklofosfamid indüksiyonunun aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), alkalen

fosfataz (ALP) ve laktat dehidrojenaz (LDH) düzeylerini yükselterek hepatoksisiteye neden olduğu belirtilmiştir (89-91).

Ayrıca buna bağlı olarak siklofosfamid in karaciğerde glutatyon peroksidaz (GPx), GR, kinon redüktaz, CAT, SOD ve GSH gibi antioksidan enzimlerin düzeylerini düşürdüğü, MDA düzeyini ise artırdığı rapor edilmiştir (92-94). Tarek ve ark. (95) Sıçanlarda yaptıkları çalışmalarında tek doz 200 mg/kg uygulanan siklofosfamid'in, MDA'yı ve TOS düzeylerini artırdığı, GSH ve TAS düzeylerini ise azalttığını belirtmişlerdir. Chen ve ark. (96), farelere uyguladığı siklofosfamid'in MDA düzeyini arttırdığı ve TAS düzeyini düşürdüğünü rapor etmişlerdir. Geçmişte yapılan birçok çalışmada siklofosfamidin serbest radikalleri anlamlı derecede artırdığı saptanmıştır.

Çalışmamızda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, siklofosfamid uygulanan grupta bulunan sıçanların serum TAS düzeyi düşmüş iken serum TOS ve doku MDA düzeyleri istatistiksel olarak artmıştır. Bu bulgular, önceki çalışmalarda siklofosfamid'in, ROS üretimini artırdığı; böbrek, kalp, beyin, karaciğer, testis ve mesanedeki antioksidan sistemi zayıflattığı yönündeki sonuçlarla örtüşmektedir (97, 98). Öte yandan, antioksidan savunma mekanizmalarının uyarılması, ROS'un biyolojik etkisini azaltabilmektedir (99). Bundan dolayı siklofosfamid'in neden olduğu oksidatif hasarın önlenmesi için anti-kanser özelliklerine sahip antioksidan veya anti-inflamatuar karakterdeki maddeler üzerindeki çalışmalar, devam etmektedir (100).

Birçok anti-kanser ajanlarının sitotoksitesi üzerine yapılan, In vitro ve in vivo çalışmalarda, vitamin D analogu olan 1,25(OH)D3 bileşiğinin doku ve hücrelerde patofizyolojik yolları baskıladığı ve hücre sağ kalımını güçlendirdiği ifade edilmiştir

(101-106). Aynı zamanda vitamin D'nin oksidatif stresi azaltarak dokuda koruyucu etkilerinin olduğu bildirilmiştir (107).

Yapılan birçok çalışmada vitamin D uygulamasının ortamda ROS oluşumunu azaltıp antioksidan enzimleri arttırdığı ve lipid peroksidasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (107-109). Aynı zamanda vitamin D'nin antioksidan savunma sisteminde çok sayıda enzimin ekspresyonunu artırdığı bilinmektedir (110). Prostat kanser hücreleri ve göğüs kanseri hücrelerine uygulanan vitamin D'nin SOD1 ve SOD2 üretimini arttırdığı gösterilmiştir (111). Ayrıca, diğer *invitro* çalışmalarda, vitamin D'nin iyi huylu prostat hiperplazisi veya yumurtalık karsinomu hücrelerinin tedavisinde etkili olduğu belirtilmiştir (112).

Bao ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada vitamin D'nin hücrelerde G6PDH, düzeyini artırdığı ve bu etkiyle hücreleri koruduğu tespit etmişlerdir (111, 113). Vitamin D 'nin oksidatif strese karşı hücrelerin korumasında, dolaylı olarak antioksidan sistemlerdeki çeşitli enzimlerinin gen ekspresyonunu kontrol eden bir transkripsiyon faktörü olan eritroid türevli 2-Like 2 (NFE2L2) nükleer faktörünün indüksiyonuna etki etmesinden kaynaklanabileceği rapor edilmiştir. Vitamin D'nin glutatyon peroksidaz 3 (GPX-3), heme oksijenaz 1 (HMOX-1) ve aldo-keto redüktaz 1C2 (AKR1C2) gibi enzimleri etkilemesi vitamin D'nin oksidatif sistem üzerindeki olumlu etkilerini desteklemektedir (114).

Bu bulgular vitamin D'nin oksidatif stres kaynaklı DNA hasarına karşı koruma sağlayabileceğini düşündürmektedir. Bu doğrultuda Banakar ve ark. kalsitriol ile tedavi edilen sıçanların VDR ekspresyonunun artırdığı, malondialdehit seviyelerini ise önemli ölçüde azalttığını bildirmektedir (115). Deneyesel ve klinik çalışmalarda vitamin D'nin hücre döngüsünde etkili olan sikline bağımlı kinaz (CDK) inhibitörün

modülasyonunda, Poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) ile apoptoz indüksiyonunda etkili bax/bcl-2 düzeylerinin dengelendiği bildirilmiştir.

Ayrıca anjiyogenezin inhibisyonu, tümör invazyonunun inhibisyonunda, vitamin D'nin etkisini gösteren birçok çalışma rapor edilmiştir. Ayrıca fosforile mitojenle aktive olan protein kinaz (P-MAPK) gibi Pro-proliferatif” sinyal moleküllerinin baskılanması nedeniyle hücre sağ kalımını güçlendirdiği ifade edilmiştir (116-121).

Bir in vitro çalışmada prostat kanserinde uygulanan vitamin D tedavisinin makrofaj inhibitörünün ekspresyonunu yukarı doğru regüle ettiği ve interlökin-6 (IL-6) ile MCP-1 mRNA seviyelerini artırdığı bildirilmiştir (122). Vitamin D'nin inflamasyonu modüle etmedeki potansiyel rolü obezite ve diğer kronik hastalıklarda giderek dikkat çekmektedir. Bulgular vitamin D'nin TNF-a IL-6, interlökin-8 (IL-8) gibi sitokinlerin ekspresyonunu aşağı yönlü düzenlediği ve monositlerde toll benzeri reseptör 2 ve toll benzeri reseptör 4'ün protein ekspresyonu düzenleyerek (123). Hücreleri koruduğu ve immünmodulator olarak görev yapmasından kaynaklanmaktadır (124, 125).

Bu çalışmada tedavi olarak vitamin D verilen grup, siklofosfamid verilen grup ile karşılaştırıldığında serum TAS düzeyi yükselmiş, serum TOS ve doku MDA düzeyleri düşmüştür. Ayrıca siklofosfamid grubuna göre histopatolojik, bulgular ile TUNEL bulgularında anlamlı bir iyileşme görülmüştür. Bu durum siklofosfamid ile oluşan karaciğer hasarına karşı uygulanan vitamin D'nin oksidatif stresi azaltarak dokuda koruyucu etkilerinin olduğu kanaatine varılmıştır. Vitamin D'nin antioksidan etkilerinin yanı sıra yağ dokusunda belirgin işlevleri olduğu ve adipositlerin sentez ve korunmasında biyolojik bir yanıt oluşturduğu ifade edilmiştir (126, 127).

Bu çalışmada ayrıca siklofosfamid'in neden olduğu oksidatif strese karşı adipoz dokudan salınan ve karaciğerde metabolize olan asprosinin cevabı ve uygulanan, vitamin D'nin etkileri incelenmiştir. Son araştırmalarda vitamin D'nin yağ dokusunda lipid sentezini ve kullanımında etkili olan lipoprotein lipaz aktivitesini ve mRNA seviyesini artırarak adipositleri uyurabileceği tespit edilmiştir (128).

Aynı zamanda vitamin D adipositlerde, adiposit lipogenezini katalize eden enzimleri düzenlediği ve obez hastalarda vitamin D reseptörünün inhibe edilmesi ile var olan yağ asidi oksidasyonunu daha da yükseldiği rapor edilmiştir (129, 130). Buna ek olarak lipid metabolizmasında yer alan lipaz, adipoz TAG lipaz ve Uncoupling Protein 1,2 ve 3 (UCP1,2,3) m-RNA ekspresyonunun vitamin D eksikliği sonucu azalmaktadır (131).

Ancak vitamin D'nin lipid metabolizması üzerindeki etkilerine ilişkin veriler hala daha yeterli değildir, obez olmayan sağlıklı denekler üzerinde yapılan bir çalışmada vitamin D takviyesinin lipaz, yağ asidi sentaz ve UCP-2 seviyelerini anlamlı olarak yükselttiğini tespit etmişlerdir (132). Kemoterapötik ajanların kaşeksi gelişimine ve ilerlemesine katkıda bulunduğu dair kanıtlarlar artmaktadır. Sağlıklı sıçanlarda yapılan çalışmalar, siklofosfamid, 5-florourasil, sisplatin ve metotreksat gibi kemoterapötik ajanların negatif nitrojen dengesi ve orantılı olarak kilo kaybı oluşturduğunu gösterilmiştir (133). Murphy ve ark., kaşeksi oluşturulan farelerde kontrol grubuna göre, önemli ölçüde azalmış gıda alımı ile kas ve yağ doku kaybının oluştuğunu ve ayrıca hem kanser hemde kemoterapinin yan etkilerine bağlı olarak dolaşımdaki glikoz seviyesinin azalması ve hipogliseminin oluşması gibi faktörler gıda alımının azalması sonucu oluşabileceğini bildirmişlerdir (134).

Bu çalışmada tüm gruplara ait sıçanların başlangıç ve final vücut ağırlıkları değerlendirildiğinde; kontrol, vitamin D ve SP+ vitamin D gruplarındaki sıçanların vücut ağırlıkları başlangıca göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış olarak izlendi. Bununla birlikte siklofosfamid, grubundaki sıçanların vücut ağırlıkları başlangıca göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış olduğu görüldü.

Asprosin glikoz metabolizması, insülin direnci, apoptoz ve iştah düzenlenmesinde etkili olup ayrıca merkezi sinir sistemi ile periferik doku ve organlar üzerinde birçok etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (58). Asprosin karaciğerde glikoz üretimini teşvik etmesi ve G proteinine bağlı reseptör aracılığıyla cAMP sinyal yolunu aktivelemesi hipotalamusta iştah reseptörlerinin uyarılmasına neden olmaktadır (59).

Yeni keşfedilen ve hakkında çok az bilgi sahibi olduğumuz bir adipokin olan asprosin'nin bu çalışmada serum ve doku düzeylerinde görülen azalmanın nedeni olarak kemoterapotik bir ajan olan siklofosfamidin neden olduğu kilo kaybıyla birlikte yağ dokusunda azalma ve bundan dolayı azalan gıda alımına bağlı olabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca kontrol grubuna göre siklofosfamid grubunda azalan glikojen depoları daha önceki çalışmalara atfen karaciğerde erken dönemde akut faz proteinlerin artan üretimi için gerekli olan enerjinin sağlanmasından dolayı olmuş olabileceğini düşündürmektedir. Tedavi olarak verilen vitamin D'nin hem yağ dokusunda adipositleri hemde karaciğer dokusunda oksidatif hasarı azaltması ile apoptozu baskılayarak asprosin seviyesini artırabileceği kanatındayız.

Çünkü sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada kemoterapotik bir ajan olan cisplatin'nin adipoz doku, karaciğer ve kaslarda lipogenezi akut olarak azalttığı ve lipogenezi baskılayarak adipoz dokuda disfonksiyon meydana getirdiğini ve adipokin

seviyelerini düşürdüğü belirtilmiştir (135, 136). Yapılan farklı çalışmalarda ise kemoterapötik ajanların adipoz dokunun hacmini azalttığı ve dolayısıyla sekresyon ürünlerinin ani artış ve azalışlarının, tüm vücut lipid ve enerji metabolizmasını etkileyebileceği tespit edilmiş olup karaciğerin çeşitli toksik ajan, virüsler veya metabolik hastalıklara bağlı değişimlere karşı oldukça hassas olduğu ve aktivitesinin değişebileceği bildirilmiştir (137-141).

Sonuç olarak; siklofosfamid ile oluşturulan karaciğer hasarına karşı vitamin D'nin oksidatif stresi baskılayarak doku hasarını azalttığı ve yeni bir adipokin olan asprosin seviyesini yükselttiği görülmüş olup kemoterapötik cevapla birlikte oluşan oksidatif hasarda asprosin rolünün aydınlatılması için daha kapsamlı ve ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu kanaatine varılmıştır. Ayrıca tıp alanında siklofosfamid kullanılmasını gerektiren karaciğer hastalıklarının tedavisinde, vitamin D kullanımının faydalı olabileceğini düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Sadler TW, (ed). Sadler TW. Langman's Medikal Embriyoloji. Basaklar C (Çev. Ed.), Ankara, Palme Yayıncılık, 1993; 230-231.
2. Moore KL, Moore KL, Persaud TVN. Klinik yönleriyle insan embriyolojisi Dalçık H, Yıldırım M. (Çev. Ed.) Nobel Tıp Kitabevi, 2009; 218.
3. Junqueira LC (ed). Junqueira L.C. Carneiro J. Karaciğer, Aytekin Y, Solakoğlu S. (eds) Temel Histoloji. Text -Atlas, Nobel Matbaacılık, 2009; 323-37.
4. Arifoğlu, Y. Her Yönüyle Anatomi 3. Baskı. 2021,
5. Arinci, K, Elhan A. Anatomi (5. Baskı), 1. Cilt. Güneş Tıp Kitabevi, Ankara, 2014; 216-21.
6. Abdel-Misih SR, Bloomston M. Liver anatomy. Surg Clin North Am 2010; 90(4): 643-653.
7. Moore KL (ed). Moore KL, Agur AMR. Essential Clinical Anatomy. Elhan A. (Çev. Ed.), Ankara, Güneş Kitabevi, 2006; 173.
8. Standring, S. Grey's anatomy. The anatomical basis of clinical practice. 2016.
9. Juza RM, Pauli EM. Clinical and surgical anatomy of the liver: a review for clinicians. Clin Anat. 2014;27(5):764-9.
10. Majno P, Mentha G, Toso C, Morel P, Peitgen HO, Fasel JH. Anatomy of the liver: an outline with three levels of complexity--a further step towards tailored territorial liver resections. J Hepatol. 2014;60(3):654-62.
11. Şeftalioğlu A, (ed). Şeftalioğlu A. Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi. 3. Baskı. Tıp teknik yayıncılık Ltd. Şti. Ankara 1998:301-302.
12. Moore KL (ed). Moore KL, Agur AMR. Essential Clinical Anatomy. Elhan A. (Çev. Ed.), Ankara, Güneş Kitabevi, 2006; 173.
13. Wanless IR, Wanless IR (ed). Anatomy, Histology, Embryology, and Developmental Anomalies of the Liver. Feldman M, Friedman LS, Brandt LJ. Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease. 8th Edition, Saunder Elsevier, Philadelphia, USA 2006; 1543-1585.
14. Junqueira LC (ed). Junqueira L.C. Carneiro J. Karaciğer, Aytekin Y, Solakoğlu S. (eds) Temel Histoloji. Text -Atlas, Nobel Matbaacılık, 2009; 323-37.
15. Eşrefoğlu M (ed). Eşrefoğlu M. Özel histoloji Medipres yayıncılık Ltd. Şti. 2009; s.106-20.
16. Kierszenbaum AL (ed). Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi Payolojiye Giriş. Demir R (Çev. Ed.), Ankara, Palme Yayıncılık, 2009;459-469.
17. William KO (ed). William KO, Patrick CN. Karaciğer. Müftüoğlu S, Kaymaz M, Atilla P. (eds). Netter's Essential Histology, Ankara, Güneş Kitabevi 2009; 312-325.
18. www.octc.kctcs.edu/gcaplan/anat2/notes8%20digestive. Erişim Tarihi 21.04.2021
19. Abraham LK (ed). Histoloji ve Hücre Biyolojisi: Patolojiye Giriş, Karaciğer, Demir R. (Çev., ed) Ankara, Palme Yayıncılık, 2006.
20. Sodeman's Pathologic Physiology. (Sodeman's Fiziopatoloji). Mechanism's of disease. Cilt II. Bölüm 4. 1992
21. Gillman GA (ed). Tedavinin Farmakolojik Temeli. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. 2009; 1315-405.

22. Reinke H, Asher G. Circadian clock control of liver metabolic functions. *Gastroenterol.* 2016;150(3):574-80
23. Chiang J. Liver physiology: Metabolism and detoxification. In: Linda M. McManus, Richard N. Mitchell, editors. *Pathobiology of human disease*. San Diego: Elsevier. 2014:1770-1782.
24. Vaja R, Ghuman N. Drugs and the liver. *Anaesthesia Intensive Care Med.* 2017;19(1):30-4.
25. Mitra V, Metcalf J. Metabolic functions of the liver. *Anaesthesia Intensive Care Med.* 2009;10(7):334-5..
26. Moignet A, Hasanali Z, Zambello R, et al. Cyclophosphamide as a first-line therapy in LGL leukemia. *Leukemia* 2014; 28: 1134–1136
27. Tsai-Turton M, Luong BT, Tan Y, Luderer U. Cyclophosphamide-induced apoptosis in COV434 human granulosa cells involves oxidative stress and glutathione depletion. *Toxicol Sci.* 2007; 98(1): 216-30.
28. Emadi A, Jones RJ, Brodsky RA. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nat Rev Clin Oncol.* 2009;6(11):638-47.
29. Rodriguez-Antona C, Ingelman-Sundberg M. Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer. *Oncogene.* 2006;25(11):1679-91.
30. Kehrer JP, Biswal SS. The molecular effects of acrolein. *Toxicol Sci.* 2000;57(1):6-15.
31. Mahmoud AM. Hesperidin protects against cyclophosphamide-induced hepatotoxicity by upregulation of PPAR γ and abrogation of oxidative stress and inflammation. *Can J Physiol Pharmacol.* 2014;92(9):717–724.
32. Fouad AA, Albuali WH, Jresat I. Protective effect of hesperidin against cyclophosphamide hepatotoxicity in rats. *Int J Biol Food Vet Agric Eng.* 2014;8(7):722–5.
33. Frew JW, Davatchi CC, Murrell DF. Cyclophosphamide in autoimmune blistering diseases: safety, efficacy and evidence base. *Blistering Diseases: Springer*, 2015: 507–13.
34. Hussein MR. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Hum Reprod Update.* 2005;11(2):162–167
35. Wahlang B, Falkner KC, Cave MC, Prough RA. Role of Cytochrome P450 Monooxygenase in Carcinogen and Chemotherapeutic Drug Metabolism. *Adv Pharmacol.* 2015;74:1-33
36. Muzio G, Marengo B, Salvo R, et al. Liver cancer is induced by a subnecrogenic dose of DENA when associated with fasting/refeeding: role of glutathione-transferase and lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med.* 1999;26(9-10):1314-20.
37. Gnanasekaran S, Sakthivel KM, Chandrasekaran G. İsviçre albino farelerinde siklofosfamid kaynaklı toksisiteye karşı polih herbal bir formülasyon olan vivartana'nın immünostimulan ve kemoprotektif etkisi . *J Exp Ther Oncol*, 2015; 11(1): 51–61
38. Zhu H, Long MH, Wu J, et al. Ginseng alleviates cyclophosphamide-induced hepatotoxicity via reversing disordered homeostasis of glutathione and bile acid. *Sci Rep.* 2015;5:17536.
39. Choe SS, Huh JY, Hwang IJ, et al. Adipose tissue remodeling: its role in energy metabolism and metabolic disorders. *Frontiers in Endocrinology*, 2016; 7: 30.
40. Birsoy K, Festuccia WT, Laplante M. A comparative perspective on lipid storage in animals. *J Cell Sci* 2013; 126:1541–52.
41. Chawla A, Nguyen KD, Goh YP. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 2011; 11:738–49.

42. Makki K, Froguel P, Wolowczuk I. Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines. *ISRN Inflamm* 2013; 2013:139239.
43. Huh JY, Park YJ, Ham M, Kim JB. Crosstalk between adipocytes and immune cells in adipose tissue inflammation and metabolic dysregulation in obesity. *Mol Cells* 2014; 37:365–71.
44. Rajala MW, Scherer PE. Minireview: the adipocyte-at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology* 2003; 144: 3765–3773.
45. Lionetti L, Mollica MP, Lombardi A, Cavaliere G, Gifuni G, Barletta A. From chronic overnutrition to insulin resistance: the role of fat-storing capacity and inflammation. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2009;19: 146–152.
46. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000 100:57–70.
47. Iyengar P, Combs TP, Shah SJ, et al. Adipocyte-secreted factors synergistically promote mammary tumorigenesis through induction of anti-apoptotic transcriptional programs and proto-oncogene stabilization. *Oncogene*. 2003;22(41):6408-23.
48. Lisanti MP, Pestell RG, Scherer PE 2003 Adipocytesecreted factors synergistically promote mammary tumorigenesis through induction of anti-apoptotic transcriptional programs and proto-oncogene stabilization. *Oncogene* 22:6408 –6423.
49. Vander Heiden MG, Cantley LC, ThompsonCB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009; 324:1029–1033.
50. Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* 2008 ; 134:703–707.
51. Thomson CA, Thompson PA. Dietary patterns, risk and prognosis of breast cancer. *Future Oncol* 2009; 5:1257–1269.
52. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89: 2548–56.
53. Fasshauer M, Bluher M. Adipokines in health and disease. *Trends Pharmacol Sci*. 2015 36: 461– 470.
54. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372 425–432.
55. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, et al. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 1995; 270: 26746–26749.
56. Blüher M, Mantzoros CS. From leptin to other adipokines in health and disease: facts and expectations at the beginning of the 21st century. *Metabolism*. 2015;64(1):131-145.
57. Romere C, Duerschmid C, Bournat J, et al. Asprosin, a fasting-induced glucogenic protein hormone. *Cell*. 2016; 165:566–79.
58. Yuan M, Li W, Zhu Y, et al. Asprosin: a novel player in metabolic diseases front *Endocrinology*, 2020; 11: 64.
59. Elnagar A, El-Belbasi HI, Rehan IF, et al. Asprosin: a novel biomarker of type 2 diabetes mellitusa *Slov. Vet. Res.* 2018; 55(20): 333-347.
60. Duerschmid C, He Y, Wang C, et al. Asprosin is a centrally acting orexigenic hormone. *Nat Med*. 2017;23(12):1444-1453.
61. Holmes D. Thyroid cancer: Incidence trends in the USA. *Nat Rev Endocrinol*. 2016;12(6):312.

62. Zhang L, Chen C, Zhou N, et al. Circulating asprosin concentrations are increased in type 2 diabetes mellitus and independently associated with fasting glucose and triglyceride. *Clin Chim Acta*. 2019;489:183-188.
63. Zhang Z, Tan Y, Zhu L, et al. Asprosin improves the survival of mesenchymal stromal cells in myocardial infarction by inhibiting apoptosis via the activated ERK1/2-SOD2 pathway. *Life Sci* 2019;231:116554.
64. Luís C, Fernandes R, Soares R, von Hafe P. A state of the art review on the novel mediator asprosin in the metabolic syndrome. *Porto Biomed J*. 2020 Dec 10;5(6):e108.
65. Hoffmann JG, Xie W, Chopra AR. Energy regulation mechanism and therapeutic potential of asprosin. *Diabetes*, 2020; 69(4), 559-566
66. Rubin D, Levij JS. Suppression by vitamins D2 and D3 of hamster cheek pouch carcinoma induced with 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene with a discussion of the role of intracellular calcium in the development of tumors. *Pathol Microbiol (Basel)* 1973; 39: 446–460.
67. Murphy LC, Wild J, Posen S, Stone G. 25-Hydroxycholecalciferol receptors in human breast cancer. *Br J Cancer* 1979; 39: 531–535.
68. Pippin JW, Brinkkoetter PT, Cormack-Aboud FC, et al. Inducible rodent models of acquired podocyte diseases. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009; 296(2): 213-229.
69. Adams JS, Hewison M. Update in Vitamin D. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2010, 95(2):471-478
70. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E: Vitamin D. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 2005, 289(1): 8- 28.
71. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4444353.html>
72. Chen S, Zhu J, Zuo S, Ma J, Zhang J, et al. 1,25(OH)2D3 attenuates TGFbeta1/beta2-induced increased migration and invasion via inhibiting epithelial-mesenchymal transition in colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 468: 130–135.
73. Abe J, Moriya Y, Saito M, et al. Modulation of cell growth, differentiation, and production of interleukin-3 by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in the murine myelomonocytic leukemia cell line WEHI-3. *Cancer Res* 1986; 46: 6316–21.
74. Komagata S, Nakajima M, Takagi S, et al. Human CYP24 catalyzing the inactivation of calcitriol is post-transcriptionally regulated by miR-125b. *Mol Pharmacol* 2009; 76: 702–709.
75. Lechner D, Manhardt T, Bajna E, et al. A 24-phenylsulfone analog of vitamin D inhibits 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D(3) degradation in vitamin D metabolism-competent cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 320: 1119–1126.
76. Xu, Y., Lou, Y., & Kong, J. VDR regulates energy metabolism by modulating remodeling in adipose tissue. *European journal of pharmacology*, 2019; 865:172-761.
77. Dabak DO, Kuloglu T, Ozercan MR. Effects of vitamin D3 (cholecalciferol) on adriamycin-induced nephrotoxicity. *Ren Fail*. 2009; 31(5):400-5.
78. Malhi H, Slehria S, Joseph B, et al. Cyclophosphamide disrupts hepatic sinusoidal endothelium and improves transplanted cell engraftment in rat liver. *Hepatology*, 2002; 36(1), 112-12.
79. Erdogan, M. A., Yalcin, A. Protective effects of benfotiamine on irisin activity in methotrexate-induced liver injury in rats. *Archives of medical science AMS*, 2020; 16(1), 205.

80. Khorwal G, Chauhan R, Nagar M. Effect of cyclophosphamide on liver in albino rats: a comparative dose dependent histomorphol study. *Int J Biomed Adv Res* 2017;8(3):102–107.
81. Cuce G, Çetinkaya S, Koc T. Chemoprotective effect of Vitamin E in cyclophosphamide-induced hepatotoxicity in rats. *ChemBiol Interact.* 2015;232:7–11.
82. Reddy S, Bradley J, Ginn S, Pathipati P, Ross JM. Immunohistochemical study of caspase-3-expressing cells within the pancreas of non-obese diabetic mice during cyclophosphamide-accelerated diabetes. *Histochem. Cell Biol.* 2003;119:451–461.
83. O'Brien BA, Harmon BV, Cameron DP, Allan DJ. Nicotinamide prevents the development of diabetes in the cyclophosphamide-induced NOD mouse model by reducing beta-cell apoptosis. *J. Pathol.* 2000;191:86–92.
84. Efdal, A. Siklofosfamid ile oluşturulmuş karaciğer hasarı üzerine vitamin D3'ün etkileri. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji Ve Embriyoloji Anabilim Dalı, 2014
85. Kern JC, Kehrer JP. Acrolein-induced cell death: a caspase-influenced decision between apoptosis and oncosis/necrosis. *Chem Biol Interact* 2002; 139: 79-95.
86. Senthilkumar S, Devaki T, Manohar BM, and BabuMS. Effect of squalene on cyclophosphamide-induced toxicity. *Clinica Chimica Acta*, 2006; 364(1-2):335–342, 2006.
87. Saandeep K, Vikram A, Tripathi DN, et al. Influence of hyperglycaemia on chemical-induced toxicity: study with cyclophosphamide in rat. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2009; 105: 236-42.
88. Luo D, Xu Z, Hu X, et al. URI prevents potassium dichromate-induced oxidative stress and cell death in gastric cancer cells. *Am J Transl Res.* 2016;8(12):5399–5409.
89. Zarei M, Shivanandappa T. Amelioration of cyclophosphamide-induced hepatotoxicity by the root extract of *Decalapis hamiltonii* in mice. *Food and Chem Toxicol* 2013; 57: 179-184.
90. Jnaneshwari S, Hemshekhar M, Santhosh MS, Sunitha K, et al. Crocin, a dietary colorant mitigates cyclophosphamide-induced organ toxicity by modulating antioxidant status and inflammatory cytokines. *J Pharm and Pharmacol* 2012; 604-614.
91. Senthilkumar S, Devaki T, Manohar MB, Babu MS. Effect of squalene on cyclophosphamide-induced toxicity. *Clin Chim Acta* 2006; 364: 335-342.
92. Nafees S, Ahmad ST, Arjumand W, et al. Modulattory effects of gentisic acid against genotoxicity and hepatotoxicity induced by cyclophosphamide in Swiss albino mice. *J Pharm and Pharmacol* 2011; 64: 259-267.
93. Tripathi DN, Jena GB. Ebselen attenuates cyclophosphamide-induced oxidative stres and DNA damage in mice. *Free Rad Res* 2008; 967-977.
94. Tripathi DN, Jena GB. Astaxanthin intervention ameliorates cyclophosphamide-induced oxidative stress, DNA damage and early hepatocarcinogenesis in rat: Role of Nrf2, p53, p38 and phase-II enzymes. *Mutat Res* 2010; 69-80.
95. Motawi TM, Sadik NA, Refaat A. Cytoprotective effects of DL-alpha-lipoic acid or squalene on cyclophosphamide-induced oxidative injury: an experimental study on rat myocardium, testicles and urinary bladder. *Food Chem Toxicol.* 2010;48(8-9):2326-36.
96. Chen Q, Song-Zhao Z, Hua-zhong Y, et al. Chemical characterization and immunostimulatory effects of a polysaccharide from *Polygoni Multiflori Radix Praeparata* in cyclophosphamide induced anemic mice. *Carbohydrate Polymers* 2012; 88: 1476– 1482.
97. Lameire N, Kruse V, Rottey S, et al. Nephrotoxicity of anticancer drugs – an underestimated problem? *Acta Clin Belg* 2011; 66: 337–345.

98. Newton HB. Neurological complications of chemotherapy to the central nervous system. *Handb Clin Neurol* 2012; 105: 903–916.
99. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic MM. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006; 160:1–40
100. Jnaneshwari S, Hemshekhar M, Santhosh MS, Sunitha K, et al. Crocin, a dietary colorant mitigates cyclophosphamide-induced organ toxicity by modulating antioxidant status and inflammatory cytokines. *J Pharm and Pharmacol* 2012; 604-614.
101. Kommagani R, Payal V, Kadakia MP. Differential regulation of vitamin D receptor (VDR) by the p53 family: p73-dependent induction of VDR upon DNA damage. *J Biol Chem* 2007; 282: 29847–54.
102. Muindi JR, Potter DM, Peng Y, et al. Pharmacokinetics of liquid calcitriol formulation in advanced solid tumor patients: comparison with caplet formulation. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005; 56: 492–496.
103. Muindi JR, Johnson CS, Trump DL, et al. A phase I and pharmacokinetics study of intravenous calcitriol in combination with oral dexamethasone and gefitinib in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009; 65: 33–40.
104. Fakih MG, Trump DL, Muindi JR, et al. A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of intravenous calcitriol in combination with oral gefitinib in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 1216–1223.
105. Chan JS, Beer TM, Quinn DI, et al. A phase II study of high-dose calcitriol combined with mitoxantrone and prednisone for androgen-independent prostate cancer. *BJU Int* 2008; 102: 1601–6.
106. Muindi JR, Modzelewski RA, Peng Y, et al. Pharmacokinetics of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ in normal mice after systemic exposure to effective and safe antitumor doses. *Oncology* 2004; 66: 62–66.
107. Garcion E, Sindji L, Leblondel G, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ regulates the synthesis of gamma-glutamyl transpeptidase and glutathione levels in rat primary astrocytes. *J Neurochem* 1999; 73: 859-866.
108. Sardar S, Chakraborty A, Chatterjee M. Comparative effectiveness of vitamin D₃ and dietary vitamin E on peroxidation of lipids and enzymes of the hepatic antioxidant system in Sprague-Dawley rats. *Int J Vitam Nutr Res* 1996; 66: 39-45.
109. Wiseman H. Vitamin D is a membrane antioxidant. Ability to inhibit iron-dependent lipid peroxidation in liposomes compared to cholesterol, ergosterol and tamoxifen and relevance to anticancer action. *FEBS Lett* 1993; 326: 285-288.
110. Fleet JC, DeSmet M, Johnson R, Li Y. Vitamin D and cancer: A review of molecular mechanisms. *Biochem J* 2012; 441:61–76
111. Peehl DM, Shinghal R, Nonn L, et al. Molecular activity of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in primary cultures of human prostatic epithelial cells revealed by cDNA microarray analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004; 92:131–41
112. Lambert JR, Kelly JA, Shim M, et al. Prostate derived factor in human prostate cancer cells: Gene induction by vitamin D via a p53-dependent mechanism and inhibition of prostate cancer cell growth. *J Cell Physiol* 2006; 208:566–74

113. Bao BY, Ting HJ, Hsu JW, Lee YF. Protective role of 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 against oxidative stress in nonmalignant human prostate epithelial cells. *Int J Cancer* 2008;122:2699–706
114. Kovalenko PL, Zhang Z, Cui M, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D-mediated orchestration of anticancer, transcript-level effects in the immortalized, non-transformed prostate epithelial cell line, RWPE1. *BMC Genomics* 2010; 11:26
115. Banakar MC, Paramasivan SK, Chattopadhyay MB, et al. 1Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 prevents DNA damage and restores antioxidant enzymes in rat hepatocarcinogenesis induced by diethylnitrosamine and promoted by phenobarbital. *World J Gastroenterol* 2004; 10:1268–75
116. Colston KW, Hansen CM. Mechanisms implicated in the growth regulatory effects of vitamin D in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2002;9:45–59.
117. Johnson CS, Muindi JR, Hershberger PA, Trump DL. The antitumor efficacy of calcitriol: preclinical studies. *Anticancer Res* 2006; 26: 2543–9
118. Miyata Y, Ohba K, Matsuo T, Watanabe S, Hayashi T, et al. Tumor-associated stromal cells expressing E-prostanoid 2 or 3 receptors in prostate cancer: correlation with tumor aggressiveness and outcome by angiogenesis and lymphangiogenesis. *Urology* 2013; 81: 136–42.
119. Chung I, Han G, Seshadri M, Gillard BM, Yu WD, et al. Role of vitamin D receptor in the antiproliferative effects of calcitriol in tumor-derived endothelial cells and tumor angiogenesis in vivo. *Cancer Res* 2009; 69: 967–75.
120. Hou YF, Gao SH, Wang P, Zhang HM, Liu LZ, et al. 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ suppresses the migration of ovarian cancer SKOV-3 cells through the inhibition of epithelial-mesenchymal transition. *Int J Mol Sci* 2016; 17: 1285.
121. Chen S, Zhu J, Zuo S, Ma J, Zhang J, et al. 1,25(OH) $_2$ D $_3$ attenuates TGF β 1/ β 2-induced increased migration and invasion via inhibiting epithelial-mesenchymal transition in colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 468: 130–135.
122. Skowronski RJ, Peehl DM, Feldman, D. Vitamin D and prostate cancer: 1, 25 dihydroxyvitamin D3 receptors and actions in human prostate cancer cell lines. *Endocrinology*, 1993; 132(5): 1952-1960.
123. Smith DC, Johnson CS, Freeman CC, Muindi J, Wilson JW, et al. A phase I trial of calcitriol (1,25-dihydroxycholecalciferol) in patients with advanced malignancy. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1339–45.
124. Johnson CS, Hershberger PA, Bernardi RJ, McGuire TF, Trump DL. Vitamin D receptor: a potential target for intervention. *Urology* 2002; 60: 123–30..
125. Bikle D. Extra renal synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D and its health implications. *Clin Rev Bone Miner Metab* 2009; 7: 114–125.
126. Li J, Byrne ME, Chang E, et al. 1Alpha,25-dihydroxyvitaminD hydroxylase in adipocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008; 112: 122–126.
127. Narvaez CJ, Matthews D, Broun E, et al. Lean phenotype and resistance to diet-induced obesity in vitamin D receptor knockout mice correlates with induction of uncoupling protein-1 in white adipose tissue. *Endocrinology* 2009; 150: 651–661.
128. Querfeld U, Hoffmann MM, Klaus G, et al. Antagonistic effects of vitamin D and parathyroid hormone on lipoprotein lipase in cultured adipocytes. *J Am Soc Nephrol* 1999;10: 2158–2164.

129. Kong J, Li YC. Molecular mechanism of 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibition of adipogenesis in 3T3 L1 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 290: 916–924
130. Wong KE, Szeto FL, Zhang W, et al. Involvement of the vitamin D receptor in energy metabolism: regulation of uncoupling proteins. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 296: 820–828.
131. Yee SW, Campbell MJ, Simons C. Inhibition of Vitamin D3 metabolism enhances VDR signalling in androgen-independent prostate cancer cells. *J Steroid BiochemMol Biol* 2006; 98: 228–35.
132. Srinivas S, Feldman D. A phase II trial of calcitriol and naproxen in recurrent prostate cancer. *Anticancer Res* 2009; 29: 3605–10.
133. Le Bricon T, Gugins S, Cynober L, Baracos VE. The negative effect of protein in traumas in healthy and growth. 1995; 44:1340-1348.
134. Murphy KT, Chee A, Trieu J, Naim T, Lynch GS. Importance of functional and metabolic impairments in the characterization of the C-26 murine model of cancer cachexia. *Dis Model Mech* 2012;5:533–545.
135. Dobrzyn P, Dobrzyn A, Miyazaki M, et al. Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency increases fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase in liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(17):6409–6414.
136. Funai K, Semenkovich CF. Skeletal muscle lipid flux: running water carries no poison. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011;301(2): 245–251.
137. Russell D.W. Cholesterol biosynthesis and metabolism. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 1992;6: 103–110.
138. Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115(5):911-919.
139. Musso G, Gambino R, Cassader M. Non-alcoholic fatty liver disease from pathogenesis to management: An update. *Obes. Rev.* 2010;11:430–445.
140. Iizuka K., Horikawa Y. ChREBP: A glucose-activated transcription factor involved in the development of metabolic syndrome. *Endocr. J.* 2008;55:617–624.
141. Ebadi M, Field CJ, Lehner R, et al. Chemotherapy diminishes lipid storage capacity of adipose tissue in a preclinical model of colon cancer. *Lipids in health and disease*, 2017; 16(1); 1-12.

ÖZGEÇMİŞ

İlk, orta ve lise öğrenimimi Elazığ'da tamamladım. 2004 yılında Elazığ Fırat Üniversitesi Biyoloji bölümünü kazandım ve 2008 yılında aynı fakülteden mezun oldum. 2011 yılında Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji programında yüksek lisans eğitimime başlayıp 2014 yılında mezun oldum. 2016 yılında Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji programında doktora eğitimime başladım. 2017 yılından beri Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalında araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım. Evliyim ve iki çocuğum var.