

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ (TIP) DOKTORA PROGRAMI

TİYOASETAMİD İLE İNDÜKLENMİŞ SIÇAN KARACİĞER
FİBROZİSİNE BOR BİLEŞİKLERİ İLE MUAMELE
EDİLMİŞ SÜNNET DERİSİ KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK
HÜCRENİN ETKİSİ

Gülüna ERDEM KOÇ
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN

II. DANIŞMAN
Prof. Dr. Fikrettin ŞAHİN

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TPF18009 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2019

KABUL VE ONAY SAYFASI

Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde Gülüna ERDEM KOÇ tarafından hazırlanan “Tiyoasetamid ile İndüklenmiş Sıçan Karaciğer Fibrozisine Bor Bileşikleri ile Muamele Edilmiş Sünnet Derisi Kökenli Mezenkimal Kök Hücrenin Etkisi” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 17/07/2019

	Ünvanı Adı Soyadı	Kurumu	İmza
Üye (T.D.):	Prof. Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN	ADÜ	
Üye:	Prof. Dr. Kemal ERGİN	ADÜ	
Üye:	Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE	PAÜ	
Üye:	Prof. Dr. Mehmet YÜNCÜ	GAÜN	
Üye:	Dr. Öğr. Üyesi Erdem Barış CARTI	ADÜ	

ONAY:

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsününtarih vesayılı oturumunda alınannolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Cavit KUM
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda; öncelikli desteğini üzerimden hiç eksik etmeyen danışmanım Prof. Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN'e; bana bir telefon edişimle araştırma laboratuvarlarında çalışmama izin veren, beni destekleyen, çalıştığım sürece varlığı ve sevgisiyle beni yüreklendiren Prof. Dr. Fikrettin ŞAHİN'e, İstanbul Yeditepe Üniversitesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü ve Moleküler Diagnostik Laboratuvarı çatısının altındaki tüm arkadaşlarıma, çalıştığım sürece desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmam için benimle birlikte önce Aydın'dan İstanbul'a sonrasında da Gaziantep'e göç eden yol arkadaşım, eşim Emrah KOÇ'a ve kızım Hayat KOÇ'a teşekkür etmek isterim.

Benimle birlikte bu aşamaları yaşayan sevgili geniş aileme annem, babam, kayınvalidem ve kayınpederime teşekkürlerimi az bulurum.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
TEŞEKKÜR	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
RESİMLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ.....	xiv
ÖZET	xviii
ABSTRACT	xix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 . Vücuttaki En Büyük Organ: Karaciğer	3
2.1.1 . Sağlıklı Karaciğere Genel Bakış.....	3
2.1.2 . Karaciğer Anatomisi.....	4
2.1.3 . Karaciğer Histolojisi.....	6
2.1.4 . Karaciğer Gelişimi.....	10
2.1.5 . Karaciğerin Vasküler Desteği.....	11
2.1.6 . Lenfatik Drenajı.....	12
2.1.7 . Sinir Desteği	12
2.1.8 . Karaciğer Zonasyonu ve Lobül Mimarisi (Arkitekturu)	13
2.1.9 . Karaciğer Sinuzoidlerinin Mimarisi ve Sinuzoidal Hücreler	16
2.1.9.1. Hepatositler ve kolanjiyositler.....	17
2.1.9.2. Karaciğer sinuzoidal endotelial hücreler (KSEH).....	19
2.1.9.3. Kupffer hücreleri	20
2.1.9.4. Hepatik stellat hücreler (HSH'ler).....	22
2.1.9.5. Pit hücreleri (karaciğer ilişkili lenfositler (LALs)).....	23
2.1.9.6. Oval hücre	24
2.1.9.7. Karaciğer kök/progenitor hücreler (KPH).....	24
2.2 . İnsan ve Sıçan Karaciğer Farklılıkları.....	25
2.3 . Fibrozis	26
2.3.1 . Karaciğer Fibrozisi	26

2.3.1.1. Karaciğerde fibrogenesis tipleri	27
2.3.1.2. Karaciğerde Fibrozis Sürecinde Karaciğer Sinüzoidlerinde Hücrel Etkileşim...	29
2.4 . Mezenkimal Kök Hücre (MKH).....	32
2.5 . Bor	35
2.6 . TAA	36
2.6.1 . TAA ve Toksikite Mekanizması	39
2.6.2 . TAA'nın İmmünotoksitesitesi	39
2.7 . Düz Kas Aktin (SMA).....	40
2.8 . Kollajen 1 Alfa	40
2.9 . Picro Sirius Red	40
2.10 . Serum ALT AST	41
3 . GEREÇ VE YÖNTEM.....	42
3.1 . Dene Düzeneği	42
3.1.1 . Hayvanların bakımı	42
3.1.2 . Thioacetamide (TAA) Uygulama.....	44
3.2 . Materyal Metod	45
3.2.1 . İnsan Sünnet Derisinden Kök Hücre İzolasyonu.....	45
3.2.2 . Hücre Çözme	46
3.2.3 . Pasaj.....	47
3.2.4 . Hücre Dondurma	48
3.2.5 . Çizik Deneyi (Scratch Assay)	48
3.2.6 . Akış Sitometri (Flow Cytometry).....	50
3.2.7 . MTS	51
3.2.8 . Farklılaşma deneyleri	53
3.2.8.1. Kondrogenik farklılaştırma.....	53
3.2.8.2. Adipogenik farklılaştırma.....	57
3.2.8.3. Osteogenik farklılaştırma	59
3.3 . Protein Eldesi, BCA Protein Deneyi ve Western Blotting	61
3.3.1 . Protein Eldesi.....	61
3.3.2 . BCA Protein Deneyi.....	62
3.3.3 . Western Blotting.....	64
3.4 . Kök Hücre İnfüzyonu	67
3.4.1 . SDKMKH İnfüzyonu	67

3.5 . Histolojik Değerlendirme	69
3.5.1 . Doku Takibi.....	69
3.5.2 . Bloklama-Parafine Gömme	70
3.5.3 . Kesit Alımı	71
3.5.4 . Boyama.....	72
3.6 . İstatistiksel Analizler	80
4 . BULGULAR	81
4.1. Her Bir Gruptaki Sıçanlara Ait, 1., 4., 7., 10., 13., 16. Haftalarda Kaydedilen Ağrlık lmleri Sonuçları	81
4.2. Karaciğer Endeksinin Hesaplanması.....	92
4.3. ALT AST lmleri	95
4.4. Scratch Deneyi (izik Deneyi)	101
4.5. Sitotoksiste Deneyi (MTS).....	107
4.6. Akış Sitometri (Flow Sitometri).....	109
4.7. Kök Hücre Farklılaştırma Deneyi	111
4.8. Western Blotlama.....	114
4.9. Histopatolojik Bulgular	114
4.9.10. TAA Grubu Pikro Sirius Kırmızıısı Boya Kesit Görüntülerinde Histopatolojik Değerlendirme.....	121
4.9.11. TAA+SDKMKH Grubu Pikro Sirius Kırmızıısı Boya Kesit Görüntülerinde Histopatolojik Değerlendirme	125
4.9.12. TAA+SDKMKH (BA) Grubu Pikro Sirius Kırmızıısı Boya Kesit Görüntülerinde Histopatolojik Değerlendirme	127
4.9.13. TAA+SDKMKH (NaB) Grubu Pikro Sirius Kırmızıısı Boya Kesit Görüntülerinde Histopatolojik Değerlendirme	128
4.10.1. Kontrol grubunda anti-alfa düz kas aktin (anti α -SMA) ve anti-kollajen1 α 1 (anti- coll1 α 1) antikorumları ile boyanan kesit görüntülerinin immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi	129
4.10.2. Sham grubunda anti-alfa düz kas aktin (anti α -SMA) ve anti-kollajen1 α 1 (anti- coll1 α 1) antikorumları ile boyanan kesit görüntülerinin immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi	131
4.10.3. TAA grubunda anti-kollajen1 α 1 (anti-coll1 α 1) ve anti-alfa düz kas aktin (anti α - SMA) antikorumları ile boyanan kesit görüntülerinin immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi	132

4.10.4. TAA+SDKMKH grubunda anti-kollajen1 α 1 (anti-coll α 1), anti-alfa düz kas aktin (anti α -SMA) antikorları ile boyanan kesit görüntülerinin immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi.....	134
4.10.5. TAA+SDKMKH (BA) grubunda anti-kollajen1 α 1 (anti-coll α 1) ve anti-alfa düz kas aktin (anti α -SMA) antikorları ile boyanan kesit görüntülerinin immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi.....	136
4.10.6. TAA+SDKMKH (NAB) grubunda anti-kollajen1 α 1 (anti-coll α 1) ve anti-alfa düz kas aktin (anti α -SMA) antikorları ile boyanan kesit görüntülerinin immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi.....	138
5 . TARTIŞMA.....	141
6 . SONUÇ VE ÖNERİLER	151
KAYNAKLAR.....	152
ÖZGEÇMİŞ.....	161

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

BA	: Borik Asit
EpCAM	: Epitel Adezyon Molekülü
ESM	: Ekstrasellüler Matriks
GFAP	: Glial Fibriller Asidik Protein
HBF	: Hepatosit Büyüme Faktörü
HSH	: Hepatik Stellat Hücre
ISCT	: Uluslararası Hücresel Terapi Derneği
KPH	: Karaciğer Kök/Progenitör Hücre
KSEH	: Karaciğer Sinuzoidal Endotel Hücreleri
LALs	: Karaciğer İlişkili Lenfositler
LSEH	: Karaciğer Sinuzoidal Epitel Hücresi
NaB	: Sodyum Pentaborat Pentahidrat
NAFLD	: Alkolik Olmayan Yağlı Karaciğer Hastalığı
NASH	: Non-alkolik Steatohepatit
NK	: Doğal Öldürücü Hücreler
PDGF	: Platelet-kökenli Büyüme Faktörü
SDKMKH	: Sünnet Derisi Kökenli Mezenkimal Kök Hücre
TGF-β1	: Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta1

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Karaciğerin segmental anatomisi ve portal ven dalları (Ellis, 2011).....	5
Şekil 2. Karaciğer lobülü. Karaciğer lobüllerinin spatial (uzaysal) düzenlenmesi ve periportal ve perisentral bölgelerle birlikte portal ven ve hepatik arter dalı ve bir safra kanalından oluşan portal alan (Matz-Soja 2019).....	13
Şekil 3. Hepatik arkitektur (Cattley ve Cullen, 2018).....	14
Şekil 4. Karaciğer lobül ve sinuzoid yapısı. (Du ve ark, 2018).	17
Şekil 5. Farklı fibroz gelişim tipleri. (A) Biliyer tip fibrozis; (B) Köprüleme fibrozisi; (C) “ters (revers) lobulasyon” ile sentrolobüler fibrozis; (D) perisellüler fibrozis (Pinzani ve Rombouts, 2004).	29
Şekil 6. Sinüzoidlerin normal mimarisi (sol resim), kan akışının portal venüllerden, sinüzoidlere ve sentral vene (sol kutucuk) normal akışı gösterilmiştir.	31
Şekil 7. Sirozda ve portal hipertansiyonda patolojik sinüzoidal yapılanma.....	32
Şekil 8. Kimyasal Yapısı:.....	37
Şekil 9. Zararlı tiyoasetamid (TAA) metabolitlerinin oluşumu (Wallace ve ark, 2015 izniyle).	38
Şekil 10 Deney düzeneği.	42
Şekil 11. Gruplardaki sıçan ağırlıklarının 1.-12. haftalardaki gram cinsinden değişimi.....	90
Şekil 12. Gruplardaki sıçan ağırlıklarının 1.-12. Haftalar arası ortalamaları	91
Şekil 13. Karaciğer endeksi.....	94
Şekil 14. Grupların pre-post ALT ve pre-post AST değerlerinin karşılaştırılması	98
Şekil 15. Scratch deneyinde yapay yaranın üst nokta için 6.h., 12.h. ve 24.h kapanma oranları (yüzde değerleri, %).....	106
Şekil 16. Scratch deneyinde yapay yaranın orta nokta için 6.h., 12.h. ve 24.h kapanma oranları (yüzde değerleri, %).....	107
Şekil 17. Scratch deneyinde yapay yaranın alt nokta için 6.h., 12.h. ve 24.h kapanma oranları (yüzde değerleri, %).....	107

- Şekil 18.** SDKMKH'de 24, 48 ve 72. saatte BA'nın sitotoksitesi. Farklı BA konsantrasyonlarının toksisite sonuçları. NC negatif kontrol. 108
- Şekil 19.** SDKMKH'de 24, 48 ve 72. saatte NaB'nın sitotoksitesi. Farklı NaB konsantrasyonlarının toksisite sonuçları. NC negatif kontrol. 108
- Şekil 20.** İnsan sünnet derisi kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonu..... 110



RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Mitokondri, bir lizozom ve birkaç endoplazmik retikulum sisternası gibi birkaç organel içeren sınırlı perinükleer sitoplazmaya sahip bir endotel hücre gövdesi. L: Sinüzoidal lümen; N: Çekirdeği. (McCuskey ve Wisse, 2010).....	8
Resim 2. Kupffer hücreleri ince yapı düzeyinde transmisyon elektron mikroskopisi.	8
Resim 3. Disse alanında lokalize hepatik stellat hücreleri ince yapı düzeyinde transmisyon elektron mikroskopisi, Sitoplazmada, çekirdeğin yanı sıra endoplazmik retikulumun yağ damlacıkları (*) ve kollajen lifi demeti (ok). L: Sinüzoidal lümen; f: Fenestra; N: Çekirdeği; SD: Disse alanı.....	9
Resim 4. Değişen çapta ve yoğunlukta yoğun cisimcikleri (lizozomları) içeren bir Kupffer hücresi	21
Resim 5. Deneysel hayvanları araştırma laboratuvarında hayvan izlem aşamaları	44
Resim 6. TAA uygulanmasında dikkat edilen hususlar	45
Resim 7. İnsan sünnet derisinden kök hücre izolasyonu	46
Resim 8. İnsan sünnet derisinden kök hücre dondurma işlemi.....	48
Resim 9. Scratch deneyinin aşamalarının gösterimi	50
Resim 10. BA ve NaB'nin MTS değerlendirilmesi	53
Resim 11. Farklılaştırma deneyi boyamaları	56
Resim 12. Farklılaştırma deneyi görüntüleme	56
Resim 13. Adipojenik farklılaştırmada Oil Red O boyama gösterimi	59
Resim 14. Von Kossa boyama	61
Resim 15. İnfüzyon aşaması	68
Resim 16. Doku trimleme ve takip aşaması için ön hazırlıklar	70
Resim 17. Gömme ve bloklama aşamaları.....	71
Resim 18. Kesit alım aşamalarının gösterimi	72

Resim 19. Boyanan kesit görüntüleri	75
Resim 20. Pikro sirius kırmızısı boyama sonrası kesitler	77
Resim 21. İmmünohistokimya boyaması görüntüleri	80
Resim 22. Akrifikasyon Sonrası Her Bir Gruba Ait Sıçan Karaciğer Görüntüleri	94
Resim 23. SDKMKH LCI cihazında 0., 6., 12., ve 24h’lerde alınan görüntüler	102
Resim 24. SDKMKH LCI cihazında 0., 6., 12., ve 24h’lerde alınan görüntüler kapanma ölçümleri	102
Resim 25. SDKMKH (BA) LCI cihazında 0., 6., 12., ve 24h’lerde alınan görüntüler....	103
Resim 26. SDKMKH (BA) LCI cihazında 0., 6., 12., ve 24h’lerde alınan görüntüler kapanma ölçümleri	103
Resim 27. SDKMKH (NaB) LCI cihazında 0., 6., 12., ve 24h’lerde alınan görüntüler..	104
Resim 28. SDKMKH (BA) LCI cihazında 0., 6., 12., ve 24h’lerde alınan görüntüler kapanma ölçümleri	104
Resim 29. Adipojenik farklılaştırma deneyi görüntüleri (ZEISS, Axio Vert.A1 invert mikroskobu ile görüntüleme (Yeditepe Üniversitesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Moleküler Diagnostik Laboratuarı))	111
Resim 30. Kondrojenik farklılaştırma deneyi görüntüleri (ZEISS, Axio Vert.A1 invert mikroskobu ile görüntüleme (Yeditepe Üniversitesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Moleküler Diagnostik Laboratuarı))	112
Resim 31. Osteojenik farklılaştırma deneyi görüntüleri (ZEISS, Axio Vert.A1 invert mikroskobu ile görüntüleme (Yeditepe Üniversitesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Moleküler Diagnostik Laboratuarı))	113
Resim 32. Kontrol grubu (Pikro Sirius Kırmızısı, 4X).....	115
Resim 33. Sham grubu (Pikro Sirius Kırmızısı, 10X).	115
Resim 34. TAA grubu (Pikro Sirius Kırmızısı, 40X-20X).....	116
Resim 35. TAA grubu (Pikro Sirius Kırmızısı, 4X).	117
Resim 36. TAA grubu (Pikro Sirius Kırmızısı, 10X).	117
Resim 37. TAA grubu (Pikro Sirius Kırmızısı, 10X).	118

Resim 38. TAA grubu (Pikro Sirius Kırmızı1, 10X)	119
Resim 39. TAA grubu (Pikro Sirius Kırmızı1, 4X).	120
Resim 40. TAA grubu, Pikro Sirius Kırmızı1, 4X.....	120
Resim 41. TAA+SDKMKH grubu (Pikro Sirius Kırmızı1, 4X).....	121
Resim 42. TAA+SDKMKH grubu (Pikro Sirius Kırmızı1, 10X-20X).	121
Resim 43. TAA+SDKMKH (BA) grubu (Pikro Sirius Kırmızı1, 10X)	122
Resim 44. TAA+SDKMKH (NaB) grubu (Pikro Sirius Kırmızı1, 4X-10X-10X-20X)..	122
Resim 45. Kontrol grubu (Hematoksilen-eozin, 20X).....	123
Resim 46. Kontrol grubu (Hematoksilen-eozin, 10X).....	123
Resim 47. Sham grubu (Hematoksilen-eozin, 4X)	124
Resim 48. TAA grubu (Hematoksilen-eozin, 100X)	125
Resim 49. TAA+SDKMKH Grubu Hematoksilen Eozin (40X)	125
Resim 50. TAA+SDKMKH (BA) Grubu Hematoksilen Eozin (40X).....	126
Resim 51. TAA+SDKMKH (NaB) Grubu Hematoksilen Eozin (100X)	127
Resim 52. Kontrol grubu negatif kontrol (NC) immunohistokimyasal kesit görüntüsü (20X).....	128
Resim 53. Kontrol grubu immunohistokimyasal kesit görüntüleri anti-kollajen1 α 1 (anti- coll1 α 1) (10X).	129
Resim 54. Sham grubu negatif kontrol (NC) immunohistokimyasal kesit görüntüsü, (10X).....	130
Resim 55. Sham grubu immunohistokimyasal kesit görüntüleri anti-kollajen1 α 1 (anti- coll1 α 1), kollajen birikimi dokuda normal seyindedir (10X-20X).	130
Resim 56. TAA grubu negatif kontrol (NC) immunohistokimyasal kesit görüntüsü (10X).....	131
Resim 57. TAA grubu immunohistokimyasal kesit görüntüleri anti-kollajen1 α 1 (anti- coll1 α 1) (10X-20X)	131
Resim 58. TAA grubu immunohistokimyasal kesit görüntüleri anti-kollajen1 α 1 (anti- coll1 α 1) (20X)	132

Resim 59. TAA+SDKMKH grubu negatif kontrol (NC) immunohistokimyasal kesit görüntüsü, (10X).	132
Resim 60. TAA+SDKMKH grubu negatif kontrol (NC) immunohistokimyasal kesit görüntüsü, (10X).	133
Resim 61. TAA+SDKMKH (BA) grubu negatif kontrol (NC) immunohistokimyasal kesit görüntüsü, (10X).	133
Resim 62. TAA+SDKMKH (BA) grubu immunohistokimyasal kesit görüntüleri anti-kollajen1 α 1 (anti-coll1 α 1) (10X).....	134
Resim 63. TAA+SDKMKH (NaB) grubu negatif kontrol (NC) immunohistokimyasal kesit görüntüsü, (10X)	134
Resim 64. TAA+SDKMKH (NaB) grubu immunohistokimyasal kesit görüntüleri, anti-kollajen1 α 1 (anti-coll1 α 1), (10X).....	135
Resim 65. TAA+SDKMKH grubu immunohistokimyasal kesit görüntüleri, anti α -SMA, (10X).	135
Resim 66. TAA+SDKMKH (BA) grubu negatif kontrol (NC) immunohistokimyasal kesit görüntüsü, (10X).	136
Resim 67. TAA+SDKMKH (BA) grubu immunohistokimyasal kesit görüntüleri anti-kollajen1 α 1 (anti-coll1 α 1) (10X).....	136
Resim 68. TAA+SDKMKH (BA) grubu immunohistokimyasal kesit görüntüleri (anti α -SMA, 20X).	137
Resim 69. TAA+SDKMKH (NaB) grubu negatif kontrol (NC) immunohistokimyasal kesit görüntüsü, (10X).	138
Resim 70. TAA+SDKMKH (NaB) grubu immunohistokimyasal kesit görüntüleri, anti-kollajen1 α 1 (anti-coll1 α 1), (+), (10X).	138
Resim 71. TAA+SDKMKH (NaB) grubu immunohistokimyasal kesit görüntüleri (+) (anti α -SMA, 10X).....	139

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Karaciğer hücrelerinin kökeni (Lobritto, 2017)	11
Tablo 2. Grupların düzenlenişi.	43
Tablo 3. Ba ve NaB'nin deneysel planlanması.....	52
Tablo 4. Kondrojenik farklılaştırma hazırlık aşaması	54
Tablo 5. Kondrojenik farklılaştırmada kullanılan kimyasallar ve miktarlarının gösterimi.....	55
Tablo 6. Adipojenik farklılaştırma deneyi.....	57
Tablo 7. Adipojenik farklılaştırmada kullanılan kimyasallar ve miktarları.....	58
Tablo 8. Osteojenik farklılaştırma	60
Tablo 9. Osteojenik farklılaştırmada kullanılan kimyasallar ve miktarlarının gösterimi ...	60
Tablo 10. BCA deneyi ile protein miktarının belirlenmesi	63
Tablo 11. Deneylenen miktarlarla western blotting deneyi	64
Tablo 12. SMA + COL yüklemesi sıralanışı	65
Tablo 13. GAPDH yüklemesi sıralanışı	65
Tablo 14. Leica 1020 doku takip cihazında 10.10.2018 tarihli doku takip işlemi:.....	69
Tablo 15. Hematoksilen-eozin boyama uygulanması.....	74
Tablo 16. Pikro sirius boyama aşmaları.....	76
Tablo 17. İmmünohistokimya kit içeriği (ab80436-EXPOSE Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB Detection IHC Kit)	77
Tablo 18. İmmünohistokimya boyama aşmaları.....	79
Tablo 19. Kontrol grubundaki sekiz sığana ait, 1., 4., 7., 10., 13., 16. haftalarda kaydedilen ağırlık ölçümleri sonuçları (g).....	81
Tablo 20. Sham grubundaki sekiz sığana ait, 1., 4., 7., 10., 13., 16. haftalarda kaydedilen ağırlık ölçümleri sonuçları (g).....	81

Tablo 21. TAA grubundaki sekiz sıçana ait, 1., 4., 7., 10., 13., 16. haftalarda kaydedilen ağırlık ölçümleri sonuçları (g).....	82
Tablo 22. TAA+SDKMKH grubundaki sekiz sıçana ait, 1., 4., 7., 10., 13., 16. haftalarda kaydedilen ağırlık ölçümleri sonuçları.....	82
Tablo 23. TAA+SDKMKH (BA) grubundaki sekiz sıçana ait, 1., 4., 7., 10., 13., 16. haftalarda kaydedilen ağırlık ölçümleri sonuçları.....	83
Tablo 24. TAA+SDKMKH (NaB) grubundaki sekiz sıçana ait, 1., 4., 7., 10., 13., 16. haftalarda kaydedilen ağırlık ölçümleri sonuçları.....	83
Tablo 25. Kontrol grubundaki sıçanların her hafta Pazartesi günleri kayıt altına alınan ağırlık ölçümlerinin artan haftalara göre (hatfa 1-hafta16) istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	84
Tablo 26. Sham grubundaki sıçanların her hafta Pazartesi günleri kayıt altına alınan ağırlık ölçümlerinin artan haftalara göre (hatfa 1-hafta16) istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	84
Tablo 27. TAA grubundaki sıçanların her hafta Pazartesi günleri kayıt altına alınan ağırlık ölçümlerinin artan haftalara göre (hatfa 1-hafta16) istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	85
Tablo 28. TAA+SDKMKH grubundaki sıçanların her hafta Pazartesi günleri kayıt altına alınan ağırlık ölçümlerinin artan haftalara göre (hatfa 1-hafta16) istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	85
Tablo 29. TAA+SDKMKH (BA) grubundaki sıçanların her hafta Pazartesi günleri kayıt altına alınan ağırlık ölçümlerinin artan haftalara göre (hatfa 1-hafta16) istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	86
Tablo 30. TAA+SDKMKH (NaB) grubundaki sıçanların her hafta Pazartesi günleri kayıt altına alınan ağırlık ölçümlerinin artan haftalara göre (hatfa 1-hafta16) istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	86
Tablo 31. Kontrol (K) grubunun hafta1-hafta12 ölçüm zamanlarına göre ağırlıkların karşılaştırılması	87
Tablo 32. Sham (Sh) grubunun ölçüm zamanlarına göre ağırlıkların karşılaştırılması	87

Tablo 33. Tiyoasetamid (TAA) grubunun ölçüm zamanlarına göre ağırlıkların karşılaştırılması	88
Tablo 34. Sünnet derisi kökenli mezenkimal kök hücre (SDKMKH) grubunun ölçüm zamanlarına göre ağırlıkların karşılaştırılması.....	88
Tablo 35. Sünnet derisi kökenli mezenkimal kök hücre (TAA+SDKMKH (BA)) grubunun ölçüm zamanlarına göre ağırlıkların karşılaştırılması	89
Tablo 36. Sünnet derisi kökenli mezenkimal kök hücre (TAA+SDKMKH (NaB)) grubunun ölçüm zamanlarına göre ağırlıkların karşılaştırılması	89
Tablo 37. Deney gruplarının 12 hafta boyunca kaydedilen ağırlıklarının ortalamalarının gruplar arası karşılaştırılması.....	91
Tablo 38. Her bir gruptaki sıçanların karaciğer ağırlığı	92
Tablo 39. 16. Haftada, sakrifikasyon öncesi her bir gruptaki sıçanların ağırlıkları.....	92
Tablo40. Karaciğer indeksi hesaplaması	93
Tablo 41 Her bir sıçanın karaciğer Endeksi.....	93
Tablo 42. Kontrol grubu pre-post ALT pre-post AST ölçümleri	95
Tablo 43. Sh grubu pre-post ALT pre-post AST ölçümleri.....	95
Tablo 44. TAA grubu pre-post ALT pre-post AST ölçümleri.....	96
Tablo 45. TAA+SDKMKH grubu pre-post ALT pre-post AST ölçümleri	96
Tablo 46. TAA+SDKMKH (BA) grubu pre-post ALT pre-post AST ölçümleri.....	96
Tablo 47. TAA+SDKMKH (NaB) grubu pre-post ALT pre-post AST ölçümleri	97
Tablo 48. Tüm grupların pre-post ALT pre-post AST ölçüm istatistik sonuçları	97
Tablo 49. Kontrol grubu pre-ALT-AST, post-ALT-AST değerlerinin istatistiksel değerlendirilmesi.....	98
Tablo 50. Sh grubu pre-ALT-AST, post-ALT-AST değerlerinin istatistiksel değerlendirilmesi.....	99
Tablo 51. TAA grubu pre-ALT-AST, post-ALT-AST değerlerinin istatistiksel değerlendirilmesi.....	99

Tablo 52. TAA+SDKMKH grubu pre-ALT-AST, post-ALT-AST değerlerinin istatistiksel değerlendirilmesi.....	100
Tablo 53 TAA+SDKMKH (BA) grubu pre-ALT-AST, post-ALT-AST değerlerinin istatistiksel değerlendirilmesi.....	100
Tablo 54. TAA+SDKMKH (NaB) grubu pre-ALT-AST, post-ALT-AST değerlerinin istatistiksel değerlendirilmesi.....	101
Tablo 55. Scratch deneyi ölçüm sonuçları (LCI).....	105
Tablo 56. Scratch deneyi kapanma aralığı ölçüm sonuçları (LCI).....	105
Tablo 57. Scratch deneyinde yapay yaranın 6.h., 12.h. ve 24.h kapanma oranları (yüzde değerleri, %).....	106
Tablo 58. Karaciğer doku kesitlerinin pikro sirius kırmızısı histokimyasal boyama ile kollajen-1-alfa ve alfa-SMA immunohistokimyasal boyama sonuçlarının değerlendirilmesi	139
Tablo 59. alfa-SMA proteininin immunohistokimyasal boyama ile western blotlama sonuçlarının değerlendirilmesi.....	140

ÖZET

TİYOASETAMİD İLE İNDÜKLENMİŞ SIÇAN KARACİĞER FİBROZİSİNE BOR BİLEŞİKLERİ İLE MUAMELE EDİLMİŞ SÜNNET DERİSİ KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRENİN ETKİSİ

Koç E. G. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi, Aydın, 2019.

Günümüzde tedavisi ortaya konulamayan, kronik viral ve/veya metabolik hastalıkların etkisiyle gelişebilen karaciğer fibrozisi, ileriki aşamalarda sirozla sonuçlanabilmektedir. Fibrozis kronik karaciğer hastalıklarında enflamatuvar reaksiyonla birlikte ortaya çıkmaktadır. Karaciğer hasarlanmasında, karaciğer stellat (yıldızsı) hücreler (HSH'ler) in artmış işlevi ve hücre dışı matriksin yoğun birikimi etkin unsurdur.

Bu çalışmadaki amaç; tiyoasetamidle oluşturulan sıçan karaciğer fibrozisinde bor bileşikleri (borik asit (BA), sodyum pentaborat penta hidrat (NaB)) ile muamele edilmiş sünnet derisi kökenli mezenkimal kök hücrelerin etkisinin araştırılmasıdır. Deney grupları: Tiyoasetamid (TAA) grubu, sünnet derisi kökenli mezenkimal kök hücre (SDKMKH) grubu, bor bileşiklerinden borik asit ile muamele edilmiş sünnet derisi kökenli mezenkimal kök hücre (SDKMKH+BA) grubu, bor bileşiklerinden sodyum pentaborat ve pentahidrat ile muamele edilmiş sünnet derisi kökenli mezenkimal kök hücreler (SDKMKH+NaB) grubu Kontrol ve Sham grubu. Tiyoasetamid 12 hafta boyunca intraperitoneal (ip) olarak 150 mg/kg olarak verildi. Sünnet derisinden mezenkimal kök hücre izolasyonu sonrası akış sitometride (flow sitometri) kök hücre işaretleyicilerine bakıldı. Kültür ortamında çoğaltılan kök hücrelere 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum (MTS) hesaplamaları ile belirlenen miktarda ($\mu\text{g/ml}$) ile bor bileşikleri verildi. Çoğaltılan kök hücreler sıçanların kuyruk veninden verildi. Kök hücrelerin infüzyonu gerçekleştirildi. İnfüzyon sonrası 4 hafta iyileşme süreçleri izledi. Anestezi sonrası karaciğer dokuları yapısal, immunohistokimyasal ve western blot çalışmaları için kullanıldı.

Anahtar Kelimeler: Fibrozis, Karaciğer, Mezenkimal Kök Hücre, Sünnet Derisi Kökenli Mezenkimal Kök Hücre, Bor Bileşikleri, Borik Asit (BA), Sodyum Pentaborat Pentahidrat (Nab).

ABSTRACT

THE EFFECT OF BORON COMPOUNDS-TREATED FORESKIN DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS ON THIOACETAMIDE-INDUCED RAT LIVER FIBROSIS

Koc E. G. Adnan Menderes University Health Sciences Institute, Department of Histology and Embryology PhD Thesis, Aydın, 2019.

Hepatic fibrosis is a disease that can be developed as a result of metabolic disease and/or from chronic viral inaction, a therapy for hepatic fibrosis has not yet been approved and the disease can result in cirrhosis in later stages. Chronic liver fibrosis is associated with inflammatory reactions in chronic liver diseases. Increased function of hepatic stellate cells (HSCs) and high accumulation of extracellular matrix proteins are also influential factors during liver injury.

The aim of this study was to investigate the effect of foreskin-derived mesenchymal stem cells treated with boron compounds (boric acid (BA), sodium pentaborate penta hydrate (NaB)) in rat liver fibrosis that was induced by thioacetamide. Experimental groups were set: Thioacetamide (TAA) group, Foreskin-derived mesenchymal stem cells (SDKMKH) group, Foreskin-derived origin mesenchymal stem cells treated with boric acid (SDKMKH+BA) group, Foreskin-derived origin mesenchymal stem cells treated with sodium pentaborate penta hydrate (SDKMKH+NaB) group, Control and Sham group were set a dose of 150 mg/kg Thioacetamide was given to the rats intraperitoneally (ip) for 12 weeks. Mesenchymal stem cells were isolated from foreskin and examined for known stem cell markers using flow cytometry. Mesenchymal stem cells were cultured in media containing specific concentrations of 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -5- (3-carboxymethoxyphenyl) -2- (4-sulfophenyl) -2H-tetrazolium (MTS) ($\mu\text{g/ml}$) and boron compounds. In-vitro expanded mesenchymal stem cells were injected into the tail vein of the experimental rats. Infusion of stem cells was performed. After infusion, healing processes were followed up for 4 weeks. Following anesthesia performed on the animals, liver tissue from different groups were obtained and structural, immunohistochemical, and western blot studies were performed on the tissue.

Key Word: Fibrosis, Liver, Mesenchymal Stem Cells, Foreskin-Derived Mesenchymal Stem Cells, Boron Compounds, Boric Acid (BA), Sodium Pentaborate Penta Hydrate (Nab)

1. GİRİŞ

Fibrozis akciğer, karaciğer, deri, böbrek, nöron ve damar gibi değişik doku ve organları etkileyen bir yapısal değişimdir. Temelde lif artışı, ESM birikimiyle sonuçlanan fibroblast ve immün hücre aktivasyonu, infiltrasyonu ve geciken apoptozis gibi hücre kökenli aşamaları içerir. Fibrozisin gelişim süreci, fibrosit ve fibroblast hücrelerinin aktivasyonu ve bunların alpha-düz kas aktini (α -SMA) salgılayan miyofibroblast benzeri hücrelere farklılaşmasıdır. ESM'nin hasarlı dokularda birikimi, kollajen tip I ve III, perlekan ve lamininleri de içeren bileşenlerinin artan sentezinden kaynaklanmaktadır (Lord ve ark, 2018).

Doku hasarını takiben böbrek, akciğer, karaciğer, kalp ve iskelet kası, merkezi sinir sistemi ve pankreas gibi çeşitli dokular ve organlar kontrollü doku onarımı ve rejenerasyonu veya kontrolsüz organ hasarı ile sonuçlanan dinamik bir yara iyileşme sürecinden geçer. Fibrozis, gözlerin, derinin, eklemlerin, kemik iliğinin, barsakların, peritonun ve retroperitonun belirli hastalıklarında da rol oynar. Dolayısıyla fibrozis çeşitli organlarda şekillenebilen ortak bir cevaptır (Schaefer, 2018). Doku hasarı ve inflamasyon, fibrozis ve rejenerasyonun en önemli tetikleyicileridir. Doku hasarı, sadece inflamasyonu indüklemekle kalmaz aynı zamanda doğal ve edinilmiş immün sistem hücrelerini aktive ederek ve hasarlı bölgede toplanmasını sağlayarak da inflamasyonun tipini ve polarizasyonunu da belirler. Diğer taraftan büyük doku hasarını takip eden inflamatuvar yanıt her zaman fibrozisle sonuçlanmayabilir, hatta aksine fibrozisi de önleyici olabilir.

Diğer bir temel nokta, inflamasyon yoksa fibrozisin gelişip gelişmeyeceğidir? İnflamasyon işaretinin görülmediği çok sayıda fibrotik doku varlığı söz konusudur. Ayrıca hastalıkların son aşamasında, fibrozis gelişim sürecinde inflamasyonun gözlenmediği çalışmalar da mevcuttur (Mack, 2018).

Monosit ve makrofajlar dokunun yeniden modellenmesi (remodelling) ve fibrozisinde de etkin bir role sahiptirler. Yetişkin fare monositleri hematopoietik kök hücrelerinden köken alırlarken öbür taraftan makrofajların iki farklı kaynağı vardır. Bazı dokularda makrofajlar hematopoietik kök hücrelerden köken alırken, karaciğerde Kupffer hücreleri, beyindeki mikroglialar ve epidermisdeki Langerhans hücreleri vitellus kesesi makrofajlarından köken alırlar (Mack, 2018).

Karaciğer fibrozisini kesit düzeyinde göstermek için pikro sirius kırmızısı boyası

kullanılmıştır. Pıro sirus kırmızısı ile kollajen kırmızı boyanırken aynı zamanda parankim sarı boyanır, aynı zamanda Pıro sirus kırmızısı boyası hematoksilen-eozin boyamasında kolayca görülmeyen perisellüler ve sinüzoidal fibrozisi de ortaya çıkarır (Lackner ve Tiniakos, 2019). Dokulardaki kollajenin miktar tayini için yaygın olarak kullanılan güçlü bir anyonik boyadır (Lei ve ark, 2019). Sirius kırmızısı boyanması, TAA'nın, sıçanlarda belirgin karaciğer fibrozisi oluşturduğunu göstermiştir. Çalışmamızda bor bileşikleri ile muamele edilen sünnet derisi kökenli kök hücrelerin sıçan karaciğer fibrozisine olan etkisini araştırmayı amaçladık.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Vücuttaki En Büyük Organ: Karaciğer

2.1.1. Sağlıklı Karaciğere Genel Bakış

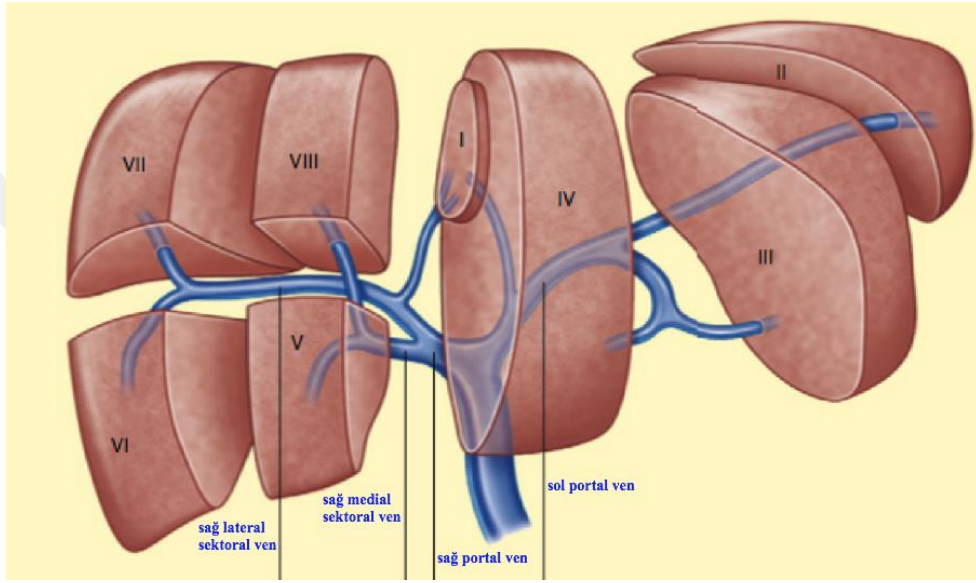
Karaciğer, organizmanın enerji metabolizması üzerine büyük etkisi olan metabolik bir organdır (Matz-Soja 2019). Vücuttaki en büyük organ olan karaciğer, metabolizma, glikojen depolanması, ilaç detoksifikasyonu, protein üretimi ve safra asidi salgılanması gibi homeostazın düzenlenmesinde geniş bir role sahiptir (Lobritto, 2017; Koike, 2018; Tomita ve ark, 2018). Karaciğerde parankimal ve non-parankimal olmak üzere iki hücre tipi vardır. Parankimal hücrelerden hepatositler (%70); karaciğerde metabolik ve salgı işlevlerinin ana hücreleridirler (Miyamura ve Nishina, 2018; Tomita ve ark, 2018). Safra kanallarını döşeyen kolanjiyositler ise karaciğerde (%1) bulunan ana epitel hücreleridir. Hepatositlerin işlevini hücre-hücre etkileşimi yoluyla düzenleyen, parankimal olmayan hücreler ise; hepatik sinüzoidal endotel hücreleri (%12), sinüzoid lümen tarafında yer alan Kupffer hücreleri (%15) ve Disse alanındaki hepatik stellat hücreleri (%3) (Tomita ve ark, 2018), Pit hücreleri, mezotelial hücreler (Miyamura ve Nishina, 2018) dir. Karaciğer, iskelet kası ve yağ dokusu gibi diğer organ ve dokularla yakından ilişkilidir. Gastrointestinal kanalda yiyecekler sindirilir ve glikoz, yağ asitleri ve aminoasitler kan dolaşımına verilir ve portal ven yoluyla da karaciğere taşınır (Matz-Soja 2019). Karaciğer, hepatik arter ve portal ven aracılı eşsiz ikili kan desteğine sahiptir. Hepatik arter aorttan gelen oksijenden zengin kanı taşırken, portal ven ise gastrointestinal sistemden, dalak ve pankreasdan gelen ve sindirilmiş besin maddelerinden zengin kanı taşımaktadır (Lobritto, 2017; Miyamura ve Nishina, 2018). Her iki damar da, hepatik arter ve portal ven, karaciğer kapillerleri olan sinüzoidlere dallanırlar ve sinüzoidler de LSEH'ler tarafından döşenir ve hepatik venin bir dalı olan ve kanı karaciğerden taşıyacak olan sentral vene drene olurlar, sentral ven yoluyla hepatik vene ve hepatik venden de inferior vena kavaya drene olur (Mahadevan, 2014; Miyamura ve Nishina, 2018). Karaciğerin önemli işlevlerinden birisi de kan-glukoz seviyelerinin düzenlenmesidir. Kan-glukoz seviyesi düşmeye başladığında, depo glikojenin depolimerizasyonunu aktive eder ve oluşan glukoz monomerleri kana karışır. Kanda aşırı glukoz birikiminde ise karaciğer hızlı bir şekilde bu glikozu glikojen şeklinde depolar (Miyamura ve Nishina, 2018). Karaciğer detoksifikasyondan, atıkların ve ksenobibiklerin metabolik dönüşüm ve safra yoluyla uzaklaştırılmasından sorumludur. Karaciğer ağır

metallerin, yan ürünlerin, ilaçların, kimyasalların, alkol ve diğer zehirlerin toksik etkilerinin uzaklaştırıldığı detoksifikasyonundan da sorumludur. Detoksifikasyonun baskılandığı karaciğer işlev kaybı gibi durumlarda kanda toksik maddelerin aşırı birikimine bağlı olarak organizmada çoklu organ yetmezliği gelişebilir (Miyamura ve Nishina, 2018). Karaciğerin önemli işlevlerinden bir diğeri de hepatositler tarafından sürekli safranin salgılanmasıdır. Safra, kolanjiyositler tarafından döşenen safra kanalları boyunca ilerleyerek safra kesesinde yoğunlaştırılır ve depolanır. Yemekten sonra safra kesesinde depolanan safra, duodenuma boşaltılarak sindirimde rol alır ve depolanan bu safra, sindirime yardımcı olmak için duodenuma boşaltılır. Safra asitleri ince bağırsakta diyet yoluyla alınan lipitlerin ve yağda çözünen vitaminlerin çözünmesi, sindirilmesi ve emilmesini kolaylaştıran karışık misellerin oluşumu için gereklidir. Safra asitleri, ileum tarafından emilerek portal ven yoluyla karaciğere tekrar taşınır ve böylelikle fazla safra asidi sentezi baskılanması sağlanır. Bu enterohepatik safra dolaşımı metabolik homeostazi korunmasında oldukça etkindir (Miyamura ve Nishina, 2018). Karaciğer, memeli fetüsünde hematopoezden sorumludur. Farklı gelişim potansiyeline sahip hematopoetik kök hücreler (HKH'ler) ilk olarak embriyonik vitellus kesesinde, aort-gonad-mezonefroz bölgelerinde ve plasentada bulunur. Bu HKH'ler fetal karaciğere göç ederek olgunlaşmaya uğrarlar. Postnatal kemik iliği hematopoezin merkezi olana kadar HKH'ler, fetal kemik iliği ve dalakta kolonize olurlar (Miyamura ve Nishina, 2018).

2.1.2. Karaciğer Anatomisi

Abdomen üst kadranında, diyaframın hemen altında bulunan ve sol tarafından ise mide tarafından sınırlandırılan (Foster, 2018) karaciğerin mikroskopik ve işlevsel anatomisi, tipik olarak hayvanlar (kemirgenler, köpekler, primatlar ve diğer memeli türleri, hem de insanlar) arasında oldukça benzerdir (Cattley ve Cullen, 2018). Vücuttaki en büyük organ olan karaciğerin makroskopik anatomik bölümleri, her biri kendi kan desteği ve biliyer drenajı olan sekiz hepatik bölüme işlevsel bölünmesiyle uyuşmayan sağ, sol, kaudat ve kuadrat lobları içerir. Porta hepatis, lenfatik ve otonom sinirlerle birlikte hepatik arter, portal ven ve sağ ve sol hepatik kanalları (portal triad) iletir. Karaciğerin doğrudan inferior vena kava içerisine drenajı, küçük aksesuar hepatik venlerle birlikte sağ, sol ve orta hepatik venleri içerir (Ellis, 2011). Karaciğer ince bir bağ dokusu ile kaplanmış dış yüzeyinde sağ ve sol lob olmak üzere iki lob'a ayrılır. Bu ayrım; diyafram yüzeyine anteriordan bağlı

falsiform ligament (Qin ve Crawford, 2018), ligamentum teres fissuru ve karaciğerin inferior yüzeyinde yer alan ligamentum venozum temellidir (Mitra ve Metcalf, 2012). Karaciğerin sağ lobu inferior ve posterior olarak iki küçük loba; kaudat ve kuadrat loblara ayrılmıştır (Mitra ve Metcalf, 2012; Qin ve Crawford, 2018). Makroskobik olarak sağ, sol, kaudat ve kuadrat loblara ayrılırken işlevsel olarak da herbirinin kan desteği ve safra drenajı birbirinden ayrı olan sekiz kısma bölünmüştür (Şekil 2.1). Bu düzenlenme segmental hepatik rezeksiyonlarda önemlidir (Ellis, 2011).



Şekil 1. Karaciğerin segmental anatomisi ve portal ven dalları (Ellis, 2011).

Karaciğerin dış yüzeyi, falsiform ligament ve sağ ve sol triangular ligamentler tarafından karın duvarına tutturulmuş, kapsül olarak da bilinen peritoneal bir zarla kaplıdır. Sıklıkla iki farklı referans kullanılarak yapılan karaciğer anatomik özellikleri, orijinal model tanımıyla ondokuzuncu yüzyılda tanımlanırken, 1950'lerde Rappaport tarafından tanımlanan hepatik mikrosirkülasyon modeli ile açıklanmıştır. Lobüler model olarak bilinen orijinal model, kanı lobülden boşaltan sentral veya terminal hepatik ven üzerine odaklıdır ve lobülün çevresinde çok sayıda, portal ven, hepatik arter ve interlobüler safra kanalından oluşan ve portal üçlü (portal triad, portal trakt) (Kruepunga ve ark, 2019) olarak da adlandırılan periportal bölgeden oluşmaktadır (Foster, 2018; Qin ve Crawford, 2018). Periportal ve sentrilobüler bölge arasında kalan alan midzonal olarak isimlendirilir. Bu modelde kan, lobun periportal bölgesine portal ven ve hepatik arter yoluyla girer ve merkezi veya terminal hepatik ven yoluyla ayrılır. Portal bölgelere yakın olan hepatositler önce kanlanırlar ve oral yoldan alınan herhangi bir ilaç ve/veya kimyasal maddelere, bu hücreler,

sentrilobüler bölgedeki hepatositlerden daha fazla maruz kalması beklenir. Bu beklenti de, bu hücrelerin lobülün merkez bölgelerinde bulunanlardan daha yüksek toksisite oluşumları göstermesidir. Portal triad bölgesine yakın bölgelere yönelik toksinlerin bulunmasına rağmen daha fazla sayıda toksinin, sentral vene yakın olan hepatositlere karşı daha fazla toksisite indüklediği görülmüştür ki karbon tetraklorür, asetaminofen ve bromobenzen gibi kimyasallar sentral bölge toksinleridir. Alkol insanlarda portal bölgeleri hedefleyen en önemli toksindir (Foster, 2018). 1950'lerde Rappaport tarafından tanımlanan hepatik mikrosirkülasyon modeli asinus modelde kan portal venden asinus olarak adlandırılan düzensiz ve tekrarlayan birimlerin çevresinde yer alan hepatik venüllere drene olur. Asinüsler portal ven merkezde olmak üzere tekrarlayan birimler şeklinde düzenlenirler ve zon 1-3 olacak şekilde mikrosirkülasyon temelli üç bölüme ya da zona ayrılmaktadırlar (Foster, 2018).

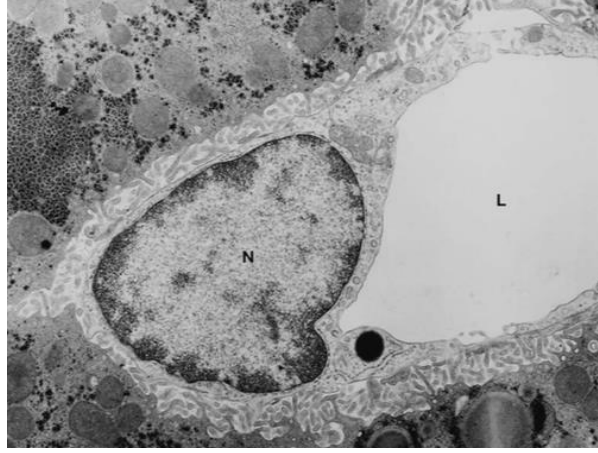
2.1.3. Karaciğer Histolojisi

Karaciğerin parankimal ve vasküler birimlerinin oluşturduğu yapısal organizasyonu, bağırsak sitem ile organizmanın geri kalanı arasında koruyucu olarak özel bir işlev kazanmıştır. Bu şekil yerleşkesi büyük miktarlarda besinin, aminoasitlerin, lipitlerin, karbonhidrat, vitamin ve ksenobiyotiklerin besin ve su alımıyla vücuda girişine imkan sağlamaktadır. Karaciğer en az yedi farklı hücre tipinden oluşan önemli bir yapısal özelliğe sahip işlevsel bir dokudur: Karaciğer epitel hücreleri, sinüzoidal endotel hücreleri, Kupffer hücreleri, stellat hücreler, kolanjiyositler, pit hücreleri ve farklı fenotipte lenfositler (Tsutsumi ve ark, 2017).

Karaciğerin en temel hücresi olan karaciğer epitel hücresi organ kütlelerinin yaklaşık %80'ini oluşturur (Tsutsumi ve ark, 2017, Foster, 2018). Safra kanalı epitel hücreleri, sinüzoidleri, arter ve venleri ve lenfatikleri döşeyen endotel hücreleri, fagositik Kupffer hücreleri ve perisinüzoidal stellat veya Ito hücreleri olarak da adlandırılan lipit ve A vitamini içeren hücreler de karaciğer kütlelerini oluşturmaktadırlar. Lenfositler, çeşitli tiplerdeki granülositler ve sayısız diğer farklı hücreler, hastalık durumlarında karaciğere göç ederler. Tüm organlarda olduğu gibi karaciğer de fibroblastlar, düz kas hücreleri, sinirler, nöroendokrin hücreler, hematopoetik hücreler ve progenitör hücreler gibi çok çeşitli bir hücre çeşidine sahiptir (Foster, 2018).

Karaciğer epitel hücreleri sinüzoidler tarafından ayrılan çift tabakalı plaklar şeklinde düzenlenmişlerdir. Plağı oluşturan iki sıra hepatosit hücresi birbirlerinden plağın iç yüzünde yer alan safra kanalikülleri tarafından ayrılırlar. Safra kanalikülleri kanalikül lümenine uzanan hepatosit mikrovillusları tarafından oluşturulurlar ve kanalikülünher iki tarafındaki membran bitişik hepatositlerin içerdiği ve desmozom ve sıkı bağlantıları da içeren bağlayıcı birimler tarafında sıkıca tutturulmuştur. İkili hepatosit plakları, sinüzoidlerce sınırlandırılır ve sinüzoidin duvarını döşeyen, sıkı bağlantı kompleksleri içermeyen, çok az ya da bazal membran içermeyen fenestralı sinüzoidal endotel hücreleri tabakasıyla düzenlenir. Bu sınır Fenestralı sinüzoidal kapillerler, kandan besin ve hormonların hepatositlere serbest geçişini sağlamaktadır. Endotel hücreleri ile hepatositler arasında şekillenen alan Disse alanı olarak ilk tanımlayan bilim adamı tarafından isimlendirilmektedir. Disse boşluğuna bakan hepatositlerin membranı, kandan bu alana giren maddelerin emilim yüzey alanını arttırmak için çok sayıda mikrovillus oluşturacak biçimde özelleşmiştir (Foster, 2018). Karaciğerde birçok sentez ve metabolik işlevlerinden sorumlu hepatositler toplam yüzeylerinin %35'i ile sinüzoidlerle karşı karşıya kalır. Bu yüzeyin alanı, hepatositler tarafından önemli ölçüde arttırılır. Karaciğer epitel hücreleri Disse alanına mikrovillus oluşturmak için sayısız plazma membran katlantıları uzatırlar. Toplam hepatosit yüzeyinin yaklaşık %50'si ise bitişik (komşu) hepatositlerle karşı karşıyadır. Bu hücreler arası yüzeylerin plazma membranı, safra kanaliküllerini oluşturmak için katlandığı yerler dışında çoğunlukla düzdür. Kanaliküler membran safra atılımı için özelleşmiş iken, sinüzoidal yüzey ise kandan çok çeşitli moleküllerin geçişi ve hepatositler tarafından sentezlenen moleküllerin ve diğer maddelerin kana geçişi için özelleşmiştir. Çok sayıda metabolik işlevlerini yerine getirmek için, hepatositler; karmaşık bir mitokondri, peroksizomlar, lizozomlar, golgi aygıtı, granüllü ve granülsüz endoplazmik retikulum kümeleri ve çok sayıda mikrotübül ve mikrofilament içerirler (Tsutsumi ve ark, 2017).

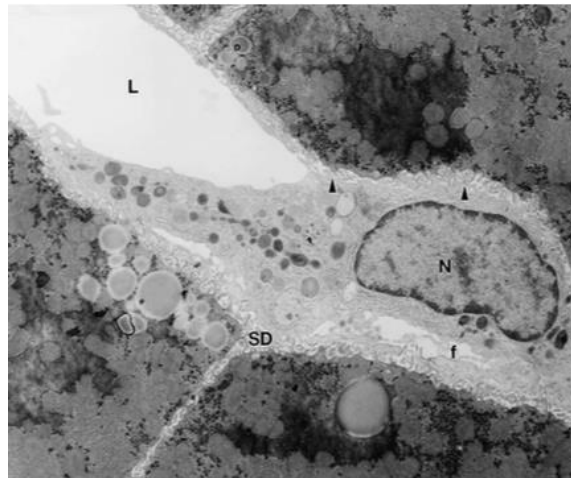
Parankimal olmayan hücrelerden karaciğer sinüzoidal endotel hücreleri, ince, düz sitoplazma uzantıları ve fenestraları ile elek plakaları olarak adlandırılan özel yapıları oluşturmak için gruplar halinde kümelenmişlerdir. Pinositotik veziküller, mitokondri, lizozomlar ve diğer organelleri içeren daha kalın sitoplazmik uzantılar ise, bu ince ve düz parçalar arasında sıralanmıştır. Endotel hücreleri, sinüzoidal lümeni çepeçevre sararak silindirik yapılar oluştururlar ve tipik karaciğer kapillerleri olan sinüzoidleri oluşturmak için üst üste ve tek hücreler halinde düzenlenirler (Resim 1) (Tsutsumi ve ark, 2017).



Resim 1. Mitokondri, bir lizozom ve birkaç endoplazmik retikulum sisternası gibi birkaç organel içeren sınırlı perinükleer sitoplazmaya sahip bir endotel hücre gövdesi. L: Sinüzoidal lümen; N: Çekirdeği. (McCuskey ve Wisse, 2010).

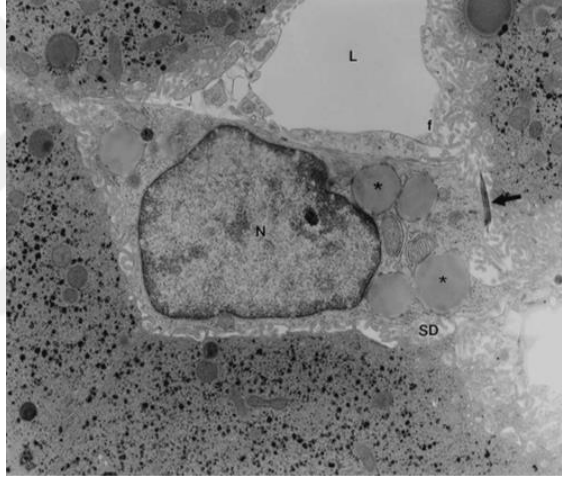
Sinüzoid lümeninde bulunan non-parankimal hücrelerden yerleşik makrofajlar, portal alanlarda daha yoğun olarak sinüzoidal endotele gevşek bağlı bulunurlar. Kupffer hücreleri, bakteriler, yıpranmış eritrositler, ölü veya hasarlı hepatositler gibi effekte hücreleri de içeren büyük parçacıkları sinüzoidal kandan temizlerler. Sinüzoidal endotel hücreleri ile birlikte çalışarak, yıpranmış hücreleri ve proteinleri perfüzyon kanından çıkarmada organizmanın temel sistemini oluştururlar. Aktif makrofajlar, parankimal hücre hasarına yanıtın düzenlenmesinde etkin rol oynayan birçok kemokin ve sitokin salgılamaktadırlar (Tsutsumi ve ark, 2017).

Kupffer hücreleri ince yapı düzeyinde; bol miktarda lizozom, mikrovillus, filopodia, psödopodia ve pinositik veziküller ile karakterizedir (Resim 2) (Tsutsumi ve ark, 2017).



Resim 2. Kupffer hücreleri ince yapı düzeyinde transmisyon elektron mikroskopisi.

Resim 2’de L: sinüzoidal lümen; f: fenestrae; N: çekirdeği; Disse alanı. (McCuskey ve Wisse, 2010). Stellat hücrelerin çekirdekleri oval veya uzundur ve sıklıkla A vitamini içeren lipi damlacıkları tarafından girintilendirilir. Granüllü endoplazmik retikulum iyi gelişmiştir. Golgi kompleksi birçok vezikül ile ilişkili iyi gelişmiş lamellerden oluşur. Bu hücrelerin en göze çarpan özelliği, sitoplazmada lipit damlacıklarının oluşmasıdır. A vitamini öncüsü olan retinil esterler şeklinde depolanır. Mikrotübüller, desmin ara filamentleri ve mikro filamentler gibi diğer yapılar, stellat hücrelerinin sitoplazmasında belirgindir (Resim 3). Safra epitel hücreleri olan kolanjiyositler, hepatositler gibi, embriyonik gelişim sırasında hepatoblastlardan öncüllenişler. Uzun çekirdeklişler ve komşu hepatositlerden daha küçük mitokondrişler içerişler. Bu hücreler belirgin bir Golgi kompleksi ve pinositotik veziküller içeriş. Safra kanalları bazal lamina ile kuşatılıdır (Tsutsumi ve ark, 2017).



Resim 3. Disse alanında lokalize hepatik stellat hücreleri ince yapı düzeyinde transmisyon elektron mikroskopisi, Sitoplazmada, çekirdeğin yanı sıra endoplazmik retikulumun yağ damlacıkları (*) ve kollajen lifi demeti (ok). L: Sinüzoidal lümen; f: Fenestra; N: Çekirdeği; SD: Disse alanı.

Periferal kan NK (doğal öldürücü) hücrelerinin morfolojik ve işlevsel olarak farklı bir formunu temsil eden Pit hücreleri, endotel hücrelerine ve Kupffer hücrelerine yakın bir şekilde yapışık halde ve sıklıkla sinüzoidal duvar boyunca göç ettiklerinin göstergesi olan iyi gelişmiş psödopodia'ya sahip hücrelerdir. Sinüzoid lümeni içinde bulunurlar. Bu hücrelerinin sitoplazmasında sıklıkla, multivesiküler yoğun granüller ve çubuk şekilli veziküller sıklıkla bulunurlar ve bağıli tümör hücrelerine karşı sitotoksitede görev aldıkları bilinmektedir (Tsutsumi ve ark, 2017).

Karaciğerin klasik yapısal birimi hepatik lobüllerdir; merkezinde efferent bir venül, ve periferinde portal alanlar olan ve 2mm uzunluğunda, 0.7mm genişliğinde polihedral prizma şeklinde yapılardır. Diğer işlevsel birim, Rappaport'un asinusudur ve portal-terminal sistem kaynaklıdır, kan, portal sistemden, efferent veya terminal venüle drene olana kadar art arda daha az oksijenli parankimal bölgelerden geçer (Tsutsumi ve ark, 2017).

2.1.4. Karaciğer Gelişimi

Embriyoda, karaciğer, ileride duodenum olarak gelişen bölge olan ön bağırsak (foregut) duvarından bir endodermal çıkıntı olarak gelişimine başlar (Foster, 2018; Bodzin ve Baker, 2019). Hepatik divertikül veya karaciğer tomurcuğu olarak da bilinen karaciğer primordiumu embriyolojik gelişimin 3-4. haftalarına denk gelir ve endodermden kaynaklanan bu divertikül septum transversuma doğru büyüyerek, vitellin (omfalomezenterik) ve umbilikal venleri istila eder. Embriyolojik önbağırsak (foregut) ile bağlantısı sonunda safra kanalına gelişecektir. Embriyolojik olarak karaciğer, sol portal ven ile bağlantılı hem portal hem de umbilikal venlerden kanlanır. Primitif portal venler, vitellin venlerin kaudal kısmından kaynaklanmasına rağmen, ilkel hepatik venler vitellin venlerinin kranial kısmından kaynaklanır. Hepatik divertikül epiteli vitellin vasküler yatağa karışarak parankim ve stroma olarak gelişecek karaciğerin portal sinüzoidal hepatik damar sistemine gelişir (Foster, 2018). Arter ve safra kanalları ise venlerden daha ileri bir zamanda gelişirler (Foster, 2018).

Karaciğerin parankimal ve non-parankimal hücrelerinin kökenleri farklılık göstermektedir (Tablo 1). Hepatik parankimin artan proliferasyonu sonucu stromal bölüm afferent ve efferent olmak üzere ikiye ayrılır. Afferent sistem portal giriş kanını taşıırken, efferent sistem ise organdan hepatik çıkış kanını taşımaktadır. Safra kanalı başlangıçta sadece porto hepatiste portal ven ile birlikte bulunurken duktal sistemin genişlemesi ile birlikte gelişen karaciğerin tümünü kuşatır ve son olarak portal triadın fibröz dokusuna yerleşir (Foster, 2018). Hepatik arter venöz sistemden çok sonra gelişir ve intrauterin yaşamda karaciğerin damar sistemi sadece portaldır. Parankime olan arter invazyonu safra kanalları ile yaklaşık aynı zamana denk gelir ve sonradan portal triada katılır. Lenfatikler ise bu süreçte, arter gelişiminde ortaya çıkmazlar sonradan gelişirler. Lenf portal yoldan porto hepatise ve hepatik ostiadan çıkış yoluyla lobul boyunca hepatik vene ve ayrıca mediastinal lenfatiklerle birleşen bir kapsüler yolla boşaltılır (Foster, 2018).

Tablo 1. Karaciğer hücrelerinin kökeni (Lobritto, 2017)

Hücre tipi	Köken doku
Hepatositler	Foregut endoderm (bipotential hepatoblast)
Endotelial hücreler	Septum transversum mezenşimi (angioblast)
Safra epitel hücreleri	Foregut endoderm (bipotential hepatoblast)
Hematopoietik hücreler	Septum transversum mezenşimi
Kupffer hücreleri	Vitellus kesesi ve kemik iliği
İto hücreleri	Septum transversum mezenşimi

Gelişimin erken safhalarında, (1) sol gastrik arterden kaynaklanan bir sol hepatik arter, (2) çölyak trunkusdan kaynaklanan bir orta hepatik arter ve (3) superior mezenterik arterden kaynaklanan bir sağ hepatik arter olmak üzere üç hepatik arter vardır. Kanal sisteminin tümü ise intrauterin hayatın 10. haftasında gelişimini tamamlar. Karaciğer ile abdominal duvar arasındaki septumun mezodermi, falsiform ligamente gelişir. Gelişmekte olan karaciğerin diyaframla temas eden yüzeyi peritondan yoksundur ve çıplak alan olarak isimlendirilir (Mahadevan, 2014; Bodzin ve Baker, 2019). Gelişimin 10. haftasında karaciğer, gestasyonel 8. ve 9. aylarda belirgin bir şekilde azalan bir hematopoietik fonksiyon göstermeye başlar. Hepatik divertikülün orijinal sapı duktus hepaticus communisi, ortak safra kanalı, oluşturur. Ortak safra kanalından gelişen divertikül sistik divertikülü şekillendirirken bu divertikülden de safra kesesi ve sistik kanal (duktus sistikus) oluşur ve gelişimin 12. haftasında, karaciğer safra üretmeye başlar. Hepatositler ise bu süreçte çoğalma uğrayarak 5 yaşına kadar tek sıralı kordon şeklinde düzenlenir ve karaciğer parankimini oluşturur. Doğumda meydana gelen olaylardan birkaçı; sol umbilikal ven ve ortak hepatik veni bağlayarak plasentadan fetüse venöz dönüşü sağlayan duktus venozus kapanır ve ligamentum venozusa dönüşür. Ekstrahepatik umbilikal ven kapanır ve ligamentum terese dönüşür. Karaciğerin gerçek anomalileri nispeten nadirdir (Bodzin ve Baker, 2019).

2.1.5. Karaciğerin Vasküler Desteği

Karaciğerin afferent kan desteği çift kaynaklıdır (Mitra ve Metcalf, 2012). Karaciğer kan desteği toplam karaciğer kan akışının yaklaşık %20'sini sağlayan hepatik arter yoluyla arteriyel kan desteğinden ve toplam hepatik kan akışının yaklaşık %80'nini sağlayan portal venöz kan desteğinden (gastrointestinal sistem, pankreas ve dalak dahil olmak üzere

abdominal viseranın venöz drenajından) oluşması bakımından benzersizdir (Cattley ve Cullen, 2018). Desteğin %75-80'i süperior mezenterik ve splenik venlerin birleşmesiyle oluşan portal ven yoluyla ve geri kalan %20-25 ise abdominal aortun çölyak trunkusundan kaynaklanan hepatik arter yoluyla sağlanır. Her ikisi de başlangıçta sağ ve sol karaciğer loblarını besleyen sırasıyla sağ ve sol portal venleri ve hepatik arterleri oluşturmak için bölünür. Her lobun içinde hepatik segmentleri besleyen sekonder ve tersiyer dallara ayrılırlar. Karaciğerin kaudat lobu portal venin hem sağ hem de sol dalları tarafından kanlanır. Portal ven, %40'ı oksijenli ve besin içeren karışık kanı taşır ve hepatik sinüzoidleri kanlandırır (Mitra ve Metcalf, 2012). İlk geçiş etkisi olarak adlandırılan bir durumla gastrointestinal sistemin venöz kanı yoluyla oral yoldan alınan kimyasal maddelerin etkisi, sistemik dolaşıma hiç ulaşmadan önce karaciğerde azaltılır (Cattley ve Cullen, 2018). Oksijenli kan taşıyan hepatik arter, esas olarak intrahepatik safra kanalları gibi non-parankimal yapılara kan taşıyan dallara ayrılır. Hepatik sinüzoidler, inferior vena kava ya drene olan sonunda hepatik venleri oluşturacak olan sublobular venleri oluşturan intralobular venlere drene olurlar (Mitra ve Metcalf, 2012). Sağ, orta (middle), sol olmak üzere üç hepatik ven vardır. Dağılım ve fonksiyonlarına göre bölümlenirler. Karaciğerin kaudat lobunun venöz drenajı, ana hepatik venlerden farklı olan ayrı hepatik venlerden geçer (Mitra ve Metcalf, 2012).

2.1.6. Lenfatik Drenajı

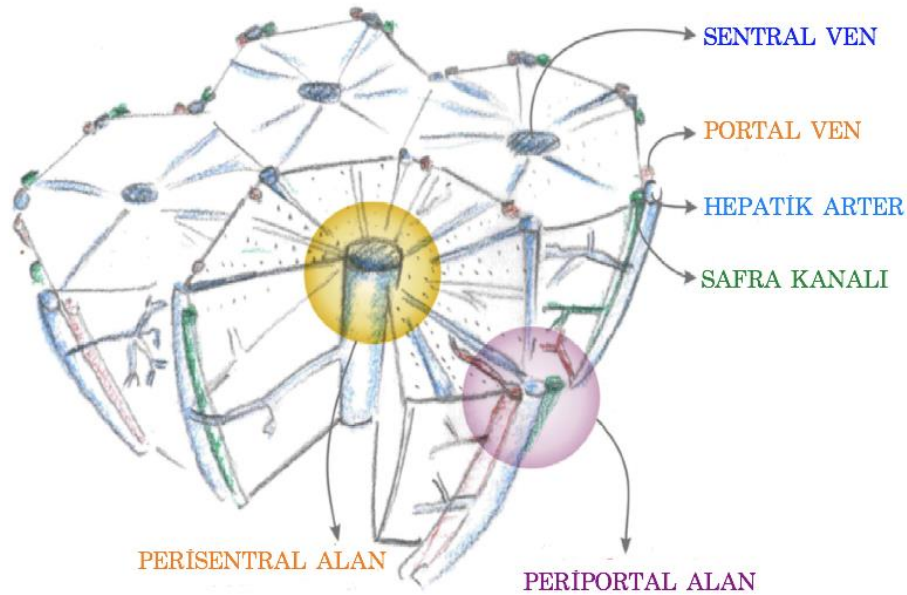
Yüzeysel ve derin hepatik lenfatik damar grubu, hepatik nod ve daha sonra da bağırsak lenf gövdelerine boşalan lenf düğümlerinin çölyak grubuna drene olur (Mitra ve Metcalf, 2012).

2.1.7. Sinir Desteği

Karaciğerin sinir desteği, çölyak pleksusun en büyük dalı olan hepatik pleksustan geçer. Hepatik pleksus, afferent ve efferent sempatik (T7-T9) ve parasempatik lifler (vagus sinirleri yoluyla) içerir (Mitra ve Metcalf, 2012).

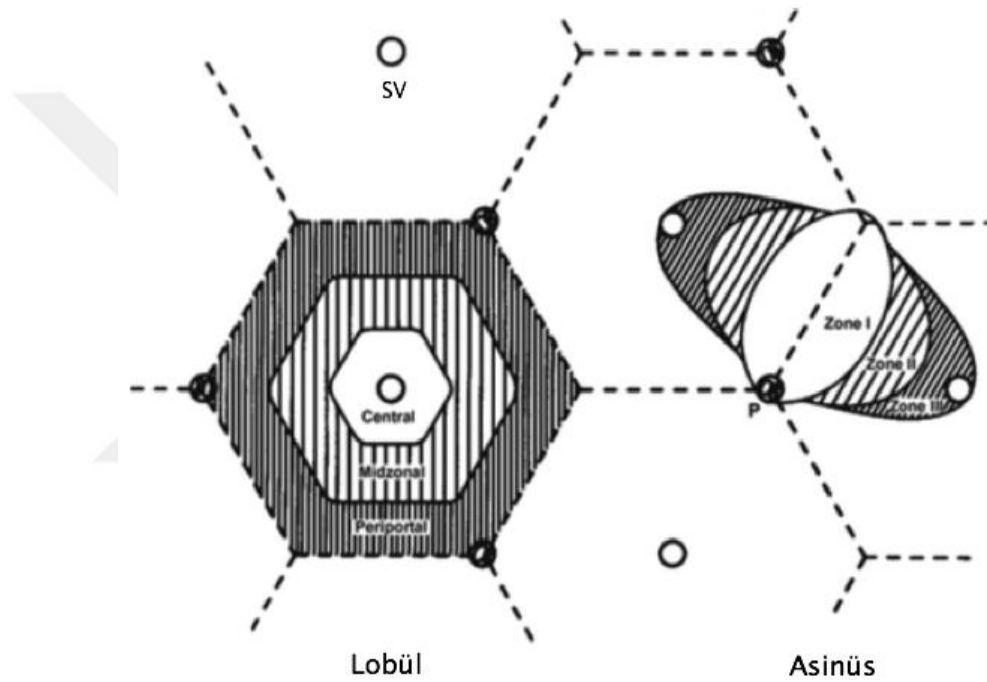
2.1.8. Karaciğer Zonasyonu ve Lobül Mimarisi (Arkitekturu)

Organizmada metabolik homeostazın sağlanmasından sorumlu metabolik organ olan karaciğerin işlevleri oldukça fazladır. Bunların arasında karbonhidrat, aminoasit ve lipit metabolizmasının yanı sıra amonyak, ilaçlar, ksenobiyotik ve alkol detoksifikasyonunun sağlanması da yer alır. Ayrıca safra, serum proteinleri ve lipoproteinler gibi esansiyel bileşiklerin sentezini de sürdüren karaciğerde bu işlemlerin bazıları aynı anda gerçekleştiğinden, karaciğer, heterojen hücre tipleri ve işlevsel organizasyon dağılımına sahip eşsiz bir mimari sergiler. Bu işlevsel organizasyona, “metabolik zonasyon” denilmektedir. Bu terminoloji yalnızca karaciğerin temel işlevsel hücreleri olan ve aynı anda farklı metabolik görevleri yerine getiren hepatositleri tanımlamaktadır. Her ne kadar bu zonasyon kavramına yıllardır odaklanılsa da hangi düzenleyici mekanizmaların bu bölgelemeyi oluşturduğu tam olarak bilinmemektedir. Son on yılda yapılan araştırmalar oksijen gradyanı tarafından şekillenen bu metabolik bölgelerin ayrımına besin maddelerinin, metabolitlerin ve morfogjenik sinyallerin de önemli katkılar sağladığını göstermiştir (Matz-Soja 2019).



Şekil 2. Karaciğer lobülü. Karaciğer lobüllerinin spatial (uzaysal) düzenlenmesi ve periportal ve perisentral bölgelerle birlikte portal ven ve hepatik arter dalı ve bir safra kanalından oluşan portal alan (Matz-Soja 2019).

Heterojen hücre tiplerine sahip olması ve işlevsel organizasyonu eşsiz bir mimarisi olan karaciğerde en küçük birim mikroskobik olarak tanınabilir yapılar olan lobüllerdir. Merkezde sentral ven olan altıgen şekildedir. Lobülün köşeleri portal ven dalı, hepatik arter dalı ve bir safra kanalından oluşan portal üçlü (portal triad) veya portal alan olarak adlandırılır ve herbir lobül beş veya altı adet portal alan ile sınırlandırılmıştır ve herbir lobül yaklaşık 1mm çapındadır (Şekil 2) (Cattley ve Cullen, 2018; Matz-Soja 2019). Sentral ven etrafındaki alana perisentral alan denir.



Şekil 3. Hepatik arkitetur (Cattley ve Cullen, 2018).

Portal alanlar ilk olarak hilusdan karaciğere giren büyük portal ven ile hepatik arter dallarının dağıtım noktalarıdır. Kan akışı portal alandan sentral vene doğru iken kanaliküller içinden safra, Hering kanallarına (kök hücre nişi) (Tiyaboonchai ve ark, 2018) oradan da interlobüler safra kanallarına akar ve bu kanallar basit kübik epitel ile döşelidir. Kanallar aşamalı olarak daha büyük kanallara akar, bireysel lobları drene eder ve hepatik kanalda sonlanır. Safra kesesi olan türlerde sistik kanal ve hepatik kanal, ortak safra kanalını oluşturmak üzere birleşir ve duodenuma açılır. Her lobülün merkezinde, kanı, hepatik vene taşıyacak olan küçük hepatik venler bulunur ve sonunda hepatik ven aracılığıyla kan karaciğeri terk eder ve kaudal vena kavaya drene olur (Cattley ve Cullen, 2018).

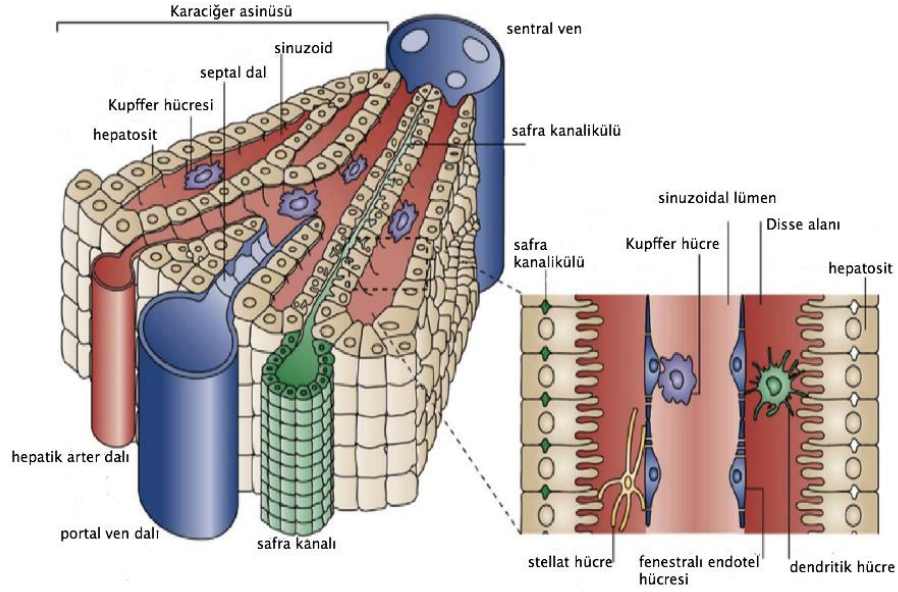
Lobül içerisinde karaciğerin temel işlevsel hücreleri olan hepatositler düzenlenir ve birbirleriyle bağlanır. Hücrelerin zarları birbirine bağlanır ve her iki taraftan sinüzoid adı verilen kan kapillerleri yüzleşir. Sinüzoidler yerleşik makrofajları, Kupffer hücrelerini, doğal öldürücü T hücreleri ve dendritik hücreler dahil olmak üzere doğal immün sistemin diğer hücrelerini barındırır. Kupffer hücreleri karaciğerin doğuştan gelen bağışıklığında merkezi bir rol oynar ve hepatik sinüzoid içindeki yerleşimleri hem portaldan hem de arteriyel dolaşımdan gelen patojenleri fagosite etmelerini sağlar (Matz-Soja 2019).

Metabolik bir bakış açısına göre, karaciğerin işlevsel birimi, bir portal triadın en az iki bitişik sentral ven ile bağlandığı bir alan olarak tanımlanabilen hepatik asinüsdür. Parankimal dokuyu tanımlamaya alternatif bir yaklaşım içinde, belirli bir portal bölge içindeki terminal arter ve portal venöz kan damarlarından kan akışının alınmasıyla tanımlanan dokunun mikroskobik bölgesi olarak tanımlanan hepatik asinüs tarafından yansıtılır. Asinus sırasıyla bu kan damarlarına göre proksimal, orta ve distal bölgeyi yansıtan zon 1, 2 ve 3 ile üç zona ayrılır. Bu kavramda portal triadların etrafındaki bir bölge (periportal zon; zon I) ve sentral ven etrafındaki ikinci bölge (perivenöz, perisentral, zon III). Genellikle ek bir ara bölge (zon II) de dikkate alınır (Cattley ve Cullen, 2018; Matz-Soja 2019) (Şekil 3).

Hormon ve oksijen gradientlerine ve besin konsantrasyonu değişimleri sebebiyle hepatositler lobül içinde farklı yerleşime ve işlevsel heterojenliğe sahiptir, bu da karaciğer mimarisinin önemli bir sonucudur (Cattley ve Cullen, 2018). Bu heterojenliğin tasviri karaciğer parankiminin periportal, midzonal ve perisentral zon olarak ayrımıyla yapılabilir. Her bir zonun hepatositleri tüm karaciğerin birçok metabolik işleviyle ilişkili ayrı bir öneme sahiptir. Periportal zon oksidatif enerji metabolizması, yağ asitleri β -oksidasyonu, aminoasit katabolizması, üregenezis, glukoneogenezis, kolesterol sentez ve yıkım işlevlerini barındırır. Perisentral zon da ise glikolizis, glukozdan glikojen sentezi, lipit sentezi, ketogenezis, glutamin oluşumu, safra oluşumu ve safra asidi sentezi, ksenobiyotik metabolizması gerçekleşir. Bu zonasyonel metabolik işlevlerin oluşumlarının nasıl olduğu sorusunu cevaplayabilmek için eşsiz karaciğer mimarisi göz önüne alınmalıdır. Periportal zondan karaciğer asinüsüne giriş yapan kan oksijen, besinler, hormonlar ve sitokinlerce zengindir, bu nedenle zon I de hepatositler zon III deki hepatositlerden daha dayanıklıdır (Matz-Soja 2019).

2.1.9. Karaciğer Sinuzoidlerinin Mimarisi ve Sinuzoidal Hücreler

Vücuttaki en büyük organ olan karaciğerin; karbonhidrat, protein ve lipit sentez ve metabolizması, toksinlerin detoksifikasyonu, patojenlerin uzaklaştırılması ve immün tepkilerin düzenlenmesi gibi 500'den fazla işlevi vardır (Yang ve ark, 2017; Du ve ark, 2018). Karaciğer, hepatik arterden %25 ve portal venden %75 olan çift kan desteğine sahiptir. Hepatik arter arteriyollere, portal ven venüllere dallanır, safra kanalı ile birlikte, portal triad, karaciğerin işlevsel birimleri, karaciğer lobüllerini oluşturur. Poligonal karaciğer lobüllerinde portal ven venülleri çok özel kapiller şekli olan karaciğer sinuzoidlerine dallanırlar (Yang ve ark, 2017; Du ve ark, 2018). Sinuzoidler, 250 µm uzunluğunda ve 7-15 µm çapında hepatosit kordonları arasında uzanan özel bir kapiller ağıdırlar. Hepatik sinüzoid, kan ve perisinüsoidal alan (Disse aralığı) arasındaki değişimin gerçekleştiği eşsiz, dinamik bir mikrovasküler yapıdır (McCuskey ve Wisse, 2010). Bu eşsiz vasküler yapı yavaş kan akımına sahiptir ($0.1-1 \text{ dyn/cm}^2$), bu da kan dolaşımı ve etrafındaki hepatositler ya da parankimal hücreler arasındaki madde alış-verişini düzenlemek için uygun ortam sağlamaktadır (Yang ve ark, 2017; Du ve ark, 2018). Bu sinüzoidal endotel tabakası, sürekli bir bazal membran içermediğinden endotel tabakası ile hepatik kordonlar arasındaki bu cep ya da boşluk "Disse aralığı" olarak isimlendirilir. Buna ek olarak birçok non-parankimal karaciğer hücreleri de sinuzoidlerde ve Disse aralığında yerleşiktirler, bu da etkin immün takip ve temizliği ile birlikte diğer metabolik işlevlere de imkan verir. Karaciğer sinuzoidlerinde en az dört ana hepatik hücre çeşidi vardır. Bunlar hepatositler, karaciğer sinüzoidal endotelial hücreler (LSEH), Kupffer hücreleri (KH) ve hepatik stellat hücreler (HSH) dir (Du ve ark, 2018).



Şekil 4. Karaciğer lobül ve sinuzoid yapısı (Du ve ark, 2018).

Karaciğer plaklarını oluşturmak için hepatositler, sinuzoidler boyunca radyal olarak hizalanırlar. Portal venlerin ve hepatik arterin dalları sinuzoidlerde sonlanarak kanı sinuzoidlere asinüs yoluyla sentral vene doğru akıtır. Fenestralı (pencereli) karaciğer sinüzoidal endotelial hücreleri ile Kupffer hücreleri sinüzoidler, endotele serpiştirilmiş Kupffer hücreleri ile birlikte fenestralı karaciğer sinüzoidal endotel hücreleri ile kaplanır. Karaciğer plakları ve sinüzoidler arasında, hücre dışı matriks bileşenleriyle birlikte hepatik stellat hücreleri içeren Disse aralığı bulunur (Şekil 4) (Du ve ark, 2018).

2.1.9.1. Hepatositler ve kolanjiyositler

Karaciğerde embriyolojik gelişim süresince hepatoblastlardan köken alan “hepatosit” ve “kolanjiyosit” olarak adlandırılan iki çeşit epitel hücresi bulunur. Karaciğerin çok yüksek bir yenilenme kapasitesine sahip olduğu iyi bilinmektedir, %70 parsiyel hepatektomi veya akut karaciğer hasarı sonrası 7-10 gün içinde rodentlerde, 6-8 hafta içinde de insanlarda karaciğer neredeyse eski kütlesine ulaşacak şekilde yeniden düzenlenebilir (Matsuda ve Tanaka 2018; Tanimizu ve Mitaka, 2018). Bu durumda sağlıklı hepatositler ve kolanjiyositler bölünerek karaciğer dokusunu yeniden oluştururlar (Tanimizu ve Mitaka, 2018). Bu fenomen hipertrofi ve rezidual hepatositlerin mitozu ve bunu takip eden non-parankimal hücrelerin proliferasyonuna bağlıdır (Matsuda ve Tanaka 2018). Diğer yandan,

kronik hasara uğramış karaciğerde bu hücreler de yenilenme kabiliyetlerini yitirebilirler ve bu durumda karaciğer kök/progenitör hücrelerinin (KPH) aktifleştiği ve hasarı onarmak için hepatositlere farklılaştıkları bilinmektedir (Tanimizu ve Mitaka, 2018).

Rodentler, köpekler, primatlar ve diğer memeli türlerinde, insanlar da dahil, bu türlerin her birinde karaciğerin parankimal hücresi hepatositlerdir (Cattley ve Cullen, 2018). Karaciğer hücre sayısının yaklaşık % 65'ini karaciğer kütesinin yaklaşık %90'ını oluşturan hepatositler (Cattley ve Cullen, 2018; Du ve ark, 2018) karaciğer lobülünün yapı taşlarıdır ve hepatosit plaklarını ayıran sinüzoidlerle radyal olarak dağılırlar.

Hepatositler; glikoz dengesi, plazma protein üretimi, lipid metabolizması, üre üretimi, ksenobiyotik metabolizması ve safra oluşumu gibi karaciğerin birçok özgün işlevlerden görevli ana hücrelerdir (Cattley ve Cullen, 2018).

Hepatositler plakalar şeklinde sinüzoidler boyunca uzanırlar. Poligonaldirler ve seyrek olarak çift çekirdeklidirler ve 20-30 µm çapındadırlar. Hepatositler yapısal ve işlevsel olarak polarizedirler, üç yüzey alanı ile karakterize edilirler (Du ve ark, 2018) ve iki yüzey hariç sıkı bağlantı komplekleri ve gap junctionlar ile komşu hepatositler bağlantılı haldedir (Cattley ve Cullen, 2018):

(1) Bazal veya sinüzoidal bölge (Disse alanı da denilen (Cattley ve Cullen, 2018)), kısa mikrovilluslar gösteren ve sinüzoidal kan ile moleküllerin değişimini içeren alan.

(2) Bitişik hepatositler arasındaki bağlantı birimlerini içeren lateral bölge

(3) Hepatositlerin safra salgıladıkları apikal veya kanaliküler alan.

Karaciğer epitel hücreleri sentez, metabolizma ve detoksifikasyonu içeren birçok karaciğer işlevinin gerçekleştiği hücreler olarak hizmet ederler (Du ve ark, 2018). Karaciğer hücreleri, özellikle hepatositler, akut hepatit, hepatik toksinler ve hepatektomi gibi akut karaciğer hasarlarında onarım için hızla çoğalırlar (Koike, 2018).

Çok sayıda enzim varlığı ve onların etki mekanizmalarının büyüklüğü sebebiyle karaciğer tüm organların metabolik kapasitesini aşan bir metabolik kapasiteye sahiptir. Karaciğer epitel hücreleri ksenobiyotik metabolize edici enzimlerin kilit yerleridirler. Bu enzimlerin varlığı ve bunlarla ilişkili faaliyetler faz 1 ve faz 2 reaksiyon sınıfları ile ilişkilidir. Faz 1 reaksiyonları substratların oksidasyon, indirgenme, hidrolizini artırır ve ksenobiyotik substratın biyolojik aktivitesini ya artırır ya da ortadan kaldırırken, faz 2 reaksiyonları ise tipik olarak faz 1 metabolitini baskılar ve lipofilik substratları suda çözünür moleküllere dönüştürerek dolaşıma veya safraya taşır (Cattley ve Cullen, 2018).

Hepatositler ayrıca, bazıları tercihen sinüzoidal segmentler boyunca diğerleri hücre membranının kanaliküler segmentleri boyunca yer alan çeşitli membran taşıyıcılarına sahiptir. Bu taşıyıcılar, safra asitleri ve glutasyon (GSH) ve glukuronat ve sülfonat konjüгатlarını içeren substratlara sahiptir (Cattley ve Cullen, 2018).

Karaciğer epitel hücreleri ve kolanjiyositlerin tek bir (single) kök/progenitör hücreden farklılaşmaları kabul edilmekle birlikte, diğer karaciğer hücrelerine farklılaşabilme potansiyeli gösterirler. Aynı zamanda karaciğer rejenerasyonunda veya toksik hasarlarda bu iki hücrenin de proliferere olduğu ve fenotiplerini korudukları da yapılan çalışmalarla desteklenmektedir (Tomita ve ark, 2018).

2.1.9.2. Karaciğer sinüzoidal endotelial hücreler (KSEH)

Karaciğer sinüzoidal endotelial hücreler (KSEH'ler), sinüzoid hattı boyunca süreklilik arz eden (Cattley ve Cullen, 2018), karaciğerde en bol bulunan ikinci hücre tipidir ve yaklaşık parankimal olmayan hücrelerin %50' sini oluştururlar. Kan ve hepatositler arasında bulunurlar. KSEH'ler, 1970'lerin başında ilk kez Dr. Eddie Wisse tarafından fenestralı (Latince fenestra: "pencere") şeklinde tanımlanmışlardır ve bazal membransız (çok az bazal membran bulunabilir (Cattley ve Cullen, 2018)) ve diyaframsız yüksek özellikli endotelial hücrelerdir. Fenestralar, 150-175 nm çapında gözeneklerdir ve 20-50 fenestra "elek plakaları" oluşturmak üzere gruplaşır. Fenestraların varlığı ve bazal membranın bulunmayışı çözünen maddelerin pasif taşınmasına izin verir ve daha da önemlisi, kan desteği ve hepatositler arasındaki alışverişi düzenlerler. Kanda çözünen maddelerin serbestçe, perisinüzoidal aralığa (Disse boşluğuna) ve oradan da hepatositlerin mikrovilluslu yüzeyine geçişine olanak sağlar (Cattley ve Cullen, 2018). Kan KSEH'ler, endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) tarafından üretilen endotel kaynaklı nitrik oksit (NO)'in de ana kaynağıdır. Ayrıca, KSEH'ler, adhezyon molekülleri ekspresyon ederek karaciğer iltihabı ve hasarında önemli bir rol oynamaktadırlar (Du ve ark, 2018).

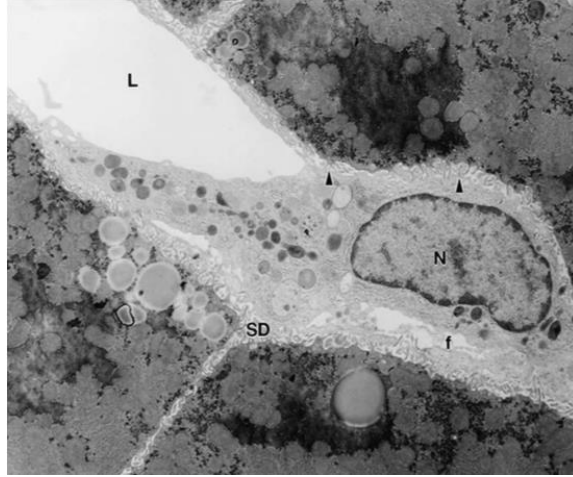
Sinüzoidal endotel hücreleri, diğer karaciğer hücreleri üzerindeki etkileri yoluyla karaciğer rejenerasyonunun anjiyogenezine katkıda bulunur ve rejenerasyon ve anjiyogenez süreçlerini anjiyopietin-2 ile birbirine bağlayarak ana düzenleyiciler olarak görev yapar. Sinüzoidal endotel hücrelerinin fenestra kaybı ile sinüzoidlerin kapillarizasyonu karaciğer hastalıklarında hepatik stellat hücrelerin aktivasyonu ve Disse alanına ekstrasellüler matriksin

birikimi ile sonuçlanır. Ayrıca Disse alanındaki ekstrasellüler matriks de fenestra modülasyonunu etkiler. Hücre-matriks etkileşiminin azalması kültüre edilen sinüzoidal endotel hücrelerinde fenestra kaybı ile sonuçlanmıştır (Qin ve Crawford, 2018). Hepatik sinüzoidin eşsiz porlu (fenestralı) yapısı, endotel hücrelerinin sinüzoidal kanı kabaca süzmesine izin verirken, çözünen makromoleküllerin sinüzoidal lümeden Disse alanına geçişini sağlayarak hepatositlerin bazolateral yüzeyleri ile temasına izin verir (Qin ve Crawford, 2018).

2.1.9.3. Kupffer hücreleri

Kupffer hücreleri yerleşik makrofajlar, sinüzoidal lümeneye bakan endotel yüzeyi boyunca dağılır. Bu hücreler küçük parçacıkların yanı sıra dolaşımdaki proteinleri de çıkarmada etkilidir. Kupffer hücreleri ayrıca bakteriyel lipopolisakaritin aktif bir bileşeni olan endotoksinin klirensindeki endotel hücreleri ile iş birliği yapar. NK (doğal öldürücü) ve NKT (doğal öldürücü T lenfosit) hücreleri de sinüzoidal endotel hücreleri boyunca yer alır ve göç eder ve bağışıklık işlevlerinde Kupffer hücreleri ile birlikte çalışır.

Kupffer hücreleri patolog Carl von Kupffer'in yerleşik karaciğer makrofajları olarak tanımlamasından sonra adlandırılırlar. Kupffer hücreleri retikuloendotelial sistem doku makrofajlarının yaklaşık %80'ini ve tüm karaciğer hücrelerinin yaklaşık %15'ini oluştururlar. Bu hücreler damarlarda hareketsiz hücrelerdir ve karaciğer sinüzoidal endotelial hücrelere yapışıktır ve doğrudan kan akışına maruz kalırlar (McCuskey ve Wisse, 2010; Du ve ark, 2018). Kupffer hücreleri yüzeylerinde bulunan mikrovillus, filopod ve lamellopodlarla birlikte düzensiz yüzeye sahip büyük hücrelerdir. Hücre yüzeylerinin bu özelliği ile endotel hücrelerine yapışık bulunabilirler. Bazen de sitoplazmik uzantıları endotel fenestrasını penetre ederek Disse aralığına uzanır ve böylece parankimal hücrelerle ve hepatik stellat hücrelerle etkileşime girebilirler. Hepatik sinüzoidlerin duvarlarında bulunan bu hücreler küçük parçacıkların ve hücrelerin endositozisinin yanı sıra portal kandaki toksiklerin ve yabancı maddelerin, özellikle bağırsak kaynaklı olanların uzaklaştırılmasında önemli bir rol oynarlar (McCuskey ve Wisse, 2010).



Resim 4. Değişen çapta ve yoğunlukta yoğun cisimcikleri (lizozomları) içeren bir Kupffer hücresi

Resim 4'te Kupffer hücreleri, sinüzoid içinde yer alır ve endotel hücrelerine yapışık ve bazen de Kupffer hücreleri parankimal hücrelerin mikrovillusları (ok başları) ile doğrudan temas halinde görülürler. L: sinüzoidal lümen; f: fenestrae; N: çekirdeği; SD: Disse alanı (McCuskey ve Wisse, 2010).

Kupffer hücreleri, küçük parçacıkların yanı sıra dolaşımdaki proteinleri de uzaklaştırmada etkilidir. Kupffer hücreleri ayrıca bakteriyel lipopolisakkaritlerin aktif bir bileşeni olan endotoksinin uzaklaştırılmasında da endotel hücreleri ile iş birliği içindedirler ve doğal öldürücü (NK), doğal öldürücü T lenfosit hücreleri (NKT) de sinüzoidal endotel hücreleri boyunca yer alır ve göç eder ve bağışıklık işlevlerinde Kupffer hücreleri ile birlikte çalışır (Cattley ve Cullen, 2018). Kupffer hücreleri bağırsak kökenli bakteriler, endotoksin (LPS) ve antijenlerle karşılaşan ilk makrofaj popülasyonudur. CD163, toll-benzeri reseptörler (TLR'ler), özellikle TLR4, kompleman reseptörleri ve Fc reseptörleri gibi bir dizi radikal temizleyici reseptörler eksprese edilerek, kupfferler patojenleri ve ilişkili molekülleri tespit edebilir, bağlayabilirler ve özümseyebilirler. Ayrıca zararlı patojenlerin varlığında immün sistem komponentlerini uyaracak sitokin ve kemokinleri aktive ederler. Kupffer hücreleri sadece doğal bağışıklıkta değil, aynı zamanda adaptif bağışıklıkta da önemli rol oynamaktadır. MHC I, MHC II ve kostimülatör molekülleri eksprese ederek, T hücrelerini aktive etmek için antijen sunan hücreler olarak görev yapabilirler (Du ve ark, 2018).

2.1.9.4. Hepatik stellat hücreler (HSH'ler)

1876 yılında von Kupffer tarafından tanımlanmış olan Hepatik stellat hücreler (HSH'ler), toplam karaciğer hücrelerinin küçük bir kısmını (%5-8) oluşturmaktadırlar. Stellat hücreler aynı zamanda yağ-depolayıcı hücreler, İto, lipositler olarak da adlandırılan bu perisinuzoidal hücreler Disse aralığında bulunurlar ve yoğunlukta periportal alan etrafındadırlar (McCuskey ve Wisse, 2010; Cattley ve Cullen, 2018). HSH'ler, hepatositler ve LSEH'ler arasındaki Disse aralığında bulunurlar ve hücre gövdeleri hepatik parankimal hücrelerinin oluklarında yerleşirken, ince sitoplazmik uzantıları perisinuzoidal alana uzanır ve sinuzoidleri saran endotelin abluminal yüzeyini örümcek benzeri sararlar (McCuskey ve Wisse, 2010; Du ve ark., 2018). Bu sessiz-sakin hücreler A vitamini ve lipit ve lipitte çözünür maddeleri depolayan çeşitli büyüme faktörleri, sitokinleri, prostaglandinleri ve diğer biyoaktif maddeleri üreten özel bir role sahip hücre topluluğunu temsil ederler (Pinzani ve Rombouts, 2004; Miyamura ve Nishina, 2018). En önemli özelliği Vitamin A metabolizmasının öncülü olan retinolu depolamasıdır. HSC aktivasyonu sırasında bu lipit damlacıklarının kaybı söz konusudur. Bununla birlikte, retinoid kaybının HSC aktivasyonunun bir nedeni veya sonucu olup olmadığı hala aydınlatılamamıştır (Pinzani ve Rombouts, 2004). Bununla birlikte kronik karaciğer hasarında, bu hücreler sakın bir hücreden fibrinojenik, hareketli, çoğalabilen, kasılabilir, kollajen ve diğer ekstrasellüler matriks komponentlerini sentezleyebilen myofibroblast-benzeri bir hücreye dönüşmektedirler (Pinzani ve Rombouts, 2004; Du ve ark., 2018, Miyamura ve Nishina, 2018). Bu farklılaşan hücreler retinoidi kaybeder ve daha fazla miktarda kaba endoplazmik retikulum bulundurlar. A-aktin (α -SMA) 'nın düz kas izoformu "aktif" HSH'lerin kimliği için güvenilir bir belirteçtir (Du ve ark., 2018). Hepatik stellat hücreler aktif olmayan, durgun (quiescent) vitamin A depolayan, lipid içeren, perisit benzeri hücrelerdir (Pinzani ve Rombouts, 2004; Agha ve ark., 2017). Hepatik stellat hücrelerin karaciğer fibrozisinde anahtar rol oynadığı düşünülmektedir. Karaciğer hasarına yanıt olarak HSH'ler aktifleşir ve myofibroblast-benzeri hücrelere dönüşerek artan proliferasyon ve kollajen sentezi gösterirler (Sarra-Bournet ve ark., 2018). İlerleyen karaciğer hasarı süresince HSH'lerin sayıları artarken, fibrotik dokunun geri çözülmesinde ise sayıları hızla düşmektedir (Pinzani ve Rombouts, 2004).

Kronik karaciğer hasarı, hepatik stellat hücrelerin aktivasyonunu tetikleyen hepatosit hasarı ile sonuçlanır. Fibrogenesis uyarılmasını takiben, HSH'ler retinoid depolarını boşaltır

proliferasiyona uğrar ve düz kas aktini ve tip 1 kollajeni de içeren ECM proteinlerinin aşırı sentezi başlar (Bai ve ark, 2014). Diğer organlardaki fibrozisin aksine, HSH'lerin karaciğer fibrozisinde kollajen üreten hücrelerin çoğunluğunu (%82-96) oluşturduğu bildirilmiştir (Ozono ve ark, 2019). ESM (ekstrasellüler matriks) üreten farklı hücre tiplerinin tümü, kronik karaciğer hasarı veya herhangi bir şekilde dokunun fizyolojik homeostazının kronik olarak bozulduğu durumlarda bir aktivasyon işlemine maruz kalabilirler. HSH aktivasyon süreci çeşitli çalışmaların bir amacı olmuştur. Takip eden kültür ortamında, HSH sakin "depolama" fenotipinden yüksek oranda proliferatif "myofibroblast benzeri" fenotipe kadar bir aktivasyon sürecine girer. Bu işlem hala karaciğer dokusunda kronik hasarın ardından meydana gelenlere benzer olarak kabul edilir, ancak bu varsayım aşırı basitleştirmeyi temsil eder. Aktive edilmiş fenotip, kolajen tip I ve III'ün belirgin şekilde artmış bir sentezi ile birlikte büyük ölçüde kolajen tip IV (I > III >> IV) ve diğer ESM bileşenlerinin sentezi de gerçekleşmektedir (Pinzani ve Rombouts, 2004).

Aktifleşen HSH'ler tipik olarak düz kas ve iskelet kas hücrelerinde bulunan düz kas aktin (α -SMA), desmin, nestin, vimentin, iskelet kası myozinin ağır zincir izoformları gibi ara filamentleri ve ayrıca astroglial soy hattındaki hücrelerde bulunan gial fibriller asidik proteini (GFAP) sentezler. HSH'nin ESM sentezleyen diğer hücrelerin yanı sıra hem fibriller ESM birikimindeki aktif rolleri hem de kasılabilir özellikleri dolayısıyla portal hipertansiyonun gelişiminde önemli rol oynaması olasıdır (Pinzani ve Rombouts, 2004). Böylece fibrotik karaciğerde ekspresyonu artan vazokonstriktif agonistler HSH'lerin kontraksiyonunu indükleyebilirler. HSH'de incelenen başlıca vazokonstriktörlerden biri, endotel hücreleri ve diğer hücre tipleri tarafından salgılanan endotelin-1' (ET-1)'dir. Aktif HSH'de PDGF, TGF- β , reaktif oksijen türleri ve ET-1'in kendisi ET-1 sentez ve salınımını uyarır (Pinzani ve Rombouts, 2004). HSC çalışmalarında incelenen başlıca vazokonstriktör faktörlerden biri endotel hücreleri ve diğer hücre tipleri tarafından salgılanan endotelin-1'dir. Aktif HSC'de platelet-kökenli büyüme faktörü (PDGF), (transforme edici büyüme faktörü beta 1) TGF- β 1, reaktif oksijen türleri ve ET-1'in kendisi ET-1 sentezini ve salınımını teşvik eder (Pinzani ve Rombouts, 2004).

2.1.9.5. Pit hücreleri (karaciğer ilişkili lenfositler (LALs))

Pit hücreleri sinüzoidal duvara tutunmuş ve doğal öldürücü (NK) aktivitesine sahip olan ve karaciğer ile ilişkili bir lenfosit popülasyonunun bir parçası olan dolaşımdaki büyük

granüler lenfositler ile karşılaştırılabilir ve muhtemelen bu hücrelerden gelişirler (McCuskey ve Wisse, 2010; Miyamura ve Nishina, 2018). Sinüzoidal duvarda sıklıkla endotel hücrelerine yapışırlar (Miyamura ve Nishina, 2018). Bu yapışmanın Kupffer hücrelerine de olduğu gözlenmiştir. Kupffer hücre sayısında azalma pit hücre sayısında da azalma ile sonuçlanır. Periportal sinuzoidlerde sentrilobüler sinuzoidlere oranla daha yaygın bulunurlar. Bu hücrelerin tümör hücrelerini öldürdüğü yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (McCuskey ve Wisse, 2010).

2.1.9.6. Oval hücre

Sıçan karaciğerinde karsinogenezise doğru gelişen sürecin ilk adımı oval hücre proliferasyonudur. Rodentlerde (kemirgenlerde) toksik kimyasallarla oluşturulan ciddi karaciğer hasarında oval hücre olarak adlandırılan ve periportal alanda bulunan bu küçük epitel hücrelerinin çoğalması gözlenmiştir (Tomita ve ark, 2018). Bu hücreler, α -fetoprotein, albümin ve glukoz-6-fosfataz gibi belirteçleri eksprese eden parankimal olmayan hücrelerin bir alt grubunu oluşturur. Bu hücreler hepatositlere, kolanjiyositlere ve ayrıca ekzokrin pankreas hücrelerine farklılaşabilirler (Ray ve ark, 2015).

2.1.9.7. Karaciğer kök/progenitör hücreler (KPH)

Karaciğer hücrelerinden özellikle hepatositler akut karaciğer hasarı gerçekleştiğinde hızla çoğalırken, karaciğer kök/progenitör hücrelerin de bu şiddetli hasar durumlarında var oldukları ve hızla çoğaldıkları düşünülmektedir. Bununla birlikte insanlarda KPH'lerin kökeni ve etki mekanizmaları açıklamaya açıktır ve çalışılmaktadır (Koike, 2018).

Kök hücreler işlevsel olarak kendini yenileme ve farklılaşabilme kapasitelerine göre tanımlanırlar. Karaciğer kök/progenitör hücreleri kendi kendini yenileyebilirliğin yanı sıra, hepatositlere ve kolonjiyositlere farklılaşma potansiyeline sahiptirler (Tanimizu ve Mitaka, 2018; Tomita ve ark, 2018). Karaciğer kök/progenitör hücreleri gelişim, homeostaz ve rejenerasyonda önemli roller alırlar. Kronik karaciğer hasarında dejenere olan hepatositler rejenerasyon kapasitelerini kaybettikleri için karaciğer kök/progenitör hücreler aktive olarak yeni hepatosit desteği sağlarlar ve karaciğer dokusunun yeniden düzenlenmesinde rol

oyunlar. CD133, epitel adezyon molekülü (EpCAM), CD24 ve Thy1 yüzey antijenlerine sahip KPH'ler sağlıklı ve hasarlı karaciğer dokusundan izole edilmiş ve in vitro ve in vivo hepatositlere ve kolanjiyositlere farklılaştıkları gösterilmiştir (Tanimizu ve Mitaka, 2018). Karaciğer gelişimle ilgili fetal karaciğer kök/progenitör hücreleri ve homeostaz ve rejenerasyon açısından erişkin karaciğer kök/progenitör hücreleri olmak üzere iki kök/progenitör hücre sistemini barındırır (Tomita ve ark, 2018).

2.2. İnsan ve Sıçan Karaciğer Farklılıkları

Üst abdomende bulunan karaciğer; insanlarda vücut ağırlığının %2,5- 3,5'ini oluştururken, sıçanlarda yaklaşık vücut ağırlığının %4'ünü oluşturmaktadır. Loblardan oluşan karaciğerde lob sayısı ve her bir lobun şekli türler içinde aynı iken, türler arasında farklılık gösterir (Cattley ve Cullen, 2018).

İlk parsiyal (kısmi) hepatektomi sıçanlarda 1932'de gerçekleşmesine rağmen, insanlarda ise 20 yıl sonra yapılmıştır, bağırsaklara yapılan büyük cerrahi müdahaleler ilk kez rapor edildikten 70 yıl sonra. Bunun nedeni kemirgenlerin her bir lobun kolayca bağlanabilir ve çıkarılabilir olduğu loblu bir karaciğere sahip olmalarıdır. Halbuki insanlardaki lob düzeni bu duruma uygun değildir. İnsan karaciğeri, lobüllü olmayan mimarisi nedeniyle kemirgen karaciğerlerinden belirgin şekilde farklıdır. Uluslararası Resmi Anatomik Terminolojiye göre insan karaciğeri sol, sağ, kaudat ve kuadrat loblara ayrılırken (Kruepunga ve ark, 2019), sıçanda ise en büyüğü sol lob olmak üzere, birleşik sağ ve sol medyan loblar ile en küçük lob; kaudat olmak üzere ayrılır (Foster, 2018).

Primatlar ve etoburlar, nispeten yüksek yağlı diyetleri nedeniyle bir safra kesesi bulundurlar, öte yandan, otoburlar, istisnalar hariç safra kesesi bulundurmaktadırlar. Bununla birlikte, en ilginç örnekler fareler ve sıçanlardır, çünkü bu türler aynı subfamilyaya (Murinae) aittir. Sıçanlar safra kesesinden yoksun olmakla birlikte sürekli bir yoğun olmayan safra salgırlar (Cattley ve Cullen, 2018), safra tomurcuğunun sıçanda olmaması dışında kaudal foregut (önbağırsak) ve bezlerinin erken gelişimi fare ve sıçanlarda çok benzerdir (Kruepunga ve ark, 2019).

2.3. Fibrozis

Hasarlı dokuda, fibroblastların oldukça aktif ESM üreten myofibroblastlara farklılaşması doku onarımı için oldukça kritik bir öneme sahiptir. Miyofibroblast farklılaşmasına, aşırı ESM üretiminin biyosentetik gereksinimlerini karşılamak için artan glikoliz de dahil olmak üzere hücrel metabolizmadaki değişiklikler de eşlik eder. Doku onarımı gerçekleştiğinde apoptozise gidilememesi myofibroblastların aşırı birikimiyle sonuçlanır ki, bu da patolojik fibrozis ve ayrıca kanser de stromal reaksiyon karşılık bulur (Selvarajah ve ark, 2019).

2.3.1. Karaciğer Fibrozisi

Karaciğer fibrozisi ve onun son evresi olan siroz (Pinzani ve Rombouts, 2004), portal hipertansiyon, karaciğer yetmezliği ve hepatosellüler karsinom riskini de içeren hayatı tehdit edici komplikasyonları nedeniyle, dünya çapında, TEMEL halk sağlığı problemleridir (Yao ve ark, 2013; Xu ve ark, 2018).

Karaciğer fibrozisi dünya çapında ciddi bir sağlık sorunudur, çoğunlukla hepatit viral enfeksiyon, şiztosomiyazis, alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD), alkole bağlı karaciğer hastalığı (ALD) gibi çeşitli faktörlerin neden olduğu kronik karaciğer hasarından kaynaklanır. Karaciğer fibrozisin en belirgin özelliği aşırı biriken ekstrasellüler matrikstir. Fibrozisin belirgin bir özelliği olan ekstrasellüler matriksin (ESM) birikimi, uygun şekilde tedavi edilmezse, sonuçta normal karaciğer yapısını bozar. Ekstrasellüler matriksin aşırı sentezlenmesinin nedeni olan hepatik stellat hücreler, karaciğer fibrozunun başlaması, ilerlemesi ve geri dönüşümünde önemli bir rol oynamaktadır. Bu hücreler perisinüsoidal disside sessiz bir şekilde yer alırken, Patolojik hasara cevap olarak, lipid damlacıklarını kaybederek, kollajen birikimini artırırlar, α -SMA ve coll1a1 ile karakterize edilen miyofibroblastlara transdiferansiye olurlar (Bu ve ark, 2018).

Karaciğer fibrozisi; siroza, karaciğer yetmezliğine ve hepatosellüler karsinom gelişme riskine yol açan yaygın bir patolojik süreçtir (Bai ve ark, 2014). Viral hepatit, alkol ve benzeri risk faktörleri sonrası, ESM İN aşırı birikimi (Bai ve ark, 2014), karaciğer mimarisinin distorsiyonu, pseudo lobül ve nodül oluşumu ile karakterize bir süreçtir. Karaciğer fibrozunun mekanizmaları ve tedavisinde ilerlemelere rağmen, henüz tatmin edici

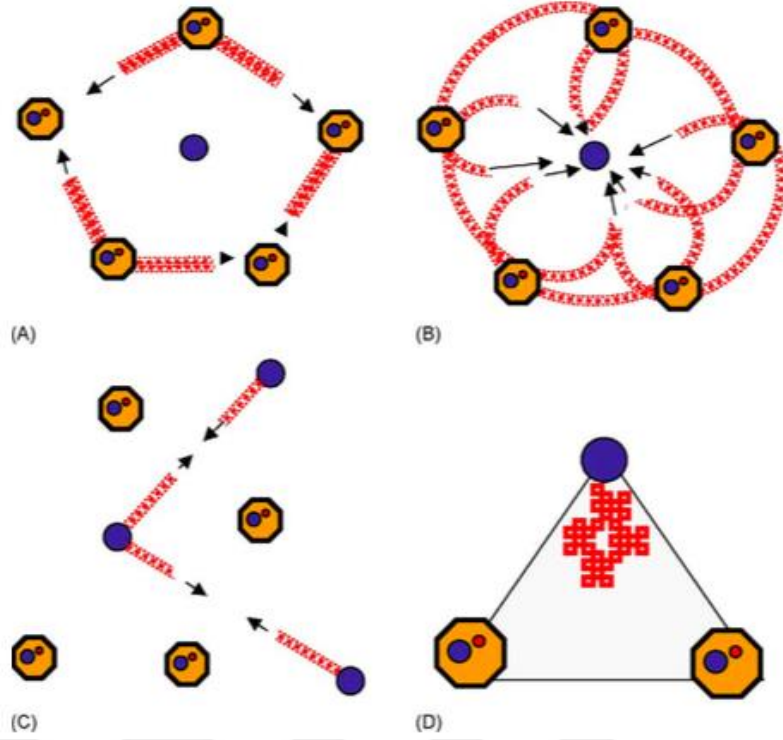
bir anti-fibrotik tedavi bulunamamıştır (Li ve ark, 2019). Aşırı ESM birikimi ile karakterize karaciğer fibrozisi, kronik alkol alımı, hepatit virüs, nonalkolik-steatohepatit ve genetik hastalıklar gibi etiyojisi bilinen ve primer safra sirozu, skleroz kolanjit ve diğerleri gibi etiyojisi bilinmeyen hastalıklardan kaynaklanabilir (Copple ve ark, 2018; Ozono ve ark, 2019). Karaciğer fibrozisi sirozu en şiddetli şekli, karaciğer hasarı sonrası hepatik stellate hücrelerin ve peribiliary fibroblastların, myofibroblastlara dönüşümünü uyaran protein ve diğer çözümler uyaranların (medyator) sentez ve salgılanmasıyla başlatılır (Copple ve ark, 2018). Bu dönüşüm, artan glikoliz ve ESM üretimini de içeren belirgin hücre metabolizmadaki değişikliklerle karakterizedir (Selvarajah ve ark, 2019). Medyatorlar de myofibroblastların çoğalmalarını, hasarlı bölgeye göçünü uyaran unsurları üretirler (Copple ve ark, 2018).

Siroz son evre fibrozudur karaciğerin. Alkol alımı ve Hepatit B ve C enfeksiyonu hepatik fibrozisin birincil nedeni olduğu düşünülmektedir. Karaciğer fibrozisinde myofibroblastların en büyük kaynağı karaciğer yıldız hücrelerdir. Sessiz-durgun, vitamin A'dan zengin, lipid içeren, perisit benzeri olan bu hücrelerin kısmi hepatektomi sonrası rejenerasyonda etkili olduğuna inanılmaktadır (Agha ve ark, 2017). Stellat hücreler, hepatoblast proliferasyonunda, göçünde ve aynı zamanda embriyonik gelişim süresince hepatosit farklılaşmasında kritik bir öneme sahip olan hepatosit büyüme faktörü (HGF) sentezlerler. Transgenik lesitin-retinol asetiltransferaz (Lrat)-Cre farelerde karbon tetraklorür ile indüklenmiş karaciğer fibrozisinde stellat hücreler, ACTA2 ve kollajen ekspresyonlarına bakılarak tüm myofibroblastların 82%–96% sini oluşturduğu izlenmiştir. Benzer sonuçlar tiyoasetamid toksik karaciğer fibrozis modelinde de gözlemlenmiştir. Ayrıca hepatik stellat hücrelerin genetik ablasyonu fare karaciğerinde fibrozisi belirgin bir şekilde azaltmıştır (Agha ve ark, 2017).

2.3.1.1. Karaciğerde fibrogenesis tipleri

Karaciğer fibrozisinin ESM'in hücre kaynaklı, uzun yıllardır tartışma konusudur. Fibriller ESM'nin anormal birikiminde potansiyel olarak rol oynayan hücre tipleri arasında HSH'ler, karaciğer dokusundan nispeten yüksek saflıkta izole edilme olasılığı nedeniyle çok fazla dikkat çekmiştir. Karaciğer fibrozisin hücre ve moleküler biyolojisi hakkındaki mevcut bilgilerin çoğu sıçan, fare veya insan karaciğerinden izole edilmiş kültür ortamında aktive

edilmiş HSH'lerin kullanıldığı in vitro çalışmalar sonucu elde edilmiştir. Günümüz de ise her biri ayrı bir lokalizasyona ve karakteristik bir immünohistokimyasal ve/veya elektron mikroskopik fenotipine sahip olan hücrelerin karaciğer fibrozisine ESM üreterek katkıda bulunabileceği açıktır. ESM üreten bu hücreler: Portal yolun fibroblast ve myofibroblastları, damar duvarındaki düz kas hücreleri ve sentrilobüler ven etrafındaki myofibroblastlardır. Bu farklı hücre tiplerinin katılımıyla birlikte farklı fibrozis modelleri de gelişmektedir. Sirozun ilerleyici fibrogenezisin genel bir sonucu olmasına rağmen fibrozis oluşumuna neden olan farklı tip modeller sıralanabilir. Biliyer fibrozis, portal-parankim arayüzünde reaktif safra kanalları ve periduktular (myo) fibroblast benzeri hücrelerin birlikte çoğalması nedeniyle, bir portal triadtan-diğer bir portal triadı takip etme eğilimindedir (Şekil 5). Bu durum santral ven ve portal triad bağlantılarının geç evrelere kadar korunduğu, karaciğer nodüllerini çevreleyen portal-portal septa oluşumuna neden olur. Diğer taraftan kronik viral hepatit kaynaklı fibrozis, portal-santral ven arasında oluşan köprü nekrozunun bir sonucu olarak kabul edilir. Bu nedenle portal-sentral septa orijinlidir (Şekil 5-B). Ek olarak, bu fibrojenik farklılaşma biçimi “arayüz” hepatitinin varlığı ve parankimde portal-portal septa gelişimi ve parankim içinde sonlanan kör septa varlığı ve portal sistemle vasküler bağlantıların hızla düzensizleşmesi (erken portal hipertansiyon) ile karakterizedir. Fibrojenik farklılaşma sürecinin sentral-sentral ven formunda ise kronik kalp yetmezliği örneğinde olduğu gibi venöz çıkış problemlerinde ikinci sıradadır ve sentral-sentral septa oluşumu ile karakterizedir (Şekil 5-C). Alkolik karaciğer hastalıkları ve non-alkolik steatohepatit (NASH), gibi metabolik karaciğer hastalıklarında alışılmamış tip ve şekilde fibrozis gelişimi gözlenir. Sinuzoidler ve hepatosit kordonları etrafında kapillarizasyona neden olan fibriller matriks birikimi (Şekil 5-D) ile sonuçlanır. Farklı faktörlerle ilişkili olan bu süreç özellikle (1) doku hasarının topografik yerleşimi; (2) pro-fibrojenik faktörlerin nisbi yoğunluğu ve (3) yaygın pro-fibrojenik mekanizmalarla ilişkilidir. Bunlara ek olarak da farklı hücre etkileşimlerini verebiliriz (Pinzani ve Rombouts, 2004).



Şekil 5. Farklı fibrozis gelişim tipleri. (A) Biliyer tip fibrozis; (B) Köprüleme fibrozisi; (C) “ters (revers) lobulasyon” ile sentrolobüler fibrozis; (D) perisellüler fibrozis (Pinzani ve Rombouts, 2004).

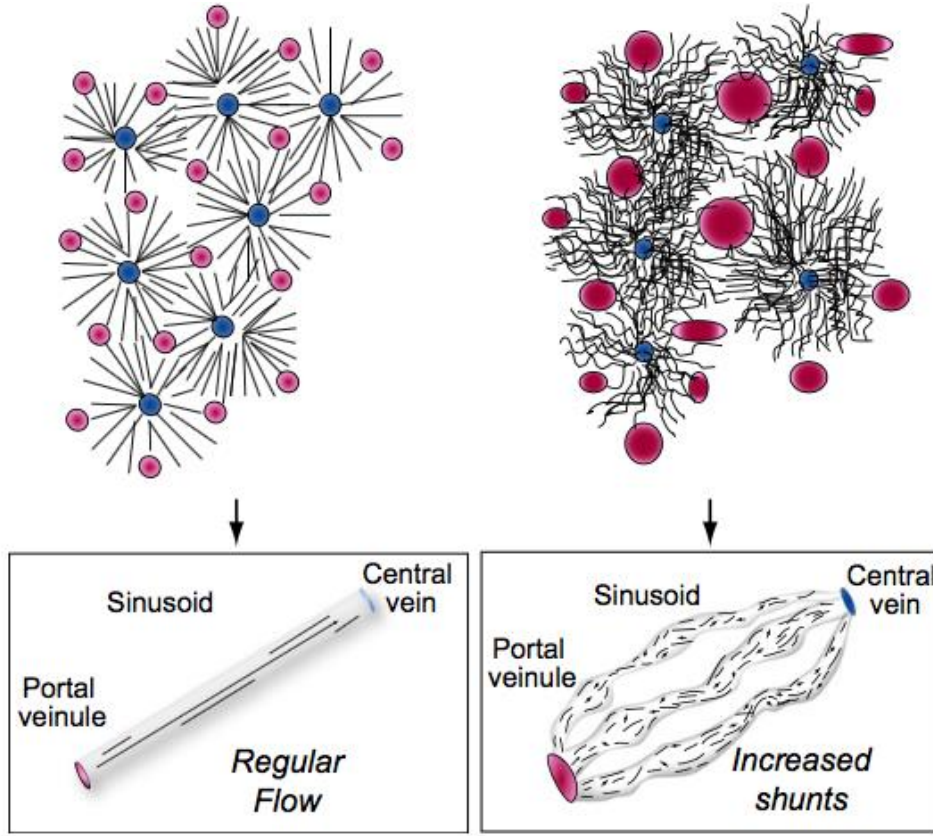
2.3.1.2. Karaciğerde Fibrozis Sürecinde Karaciğer Sinüzoidlerinde Hücresel Etkileşim

Karaciğer mikroçevresi, tümleşik yapı ve hücresel kısımlarıyla her bir bölümün (hücre veya matriks) çok önemli bir rol oynadığı çok yönlü bir etkileşim ağı (hücre-matriks-hücre) olarak tanımlanabilir. Hücresel etkileşimler, fibrozis ve inflamasyonun da dahil olduğu pek çok karaciğer hastalıklarında kritik bir öneme sahiptir. Karaciğer hasar varlığında LSEC’ler düzensiz bir şekilde kapillarizasyon fenotipi sergilerler (Du ve ark, 2018).

Sağlıklı karaciğerde sinüzoid endotelinde bazal lamina çok az bulunur ya da hiç bulunmaz. Dolayısıyla bu geçirgen yapı kan ve hepatositler arasında plazma devamlılığına izin verir. Aynı zamanda sinüzoid duvarında kollajen de gözlenmez. Bununla birlikte yaşlanma, fibrozis ve siroz gibi belirli tip karaciğer hasarlarında, perisinüzoidal alanda kapillarizasyon olarak adlandırılan, bazal membran materyalleri ve kollajen fibril birikimi ile karakterize durum meydana gelirken bozulmuş bir damarsal geçiş değişimi söz konusudur (McCuskey ve Wisse, 2010). Perisinüzoidal stellat hücreler, myofibroblast

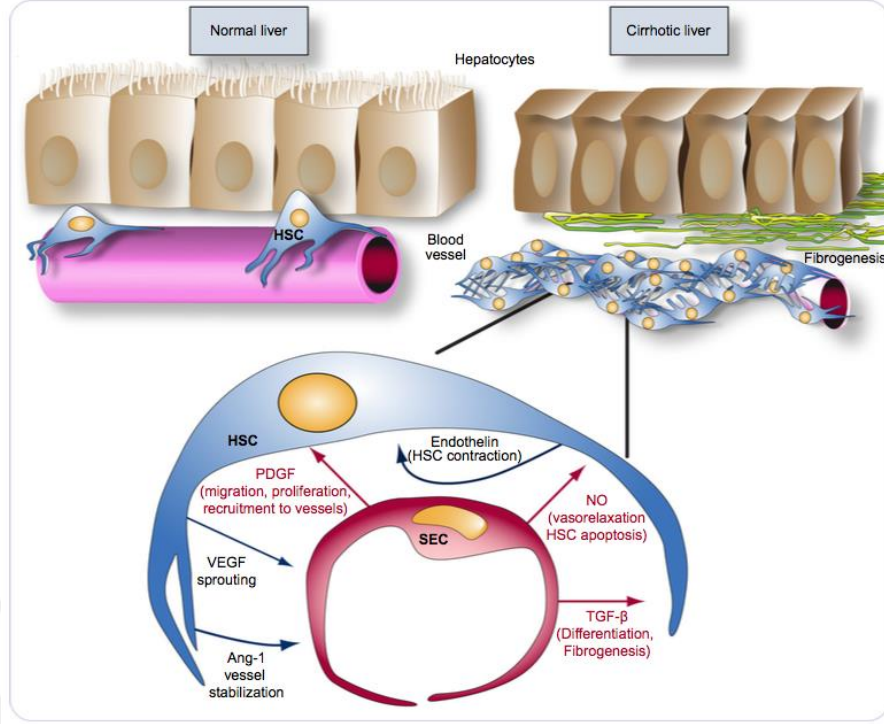
benzeri hücre transformasyonunu takiben yağ damlacıklarının sayısını ve vitamin A sentezini azaltırken, kollagen tip I, III–VI, fibronektin, laminin, tenaskin, undulin, hyaluronik asit, dekorin, sindekan vb. ekstrasellüler matriks materyallerinin sentez ve salınımını artırır (McCuskey ve Wisse, 2010). Stellat hücrelerin aktif forma ve myofibroblastlara dönüşümünü uyaran sitokin ve diğer maddelerin kupffer hücrelerinden salındığı düşünülmektedir (McCuskey ve Wisse, 2010).

Sinüzoidal kapillarizasyon, hem portal hipertansiyon hem de karaciğer fibrozu da olmak üzere birçok karaciğer hastalığının gelişmesinden önce gelir. Kapillarizasyon muhtemelen kronik karaciğer hastalıklarında oluşan sinüzoidal değişikliklerin sadece bir bileşenidir ve kronik yara iyileşme sürecinde artan anjiyogenik faktörlerin varlığı nedeniyle gelişen bir durum da olabilir. Anjiyogenezisin karaciğer fibrozisi ile ilişkili olmasına rağmen (Taura ve ark, 2008; Yao ve ark, 2013), fibrozis ilişkili anjiogenezisin moleküler mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır ancak hipoksinin anjiyogenezisin temel faktörü olduğu ileri sürülmektedir. Bu şekilde hipoksik tepkilere neden olan moleküler mekanizmaların açıklanabilmesinde ilerleme kaydedilmiştir (Yao ve ark, 2013). Fenestra kaybına uğrayan sinüzoidal endotel ve subendoteliyal bazal membran varlığını içeren sinüzoidal endotel kapillarizasyonu, siroza önemli derecede katkı sağlamaktadır. Karaciğer sinüzoidal endotel hücreleri (LSEH'ler) fenestralara sahipken bazal laminadan yoksundurlar (Yao ve ark, 2013). Bu hücreler çözünebilir faktörler üretilip salgılayarak ve kollajen matrikse mekanik gerginlik kullanarak komşu hücrelerin fenotipini de etkilerler. LSEH-kökenli fibronektin, hepatik stellat hücrelerin fenotipini düzenler ve bu hücreleri sessiz-sakin (quiescent) şekilden aktif şekle dönüştürürler. Erken evre fibroziste LSEH'ler kollajen fibriller yoluyla kasılma güç üreterek hepatik stellat hücreleri aktive ederler. Beraberinde dış kaynaklı hepatik hasar hepatosit apoptozisi teşvik eder bu da apoptotik cisimciklerin salınımıyla non-parenkimal hücrelerin, hepatik stellat hücreler ve kupffer hücrelerinin aktivasyonu ile sonuçlanır. Aktifleşen hepatik stellat hücreler de çoğalır, kasılabilir özellikler kazanır ve hepatik parankimine artan oranda kollajen fibriller ve ekstrasellüler matriks (ESM) biriktirmeye başlarlar bu da karaciğer sertliğine ve intersellüler fonksiyonların bozulmasıyla sonuçlanır. Böylece Disse aralığında kollajen birikimi endoteliyal fenestraların kaybı ve karaciğer fibrozisin birikimiyle sonuçlanır. Bu durum kapillarize LSEH'ler ile aktif hepatik stellat hücrelerin pozitif geri-besleme mekanizması sonucu karaciğer fibrozisini arttıran bir süreçtir (Du ve ark, 2018).



Şekil 6. Sinüzoidlerin normal mimarisi (sol resim), kan akışının portal venüllerden, sinüzoidlere ve sentral vene (sol kutucuk) normal akışı gösterilmiştir.

Şekil 6’da fibrozisin ileri safhası olan sirozlu karaciğerdeki sinüzoidal vasküler ağ, mikronodüller ve makronodüller (sağ resim) halinde düzenlenmiş, değişen çapta ve akış düzeninde artan sayıda sinüzoidal kapillerler (anjiyogenez) ile birlikte değişikliklere uğrar. Anjiyogenezin fibrozisi arttırdığı öne sürülmüş olsa da, bu yeni damarlar teorik olarak intrahepatik şantları azaltan portal basınç olarak da görev yapabilir (sağ kutucuk) (Thabut ve Shah, 2010).



Şekil 7. Sirozda ve portal hipertansiyonda patolojik sinüzoidal yapılanma.

Şekil 7’de Hepatik stellat hücreler, sinüzoidlerin kasılmasını sağlamak için sinüzoidal lümen çevresinde hizalanırlar. Normal fizyolojik koşullarda, HSH’lerin kontraktilitesi ve sinüzoid etrafında toplanması nadir olmakla birlikte, sirozda, hücresel çıkıntıları olan HSH sayısının artması, sinüzoidlerin etrafına sararak yüksek dirençli, daralmış bir sinüzoid kapillerlerinin varlığına neden olurlar. Hücresel düzeyde, bir dizi büyüme faktörü molekülü, HSC ve LSEH arasındaki otokrin ve parakrin sinyalleri vasıtasıyla bu sürece katkıda bulunur (Thabut ve Shah, 2010).

2.4. Mezenkimal Kök Hücre (MKH)

Mezenkimal Kök Hücreler (MKH), hematopoietik hücrelerde eksprese edilmeyen mezenkimal hücre yüzey işaretleyicileri ile ve self-renew ve mezodermal soylara farklılaşma potansiyelleri ile karakterizedirler. Mezenkimal hücrelerin transplantasyon sonrası anjiyogenezi uyarması, oksidatif stresi azaltması, büyüme faktörleri ve mikrovezikül salgılama ile doku onarımını arttırdığı ve fibrozisi azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca MKH’ler klinik denemelerle onaylanmış güçlü immünomodulator kapasiteye sahiptirler (Li ve ark, 2013; Walraven ve Hinz 2018).

MSC'nin tanımı tartışmalı olmasına rağmen, bu terim genellikle çoğu dokunun perivasküler nişinde bulunan ve kemik ve kırıkta gibi mezodermal dokularda farklılaşma yeteneği olan kök hücre çeşidini tanımlamak için kullanılır (Pajarinen ve ark, 2019). 2006, Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği, MSC'leri, 1) in vitro plastik hücre kültürlerine tutunan hücreler olarak tanımlamıştır; 2) belirli bir yüzey işaretleyicilerine sahip (CD105, CD73, CD90 ve CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79, CD19 ve HLA-DR-); ve 3) osteoblastlara, adipositlere ve kondroblastlara farklılaşma eğilimi gösterirler (Nunes ve ark, 2018; Pajarinen ve ark, 2019). Mezenkimal dokuları yeniden oluşturma yeteneklerine ek olarak, MSC'ler doku mühendisliği uygulamaları için onları hedef hücreler haline getiren geniş immünomodülatör özelliklere sahiptir (Nunes ve ark, 2018; Pajarinen ve ark, 2019). Bu farklılaşma potansiyelleri ve immünomodülatör etkileriyle MSK'ler rejeneratif tıpta, hücre immünoterapide ve gen tedavisini etkileyici bir araç olarak kullanılmaktadır (Li ve ark, 2013).

Bu hücreler kolayca izole edilebilir, kültüre edilebilir, osteoblastlar, kondroblastlar, adipositler, hepatosit benzeri hücreler ve myoblastlar gibi farklı tip hücrelere indüklenebilirler. MSCler kemik iliği, adipoz doku, iskelet kası, kordon kanı, plasenta, göbek bağı gibi çeşitli dokulardan izole edilebilirler (Li ve ark, 2013). Gelecek vaad eden bir kök hücre tipi, bebek insan sünnet derisinin dermisinden izole edilen (Kock ve ark, 2009) insan sünnet derisi MKH'lerin başlıca kaynağıdır. Bol miktarda MKH'ye sahiptir, ucuz olması ve invaziv olmayan işlemlerle elde edilmesi de sünnet derisinin kök hücre kaynağı olarak tercih edilmesinin başlıca nedenlerindedir (Li ve ark, 2013).

MKH'ler ana özelliklerinde önemli değişiklikler olmadan ardışık olarak in vitroda pasajlanabilirler (Nunes ve ark, 2018).

Artan sayıda raporun önerisi MKH ve MKH kökenli ekzozomların birçok hastalığın tedavisine aday olduğu yönündedir (Huang ve ark, 2018, Nunes ve ark, 2018).

Multipotent mezenkimal stromal hücreler veya mezenkimal kök hücreler olarak da adlandırılan koloni oluşturan birimler-fibroblast (lar) (CFU-Fs), ilk olarak in vitro koloni oluşturan plastik adherent-fibroblast benzeri hücreler olarak tanımlandı. Bu hücrelerin kaynağı kemik iliği (BM: Bone Marrow) olmasına rağmen, hemen hemen tüm fetal ve postnatal doku ve organ kaynaklı MKH'lerin varlığı bildirilmiştir. Bu hücreler plasenta, göbek kordonu, amniyon sıvısı ve zarı, iskelet kası, yağ dokusu, akciğer, kalp, karaciğer, böbrek ve diğer doku ve organlardan izole edilmiştir. MKH'ler, kendi kendini yenileme kapasiteleri (self-renewal) ve in vitro farklılaşma potansiyellerinin (multilineage

differentiation) yanı sıra büyüme faktörü salgılaması ve immünomodülasyonu ile karakterize edilir. MKH'ler in vitroda belirgin bir telomeraz aktivitesinin olmamasına rağmen, uzun süreli kültür ortamında MKH'lerin yaşlanmasına, güç kaybına rağmen yetiştirilebilirler. Uygun büyüme faktörleri ve kimyasal uyarıcıların varlığında, MKH'ler adipositler, osteoblastlar ve kondroblastlar da olmak üzere in vitroda farklılaşabilirler. MKH'lerin çeşitli immün hücrelerde olgunlaşma, proliferasyon, aktivasyon, sitokin sekresyonunu ve ortak uyarıcı molekül ekspresyonunu yönettiği de gösterilmiştir. Uluslararası Hücresel Terapi Derneği'ne (ISCT) göre, insanlarda MKH tanımlaması için minimum gereklilikler plastik tutunma yüzeyi, üçlü farklılaşma potansiyeli (adipositler, osteoblastlar ve kondroblastlar) ve yüzey belirteçleri ekspresyonudur (Agha ve ark, 2017).

Kendi kendini yenileme ve farklılaşma yeteneğine sahip kök hücreler, memelilerde totipotent kök hücreler, pluripotent kök hücreler ve multipotent kök hücreler olmak üzere üç tiptedir: Totipotent kök hücreler, embriyo oluşumunu sağlayan germ hattı kök hücreleri gibi hücrelerdir. Embriyonik kök hücreler ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler olarak adlandırılan pluripotent kök hücreler, üç germ tabakasına farklılaşabilme ve daha sonra da her bir germ yaprağı, endoderm germ yaprağı gibi, endodermden gelişen karaciğer gibi diğer dokulara farklılanabilirler. Yetişkin kök hücreler olarak adlandırılan multipotent kök hücreler, mekanik hasar veya toksisitenin neden olduğu doku hasarında dokunun rejenerasyonunu sağlarlar. Multipotent kök hücreler vücut içinde nadir bir popülasyona sahiplerdir ve hasar ile aktif olurlar. Doku sağlıklı iken genellikle inaktiftir. Somatik kök hücreler, “niş” adı verilen belli bir ortama ihtiyaç duyarlar. Niş sinyalleri kök hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını sağlarlar (Tiyaboonchai ve ark, 2018).

Transplantasyonda, işlevsel karaciğer hücre eksikliğini gidermek için hepatosit kaynağı olarak karaciğer kök hücre kullanımına odaklanılmıştır (Tiyaboonchai ve ark, 2018).

Diğer bir yandan karaciğer kök hücreleri, izole edilmesi kolay, in vitro ve in vivo olarak hepatositlere farklılaşabilir hücreler olduğu bilinmesine rağmen karaciğer kök hücrelerin sağlıklı bir karaciğerden izole edilip edilemeyeceği hala bilinmemektedir. Ayrıca, karaciğer kök hücreleri hakkında çok az şey bilinmektedir ve hepatik kök hücrelerin işlevsel hepatositlere ve kolanjiyositlere (safra kanalı epitel hücreleri) nasıl farklılaştığı ile ilgili bilinmeyenler devam etmektedir. Bu nedenle transplantasyonda karaciğer epitel hücreleri için daha iyi bir kaynağa ihtiyaç vardır (Tiyaboonchai ve ark, 2018). Kök hücrelerin farklılaşma ve kendini yenileme kapasiteleri, onları sınırsız sayıda hepatosit üretimi için

kullanılabilecek kaynak yapar. Tanım olarak, kök hücreler farklılaşma ve kendini yenileme kapasitesine sahiptir ve bu da onları sınırsız sayıda hepatosit üretimi için bir kaynak haline getirmektedir. Akut, kronik ve konjenital karaciğer hastalıklarının tedavilerinde çeşitli kök hücre kaynakları ve tipleri test edilmiştir (Nicolas ve ark, 2018).

Karaciğerde hem fetal (hepatoblastlar) hem de yetişkin (oval hücreler) kök hücreler bulunmasına rağmen sayıları çok düşüktür. Bu nedenle rejeneratif tıp alanı, odağını diğer kök hücre tiplerine yöneltmiş (Nicolas ve ark, 2018) olması bizi de sünnet derisi kök hücrelerini araştırmaya yöneltmiştir.

2.5. Bor

Yüzyılı aşkın bir süredir borun bitkiler için esansiyel bir element olduğu bilinmektedir. Ayrıca memeli hücreleri üzerindeki etki mekanizması tam olarak açıklanamamış olsa da birçok kanıt borun insan beslenme ve metabolizmasında önemini ortaya koymuştur ve insan ve hayvanları da içine alan yüksek organizmalarda borun vital mikromineral olduğu da ileri sürülmektedir (Demirci ve ark, 2014). Borun; beyin gelişimi ve işlevini, hormon metabolizması, inflamatuvar yanıtın düzenlenmesi, yara onarımı, diş ve kemik gelişimi gibi birçok metabolik yolakta önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Demirci ve ark, 2014; Doğan ve ark, 2014). Ayrıca sınırlı sayıda çalışmada, kilo vermede etkin mekanizması belirsizliğini korumakla birlikte, borun besin takviyesi olarak diyetle kullanılması durumunda kısa ve uzun vadede kilo kaybına neden olabileceği ve ileride obezite gibi halk sağlığı sorunlarında kullanılabileceğini ileri sürmektedir (Doğan ve ark, 2017).

Bitki biyolojisindeki önemi vurgulanan borun yapılan çalışmalarda, bitki hücrelerinin zar bütünlüğünde önemli bir yer aldığı düşünülmektedir. Bitki hücrelerinde bor eksikliği, hücre duvarının ve membranının yıkımı ile sonuçlanır. Bitki hücre zarındaki bor ve kalsiyum metabolizması, hücre sinyal mekanizmaları için önemlidir. Bitkilerde, bor, membran glikoproteinleri ve glikolipitler ile diester borat bileşikleri oluşturarak, membran yapısı ve işlevi için önemli olan kalsiyum şelatlayıcıları veya redoks düzenleyicileri olarak görev görürler (Demirci ve ark, 2014).

Bor çeşitli sebze ve meyvelerde, özellikle fındıkta iz element olarak bulunmaktadır. Bor eksikliği veya fazlalığı biyolojik etkilere neden olmaktadır. Hormon ve enzim reaksiyonlarında, hücre zarı işlevlerinde mineral metabolizmasında rol oynayan bor, birçok bitkinin büyüme sürecinde temel bir bileşendir. Buna ek olarak, insan ve hayvan dokularında hafif konsantrasyonlarda bulunması insan yaşamı için temel bir gereklilik olduğunu düşündürmektedir. Önceki çalışmalar, bor eksikliği yaşayan bitkilerde fotosentez reaksiyon kapasitesinin azalmasından yaşanan bor eksikliğinin sorumlu olduğunu göstermiştir. Tarımsal ürünlerde yaşanan bor eksikliği ürünleri olumsuz etkilemektedir. Bu tür problemlerin varlığı araştırmacıları canlı sistemlerde borun öneminin araştırılmasına yönlendirmiştir. Beslenmedeki eksikliği, beyin davranış ve elektrofizyolojisi üzerinde etkilidir. Psikolojik olayların dışında, boronik bileşikler, Bor Nötron Yakalama Terapisi (Boron Neutron Capture Therapy; BNCT) olarak adlandırılan kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bor ve nötronlar kendi başlarına herhangi bir doku hasarına neden olamazlar. BNCT yüksek maliyetli bir nükleer reaktör gerektirdiğinden, klinik tedavilerde dünya çapında sınırlı bir kullanıma sahiptir. Ayrıca bor atomunun antioksidan enzimler üzerinde önemli bir etkisi olduğunu gösteren çalışmalarından özellikle bitki çalışmalarda aşırı bor varlığının antioksidan enzimleri uyardığını ve özellikle askorbat döngüsü ilişkili enzimleri aktive ettiğini göstermiştir (Pasa ve ark, 2016).

Çalışmamızda bor bileşikleriyle bu bileşiklerden borik asit (BA) ve sodyum pentaborat pentahidrat (NaB) kullanılmasının amacı hücrelere olan etkisinin araştırılmasının yanında, hücrelere uzun süreli işlevsel etkinlik kazandıran uygun yaşamın sağlanmasıdır.

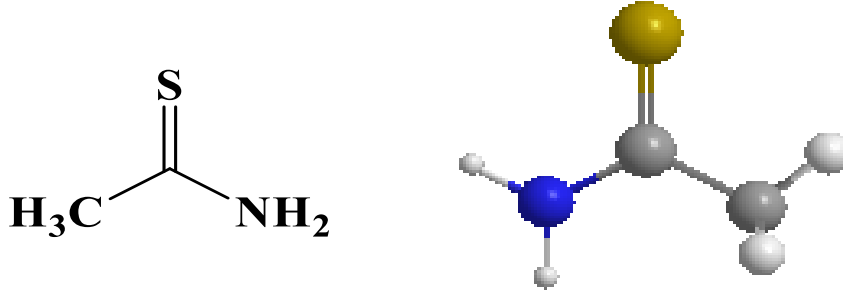
2.6. TAA

Türkçe adı: Tiyoasetamid

CAS (Kimyasal Kuramlar Servisi) numarası: 62-55-5

Eşanlamlıları: Asetothioamide, Ethanethioamide, Thiacetamide, TAA

Moleküler Formülü: C_2H_5NS



Şekil 8. TAA kimyasal yapısı

Tiyoasetamidin (TAA) doğada oluştuğu bilinmemektedir. Amonyum asetat ve alüminyum sülfürün ısıtılmasıyla hazırlanmaktadır (SC GAD, 2014).

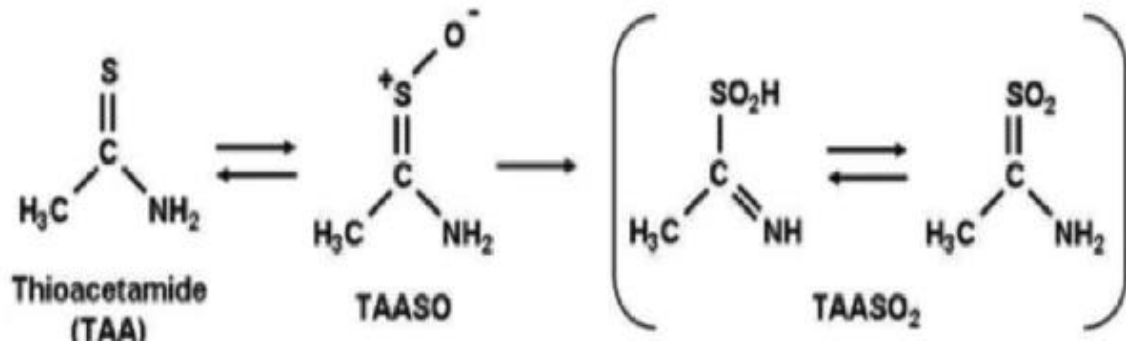
TAA nitel analizlerde hidrojen sülfid gazı yerine kullanılırken, tetraetil kurşun içerikli motor yakıtı için bir dengeleyici olarak deri, tekstil ve kağıt endüstrileri için bir organik çözücü olarak kullanılmaktadır (SC GAD, 2014).

1945'te portakal çürüklerinin önlenmesinde mantar ilacı olarak kullanılan bir madde olan tiyoasetamidin sonradan hepatoksisite ve kimyasal bir kanserojen ajan olduğu anlaşılmıştır. TAA 1960'ların sonlarında yasaklandı ve o zamandan beri karaciğer hasarı, karaciğer fibrozisi, karaciğer kanseri ve karaciğer yenilenmesini incelemek için hepatotoksik bir model olarak kullanıldı. Suda çözünürlüğünün çok iyi olması, uzun süreli bir hasar oluşturmada kullanılabilmesi, iyileşme paterninin 120 saate kadar olması, subkronik bir tek doz indüklü akut karaciğer hasarında geniş bir kullanım yelpazesi, karaciğer fibrozisine neden olan subkronik ve karaciğer kanserine neden olan kronik maruziyette kullanılabilmesi bu mekanizmaların açıklanmasında çok önemli bir özelliktir. CCl₄ gibi TAA'da hasara neden olan CYP450-aracılı biyoaktivasyona uğrayan klasik sentrilobular (zon 3) hepatotoksindir. TAA ilk önce CYP2E1 tarafından TAA-sülfoksit (TASO) ve ayrıca ileri reaktif metabolit olan TA-sülfona (TASO2) metabolize edilir (Chilakapati ve ark, 2007; Pritchard ve Apte, 2015). TAA-sülfon hücrel makromoleküllere bağlanır ve nekrotik hücre ölümüne neden olur. CCl₄ ve asetaminofen'den farklı olarak TAA toksisitesi sırasıyla lipid peroksidasyonuna veya GSH tükenmesine bağlı gibi görünmemektedir. Ayrıca TAA flavin içeren monooksijenaz enzim sistemi ile daha az toksik olan bilinmeyen metabolitlere metabolize edilebilir. Bununla birlikte çok az çalışmayla sonuçlanan bir toksik madde olarak sınırlı kullanımı nedeniyle, TAA kaynaklı nekrotik hücre ölümünün kesin mekanizması açık değildir. Bu çalışmalar karaciğer CYP2E1'i indükleyen veya baskılayan tedavilerin veya genetik değişikliklerin, TAA toksisitesini ve ardından karaciğer rejenerasyonunu etkileyeceğini göstermektedir.

TAA'nın sulu çözücüler içinde yüksek çözünürlüğü nedeniyle Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Tuzlu Çözelti (dPBS), tedavi için araç seçimidir (Pritchard ve Apte, 2015).

Hayvanlarda kanserojen olduğuna dair yeterli kanıt yoktur. Tekrarlanan diyet uygulaması, farelerde karaciğer hücre tümörleri ve safra kanalı ve karaciğer tümörleri oluşturmuştur. Siroz, hem farelerde hem de sıçanlarda gözlenmiştir (SC GAD, 2014).

Tioasetamide (TAA), kemirgenlerde fibrozis indüksiyonunda sıklıkla kullanılan toksik bir ajandır (Bai ve ark, 2014; Zhang ve ark, 2015; Golan-Gerstl ve ark, 2018) biyokimyasal ve morfolojik gözlemler sonrası TAA kaynaklı deneysel hayvan sirozu insana yakınlığı nedeniyle kullanılmaktadır. Bu madde karaciğer fibrozisinde geri-dönüşümü, anti-fibrotik ve düzenleyici maddelerin denemesi amaçlı uygun bir hayvan modeli oluşturmada tercih edilmektedir (Bai ve ark, 2014). Fibriller kolljen tip I' in aşırı birikimi fibrotik ESM'in en ayırı karakteristiğidir (Walraven ve Hinz 2018).



Şekil 9. Zararlı tiyoasetamid (TAA) metabolitlerinin oluşumu (Wallace ve ark, 2015).

Zararlı tiyoasetamid (TAA) metabolitlerinin oluşumu (Şekil 9) ve hepatositler üzerindeki etkileri için basitleştirilmiş bir model: İlk biyotransformasyon adımında, TAA, TAASO'ya geri dönüşümlü olarak metabolize edilir. İkinci adımında, yüksek oranda reaktif olan TAASO₂ oluşur. Daha sonra, TAASO₂ direkt olarak hücresel proteinler veya lipidler üzerindeki amin grupları (R-NH₂) ile reaksiyona girerek fonksiyonel bozukluğa neden olabilir. Ek olarak, TAA glutasyon tükenmesine ve yüksek seviyelerde reaktif oksijen türlerine (ROS), lipid peroksitlere, sitotoksinite ve mitokondriyal hasara yol açar. Bu olaylar bir arada, apoptoz, nekroz ve hepatoselüler karsinom ve kolanjiyokarsinom oluşumuna neden olabilir (Wallace ve ark, 2015).

2.6.1. TAA ve Toksikite Mekanizması

Dolaylı olarak hepatotoksin olarak davranan TAA, parenkimal hücre nekrozuna sebep olur (Chilakapati ve ark, 2007; SC GAD, 2014).

TAA'nın reaktif metaboliti, TASO₂, kovalent olarak, TAA kaynaklı hepatotoksik etkilerden sorumlu olan asetilimidolizisin türevlerinin oluşumu ile proteinlere bağlanır, TA aynı reaktif ara madde vasıtasıyla asetamid de oluşturabilir, bununla birlikte, çalışmalar, asetamidin, TAA'dan çok daha büyük dozlarda verildiğinde bile, TAA için bildirilenler gibi hepatik lezyonlar üretmediğini göstermiştir ki (Chilakapati ve ark, 2007), yapılan bazı çalışma sonuçlarında da TAA'nın in vivo metabolizasyonu sonucu oluşan kanserojen olan asetamidin sonrasında asetata hidrolize olduğu ve yolla TAA'nın indüklediği karaciğer nekrozu, TAA'nın S-oksidi metabolik dönüşümünü ve ardından TAA-S-oksidin karaciğer makromoleküllerine bağlanabilen reaktif bir ara maddeye metabolize edilmesini veya asetamid ve polar ürünlere indirildiğini açıklanmıştır. TAA'nın karaciğerdeki biyokimyasal etki örnekleri, TAA ile muamele edilen sıçanlarda glikoz-6 fosfat dehidrogenazın indüklenmesi ve hepatik karbamil fosfat sentetaz, ornitin transkarbamilaz ve arginazın aktiviteleriyle üre ürününün seviyesi düşer. Böylece, TAA karaciğerde üre döngüsünde belirgin bozukluklara sebep olur. Ayrıca, sıçanlara uygulanan TAA, 24 saat sonrasında karaciğerlerden izole edilen mitokondrilerde fonksiyonel rahatsızlıklara yol açar ve mitokondrinin maksimum solunum aktivitesi de düşer, mitokondriyal Ca²⁺ içeriği önemli ölçüde artar ve hepatik mitokondriyonların Ca²⁺ transport davranışı değişir. Sonuçlar iç mitokondriyal membranların yapısal değişikliklerinin göstergesidir. TAA'nın karsinogenezin başlatılma evresindeki potansiyel rolü, ribonükleik asit (RNA) taşıma aktivitesinde karşılık gelen bir artış ile hücre nükleer zarflarında nükleosit trifosfat aktivitesindeki bir artış ile ilişkilendirilebilir. Nükleer RNA dizilerinin taşınmasındaki değişiklikler, kanserogenlere erken yanıt olarak kabul edilir (SC GAD, 2014).

2.6.2. TAA'nın İmmünotoksitesisi

TAA'nın genel immünotoksitesisi bilinmemekle birlikte, bağışıklık sisteminde meydana getirdiği değişiklikleri ortaya çıkarmak için diğer bazı bileşiklerle paralel çalıştığı sonucunu destekleyen bazı kanıtlar vardır (SC GAD, 2014).

2.7. Alfa Düz Kas Aktin (α -SMA)

Bilinen birçok fibrotik hastalıkta ortak olan temel hücre tipi myofibroblasttır. Myofibroblastlar alfa düz kas aktin-pozitif (SMA⁺) fibroblastlardır, bu hücreler kollajen ve fibronektin gibi ekstrasellüler matriks proteinlerini biriktirirler. Fibrotik hastalık durumları tipik olarak ilerleyici, anormal derecede yüksek myofibroblast birikiminin kısır döngüsü ile tanımlanır. Bu fenomen, organ yapı ve işlevini bozan ve nihayetinde yaşamı tehdit eden ESM bileşiklerinin birikimine neden olan myofibroblastların aşırı artışıyla ilgilidir (Agha ve ark, 2017).

2.8. Kollajen 1 Alfa

Karaciğer fibrozisi, temel olarak α -SMA pozitif HSH'ler/myofibroblastlar tarafından üretilen ESM birikiminden kaynaklanır ve kollajen, fibrozis derecesini yansıtan hassas bir indekstir (Cao ve ark, 2018).

2.9. Pikro Sirius Kırmızısı

Karaciğer fibrozisi özgün histokimyasal boyalar kullanılarak doku seviyesinde değerlendirilir. Bu boyamalarla sağlıklı karaciğerde bulunan kollajenin varlığı tespit edilebildiği gibi, anormal şekilde biriktirilmiş kollajen miktarı da tespit edilebilir. Kollajen lifleri rutin hematoksilin ve eozin boyamasıyla dahil, sinüzoidler boyunca veya bağ dokusu septalarında amorf pembe bantlaşmalar görünümündedir. Kollajen için özel boyalar arasında şunları gösterebiliriz: Rutin boyamalarda en sık kullanılan Masson trikrom (kollajenler yeşil boyanır); kırmızı boyanmanın artan yoğunluğunun sürekli bir kollajen birikimi yansıttığı ve kronik hepatitte son kollabe olan ve önceden var olan fibrozis ayırımına yardımcı olduğu boyama van Gieson (kollajen kırmızı boyanır); Mallory-Denk cisimlerini (mavi veya kırmızı) ve megamitokondriyi (kırmızı) boyayan kromotrop anilin mavisi (kollajenler koyu mavi boyanır); fast-green olan veya olmayan Pikro sirius kırmızısı (kollajen kırmızı renk alırken, fast-green kollajen olmayan proteinleri boyar), bu morfolometrik görüntü analizleri için en doğru boyamadır. Pikro sirius kırmızısı boyası ile kollajen kırmızı boyanırken aynı zamanda parankim sarı boyanır, aynı zamanda pikro sirius kırmızısı boyası hematoksilin-eozin boyamasında kolayca görülmeyen perisellüler ve

sinüzoidal fibrozisi de ortaya çıkarır (Lackner ve Tiniakos, 2019). Dokulardaki kollajenin miktar tayini için yaygın olarak kullanılan güçlü bir anyonik boyadır (Lei ve ark, 2019). Sirius red boyanması, TAA'nın, sıçanlarda belirgin karaciğer fibrozisi oluşturduğunu göstermiştir.

2.10. Serum ALT AST

TAA'in uzun dönem intraperitoneal enjeksiyonu sonrası gözlemlenen hepatosit hasarı serum ALT ve AST değerlerinin keskin bir şekilde yükselmesine ve bu kronik süreçte oksidatif stres kaynaklı patolojik başlangıca neden oldu.

Serum ALT ve AST karaciğer fonksiyonunun güvenilir belirteçleridir, hepatosit hasarı hücre geçirgenliğini değiştirerek karaciğer işlev bozukluğu ve karaciğer nekrozis ve inflamasyonun karakteristiğini gösteren AST ALT proteinlerinin seruma sızmasına neden olur (Sun ve ark, 2018).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

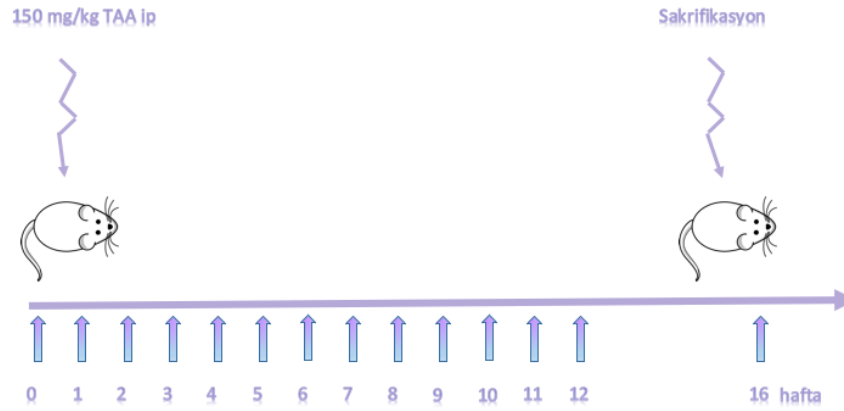
3.1. Deney Düzenegi

3.1.1. Hayvanların bakımı

Yeditepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu (YÜDHEK) 01.06.2018 toplantı tarihli 668 karar no ile etik onay alınan bu çalışmada 49 adet, 180-200 gram ağırlığında erkek Sprague dawley sıçan kullanıldı.

Yeditepe Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarında 12 saat ad libitum standart rat yemi ile beslenildi ve içme suyu olarak musluk suyu kullanıldı. Haftalık olarak ağırlıkları KERN marka terazide kaydedildi.

Deney öncesi, sıçanların işaretlemeleri yapılarak altı grup oluşturuldu: Kontrol (n:8), sham (n:8), TAA (150 mg/kg ip 12 hafta, haftada üç kez TAA), TAA+SDKMKH (12 hafta, haftada üç kez TAA, 12. Haftada 3×10^6 SDKMKH infüzyonu), TAA+SDKMKH (BA) (12 hafta, haftada üç kez TAA, 12. Haftada 3×10^6 SDKMKH (BA) infüzyonu), TAA+SDKMKH (NaB) (12 hafta, haftada üç kez TAA, 12. Haftada 3×10^6 SDKMKH (NaB) infüzyonu) (Tablo 2) (Şekil 10).



Şekil 10. Deney düzenegi.

Tablo 2. Grupların düzenlenişi.

Grup No	Grup Adı	Uygulama 12 hafta	12. hafta	16. hafta
1	Kontrol (n=8)	Hiçbir uygulama yok		Sakrifikasyon
2	Sham (Sh) (n=8)	Haftada üç kez (Pazartesi, Çarşamba, Cuma) ip, 1 ml dPBS	(500 µl dPBS) kuyruk veninden.	Sakrifikasyon
3	Tiyoasetamid (TAA) (n=8)	Haftada üç kez (Pazartesi, Çarşamba, Cuma) ip 150 mg/kg TAA.		Sakrifikasyon
4	TAA+SDKMKH (n=8)	Haftada üç kez (Pazartesi, Çarşamba, Cuma) ip 150 mg/kg TAA.	3x10 ⁶ SDKMKH (500 µl dPBS içinde) kuyruk veni infüzyonu	Sakrifikasyon
5	TAA+SDKMKH+BA (n=8)	Haftada üç kez (Pazartesi, Çarşamba, Cuma) ip 150 mg/kg TAA.	BA ile muamele edilmiş 3x10 ⁶ SDKMKH (500 µl dPBS içinde) kuyruk veni infüzyonu	Sakrifikasyon
6	TAA+SDKMKH+NaB (n=8)	Haftada üç kez (Pazartesi, Çarşamba, Cuma) ip 150 mg/kg TAA.	NaB ile muamele edilmiş 3x10 ⁶ SDKMKH (500 µl dPBS içinde) kuyruk veni infüzyonu	Sakrifikasyon



Resim 5. Deney hayvanları araştırma laboratuvarında hayvan izlem aşamaları.

3.1.2. Tiyoasetamid (TAA) Uygulama

Çalışmamızda 150 mg/kg TAA (thioacetamide, 163678-25G) (Wallace ve ark, 2015) TAA+SDKMKH, TAA+SDKMKH (BA), TAA+SDKMKH (NaB) grubundaki ratlara haftada üç gün (pazartesi, çarşamba, cuma) olmak üzere on iki hafta intraperitoneal olarak uygulandı. TAA karanlık ortamda, hassas terazide (SHIMADZU, AUW220D) 150 mg/kg olarak tartılıp, alüminyum folyo ile sarılı olarak çeker ocak içinde steril dPBS ile çözdürüldü, 0.20 µl süzgeç' den (Minisart 16534, sartorius stedim biotech) geçirildi, insülin enjektörü ile 1 ml içinde olacak şekilde hazırlanma aşamasının bir saat sonrasında, intraperitoneal olarak verildi. Sham grubundaki sıçanlara ise steril dPBS 1 ml olacak şekilde intraperitoneal olarak uygulandı.



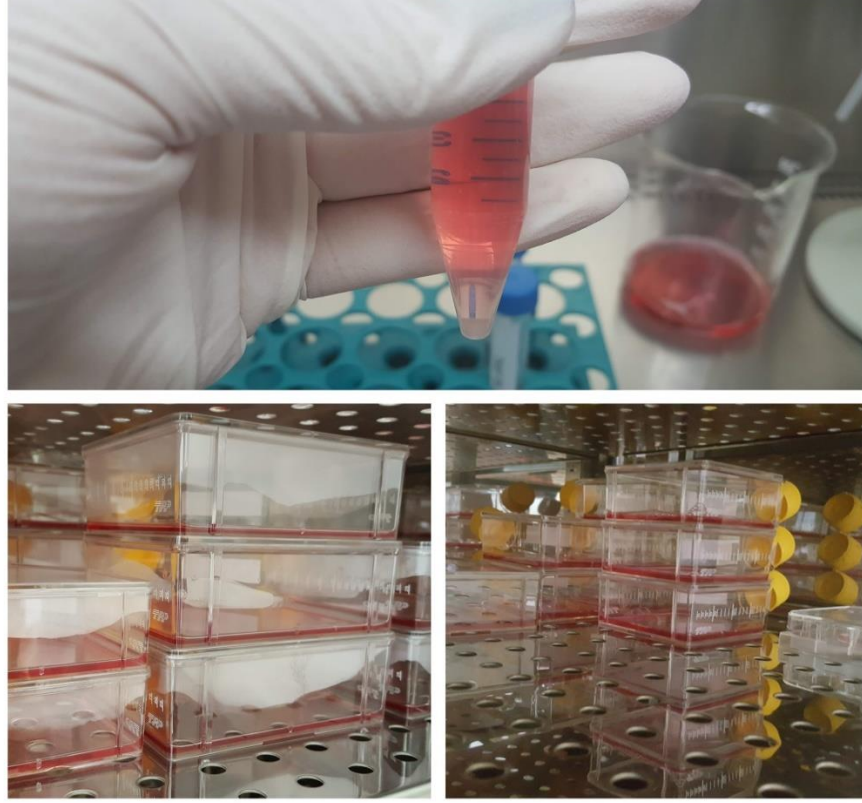
Resim 6. TAA uygulanmasında dikkat edilen hususlar

3.2. Materyal Metod

3.2.1. İnsan Sünnet Derisinden Kök Hücre İzolasyonu

Sünnet deri dokusu %2 Fetal Bovine Serum (gibco, FBS, 10270), içeren PBS de yıkama işlemine alındı. Dokudan kanın uzaklaştırılması ve doku bütünlüğünün bozularak hücrelerin açığa çıkması için deri üzerine bistüri ile vurularak parçalandı. Dokunun büyüklüğüne göre 2 adet 100'lük petri kabı kullanıldı. Doku parçacıkları yıkama işleminden sonra petri kaplara alınarak üzerine 5 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) low glukoz, %10 FBS %1 penisilin stretomisin Amfoterisin (PSA) eklendi. Deri dokusuna bistüri ile vurularak çok küçük parçalara ayrıştırma işlemi tekrarlandı. Üzerine 10 ml DMEM low glucose, %10 FBS %1 PSA içeren besiyeri eklendi. İnkübatörde 37 °C, %5 CO₂'de 5

gün (pazartesi-cuma) inkübe edildi. 5. Gün de besiyeri pipet ile çekilip 1300 rpm de 5 dakika santrifüj edildi, hücre pelleti taze hazırlanmış 10 ml besiyerinde resüspanse edilip petri kap içindeki deri parçacıkları üzerine tekrar aktarıldı. Bu şekilde iki gün daha inkübe edildi ve sonrasında besiyeri çekilip değiştirildi ve %80 konfluense ulaştığında T75 flaklara aktarılarak kültüre alındı.



Resim 7. İnsan sünet derisinden kök hücre izolasyonu

3.2.2. Hücre Çözme

Artı bir derecede muhafaza edilen Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (gibco, catalog number 31885023) (1X, 1g/L D-Glucose, L-Glutamine, pyruvate), su banyosunda (stuart, SBS40) (37°C) bekletildi. Microbiological Safety Cabinet II (ESCO Class II Biohazard Safety Cabinet Type A2) çalıştırıldı. Yaklaşık 10 dakika sonra DMEM su banyosundan çıkarılıp %70 alkol ile silinip kabin içine alındı.

Önceden alikotlanan %10 Fetal Bovine Serum (gibco, FBS, 10270), %1 Penicillin, Streptomisin, Amphotericin (PSA, gibco REF15070-063, (100 mL)) ile besiyeri (complete medium) hazırlandı. 15 ml'lik falkon içine 9 ml hazırlana besierinden konuldu. Bu aşamadan sonra likit nitrojen içinden -80 °C' ye alınan kriyovial içindeki hücreler 1 dakika

kadar 37 °C' lik su banyosunda bekletilip hızla kabin içine alındı, buz kütesinin eridiği gözlemlendikten sonra çözölen h.ler bekletmeksizin içinde 9 ml besiyeri bulunan falkona konulup, 1300 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi, pellet oluşumu gözlendi, süpernatant dökölüp hücreler 1 ml besiyeri ile resüspanse edildi, T25'lik flaska 4 ml medium eklendi ve üzerine resüspanse edilen 1 ml içindeki hücreler eklendi, flask inkübatöre (NUAIRE) yerleştirildi.

Hücreler ertesi gün Nikon ECLIPSE TS100 marka ve model invert mikroskopta gözlemlendi. Gözlem sonucu sünet derisi kökenli mezenkimal hücrelerin (SDKMH) flask yüzeyine tutunmaya başladıkları gözlemlendi (ZEISS, AX10).

3.2.3. Pasaj

T25 flask

T75 flask

15 ml falkon

%0.25 Trypsin/EDTA (1X) (gibco)

DPBS (gibco 1X, CaCl₂-MgCl₂ (-), 500 mL(REF 14190-094))

Serolojik pipetler; 5 ml, 10 ml...

T25 flaskta bulunan hücrelerin yaklaşık %80 konfluens olduğu gözlemlendi. Kabin hazırlıkları yapıldıktan sonra hücreler inkübatörden kabin içine alındı. Flask içindeki besiyeri atıldı, 2 ml DPBS eklenip flask yüzeyi temizlendi, sonrasında 1.5 ml %0.25 Trypsin/EDTA eklendi, inkübatöre kaldırılan flask 4 dakika sonrasında alındı. İvert mikroskop altında hücrelerin yüzeyden kalkıp kalkmadıkları takip edildi, asılı haldeki hücreler üzerine 1.5 ml besiyeri eklendi. Pipet ile 15 ml falkon içine aktarıldıktan sonra 1300 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası pellet 1 ml besiyeri ile resüspanse edildi ve 1 ml içinden 10 mikrolitre alınıp hemositometri (heamocytometer) ile sayım yapıldı. 350.000 hücre sayıldı ve bu 1 ml, içinde 13 ml besiyeri bulunan T75' lik flaska ekildi. İnkübatöre kaldırıldı.

3.2.4. Hücre Dondurma

T75 ve T150'lik flasklardaki hücreler invert (ters) mikroskop altında gözlemlendi, %70-80 konfluense ulaştıkları gözlemlendi. Kabin içi hazırlıkları yapıldı. Trypsin ile kaldırılan hücreler 1300 rpm de santrifüj edildikten sonra DMEM Low ile resüspanse edilip hemositometri ile sayıldı. Sayım sonucu bir kriyovialde 1×10^6 hücre olacak şekilde resüspanse edilip 1 ml media + hücre kriyoviale alınıp üzerine 100 mikrolitre DMSO ilave edilip etiketlendikten sonra Mr. Frosty içinde $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye kaldırıldı, 4h sonra frosty den alınıp menteşe kapaklı kriyovial kutular içinde $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ likit nitrojene bırakıldı.



Resim 8. İnsan sünnnet derisinden kök hücre dondurma işlemi

3.2.5. Çizik-Kazıma Deneyi (Scratch Assay)

Scratch Assay deneyinde NC (negatif kontrol) için P5 deki SDKMKH' ler kullanıldı, T75 flaskda tutunan SDKMKH' ler, inkübatörden (MEMMERT 11500386) alınıp mikroskop altında %80-90 konfluense ulaştıkları gözlemlendi. Kabin içi hazırlıkları yapıldıktan sonra trypsin EDTA ile yaklaşık dört dakika muamele edildikten sonra hücreler toplanıp santrifüj edildi, Thoma lamı ile sayım yapıldıktan sonra 6 kuyucuklu plate de

250x10³-500x10³-750x10³ olacak şekilde işaretleme yapıldı. 2 ml içinde 1620x10³ hücre sayımı yapıldı, 250x10³ için 0.30 ml, 500x10³ için 0.60, 750x10³ için 0.90 ml 2 ml içinde 1620x10³ içinden çekilip üzerine 1700, 1400, 1100 ml DMEM low %10 FBS, %1 PSA içeren besiyeri eklendi. Çok hafifçe karıştırılıp mikroskop altında gözlemlendikten sonra %5 CO₂, 37 °C' de 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonrasında 250x10³ hücre ekimi yapılan kuyucukta %70-80 konfluens gözlemlendi, biyogüvenlik II kabin içinde scratch için bu kuyucuktaki besiyeri çekilip kuyucuğun duvarından pipet ile dPBS yavaşça eklenip 10 µl'lik mikropipet tipi ile kuyucuk tam ortadan çizildi, tekrar dPBS ile yavaşça yıkama yapıp 3 ml besiyeri eklendi. 3 ml besiyeri içinde kuyucuğa tutunmuş hücreler LCI (Canlı Hücre Görüntüleme Sistemi, 11001402, Olympus STC) cihazına yerleştirildi. 72 saat gözlem altında tutulup çizginin kapanma süreci gözlemlendi.

250x10³ hücre ekimi gerçekleştirildi, inkübatöre bırakıldı, ertesi gün 24 saatlik MTS sonucu elde edilen değer 10 µg BA/NAB uygulaması için hesaplamalar yapıldı. 5000 hücre için 10 µg bor bileşikleri kullanılmıştı, 250x10³ hücre için 500 µg bor bileşiği hesaplandı, deney 6 kuyucuklu platede 2 tekrarlı yapıldığı için 1 mg BA ve NAB ayrı ayrı tartılıp 4 ml besiyeri içinde vortekslendi. 0.20 µm'lik filterdan geçirilip kullanıldı. Fazla hazırlanıp süzme işlemi esnasında yaşanacak kayıp önlemi alındı.



Resim 9. Scratch deneyinin aşamalarının gösterimi

BA ve NAB hesaplanan miktarda 50 ml falkonda hassas terazide tartılıp üzerine besiyeri eklenip vortekste çözdürüldü. Biyogüvenlik kabin II içinde 0.20 µl filterdan geçirildi. 6 well platede 24 saat öncesinden ekimi yapılan 250×10^3 FSMSC üzerindeki besiyeri çekildi, DPBS ile yıkama esnasında 10 µl'lik pipet ucuyla boydan boya çizildi, bu işlem sonrasında DPBS wellden çekilip üzerine hazırlanan besiyeri eklendi. Sonrasında LCI cihazı 72 saat için ayarlanıp izleme bırakıldı, her üç dakikada bir fotoğraf alındı.

3.2.6. Akış Sitometri (Flow Cytometry)

ab82434 CD14

ab27332 CD31

ab18227 CD34

sc70686 CD45

ab157335 CD73

ab95700 CD90

ab53321 CD105

NC

T75 flask'da tutunan SDKMKH'leri, biyogüvenlik II kabin içinde trypsin EDTA ile kaldırılıp pellet haline getirildi. Sayım işleminden sonra 1.5×10^5 hücre ile çalışıldı. Öncesinde $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ' de alikotlanmış %2 lik Paraformaldehit (PFA) su banyosuna bırakıldı. 15 ml'lik falkon içindeki pellet 1 ml %2'lik PFA ile resüspanse edilip 1.5 ml'lik eppendorf tüpüne alındı. $+4\text{ }^\circ\text{C}$ ' de 30 dakika fikse edildi. Sonrasında 1300 rpm'de 5 dakika santrifüje bırakıldı. Süpernatant atılıp pellet 1ml dpbs ile çözdürülüp 15'lik falkona alınıp üzerine toplamda 8 ml olacak şekilde DPBS eklendi. 8 ayrı 1.5 ml'lik eppendorflara (ab82434 CD14, ab27332 CD31, ab18227 CD34, sc70686 CD45, ab157335 CD73, ab95700 CD90, ab53321 CD105, NC etiketli) 1 ml olacak şekilde pipetlendi. Tekrar 1300 rpm de 5 dakika santrifüj edildi ve sonrasında eppendorf içindeki süpernatant atılıp pellet üzerine 100 µl DPBS (gibco 1X, $\text{CaCl}_2\text{-MgCl}_2$ (-), 500 mL (REF 14190-094)) eklenip resüspanse edildi, sonrasında 7 eppendorf tüpüne her bir CD antibody den farklı farklı olacak şekilde 10 µl eklendi, pipetaj yapıldı ve 8. negatif kontrol (NC) eppendorf tüpüne 100 µl DPBS eklenip $+4\text{ }^\circ\text{C}$ ' de 1 h bekletildi. $+4\text{ }^\circ\text{C}$ ' den alınan eppendorf tüplere 1 ml dpBS pipetlenip 1300 rpm 5 dak santrifüj edildi. Süpernatant atılıp pellet 500 µl dpBS ile resüspanse edildi. (PFA ile fiksasyon yapıldığı için 30 gün dahi $+4\text{ }^\circ\text{C}$ ' de bekletebilir). Flowcytometry cihazında (BDFACS Calibur) okutma yapıldı.

3.2.7. MTS

MTS (MTS Reagent Powder, CellTiter 96 AQueous, PROMEGA, Lot 0000212858) 50 ml falkona, karanlık ortamda, hassas terazide (SHIMADZU AUW220D Uni Bloc) 42 mg tartıldı, üzerine 21 ml PBS eklendi, çözdürüldü. 2,016 mg Phenazine methosulfate (PMS CAS 299-11-6 SANTA CRUZ) 15 ml falkona, karanlık ortamda, hassas terazide tartılıp üzerine 2ml PBS eklenerek çözdürüldü, 50 ml falkon içindeki MTS içine aktarılıp karıştırıldı ve 0,22 µl filterdan geçirildi. Alüminyum folyo ile sarılı 1,5 ml eppendorf tüplere 1 ml karışım konularak $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ' de kullanılmak üzere muhafaza edildi.

BA için 9*4 (tekrar)=36 well (96 well plate), NAB için 9*4 (tekrar)=36 well (96 well plate) olacak şekilde hesaplandı.

$36+36+32=104 \times 3=312$ WELL= 350 WELL olarak hesaplama yapıldı.

2 adet T75 P5 olan hücreler kaldırılıp Life Technologies Countess II Automated Cell Counter ile sayım yapıldı. 5 µl Trypan blue, 5 µl hücre süspansiyonu eppendorf tüp içinde pipetaj yapıp Countess slide kuyucuklarına 10 µl karışım konularak cihazda sayım işlemi yapıldı. 1 well 100 µl ve 5000 hücre= $350 \times 5000=1750000$ hücre=35 ml içinde resüspanse edildi. Her bir kuyucuğa çoklu pipetle 100 µl dağıtıldı.

İlk gün 24, 48 ve 72 saat olmak üzere her madde için üç adet 96 well platede hücre ekimi yapıldı. Ertesi gün (24 saat sonrası) kuyucuklarda hücreler gözlemlendi, sonrasında 100 µl media (complete DMEM Low) çekildi.

NAB ve BA 1,5 mg tartılıp üzerine 1,5 ml media eklendi ve vortekste çözdürüldü (VORTEX-GENIE, K-550-GE), ardından 0,22 µl filterdan geçirildi. Hesaplanan oranlarda her bir kuyucuk için ayrı eppendorflara hazırlanıp işaretlendi ve içinden medyası çektilen kuyucuklara bu eppendorlardan 100 µl pipetle alınıp eklendi. 24 h sonrası ilaçlı media çekildi. Çekme işleminden hemen önce PBS/Glucose çözeltisi hazırlandı, 4,5 g glucose /L DPBS olacak şekilde hazırlanıp 0,2 µl filterdan süzüldü. BA ve NAB 24 saat okutması için taze hazırlanıp uygulandı. 120 kuyucuk için 100 µl 12000 µl =12 ml

$12 \times 10/100=1,2$ ml MTS solüsyonu, $12-1,2=10,800$ ml pbs/glucose karanlık ortamda miks edildi. Karışım biyogüvenlik kabin II içinde petri kaba aktarılıp, her bir kuyucuğa çoklu pipet ile 100 µl eklendi, ekleme saati plate üzerine not edildi ve plate alüminyum folyo ile sarılı olarak inkübatöre yerleştirildi. 1 saat sonrasında BIO-TEK ELx800 cihazında okutma yapıldı. 48 ve 72 saat sonrası içinde aynı uygulamalar gerçekleştirildi. Deney üç kez tekrarlandı.

Tablo 3. Ba ve NaB'nin deneysel planlanması

BA-NaB 24h/48h/72h								
NC	5	10	20	30	50	100	200	300 (ug/ml)
x	x	x	x	x	x	x	x	x
x	x	x	x	x	x	x	x	x
x	x	x	x	x	x	x	x	x
x	x	x	x	x	x	x	x	x



Resim 10. BA ve NaB'nin MTS değerlendirilmesi

MTS Sonuçlarının değerlendirilmesinde 24 saatlik MTS sonucu 10 değerlendirmeye alındı. MTS de 96 well platede çalışıldı. Herbir kuyucuğa 5000 hücre ekimi yapıldı. 5000 hücre 100 µl DMEM Low %10 FBS %1 PSA içeren medyada ekildi.

3.2.8. Farklılaştırma deneyleri

Öncesinde hücre ekimi yapıldı ve ertesi gün taze hazırlanan 50 ml 5X farklılaştırma besiyerleri (Demirci ve ark, 2014; Doğan ve ark, 2014) ekleme işlemi yapıldı.

3.2.8.1. Kondrojenik farklılaştırma

T75 flasttaki P6 SDKMKH' leri Biyogüvenlik II kabin (Bio Güvenlik Kabini, 11700301, Heal Force) içinde Trypsin EDTA ile kaldırılıp santrifüj edildi. Pellet, besiyeri ile 50 µl de 200×10^3 hücre olacak şekilde resüspanse edildi. 3 tekrarlı bir deney düzenlendi. 6 kuyucuk plate de 3 kuyucuk kondrojenik farklılaştırma için kullanıldı. İşaretlenen üç kuyucuğun ortasına gelecek şekilde 50 µl içindeki 200×10^3 hücre pipet ile damla şeklinde

bırakıldı. İnkübatöre kaldırıldı. 3 saat sonrasında kuyucuk ortasındaki damla dağıtılmadan 2 ml DMEM low besiyeri kuyucuk duvarından yavaşça eklendi, inkübatöre bırakıldı. Ertesi gün invert mikroskop altında gözlemlendiğinde nokta biçiminde olan hücre topluluğunun etrafa doğru yayılmalarına başlandığı gözlemlendi, kabin içinde, kuyucuklardaki besiyeri çekilip atık kutusuna atıldı. Hazırlanan kondrojenik farklılaştırma besiyeri her bir kuyucuğa 2 ml olacak şekilde eklenip inkübatöre kaldırıldı ve her 2 ile 3 günde bir farklılaştırma besiyeri değişimi yapıldı.

Tablo 4. Kondrojenik farklılaştırma hazırlık aşaması

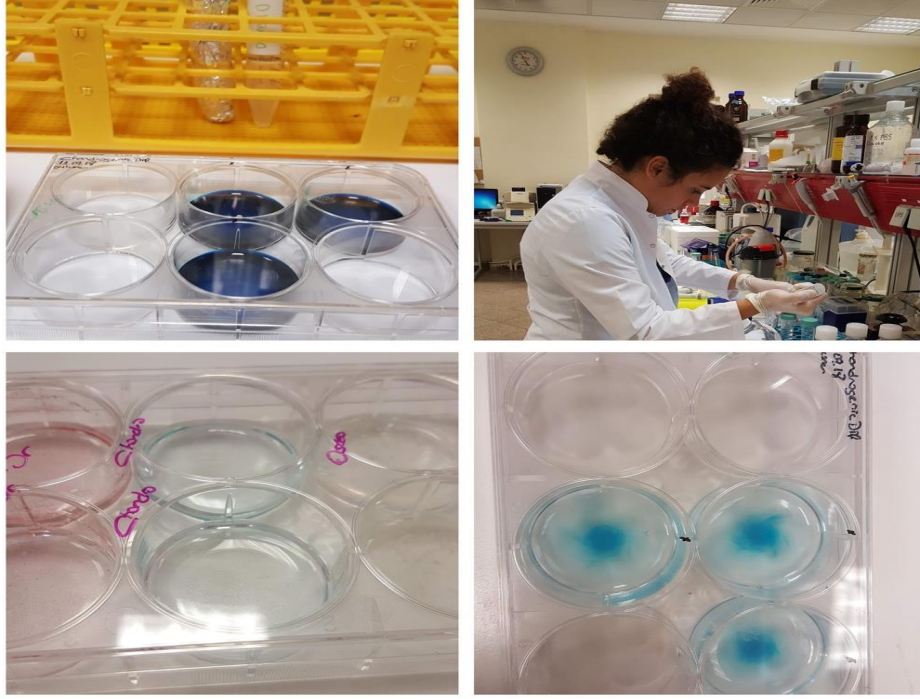
Kondrojenik farklılaştırma		
Madde	Miktar	Hazırlama
ITS (Insulin-transferrin-selenium) (REF 41400-045, LOT 1492253, gibco)	%1	50 ml 5X stok solüsyon için 2.5 ml ITS alınıp stok solüsyona eklendi (hazır solüsyon, bu nedenle direkt içinden alındı).
Bovine serum albümin (A9418-10G, Pcode: 1002591744, SIGMA)	1 mg/mL	50 ml 5X stok solüsyon için 250 mg hassas terazide (SHIMADZU AUW220D Uni Bloc) Bovine serum albümin tartıldı. 50 ml falkon içine 10 ml DMEM low %10 FBS, %1 PSA içeren besiyeri konulup tartılan BSA içine az az dökülerek eklendi ve falkon yavaşça sallanarak çözdürüldü.
TGF-Beta-1	10 ng/mL	50 ml 5X stok solüsyon için 2500 ng=2.5 µg TGF-Beta-1 stok solüsyona eklendi. 50 ml 5X stok solüsyon için 14x50=700x5X=3500 µg hesaplandı.
Askorbik asit (L-Ascorbic acid, Pcode: 1001670429, A4544-100G, SIGMA)	14 µg/mL (hazır stok) 8 µg/µL)	1mikrolitrede 8 mikrogram var ve bu deney için 3500 mikrograma ihtiyaç var= 8 µg µl 3500 µg için stoktan 437.5 µl alınıp direkt olarak stoklanan 50 ml besiyeri içine konuldu.
Dexamethasone (D1756-100MG, BCBV3214, SIGMA) ()	10 ⁻⁷ MOLAR	3.2 mg 3.2 ml absolute alkol içinde çözüldü, 2.5 milimol (mM) solüsyon hazırlandı, 10 µl alınarak stok solüsyona eklendi.
Linoleic acid, Code: 215040050, CAS 60-33-3, Cole Parmer)	5 µg/mL	50 ml 5X stok solüsyon için 1250 µg linoleik asit hassas terazide 50 ml falkon içinde tartıldı. 50 ml içinden 50 ml lik falkona içindeki 1250 µg linoleik asit üzerine 10 ml besiyeri eklenip vorteksle çözdürüldü, 0.20 µm filterdan süzülüp 50 ml falkon içindeki farklılaştırma besiyerine aktarıldı.

Tablo 5. Kondrojenik farklılaştırmada kullanılan kimyasallar ve miktarlarının gösterimi

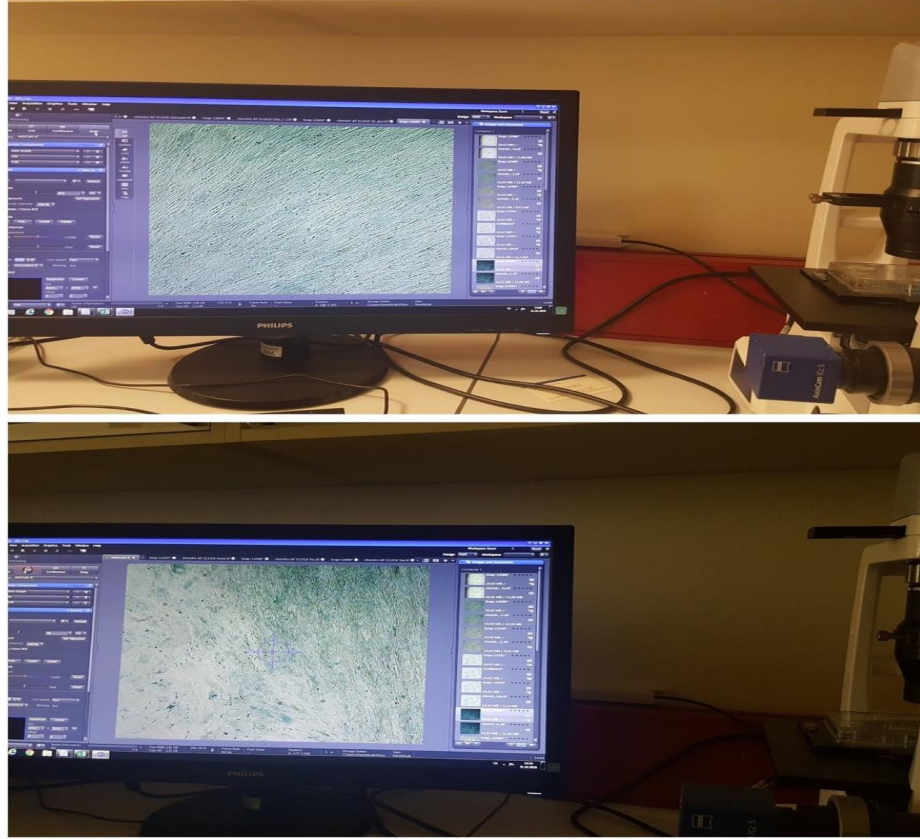
Kondrojenik farklılaştırma kimyasalları ve miktarları	
ITS (Insulin-transferrin-selenium)	%1
İnsan serum albumin	1 mg/ml
TGF-Beta-1	10 ng/ml
Askorbik asit	14 µg/ml
Dezametazon	10 ⁻⁷ molar
Linoleik asit	5 µg/ml

Alcian blue ile boyama için kondrojenik farklılaştırmanın invert mikroskop altında gözlemlenmesinden sonra, inkübatörden kabin içine alınan 6 kuyucuklu platedeki kondrojenik farklılaşmaya uğrayan hücrelerin besiyerleri çekildi. Steril dPBS ile kuyucuk duvarından yavaşça yıkama yapıldı. Yıkama solüsyonu da çekildikten sonra %4' lük paraformaldehit (PFA) 2ml olacak şekilde kuyucuklara eklendi ve hücrelerin fiksasyonu için 45 dakika +4 °C de bekletildi.

Fiksasyon sonrası fiksatif çekildi ve kuyucuktaki hücreler dH₂O ile yıkandı ve her bir kuyucuğa hazır Alcian blue boya solüsyonundan 2 ml konuldu, 30 dakika bekletildi, sonrasında 3 kez dH₂O ile yıkama yapıldı, yıkama solüsyonu durulanana kadar sayı artırılabilir. Bu işlemde sonra kuyucuklara 2 ml dH₂O eklenerek farklılaşma deneyi için fotoğraf çekimi yapıldı.



Resim 11. Farklılaştırma deneyi boyamaları



Resim 12. Farklılaştırma deneyi görüntüleme

3.2.8.2. Adipogenik farklılaştırma

T75 flastaktaki P6 SDKMKH'leri Biyogüvenlik II kabin (Heal Force) içinde Trypsin EDTA ile kaldırılıp santrifüj edildi. Pellet, 2 ml besiyeri (HIGH-DMEM besiyeri) içinde 100×10^3 hücre olacak şekilde resüspanse edildi. 3 farklı kuyucuğa 2 ml içinde 100×10^3 hücre ekimi yapıldı.

İnkübatöre kaldırıldı. Ertesi gün kabin içinde, kuyucuklardaki besiyeri çekilip atık kutusuna atıldı. Hazırlanan adipogenik farklılaştırma besiyeri her bir kuyucuğa 2 ml olacak şekilde eklenip inkübatöre kaldırıldı ve her 2 ile 3 günde bir farklılaştırma besiyeri değişimi yapıldı.

Tablo 6. Adipojenik farklılaştırma deneyi

Adipogenik Farklılaştırma		
Madde	Miktar	Hazırlama
Dexamethasone (D1756-100MG, BCBV3214, SIGMA) (392.46 Molecular weight)	0.5 μ molar	50 ml 5X stok solüsyon için 3.2 mg, 3.2 ml absolute alkol içinde çözüldü, 2.5 milimol (mM) solüsyon hazırlandı, 50 μ l alınarak stok solüsyona eklendi. Stok solüsyon 0.20 μ m filterdan geçirildi.
IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthine, Lot: 2697736, Cat: 410957-1GM, Calbiochem) (molecular weight 222.24)	0.5 mmolar	27.75 mg IBMX, 112.6 ml DMSO da çözüldü, 500mM solüsyon hazırlandı, 50 μ l alınıp 50 ml besiyerine eklendi. 50 ml 5X stok solüsyon için
Indomethacin (Indomethacin, LOT: 10166428, A19910, AlfaAesar) (molecular weight 357.8)	50 μ molar	4472.5 μ g Indomethacin hassas terazide 50ml falkon içinde tartıldı, 10 ml besiyeri eklenip vorteksle çözdürüldü, 0.20 μ m filterdan süzülüp 50ml falkon içindeki farklılaştırma besiyerine aktarıldı.
10516-5ML İnsulin solution from bovine Lot SLBM5132V SIGMA 200 ng/ml insülin taze olarak farklılaştırma besiyerine eklendi. 6 well de 1 welle 100 000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı, yağ dropletleri görüldüğünde oil red o ile boyama yapıldı.	200 ng/ml insülin	1mg insülin /1ml stok solüsyon hazırlandı, 1ml 200ng 10 ml 2000ng=2mikrogram gerekiyor stok 10 ml solüsyon için, 1mikrolitre 1mg/ml stoktan al

Oil Red O (ORO) boyamada, adipogenik farklılaşmış hücreler, oda sıcaklığında 1 ml %4'lük PFA ile 45 dakika fikse edildi. Fiksasyon sonrası iki kez 1-1,5 ml PBS ile yıkama işlemi yapıldı. 50 ml falkon içindeki ddH₂O filterdan geçirilerek hazırlandı. Alüminyum folyo ile sarılı stok solüsyon hazırlığı: 0,5 g ORO (Oil Red O, SIGMA ALDRICH, O0625-25G) hassas terazide tartılıp, 100 ml isopropanol alkol (24137, SIGMA-ALDRICH) içinde çözüldü, 0,45 µm filterdan geçirilip, boyama öncesi 10 dakika bekletildi.

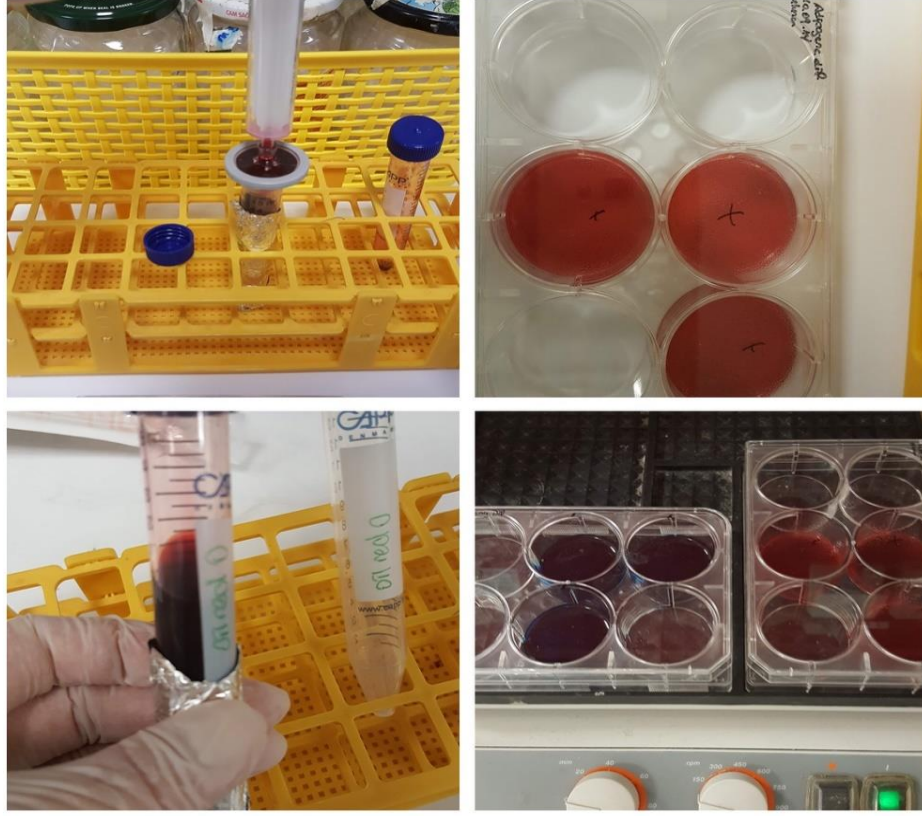
3:2 oranında ORO: ddH₂O ile karıştırılıp tekrar 10 dakika bekletildi.

1 ml oil red o fikse edilen 6 well'in her bir kuyucuğundaki hücrelerin üzerine pipetlendi. Oda sıcaklığında, hafif olarak boyanın tüm yüzeye ulaşması için çalkalama cihazı üzerinde (shaker) (heidolph TITRAMAX 100) tutuldu, 15 dakikada bir invert mikroskop altında gözlemlendi.

Boyama gerçekleştiğinde ddH₂O ile yıkama yapıldı, üzerini kaplayacak şekilde ddH₂O eklenip invert mikroskopta gözlemlendi. Hücre stoplazmasında yağ damlaları gözlemlendi.

Tablo 7. Adipojenik farklılaştırmada kullanılan kimyasallar ve miktarları

Adipojenik farklılaştırma kimyasalları ve miktarları	
Dekzametazon	0.5 µmolar
IBMX	0.5 mmolar
Indometazin	50 µmolar
insülin (10516-5ML	200 ng/ml
İnsulin solution from bovine Lot SLBM5132V SIGMA)	



Resim 13. Adipojenik farklılaştırmada Oil Red O boyama gösterimi

3.2.8.3. Osteojenik farklılaştırma

T75 flasttaki P6 SDKMKH'leri Biyogüvenlik II kabin (Heal Force) içinde Trypsin EDTA ile kaldırılıp santrifüj edildi. Pellet besiyeri 2 ml içinde 50×10^3 hücre olacak şekilde resüspanse edildi. 3 farklı kuyucuğa 2 ml içinde 50×10^3 hücre ekimi yapıldı.

İnkübatöre kaldırıldı. Ertesi gün kabin içinde, kuyucuklardaki besiyeri çekilip atık kutusuna atıldı. Hazırlanan osteojenik farklılaştırma besiyeri her bir kuyucuğa 2 ml olacak şekilde eklenip inkübatöre kaldırıldı ve her 2 ile 3 günde bir farklılaştırma besiyeri değişimi yapıldı.

Tablo 8. Osteojenik farklılaştırma

Osteojenik Farklılaştırma		
Madde	Miktar	Hazırlama
Dexamethasone (D1756-100MG, BCBV3214, SIGMA, molecular weight 392.46)	0.1 µmolar	50 ml 5X stok solüsyon için: 3,2 mg 3,2 ml absolute alkol içinde çözüldü, 2,5 milimol (mM) solüsyon hazırlandı, 10 µl alınarak stok solüsyona eklendi.
B-Glycerophosphate (β-Glycerophosphate disodium salt hydrate, sc-220452A, ChemCruz) 216,04 Molecular weight)	10 mmolar	50 ml 5X stok solüsyon için: 108,2x5X=541 mg (10 ml) gliserofosfat hassas terazide 50 ml falkon içinde tartıldı. 50 ml besiyeri stoğu içinden 50 ml' lik falkona 10 ml besiyeri eklenip vorteksle çözdürüldü, 0,20 µm filterdan süzülüp 50 ml içindeki farklılaştırma besiyerine aktarıldı.
Askorbik asit (L-Ascorbic acid, Pcode: 1001670429, A4544-100G, SIGMA)	50 µmolar	50 ml 5X stok solüsyon için: 2201,5 µg hesaplandı. 1mikrolitrede 8 mikrogram var ve bu deney için 2201,5 mikrograma ihtiyaç var= 8 µg/µL 2201.5 µg için stoktan 275,2 µL alınıp direkt olarak stoklanan 50 ml besiyeri içine konuldu.

Tablo 9. Osteojenik farklılaştırmada kullanılan kimyasallar ve miktarlarının gösterimi

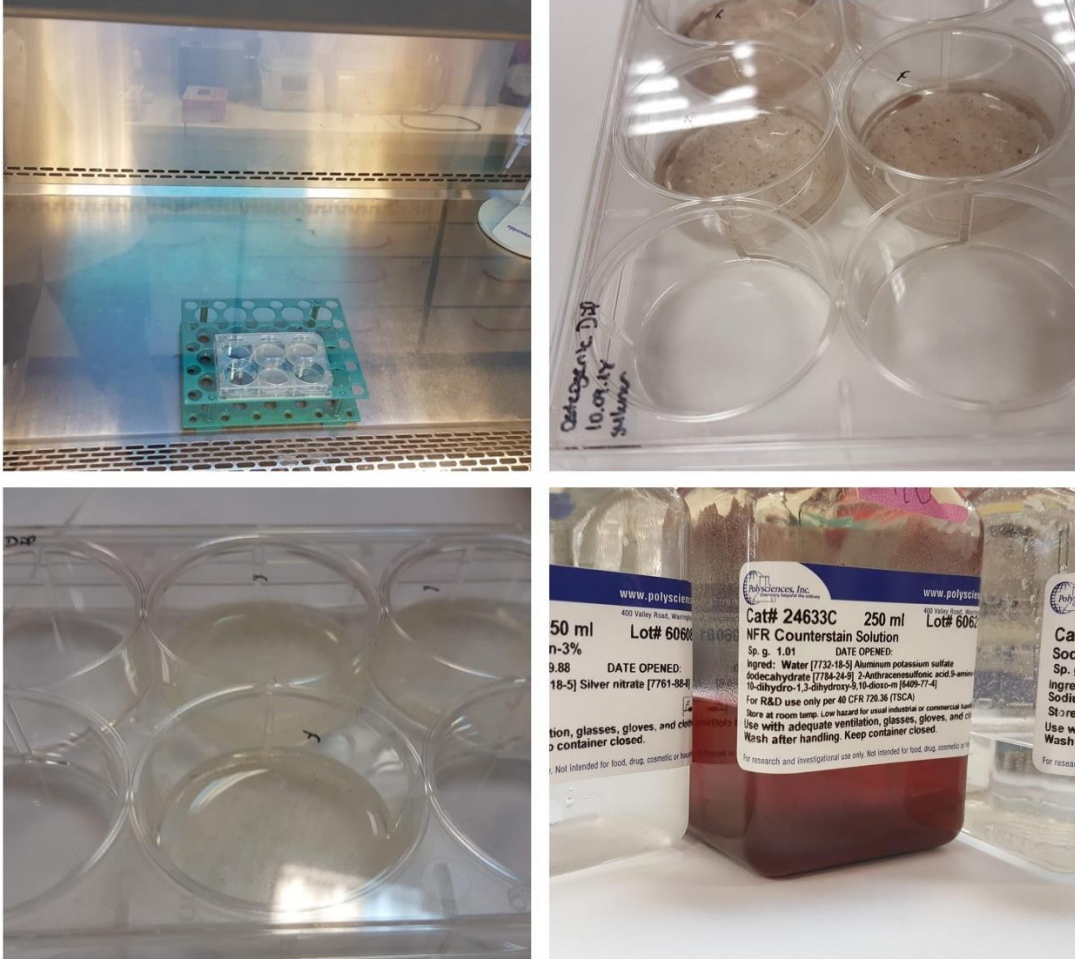
Osteojenik farklılaştırma kimyasalları ve miktarları	
Dekzametazon	0,1 µmolar
Betagliserofosfat	10 mmolar
Askorbik asit	50 µmolar

Von kossa Boyama; Von Kossa Method for Calcium Kit (24633), Polysciences Inc, Cat# 24633A Silver Nitrate Solution, Cat#24633B Sodium Thiosulphate Solution, Cat#24633C NFR Counterstain Solution.

Farklılaşması beklenen 6 kuyucuklu platedeki hücreler 45 dakika %4'lük PFA ile fikse edildi. Fiksasyon işlemi sonrası hücre ekili kuyucuklar iki kez dPBS ile yıkandı. Kit içinde bulunan %3'lük Gümüş Nitrat solüsyonundan 1,5 ml bu kuyucuklara pipetlendi. UV ışığı altında 60 dakika süre içinde gümüş nitrat çözeltisini emen kalsiyum minerallerinin koyulaştığı gözlemlendi.

Üç kez ddH₂O ile yıkama yapıldı.

%5'lik sodyum tiyosülfat solüsyonundan 1,5 ml kuyucuklara pipetlendi ve 2 dakika sonrasında üç kez ddH₂O ile yıkama yapıldı. 1,5 ml Nuclear Fast Red eklendi ve 5 dakika bekletildi, sonrasında yıkama yapıldı ve son olarak da kuyucuklara 1,5 ml ddH₂O pipetlenip invert mikroskop altında gözlemlendi.



Resim 14. Von Kossa boyama

3.3. Protein Eldesi, BCA Protein Deneyi ve Western Blotting

3.3.1. Protein Eldesi

Disseksiyon sırasında önce likit nitrojen içine alınan sonrasında 2 ml'lik eppendorf tüpler içinde -80°C de dolaba kaldırılan karaciğer dokuları kuru buz üzerinde tartım cihazı yanına alındı. Kuru buz üzerinde bistüri ile trimlenen dokular hassas terazide 0,1 gram

olacak şekilde ayrı ayrı tartıldı. Farklı doku trimleneceği esnada alkol ile tartım kabı ve bistüri ve pens silinerek işleme devam edildi.

0,1 gram dokular 2 ml'lik eppendorf tüpler içinde kuru buzun üzerinde bırakılmaya devam edildi. Bu işlemden sonra Chem Cruz RIPA Lysis Buffer System VIAL 1: RIPA Lysis Buffer (1 ml ise), VIAL 2:200 Mm PMSF in DMSO (10 µl), VIAL 3: Protease inhibitör coctail in DMSO (10 µl), VIAL 4: 100 Mm Sodium Orthovanadate in water (10 µl) hazırlandı.

0,1 gram doku için 0,5 ml RIPA Lysis Buffer ekleneceği için ve toplam 6 grup olduğu için:

TAA+SDKMKH

TAA+SDKMKH (BA)

TAA+SDKMKH (NAB)

Sh

Kontrol

TAA

0,4*6=2,4 ml hazırlandı (stok).

1 ml için 10 (10µl), 2,4 ml VIAL 1, için 24 µl VIAL 2, VIAL3 ve VIAL 4'den eklenerek hazırlandı. Buz üzerinde, 2 ml eppendorf tüp içindeki 0,1 g doku üzerine 0,4 ml LYSIS BUFFER dan eklenip, SIGMA-ALDRICH Z359971-1EA, pellet pestle, disposable homojenizatör ile buz içinde yaklaşık 10 dakika homojenize edildi, tüm dokular bu işlem sonrasında buz içinde 15 dakika bekletildi.

Buz ile birlikte MIKRO 22 R Hettich santrifüj cihazında 19000 g de 10 dakika +4 °C santrifüj edildi. Santrifüj sonrası buz içine alınan eppendorflardan supernatant 200'lük mikropipet ile alınarak yeni işaretlenen eppendorflara aktarıldı, pellet atıldı. Böylelikle proteinler hazırlandı, -80 °C ye kaldırıldı.

3.3.2. BCA Protein Deneyi

Pierce BCA Protein Assay Kit (Prod#23227, Lot#RD232687) For Protein Assays Using Bicinchoninic Acid Thermo Scientific

Kit içeriği:

Pierce BCA Assay Reagent A, 1 x 500 ml

(REF23228)

Pierce BCA Assay Reagent B, 1 x 25 ml

(Prod#1859078)

Albumin Standard, 10 x 1 ml

(REF23209)

Bu aşamada 96 well plate ile çalışıldı, 1. ddH₂O (10 ul), 2. 125, 3. 250, 4. 500, 6. 750, 7. 1000, 8. 1500, 9. 2000

Tablo 10. BCA deneyi ile protein miktarının belirlenmesi

1	Standart (Std)	Std	protein örnek	protein örnek
2	ddH ₂ O (10µl)	ddH ₂ O	TAA+SDKMKH1	TAA+SDKMKH2
3	125	125	TAA+SDKMKH(BA)1	TAA+SDKMKH(BA)2
4	250	250	TAA+SDKMKH(NaB)1	TAA+SDKMKH(NaB)2
5	500	500	Sh1	Sh2
6	750	750	Kontrol	Kontrol
7	1000	1000	TAA	TAA

Öncelikle standartlar hazırlanıp kuyucuklara (10 µl) ekimi yapıldı, sonrasında buz üzerinde -80 dondurucudan getirilen örneklerin her birinden 5 µl alındı. 1,5 ml'lik eppendorf tüpler işaretlendi, buz üzerine konuldu, öncelikle her birine 20 µl ddH₂O konuldu, sonrasında üzerine 5 µl protein örneği eklenip iyice pipetaj yapıldı, örnekler buz üzerinde çalışıldı. Bir eppendorf tüpte bir örneğe ait 5 µl örnek+20 µl ddH₂O eklenip hazır halde buz üzerinde tutuldu, sonrasında her iki örnek sırasına, örneğin TAA+SDKMKH 1' 10 µl TAA+SDKMKH 2'ye 10 µl olacak şekilde pipetle kuyucuğa eklendi.

Tüm örnekler de eklendikten sonra tüm kuyucuklara multipipet ile (bu aşama da hızlı olmak çok önemli, örneklerin bekletilmemesi için hızlı olunmalı), 200 µl BCA Sol A (50)+Sol B(1) (50:1) karışımından eklendi.

28 kuyucuk var, 30 kuyucukdan hesaplama yapıldı, $30 \times 200 \mu\text{l} = 6000 \mu\text{l} = 6 \text{ ml}$. $6000:51(50+1)=117,6=118 \mu\text{l}$ olarak çevrildi

118 µl sol B + 5900 µl de Sol A dan eklenip pipetaj yapıldıktan sonra tüm kuyucuklara 200 µl dağıtıldı ve 96 well plate alüminyum folyo ile sarılı 30 dakika 37 °C de

inkübatöre yerleştirildi, sonrasında BCA okuma işlemi BIO-TEK plate okuyucu (plate reader) ile yapıldı.

Tablo 11. Deneylenen miktarlarla western blotting deneyi

	PROTEİN	ddH2O	LAEMLI
TAA+SDKMKH	33,527 ul	16,472 ul	50ul
TAA+SDKMKH (BA)	25,214	24,785	50
TAA+SDKMKH (NAB)	34,306	15,693	50
Sh	22,817	27,182	50
Kontrol	28,342	21,657	50
TAA	25,579	24,420	50

3.3.3. Western Blotting

Buz içinde, 1.5'lük eppendorf tüpler içine laemli, sonrasında distile su, sonrasında da (en son) protein örnekleri eklenip, pipetaj yapıldı. WiseTherm HB-R ısıtıcı blok cihazında 95 °C' de eppendorf tüpler 5 dakika bekletilerek proteinlerin denatürasyonları sağlandı. Sonrasında eppendorf tüpler hızlıca buz içine alındı. Buz içindeki eppendorf tüpler içinden hesaplanan miktarlarda protein ile yüklemesi yapıldı.

Yürütme tamponu (running buffer); 1X den 1 litre kullanıldı, öncelikle hazır jelin yerleştirildiği, sonrasında denge için karşısına yerleştirilen kaset sistemin içi yürütme tamponu ile dolduruluyor, akma ya da sızma var mı diye kaldırılıp kontrol ediliyor, akma yok ise tetra sistemin içindeki yerine yerleştirilip, üzerinden akar şekilde yürütme tamponunun tamamı boşaltılıyor ve BIO RAD Mini-PROTEAN Tetra Sistem'in "2 Gels" sınırına kadar dolduruluyor. Bu aşamadan sonra 200'lük pipet tipli pipet ile system içindeki running bufferdan alınıp yerleştirilmiş jel kuyucukları yıkılıyor. Bu işlem de sona erdiğinde proteinler yükleniyor. Protein yükleme aşaması 200'lük pipet tipi 45 derece açı ile kuyucuklara yapıştırılıp yavaşça yapılıyor, protein karışımı kuyucuklara 20 ul konuluyor, 5 ul de marker (Color protein Standard Broad range #P7712S BIOLABS) en baştaki kuyucuğa yerleştiriliyor.

Tablo 12. SMA + COL yüklemesi sıralanışı

Marker	TAA+SDKMKH1	BA1	NAB1	Sh1	K1	TAA1
--------	-------------	-----	------	-----	----	------

Tablo 13. GAPDH yüklemesi sıralanışı

Marker	TAA+SDKMKH1	BA1	NAB1	Sh1	K1	TAA1
--------	-------------	-----	------	-----	----	------

BIO RAD Mini-PROTEAN Tetra Sistem'i kapatılıp 50 V (volt) da 5 dakika yürütülüyor, alt çubuk çizgide baloncuk çıkışını gözlemlendiğinde, sistemin çalıştığı bu şekilde anlaşılıp, jelin yerine oturması tamamlanmıştır. 5 dakika sonrasında 110 V'a yükseltiilip proteinlerin yürümesi sonlanıncaya kadar devam ediyor.

Bu işlem devam ederken:

-PVDF Membrane jel büyüklüğünde kesilip içine methanol konulmuş plastik kap içine yerleştirildi.

-10X transfer tamponu

-absolut alkol

-ddH₂O hazırlandı.

100 ml Transfer tampon+200 ml, absolut alkol+700 ml, ddH₂O hazırlanıp dondurucunun -20 santigrad derecesine soğumaya bırakıldı.

10X TBS tamponu hazırlama: TBS 10X 1L için, 24 g Tris-HCl (formula weight: 157,6 g), Tris (Trizma hydrochloride, Bioultra, 93363-500G Lot#BCBW4882)), 5,6 g Tris base (formula weight: 121,1 g, Tris (hydroxymethyl) aminomethane, Cat.#161-07169, 88g NaCl (formula weight: 58,4 g) (sodium chloride CAS: 7647-14-5 pcode 1002587601, S9888-2,5 kg Lot#slbv8252) hassas terazide tartıldı.

Her biri tartılıp 1000'lik dereceli mezür içine aktarılıp üzerine 900 ml ddH₂O eklendi içine magnetik balık atılıp Heidolph MR Hei-Standart cihazı ile döndürülerek şeffaflanana kadar (10 dakika kadar) çalıştırıldı.

TBS-T Hazırlanışı: TBS 10X' den 1X hazırlandı, TBS 100 ml (TBS 10X) + 900 ml dH₂O, 1000'lik mezür içine boşaltıldı. 1 L TBS içine 1 ml Tween-20 (Tween-20, TWN 508.100, LotNO:8E55069 Cas#9005-64-5) (bal görünümünde), 1000'lik tip ucu 45 derece açı ile kesilip T-20 çekildi, 1 L mezür içindeki TBS üzerine eklendi, pipetaj yapıldı, balık içinde tekrar döndürüldü.

“Blotting-Grade Blocker (Cat#170-6404)” ile Skimmed milk Blocking Hazırlanışı: 2,5 g skimmed milk 50 ml TBS-T içinde vortekslendi, sonrasında Heidolph MR-Hei Standard cihazında magnetik balık ile 2 dakika kadar çözülmesi beklendi (%5 skimmed milk).

Proteinler yürüdüktan sonra işlem sona erdirilip kaset systemden çıkarıldı, jelin olduğu kaset ele alınarak ok işareti olan noktalardan yeşil çıkarma aparatı ile teker teker açıldı. En son yavaşça kaldırıldı, açıldı, jel çok çabuk kuruduğu için distile su üzeri ile yıkandı, yeşil dikdörtgen aparat ile taraklar (protein yüklenen kuyucuklar) kesildi. Diğer uçta laemli, mavi çizginin altından da kesilip düz kalması sağlandı.

Siyah ve beyaz aparatta sandviç hazırlandı, önce transfer buffer ile ıslatılmış siyah sünger sonra filtre beyaz kağıt, sonra jel (yeşil olan tarak ile el ile müdahale edilmeden, yırtılması önlenerek) yerleştirildi, cımbız ile membran tutulup jelin üzerine yerleştirildi, fazlası ince uçlu makas ile kesildi, iyice yerleştirildi, üzerine tekrar filtre kağıdı, üzerine siyah sünger yerleştirilip sandviç model oluşturuldu. Siyah tarafa jel, daha yakın iken membran ise kırmızı (beyaz tarafa daha yakın) tarafa yakın yerleştirildi, sistem içine yerleştirildi, beyaz kırmızı tarafta, siyah siyah tarafta olacak şekilde kasetler sisteme yani tanka yerleştirildi, sonra tanka transfer buffer blotting çizgisine kadar dolduruldu ve tank kapatıldı, soğuk da daha iyi sonuç verdiği için tank buz dolu köpük içine yerleştirildi. Constant amper işaretinde, 240 amper 1 saat olarak ayarlandı, çalışıp çalışmadığı tankın arkasındaki tellerden köpükler çıkıp çıkmamasına göre bakılıp çalıştığı için işleme devam edildi.

1 saat sonra membran çıkarılıp kendi büyüklüğü kadar olan plastik kap içinde 1 saat, yaklaşık 7,5 ml skimmed milk içinde Heidolph TITRAMAX 100 shakerda tutuldu. Sonrasında 50 ml falkonlara yerleştirildi. Membranların bulunduğu falkonlara skimmed milk içinde hazırlanmış primer antikolar konularak +4 santigrad derecede çalkalamalı cihazda (ISOLAB falkon shaker) overnight bırakıldı.

50 ml iki adet falkon, sol üst köşeleri kesilerek işaretlenmiş membran kağıtlar, 50 ml falkon içinde 5 ml skimmed milk eklenerek col 1+ GAPDH (COL1 5 ul, GAPDH 5 ul) bir falkona, diğer falkon SMA+5 ml skimmed milk (1 ul SMA) ile hazırlandı.

Primer antikor hazırlanışı: anti-kollagen I antikor [EPR7785] (ab138492) 1/1000-1/10000 aralığında kullanıldı (tahmini moleküler ağırlığı: 139 kda). 50 ml hazırlanan %5'lik skimmed milk içinden 5 ml alınıp içine 1/1000 oranında 5 µl antikor eklenip pipetaj yapıp hazırlandı. Anti-alpha düz kas aktin antikor [EPR5368] ab124964; 1/10000-

1/50000 oranında hazırlandı, (tahmini moleküler ağırlığı: 42 kda), 50 ml hazırlanan %5'lik skimmed milk içinden 5 ml alınıp içine 1/5000 oranında 1 µl antikor eklenip pipetaj yapıp hazırlandı.

Tüm gece sonrası, +4 °C'de odadan alınan ISOLAB falkon shaker üzerinde bulunan, 50 ml'lik falkon tüpler içinde primer antikorlar ile muamele olan membranlar, oda ısısına getirildi. İçindeki skimmed milk+primer antikor karışımı dökülerek serolojik pipetle 5 ml TBS-T konularak çalkalanıp döküldü, yıkandı. Sonrasında membran bulunan falkonlara 15 ml TBS-T konularak ISOLAB falkon shakerda 15 dakika bekletilerek yıkama işlemi yapıldı. 3x15 dakika yıkama işleminden sonra falkon içindeki TBST dökülerek içine 10 ml TBS-T konuldu ve bu 10 ml TBS-T içine 1/10000 oranında sekonder antikor eklenip pipetlenerek iyice pipetaj yapıldı ve falkonlar alüminyum folyo ile sarılarak ISOLAB falkon shaker üzerinde 1-2 saat aralığında olabilecek şekilde tutuldu. Sonrasında bir kez 5 dakika dPBS (yaklaşık 10 ml) ile muamele edildi. Son olarak da kemüliminesans jel dökümantasyon sisteminde (Yeditepe Üniversitesi) okutma işlemi için götürüldü.

3.4. Kök Hücre İnfüzyonu

3.4.1. SDKMKH İnfüzyonu

Haftada üç gün 150 mg/kg TAA uygulanmasının ardından kuyruk veninden yapılacak mezenkimal kök hücre infüzyonu için pasaj 5 ve pasaj 6'da ki hücreler miks edilerek kullanılmak üzere hazırlandı. SDKMKH+BA, SDKMKH+NAB ve SDKMKH grubundaki her bir sıçan için 3×10^6 milyon hücre hesaplaması yapıldı. 24 saat MTS testi sonuçları kullanılarak hesaplanan BA ve NAB miktarları hassas terazide tartıldı, ayrı ayrı 5 ml falkon içine SDKMKH'leri için kullandığımız besiyeri eklenilip vortekslendi, sonrasında kabin içinde 0.20 µl'lik süzgeçlerden geçirilip SDKMKH+BA, SDKMKH+NAB flasklarına aktarıldı, 24 saat sonunda hücreler kaldırıldı, countess slide cihazında (life Technologies Countess II FL) sayım işlemine göre 500 µl steril DPBS içinde 3×10^6 hücre olacak şekilde işaretlenen 1,5 'luk eppendorf tüplere konuldu.

TAA enjeksiyonundan 48 saat sonra tüm ratlardan 1 ml insülin enjektörü ile vena jugularis eksternadan Vacuette K3EDTA ve Z Serum Sep Clot Activator tüplere kan alındı, serum eldesi için Universal 320 R Hettich Zentrifugen santrifüjünde 3000 rpm de 10 dakika +4 °C de santrifüj edildi, Sonrasında ALT ve AST ölçümü için VetTest 8008 IDEXX

LABORATORIES cihazında IDEXX VetTest ALT (98-20360-US) ve AST kitleri kullanılarak yapıldı. Tam kan sayımı için PROKAN PE-6800 cihazında okutma yapıldı. MAY MSA-4100 hayvan anestezi cihazı ile %2-4 isoflurane inhalasyon anesteziği altında kuyruk veninden 3×10^6 sünnet derisi kökenli mezenkimal kök hücre infüzyonu yapıldı. Bu işlem için p5 ve p6 daki miks edilmiş sünnet derisi kökenli mezenkimal kök hücreler infüzyon saatinden hemen önce trypsin/EDTA ile kaldırılıp steril dPBS ile resüspanse edilip 1,5 ml eppendorf tüplerde 500 μ l DPBS içinde pipetaj yapıp 3 milyon hücre kuyruk veninden kannül (BD Neoflon 24G I.V. Cannula) ile infüze edildi.



Resim 15. İnfüzyon aşaması

3.5. Histolojik Değerlendirme

3.5.1. Doku Takibi

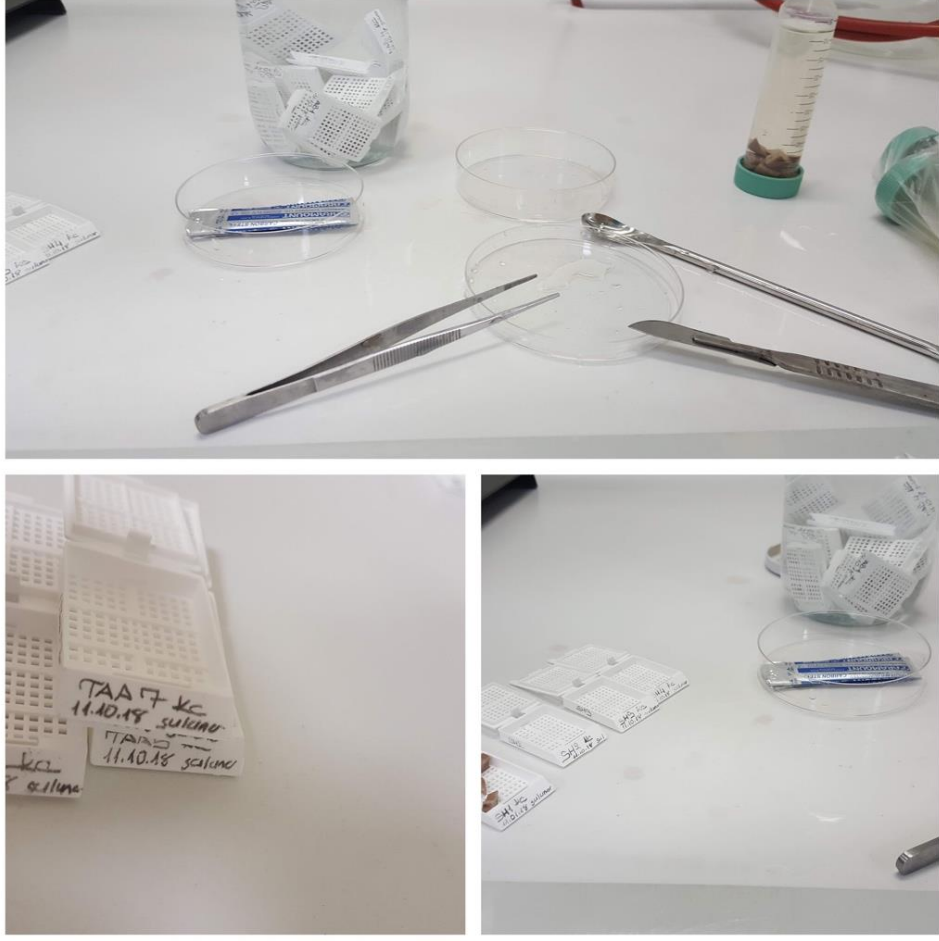
Formol içindeki karaciğer dokuları, çeker ocak içinde işaretlemeleri (grup adı, gruptaki hangi sıçana ait olduğu, tarih, çalışan kişinin adı soyadı) nceden yapılan doku kasetlerine konuldu.

Tablo 14. Leica 1020 doku takip cihazında 10.10.2018 tarihli doku takip işlemi:

#	Süre	ile
1	30 dk.	Musluk suyu
2	30 dk.	Musluk suyu
3	15 dk.	%70 alkol
4	15 dk.	%90 alkol
5	15 dk.	Mutlak alkol
6	15 dk.	Mutlak alkol
7	30 dk.	Mutlak alkol
8	45 dk.	Mutlak alkol
9	40 dk.	Ksilen
10	45 dk.	Ksilen
11	1 saat	Parafin
12	19 saat	Parafin

Öncelikle 1600 ml sıvı alabilen cihaz tankları için alkol serileri hazırlandı. 1600 ml %70 alkol için 1120 ml %100'lük alkolden alınıp 480 ml saf su ilave edildi ve bu karışım tanka boşaltıldı. %90 alkol için 1440 ml %100'lük alkolden alınıp 160 ml saf su ilave edildi ve bu karışım tanka boşaltıldı.

Solüsyon dolu tanklar tabloda belirtilen sırada cihaza yerleştirildi. Doku kasetler içine alınan doku parçaları gerekli işaretlemeler yapıldıktan sonra tank içindeki doku kasedine yerleştirildi. Belirlenen tank süreleri cihazda ayarlanıp program cihaza belirtildikten sonra çalıştırılarak karaciğer dokuları takibe bırakıldı.



Resim 16. Doku trimleme ve takip aşaması için ön hazırlıklar

3.5.2. Bloklama-Parafine Gömme

Doku takip aşamasından sonra kasetler doku takip cihazından alındı. En son aşama olan parafin içinde bekleyen doku kasetleri, Leica EG 1160 bloklama cihazına yerleştirildi. Cihaz kasetleri kullanılarak kesit yüzeyleri dikkate alınıp parafin ile kasetler doldurulup buz üstüne bırakıldı. Yaklaşık bir saat sonra kasetlerden çıkarılan parafin blok +4 °C'de muhafaza edildi.



Resim 17. Gömme ve bloklama aşamaları

3.5.3. Kesit Alımı

Leica EG 1160 doku gömme cihazında blok haline getirilen dokular kesit alınmak üzere hazırlandı.

Leica RM2245 mikrotom cihazında 5 µm lik kesitler doku tüm olarak gelmeye başladıktan sonra 3. kesitten başlayıp her alınan kesitten sonra 20 adım sonrasında seri kesit alındı. 37 derece su banyosuna alınan kesitlerin 20 saniye kadar bekletildikten sonra işaretlenen lamlara (HE, PSR, İH) alındı. Oda sıcaklığında kurutulmaları sağlandı sonrasında boyama için bekletildi.



Resim 18. Kesit alım aşamalarının gösterimi

3.5.4. Boyama

Mikrotom cihazına yerleştirilen doku bloklarından 5 µm lik kesitler alındı. Alınan bu kesitler parafin büzüşmelerinin açılması için 40 °C ye kadar ısıtılmış su banyosuna bırakıldı. İşaretlenen lamellere kesitler alınma sırasına göre yerleştirildi ve oda sıcaklığında kuruyan lam üzerindeki kesitler cam kesit taşıma kasetlerine yerleştirildi. Bu kasetler içinde önce 37 °C ye ayarlanmış etüvde 1 saat bekletildi, sonrasında etüvün derecesi 60 °C'ye çıkarılıp yaklaşık 3-4 saat bekletildi. Etüvden çıkarılan kesitlerden HE işaretli olanlar “hematoksilen-eozin” boyası ile PSR işaretli olanlar “pikrosirius kırmızısı” boyası ile boyandı, İH işaretli olanlar da belirlenmiş iki antikorla immünohistokimyasal olarak boyandı.

Hematoksilen-eozin

Etüvden alınan ve hematoksilen-eozin boyanacak olan işaretli kesitler parafini giderme işlemi için cam boyama kaplarına önceden konulmuş olan ksilen içine bırakıldı. 15

dakika bekletildikten sonra ksilen II olarak işaretlenen boyama kabına alındı ve bu işlem 3 kez tekrarlandı, sırayla 15 dk. ksilen I, onar dk. ksilen II ve ksilen III boyama kaplarında bekletildi. En son ksilenden alınır alınmaz ksilenin kesit üzerinden uçması için 9-10 saniye kadar dış ortamda bekletilip mutlak alkol içine alındı ve beş dakika bekletildikten sonra %96, %80, %70 azalan alkol serilerinde 5 dakika bekletildi. Boyama kaplarından birine musluk suyu doldurulup kesit kaseti bu kaba alınarak akarsuda 5 dakika kadar bekletildi. Bu aşamadan sonra hematoksilen içinde 6 dakika bekletildikten sonra lamin altı silinerek mikroskop altında gözlem yapıldı, çekirdeklerin sağlıklı boyandığı gözlemlendiği için bu işlemde karaciğer doku kesitleri için 6 dk. yeterli oldu. İkinci bir akarsuda bekletme aşamasından sonra kesitler %80 alkol dolu kaba daldırılıp çıkarılarak eozin dolu kaba alındı ve 3 dakika kadar bekletildi. Bu aşamada da mikroskop altında gözlem yapıldı ve sitoplazmanın sağlıklı boyanmasında sonra kesitler sırayla %80, %90 ve mutlak alkolde ikişer dk. bekletildi. Sonrasında kesit üzerinde alkol kalmaması için dış ortamda 10 saniye kadar bekletildikten sonra kesitler ksilen I, II ve III içine alınarak ksilen I ve II' de onar dk., ksilen III de 1 saat bekletildi.

Son olarak ksilenden alınan lamlara doku üzerine gelmeyecek şekilde yapıştırma materyali (Bio Mount HM, Bio Optica) pastör pipet ile damlatılarak 45 derece açıda yerleştirilen lameller ile hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek kapatıldı, oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

Tablo 15. Hematoksilen-eozin boyama uygulanması

#	Aşama	Zaman Dakika	Detaylar Saniye
1	Parafini giderme	Ksilen I	15
2	Parafini giderme	Ksilen II	10
3	Parafini giderme	Ksilen III	10
4	Durulama (Ksilenden uzaklaştırma)	Mutlak alkol	5
5	Durulama (Ksilenden uzaklaştırma)	%96 alkol	5
6	Durulama (Ksilenden uzaklaştırma)	%80 alkol	5
7	Daldır	%70 alkol	5
8	Daldır çıkar	Akar su	5
9	Çekirdek boyama	Hematoksilen	6
10		Akar su	5
11		%80 alkol	1-2
12	Sitoplazma boyası	Eozin	3
13		%80 alkol	2
14		%96 alkol	2
15		Mutlak alkol	2
16		Ksilen I	10
17		Ksilen II	10
18		Ksilen III	60
19		Kapama	



Resim 19. Boyanan kesit görüntüleri

Pikro sirius kırmızısı boyaması

ab150681 Picro Sirius Red Stain Kit (Connective Tissue Stain) boyama kiti prosedürüne uygun olarak yapılmıştır.

Bir gün öncesinden mikrotom cihazında alınan kesitler 37 °C' de bir saat kurutma işleminden sonra 60 °C' ye ayarlanmış etüvde bir saat bekletildi. Oda sıcaklığında muhafaza edilen pikro sirius kırmızısı boyama kiti ağzı kapaklı cam boyama kaplarına boşaltıldı. Kitin protokolüne uygun olarak boya düzeneği hazır hale getirildi.

Pikro sirius kırmızısı (PSR) boyanacak kesitler, parafinden uzaklaştırma işlemi için etüvden sonra hemen ksilen içine alındı. 10 dk. bekletildikten sonra ksilen II olarak işaretlenen boyama kabına alındı ve bu işlem 2 kez tekrarlanmış oldu. En son ksilenden alınır alınmaz ksilenin kesit üzerinden uçması için 9-10 saniye kadar dış ortamda bekletilip mutlak alkol içine alındı ve beşer dk. iki seri mutlak alkol içinde bekletildi. Sonra %96'lık alkolde 5 dk., saf suda 1 dakika bekletildi. Kasetlerdeki kesitlerin tamamı boya içine nüfuz edecek şekilde pikro sirius kırmızısı içinde 60 dk. bekletildi. Bu süre dolana kadar kesitler mikroskop altında gözlemlenerek takip edildi. Boyama işleminin gerçekleştiği bu bir saatlik süre dolduğunda gözlemlendi ve bu aşamadan sonra iki seri %0,5 asetik asit solüsyonlarına

daldırılıp çıkarıldı. Sonrasında mutlak alkol I' e daldırılıp çıkarılırken mutlak alkol II de 1 dk. bekletildi. Bunu ksilen I'de 10 dk. ve ksilen II' de 20 dk. bekleme süreleri izledi. Son olarak da kapama maddesi ile kapatılan pikro sirius kırmızısı ile boyanan kesitler mikroskopta incelenmek üzere kurumaya bırakıldı.

Tablo 16. Pikro sirius boyama aşamaları

#	Aşama	ile	Sıcaklık °C	Dakika-Saniye
1	Parafini giderme	Ksilen I	Oda sıcaklığı	10
2	Parafini giderme	Ksilen II	Oda sıcaklığı	10
3	Durulama (Ksilenden uzaklaştırma)	Mutlak alkol	Oda sıcaklığı	5
4	Durulama (Ksilenden uzaklaştırma)	Mutlak alkol	Oda sıcaklığı	5
5	Durulama (Ksilenden uzaklaştırma)	%96' lık alkol	Oda sıcaklığı	5
6	Durulama (Alkolden uzaklaştırma)	Saf su	Oda sıcaklığı	1
7	Daldır	Pikro Sirius Kırmızısı	Oda sıcaklığı	60
8	Daldır çıkar	% 0.5 asetik asit I	Oda sıcaklığı	1-2
9	Daldır çıkar	% 0.5 asetik asit II	Oda sıcaklığı	1-2
10	Daldır çıkar	Mutlak alkol	Oda sıcaklığı	2-3
11	Daldır	Mutlak alkol	Oda sıcaklığı	1
12	Şeffaflaştırma	Ksilen I	Oda sıcaklığı	10
13	Şeffaflaştırma	Ksilen II	Oda sıcaklığı	20
14	Kapama	Bio Mount Media	Oda sıcaklığı	



Resim 20. Pikro sirius kırmızısı boyama sonrası kesitler

İmmünohistokimya Boyaması

Tablo 17. İmmünohistokimya kit içeriği (ab80436-EXPOSE Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB Detection IHC Kit).

Ürün	Miktar
Protein Block	15 mL
Complement	15 mL
50x DAB Chromogen	0,5 mL
Hydrogen Peroxide Block	15 mL
DAB Substrate	15 mL
HRP Conjugate	15 mL

Formalin ile tespit edilmiş ve parafine gömülmüş karaciğer doku kesitleri alındıktan sonra parafini giderme işlemi için 37 °C etüvde 1 saat, 60 °C etüvde 3 saat bekletildi.

Etüvden alınan kesitler ksilen içine alındı, 10 dk. bekletildi, bu aşama üç kez

tekrarlandı. Ksilenden sonra azalan alkol derecelerinden geçirildi, iki farklı mutlak alkolde, iki farklı %96'lık alkol, %80 alkol, %70 alkol serilerinden geçirildikten sonra kesitler saf su içine alındı ve 5 dakika bekletildi, sonrasında dPBS içine alındı ve 5 dk. bekletildi.

Kesitler bu aşamadan sonra sitrat buffer içinde (citrate buffer, Ph6, RET/Cat. No.00-5000) mikrodalga fırın içinde (Arçelik MD 574) 20 dk. kaynatıldı (20 dk. 98 °C). Bu aşamada buharlaşmaya ve kesitlerin kurumamasına dikkat edildi. 20 dakika sonra mikrodalga fırından alınan kesitler akarsuda 10 dakika bekletildi.

Soğuyan lamalar üzerindeki kesitlerin etrafı "pap-pen" ile daire şeklinde çizildi (Sigma-Aldrich, Z672548-1EA Lot#3110 Pcode 1002564011).

Kesitlerin boyama işlemine kit protokolüne uygun olarak devam edildi. Etrafı çizilen kesitlerin üzerine "hydrogen peroxide block" damlatıldı, bir damla yeterli oldu ve 10 dk. kadar bekletildi, sonrasında iki kez buffer ile dPBS ile yıkandı. Protein Block birer damla kesitlerin üzerine damlatıldı ve 10 dk. bekletildi, sonrasında bir kez dPBS ile yıkandı. Primer antibody damlatması yapıldı ve +4 °C' de bir gece (overnight) bırakıldı. Ertesi sabah 3 kez dPBS ile yıkandı ve üzerlerine "complement" damlatıldı ve 10 dk. inkübe edildi. İki kez dPBS ile yıkandı. "HRP" conjugate eklendi ve 15 dk. oda sıcaklığında bekletildikten sonra dört kez dPBS ile yıkandı. Bu aşamadan sonra alüminyum folyo ile sarılı eppendorf tüp içine 1,5 ml (50 damla) "DAB Substrate" pipetlendi ve üzerine 30 µl (1 damla) "DAP Chromogen" damlatıldı, bu karışım her boyamada taze olarak hazırlandı, pipetaj yapıldı ve 1-10 dk. arası bekletildi, bu aşamada kesitte kahverengi boyanma olup olmamasına dikkat edildi ve mikroskop altında gözlemlendi. Dört kez dPBS ile yıkandı. Bu aşamadan sonra kesitler hematoksilen boyası ile zıt boyama yapıldı, boya solüsyonu içinde 6 dk. bekletildi, fazla boyanın akması için saf su dolu kaba daldırıldı, hafif çalkalanarak boyanın fazlasının akması sağlandı, bu aşamadan sonra tekrar saf su dolu kaba daldırılıp 1 dk. bekletildi. Suyunu giderme için mutlak alkol serilerinden geçirildi, ksilen serilerinde 10 dk. bekletildi ve sonrasında kapama medyumu ile lam üzerindeki doku kesitleri üzerine lamel yapıştırıldı ve kuruması için bir gece oda sıcaklığında bekletildi. Kesitler mikroskopta incelenmek ve görüntü almak için hazır hale getirildi.

Tablo 18. İmmünohistokimya boyama aşamaları

#	Aşama	ile	Sıcaklık °C	Dakika
1	Parafini giderme	Ksilen I	Oda sıcaklığı	10
2	Parafini giderme	Ksilen II	Oda sıcaklığı	10
3	Parafini giderme	Ksilen III	Oda sıcaklığı	10
3	Durulama (Ksilenden uzaklaştırma)	Mutlak alkol I	Oda sıcaklığı	5
4	Durulama (Ksilenden uzaklaştırma)	Mutlak alkol II	Oda sıcaklığı	5
5	Durulama (Ksilenden uzaklaştırma)	%96' lık alkol I	Oda sıcaklığı	5
6	Durulama (Ksilenden uzaklaştırma)	%96' lık alkol II	Oda sıcaklığı	5
7	Durulama (Ksilenden uzaklaştırma)	%80 alkol	Oda sıcaklığı	5
8	Durulama (Ksilenden uzaklaştırma)	%70 alkol	Oda sıcaklığı	5
9	Hidratasyon	Saf su	Oda sıcaklığı	5
10	Hidratasyon	dPBS	Oda sıcaklığı	5
11	Retrieval	Sitrat tampon	98 °C	20
12		Hydrogen Peroxide Block	Oda sıcaklığı	10
13	Yıkama	2 X dPBS	Oda sıcaklığı	1
14		Protein Block	Oda sıcaklığı	10
15	Yıkama	dPBS	Oda sıcaklığı	1-2
16		Primer antikorlar	+4 °C	Bir gece (overnight)
17	Yıkama	3 X dPBS	Oda sıcaklığı	1
18		Complement	Oda sıcaklığı	10
19	Yıkama	3 X dPBS	Oda sıcaklığı	1
20		HRP Conjugate	Oda sıcaklığı	15
21	Çalkalama	4 X dPBS	Oda sıcaklığı	1
22		DAB Chromogen+DAB Substrate	Oda sıcaklığı	10
23	Çalkalama	4 X dPBS	Oda sıcaklığı	1
24	Zıt boyama	Hematoksilen	Oda sıcaklığı	6
25	Yıkama	2X Saf su	Oda sıcaklığı	1
26	Dehidratasyon	2X Mutlak alkol	Oda sıcaklığı	5
27	Şeffaflandırma	Ksilen I	Oda sıcaklığı	10
28	Şeffaflandırma	Ksilen II	Oda sıcaklığı	10
29	Kapama	Bio Mount Media	Oda sıcaklığı	



Resim 21. İmmünohistokimya boyaması görüntüleri

3.6. İstatistiksel Analizler

Çalışmadan elde edilen verilerin gruplara göre normal dağılım testi Kolmogorov-smirnov ve Shapiro Wilk testleri ile yapılmıştır. Verilerin gruplara göre normal dağılım gösterdiği tespit edilmiştir ($p>0,05$). Pre-ALT, pre-AST, post-ALT, post-AST değerlerini çalışma gruplarına göre karşılaştırmak için tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır. ALT ve AST ölçümlerinin ön test-son test karşılaştırmaları için ise her bir grubun olacak şekilde eşleştirilmiş t testi kullanılmıştır. Denek gruplarının haftalara göre ağırlıklarının karşılaştırılmasında tekrarlı ölçümler varyans analizi kullanılmıştır. Ayrıca deneklerin karaciğer ağırlıklarının gruplara göre karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır. Analizler SPSS 22.0 programı yardımıyla gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Her Bir Gruptaki Sıçanlara Ait, 1., 4., 7., 10., 13., 16. Haftalarda Kaydedilen Ağırlık Ölçümleri Sonuçları

Tablo 19. Kontrol grubundaki sekiz sıçana ait, 1., 4., 7., 10., 13., 16. haftalarda kaydedilen ağırlık ölçümleri sonuçları (g).

Hafta1	Hafta4	Hafta7	Hafta10	Hafta13	Hafta16
Kontrol	Kontrol	Kontrol	Kontrol	Kontrol	Kontrol
1.168,3 (g)	231,2	269,4	301,6	329,3	350,9
2.206,3	287,9	345,7	374,4	405,5	421,9
3.164,0	233,6	257,7	283,5	316,1	330,4
4.152,7	264,4	311,7	331,7	361,1	365,8
5.179,9	270,3	341,1	386,3	414,4	445,2
6.211,2	282,7	331,6	367,9	381,6	417,7
7.219,9	285,7	334,0	382,3	406,9	441,7
8.199,7	289,3	335,4	371,7	407,3	419,8

Tablo 20. Sham grubundaki sekiz sıçana ait, 1., 4., 7., 10., 13., 16. haftalarda kaydedilen ağırlık ölçümleri sonuçları (g).

Hafta1	Hafta4	Hafta7	Hafta10	Hafta13	Hafta16
Sham	Sham	Sham	Sham	Sham	Sham
1.182,2 (g)	253,0	291,9	322,7	355,2	376,9
2.222,4	320,4	361,5	390,2	430,7	462,6
3.179,6	250,9	293,2	344,5	381,6	405,8
4.186,2	242,6	267,6	304,7	328,9	351,2
5.167,9	241,0	284,3	340,9	385,5	412,8
6.195,7	265,2	312,7	365,3	404,1	442,9
7.180,1	243,1	292,3	341,5	380,5	400,1
8.170,8	218,1	255,6	307,4	329,9	356,1

Tablo 21. TAA grubundaki sekiz sığana ait, 1., 4., 7., 10., 13., 16. haftalarda kaydedilen ağırlık ölçümleri sonuçları (g).

Hafta1	Hafta4	Hafta7	Hafta10	Hafta13	Hafta16
TAA	TAA	TAA	TAA	TAA	TAA
1.187,1 (g)	231,3	259,3	274,1	316,3	353,0
2.186,3	234,5	266,7	285,3	324,5	361,0
3.215,1	268,1	304,5	316,3	363,3	405,9
4.200,0	226,1	241,7	256,0	296,3	336,9
5.180,8	232,4	253,9	272,1	299,5	342,5
6.163,3	200,3	216,5	226,1	250,1	271,1
7.194,3	223,9	250,2	266,2	305,9	349,5
8.175,5	212,4	236,6	252,7	280,3	306,7

Tablo 22. TAA+SDKMKH grubundaki sekiz sığana ait, 1., 4., 7., 10., 13., 16. haftalarda kaydedilen ağırlık ölçümleri sonuçları.

Hafta1	Hafta4	Hafta7	Hafta10	Hafta13	Hafta16
TAA+	TAA+	TAA+	TAA+	TAA+	TAA+
SDKMKH	SDKMKH	SDKMKH	SDKMKH	SDKMKH	SDKMKH
1.184,4 (g)	217,6	253,2	260,8	287,2	321,9
2.192,5	238,5	282,5	296,8	318,4	376,4
3.226,4	249,6	287,6	305,8	331,9	390,4
4.177,6	205,9	238,5	253,0	275,7	310,9
5.158,6	214,8	248,4	265,8	307,3	347,4
6.171,7	216,9	237,2	248,3	284,4	301,9
7.137,8	183,1	206,8	224,0	264,5	290,4
8.205,8	242,2	264,7	278,8	313,2	350,0

Tablo 23. TAA+SDKMKH (BA) grubundaki sekiz sığana ait, 1., 4., 7., 10., 13., 16. haftalarda kaydedilen ağırlık ölçümleri sonuçları.

Hafta1	Hafta4	Hafta7 TAA+	Hafta10	Hafta13	Hafta16
TAA+	TAA+	SDKMKH	TAA+	TAA+	TAA+
SDKMKH	SDKMKH	(BA)	SDKMKH	SDKMKH	SDKMKH
(BA)	(BA)		(BA)	(BA)	(BA)
1.173,6 (g)	197,3	222,0	236,0	269,3	305,9
2.184,5	238,6	258,6	279,7	311,5	312,7
3.161,7	194,1	220,5	247,0	287,6	310,2
4.156,8	188,9	212,0	238,4	278,4	315,2
5.207,4	234,3	261,9	272,5	323,5	359,7
6.185,1	198,4	235,8	255,0	297,2	339,4
7.171,1	218,2	255,1	267,3	320,1	359,7
8.210,8	231,0	261,7	285,4	-	-

Tablo 24. TAA+SDKMKH (NaB) grubundaki sekiz sığana ait, 1., 4., 7., 10., 13., 16. haftalarda kaydedilen ağırlık ölçümleri sonuçları.

Hafta1	Hafta4	Hafta7	Hafta10	Hafta13	Hafta16
TAA+	TAA+	TAA+	TAA+	TAA+	TAA+
SDKMKH	SDKMKH	SDKMKH	SDKMKH	SDKMKH	SDKMKH
(NaB)	(NaB)	(NaB)	(NaB)	(NaB)	(NaB)
1.185,6 (g)	227,5	266,6	287,7	329,2	372,5
2.206,3	254,2	303,8	334,9	369,1	419,8
3.194,5	251,5	298,6	332,0	369,9	414,2
4.191,1	241,8	273,7	313,8	355,3	400,3
5.165,5	185,1	220,0	231,6	266,7	300,2
6.157,6	190,8	226,6	247,6	282,5	329,1
7.175,9	202,1	241,7	257,7	288,1	327,9
8.206,3	243,5	303,5	326,9	365,7	410,9

Tablo 25. Kontrol grubundaki sıçanların her hafta Pazartesi günleri kayıt altına alınan ağırlık ölçümlerinin artan haftalara göre (hafta 1-hafta16) istatistiksel olarak değerlendirilmesi

Kontrol	Haftalar	N	Ortalama±Std. Sapma	F	p
	hafta1	8	187,75 ^a ±24,79		
	hafta4	8	268,14 ^b ±23,71		
	hafta7	8	315,83 ^c ±33,90		
	hafta10	8	349,92 ^d ±39,37	262,766	0,001
	hafta13	8	377,78 ^e ±38,32		
	hafta16	8	399,17 ^f ±43,73		

Kontrol grubunda yer alan sıçanların vücut ağırlıkları hafta1-hafta16 göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0,05$). Haftalar ilerledikçe sıçanlarda ağırlık artışı söz konusudur.

Tablo 26. Sham grubundaki sıçanların her hafta Pazartesi günleri kayıt altına alınan ağırlık ölçümlerinin artan haftalara göre (hafta 1-hafta16) istatistiksel olarak değerlendirilmesi

Sham	Haftalar	N	Ortalama±Std. Sapma	F	p
	hafta1	8	185,61±17,18		
	hafta4	8	254,29±29,88		
	hafta7	8	294,89±32,01		
	hafta10	8	339,65±28,76	323,769	0,001
	hafta13	8	374,55±35,22		
	hafta16	8	401,05±39,26		

Sham grubunda yer alan sıçanların vücut ağırlıkları hafta1-hafta16 göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0,05$). Haftalar ilerledikçe sham grubundaki sıçanlarda ağırlık artışı söz konusudur.

Tablo 27. TAA grubundaki sıçanların her hafta Pazartesi günleri kayıt altına alınan ağırlık ölçümlerinin artan haftalara göre (hafta 1-hafta16) istatistiksel olarak değerlendirilmesi

TAA	Haftalar	N	Ortalama±Std. Sapma	F	p
	hafta1	8	187,80 ^a ±15,76		
	hafta4	8	228,63 ^b ±19,67		
	hafta7	8	253,67 ^c ±25,67		
	hafta10	8	268,60 ^d ±26,24	214,605	0,001
	hafta13	8	304,53 ^e ±33,03		
	hafta16	8	340,83 ^f ±39,48		

TAA grubunda yer alan sıçanların vücut ağırlıkları hafta1-hafta16 göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0,05$). Haftalar ilerledikçe bu gruptaki sıçanlarda ağırlık artışı söz konusudur.

Tablo 28. TAA+SDKMKH grubundaki sıçanların her hafta Pazartesi günleri kayıt altına alınan ağırlık ölçümlerinin artan haftalara göre (hafta 1-hafta16) istatistiksel olarak değerlendirilmesi

TAA+ SDKMKH	Haftalar	N	Ortalama± Std. Sapma	F	p
	hafta1	8	181,85±27,46		
	hafta4	8	221,08±21,73		
	hafta7	8	252,36±26,23		
	hafta10	8	266,66±26,64	278,519	0,001
	hafta13	8	297,82±23,31		
	hafta16	8	336,16±35,83		

TAA+SDKMKH grubunda yer alan sıçanların vücut ağırlıkları hafta1-hafta16 göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0,05$). Haftalar ilerledikçe bu gruptaki sıçanlarda ağırlık artışı söz konusudur.

Tablo 29. TAA+SDKMKH (BA) grubundaki sıçanların her hafta Pazartesi günleri kayıt altına alınan ağırlık ölçümlerinin artan haftalara göre (hafta 1-hafta16) istatistiksel olarak değerlendirilmesi

TAA+ SDKMKH (BA)	Haftalar	N	Ortalama±Std. Sapma	F	p
	hafta1	8	177,17±17,00		
	hafta4	8	209,97±20,29		
	hafta7	8	237,99±20,54	212,764	0,001
	hafta10	8	256,56±17,08		
	hafta13	7	298,23±20,97		
	hafta16	7	328,97±23,58		

TAA+SDKMKH (BA) grubunda yer alan sıçanların vücut ağırlıkları hafta1-hafta16 göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0,05$). Haftalar ilerledikçe bu gruptaki sıçanlarda ağırlık artışı söz konusudur.

Tablo 30. TAA+SDKMKH (NaB) grubundaki sıçanların her hafta Pazartesi günleri kayıt altına alınan ağırlık ölçümlerinin artan haftalara göre (hafta 1-hafta16) istatistiksel olarak değerlendirilmesi

TAA+SDKMKH (NaB)	Haftalar	N	Ortalama±Std. Sapma	F	p
	hafta1	8	185,35±17,92		
	hafta4	8	224,56±27,95		
	hafta7	8	266,81±34,25	280,117	0,001
	hafta10	8	291,53±41,31		
	hafta13	8	365,88±47,37		
	hafta16	8	371,86±46,78		

TAA+SDKMKH (NaB) grubunda yer alan sıçanların vücut ağırlıkları hafta1-hafta16 göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0,05$). Haftalar ilerledikçe bu gruptaki sıçanlarda ağırlık artışı söz konusudur.

Grupların 12 hafta boyunca uygulanan TAA (tiyoasetamid) (150mg/kg ip) hepatotoksik ajana göre ağırlıklarının değişiminin değerlendirilebilmesi için kayıt edilen ağırlıklarının istatistiksel değerlendirilmesi

Tablo 31. Kontrol (K) grubunun hafta1-hafta12 ölçüm zamanlarına göre ağırlıkların karşılaştırılması

Kontrol	N	Ortalama±Std.Sapma	F	p
hafta1	8	187,75±24,79		
hafta2	8	220,38±21,96		
hafta3	8	246,93±20,19		
hafta5	8	286,20±28,04		
hafta6	8	309,29±24,07		
hafta7	8	315,83±33,90	147,481	0,001
hafta8	8	329,24±34,40		
hafta9	8	343,66±35,01		
hafta10	8	349,92±39,37		
hafta11	8	361,79±39,19		
hafta12	8	361,70±37,76		

Kontrol grubunda yer alan sıçanların vücut ağırlıkları zamana göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0,05$). Haftalar ilerledikçe sıçanlarda ağırlık artışı söz konusudur.

Tablo 32. Sham (Sh) grubunun ölçüm zamanlarına göre ağırlıkların karşılaştırılması

Sh	N	Ortalama±Std.Sapma	F	p
hafta1	8	185,6±117,18		
hafta2	8	215,05±21,61		
hafta3	8	229,55±26,23		
hafta4	8	254,29±29,88		
hafta5	8	253,8±35,44		
hafta6	8	273,01±35,35	183,032	0,001
hafta7	8	294,89±32,01		
hafta8	8	316,81±31,23		
hafta9	8	332,61±27,62		
hafta10	8	339,65±28,76		
hafta11	8	355,2±32,61		
hafta12	8	355,46±31,68		

Sh grubunda yer alan sıçanların vücut ağırlıkları zamana göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0,05$). Haftalar ilerledikçe Sh grubundaki sıçanlarda sıçanlarda ağırlık artışı söz konusudur.

Tablo 33. Tiyooasetamid (TAA) grubunun ölçüm zamanlarına göre ağırlıkların karşılaştırılması

TAA	N	Ortalama±Std.Sapma	F	p
hafta1	8	187,80±15,76		
hafta2	8	209,76±15,47		
hafta3	8	214,55±18,79		
hafta4	8	228,63±18,79		
hafta5	8	234,65±19,14		
hafta6	8	242,79±22,76	122,617	0,001
hafta7	8	253,67±25,67		
hafta8	8	256,38±26,39		
hafta9	8	267,29±24,46		
hafta10	8	268,60±26,24		
hafta11	8	275,68±30,14		
hafta12	8	271,95±32,00		

TAA grubunda yer alan sıçanların vücut ağırlıkları zamana göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0,05$). Haftalar ilerledikçe TAA grubundaki sıçanlarda sıçanlarda ağırlık artışı söz konusudur.

Tablo 34. Sünnet derisi kökenli mezenkimal kök hücre (SDKMKH) grubunun ölçüm zamanlarına göre ağırlıkların karşılaştırılması

TAA+SDKMKH	N	Ortalama±Std.Sapma	F	p
hafta1	8	181,85±27,46		
hafta2	8	191,76±25,26		
hafta3	8	208,88±23,18		
hafta4	8	221,08±21,73		
hafta5	8	236,08±25,43		
hafta6	8	240,65±26,73	212,052	0,001
hafta7	8	252,36±26,23		
hafta8	8	255,44±24,99		
hafta9	8	268,76±25,20		
hafta10	8	266,66±26,64		
hafta11	8	275,89±26,32		
hafta12	8	275,11±25,85		

TAA+SDKMKH grubunda yer alan sıçanların vücut ağırlıkları zamana göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0,05$). İlerleyen haftalarda alınan sıçan ağırlıklarında artış söz konusudur.

Tablo 35. Sünnet derisi kökenli mezenkimal kök hücre (TAA+SDKMKH (BA)) grubunun ölçüm zamanlarına göre ağırlıkların karşılaştırılması

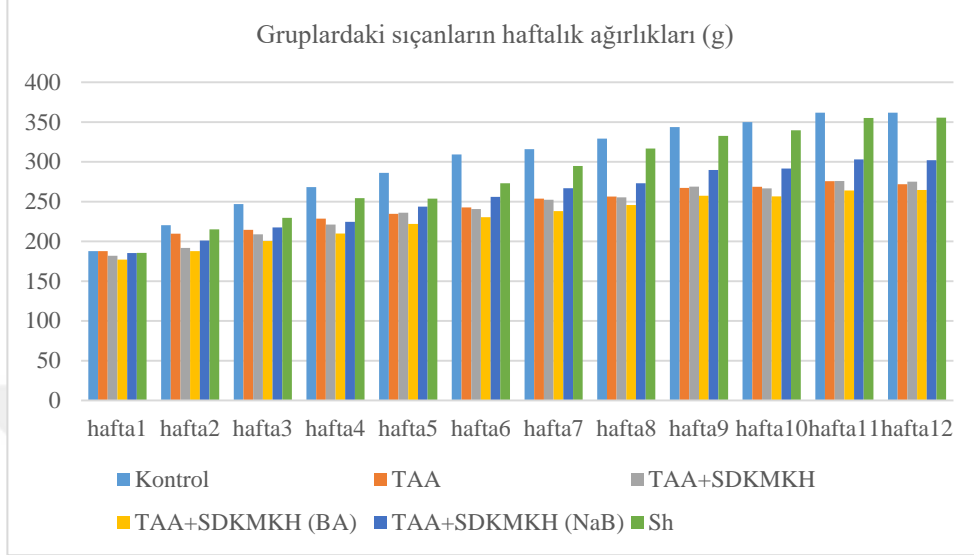
TAA+SDKMKH (BA)	N	Ortalama±Std.Sapma	F	p
hafta1	8	177,17±17,00		
hafta2	8	187,83±20,39		
hafta3	8	200,46±20,44		
hafta4	8	209,97±20,29		
hafta5	8	221,90±21,97		
hafta6	8	230,41±21,58	143,618	0,001
hafta7	8	237,99±20,54		
hafta8	8	245,76±18,14		
hafta9	8	257,39±18,90		
hafta10	8	256,56±17,08		
hafta11	8	263,97±18,48		
hafta12	8	264,67±19,18		

Bu grupta, TAA+SDKMKH (BA), yer alan sıçanların vücut ağırlıkları zamana göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0,05$). 1. Haftadan 12. Haftaya kadar alınan sıçan ağırlıklarında artış söz konusudur.

Tablo 36. Sünnet derisi kökenli mezenkimal kök hücre (TAA+SDKMKH (NaB)) grubunun ölçüm zamanlarına göre ağırlıkların karşılaştırılması

TAA+SDKMKH (NaB)	N	Ortalama±Std.Sapma	F	p
hafta1	8	185,35±17,92		
hafta2	8	200,98±24,89		
hafta3	8	217,56±28,57		
hafta4	8	224,56±27,95		
hafta5	8	243,66±29,51		
hafta6	8	255,89±33,26	142,907	0,001
hafta7	8	266,81±34,25		
hafta8	8	273,06±35,30		
hafta9	8	289,75±40,34		
hafta10	8	291,53±41,31		
hafta11	8	302,99±44,65		
hafta12	8	301,99±44,83		

TAA+SDKMKH (NaB) grubunda yer alan sıçanların vücut ağırlıkları zamana göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0,05$). 1. Haftadan 12. Haftaya kadar alınan bu grubun da sıçan ağırlıklarında artış söz konusudur.



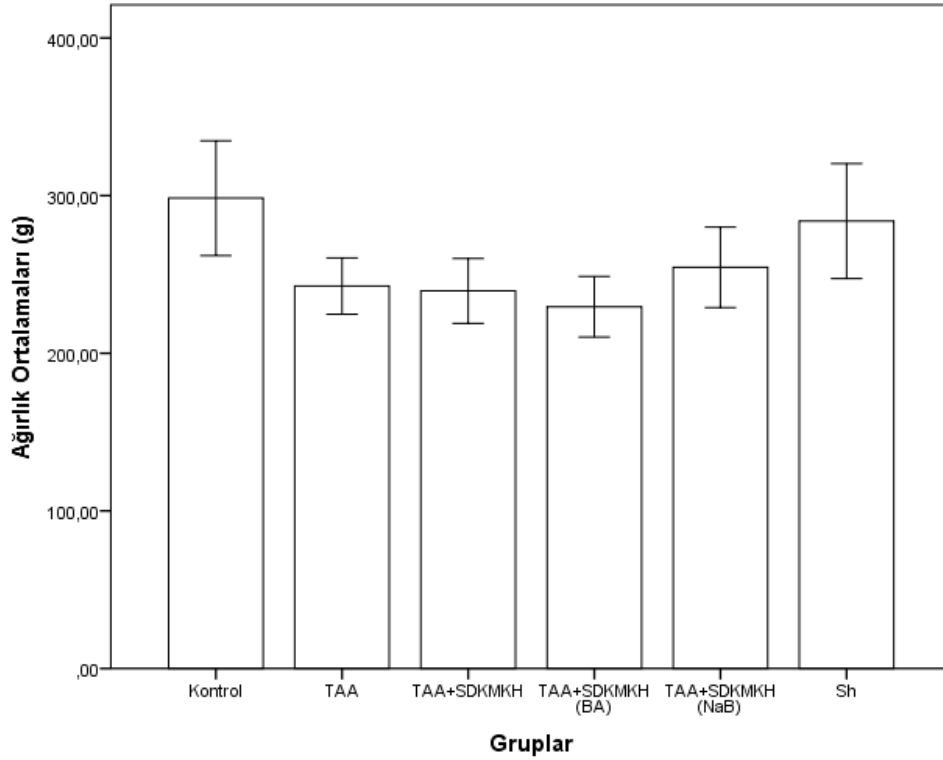
Şekil 11. Gruplardaki sıçan ağırlıklarının 1.-12. haftalardaki gram cinsinden değişimi

Görüldüğü gibi Kontrol ve Sh gruplarının sıçanlarının haftalara göre ağırlık artışı ile TAA uygulanan TAA, TAA+SDKMKH, TAA+SDKMKH (BA), TAA+SDKMKH (NaB) bu dört grubun sıçanlarının ağırlık artışı değişkenlik göstermektedir ki bunu da istatistiksel olarak değerlendirdiğimizde sonuç bize farklılığı kanıtlamaktadır. Kontrol ve Sh gruplarının sıçanlarının haftalara göre ağırlık artışı TAA, TAA+SDKMKH, TAA+SDKMKH (BA), TAA+SDKMKH (NaB)'ından daha fazladır. ağırlık artışında bu dört grup arasında (TAA, TAA+SDKMKH, TAA+SDKMKH (BA), TAA+SDKMKH (NaB)) ise yakınlık söz konusudur.

Tablo 37. Deney gruplarının 12 hafta boyunca kaydedilen ağırlıklarının ortalamalarının gruplar arası karşılaştırılması

Gruplar (12 hafta ağırlık ort. (g))	N	Ortalama±Std.Sapma	F	p
Kontrol	8	298,40 ^a ±57,32		
TAA	8	242,65 ^b ±28,09		
TAA+SDKMKH	8	239,54 ^b ±32,33	4,874	0,001
TAA+SDKMKH (BA)	8	229,51 ^b ±30,20		
TAA+SDKMKH (NaB)	8	254,51 ^b ±40,16		
Sh	8	283,83 ^a ±57,32		

Deney gruplarının 12 hafta boyunca alınan ağırlıklarının ortalamalarının gruplar arası karşılaştırılması sonucu istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p < 0,05$). Buna göre kontrol ve SH grubunun ortalama ağırlık değerleri benzerdir ve TAA, TAA+SDKMKH, TAA+SDKMKH (BA), TAA+SDKMKH (NaB) gruplarına göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. TAA, TAA+SDKMKH, TAA+SDKMKH (BA), TAA+SDKMKH (NaB) gruplarının da ortalama ağırlık değerleri benzerdir.



Şekil 12. Gruplardaki sıçan ağırlıklarının 1.-12. haftalar arası ortalamaları

4.2. Karaciğer Endeksinin Hesaplanması

Karaciğer endeksi hesaplaması; her bir sıçanın karaciğer endeksi=(karaciğer ağırlığı/vücut ağırlığı) x 100 (Wang ve ark, 2017) formülü ile yapılmıştır.

Tablo 38. Her bir gruptaki sıçanların karaciğer ağırlığı

N	TAA+ SDKMKH	TAA+ SDKMKH (BA)	TAA+ SDKMKH (NaB)	Sham	Kontrol	TAA
N1	11.381	13.111	9.784	11.927	11.327	10.359
N2	12.657	12.238	10.965	14.561	14.823	10.971
N3	13.873	10.777	11.140	13.384	12.983	13.001
N4	12.922	10.558	10.921	12.110	12.750	12.302
N5	11.646	13.044	9.061	12.900	12.386	11.014
N6	9.408	12.241	8.752	14.445	11.004	9.970
N7	10.222	13.372	8.940	11.718	19.987	12.808
N8	10.237	-	13.811	11.897	15.976	10.624

Tablo 39. 16. haftada, sakrifikasyon öncesi her bir gruptaki sıçanların ağırlıkları

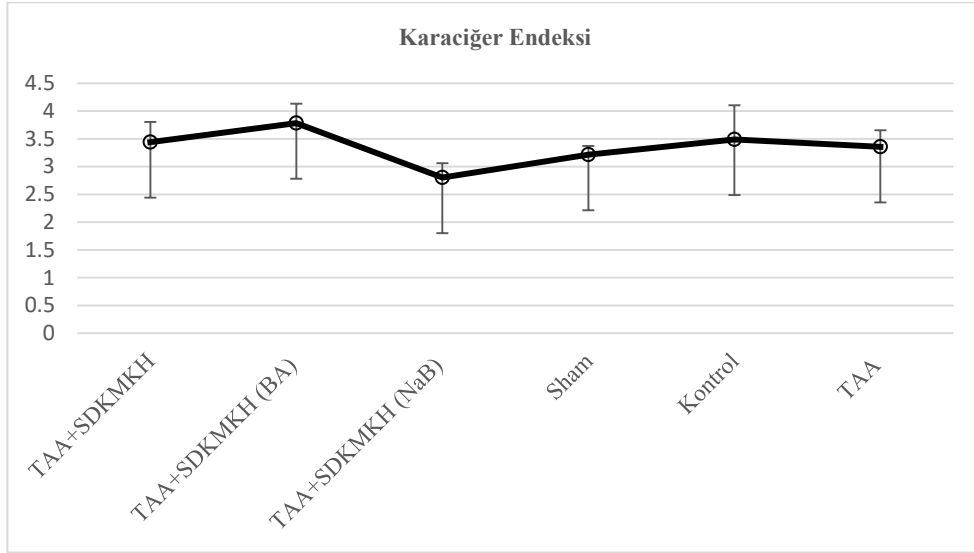
N/16. Hafta ağırlık	TAA+ SDKMKH	TAA+ SDKMKH (BA)	TAA+ SDKMKH (NaB)	Sham	Kontrol	TAA
N1	321.9	305.9	372.5	376.9	350.9	353.0
N2	376.4	312.7	419.8	462.6	421.9	361.0
N3	390.4	310.2	414.2	405.8	330.4	405.9
N4	310.9	315.2	400.3	351.2	365.8	336.9
N5	347.4	359.7	300.2	412.8	445.2	342.5
N6	301.9	339.4	329.1	442.9	417.7	271.1
N7	290.4	359.7	327.9	400.1	441.7	349.5
N8	350.0	-	410.9	356.1	419.8	306.7

Tablo 40. Karaciğer indeksi hesaplaması

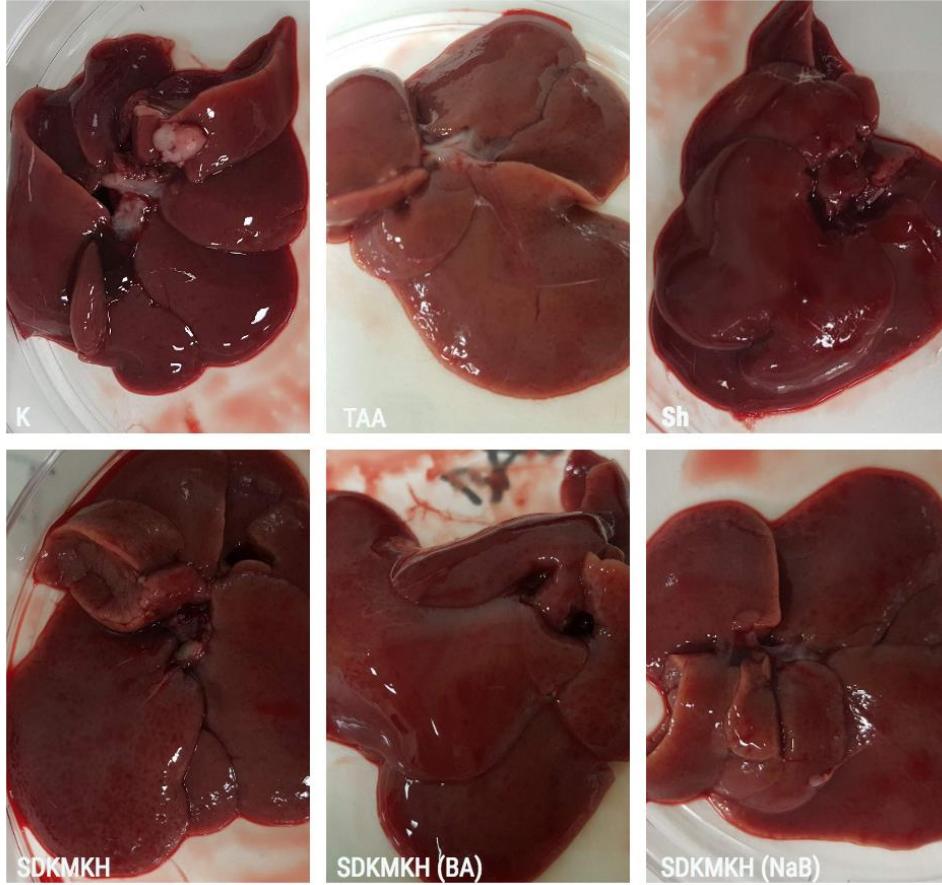
N	TAA+ SDKMKH	TAA+ SDKMKH (BA)	TAA+ SDKMKH (NaB)	Sham	Kontrol	TAA
N1	(11.381 (g)/321.9)*100	13.111/305.9	9.784/372.5	11.927/376.9	11.327/350.9	10.359/353.0
N2	12.657/376.4	12.238/312.7	10.965/419.8	14.561/462.6	14.823/421.9	10.971/361.0
N3	13.873/390.4	10.777/310.2	11.140/414.2	13.384/405.8	12.983/330.4	13.001/405.9
N4	12.922/310.9	10.558/315.2	10.921/400.3	12.110/351.2	12.750/365.8	12.302/336.9
N5	11.646/347.4	13.044/359.7	9.061/300.2	12.900/412.8	12.386/445.2	11.014/342.5
N6	9.408/301.9	12.241/339.4	8.752/329.1	14.445/442.9	11.004/417.7	9.970/271.1
N7	10.222/290.4	13.372/359.7	8.940/327.9	11.718/400.1	19.987/441.7	12.808/349.5
N8	10.237/350.0	EX	13.811/410.9	11.897/356.1	15.976/419.8	10.624/306.7

Tablo 41. Her bir sıçanın karaciğer Endeksi

N	TAA+ SDKMKH	TAA+ SDKMKH (BA)	TAA+ SDKMKH (NaB)	Sham	Kontrol	TAA
N1	3.535570	4.2860411	2.626577	3.164499	3.227985	2.934560
N2	3.362646	3.9136552	2.611958	3.147643	3.513391	3.039058
N3	3.553534	3.4742101	2.689521	3.298176	3.929479	3.203005
N4	4.156320	3.3496192	2.728203	3.448177	3.485511	3.651528
N5	3.352331	3.6263552	3.018321	3.125	2.782120	3.215766
N6	3.116263	3.6066588	2.659374	3.261458	2.634426	3.677609
N7	3.519972	3.7175423	2.726440	2.928767	4.525016	3.664663
N8	2.924857	4.2860411	3.361158	3.340915	3.805621	3.463971



Şekil 13. Karaciğer endeksi



Resim 22. Sakrifikasyon sonrası her bir gruba ait sıçan karaciğer görüntüleri

4.3. ALT AST Ölçümleri

Tablo 42. Kontrol grubu pre-post ALT pre-post AST ölçümleri

Kontrol	Pre-ALT U/L	Post-ALT U/L	Pre-AST U/L	Post-AST U/L
1	76	61	92	75
2	62	64	98	70
3	93	56	99	87
4	58	56	88	78
5	87	35	78	83
6	63	59	103	36
7	66	-	84	-
8	69	42	62	61

7. kontrol POST-ALT-AST sıçanında serum yetersizliğine bağlı olarak değer okunamamıştır.

Tablo 43. Sh grubu pre-post ALT pre-post AST ölçümleri

Sh	Pre-ALT U/L	Post-ALT U/L	Pre-AST U/L	Post-AST U/L
1	62	30	90	119
2	89	-	47	-
3	46	76	93	108
4	55	56	101	100
5	83	48	98	77
6	85	73	88	79
7	80	53	105	131
8	43	52	79	84

2. sham POST-ALT-AST sıçanında serum yetersizliğine bağlı olarak değer okunamamıştır.

Tablo 44. TAA grubu pre-post ALT pre-post AST ölçümleri

TAA	Pre-ALT U/L	Post-ALT U/L	Pre-AST U/L	Post-AST U/L
1	91	45	148	148
2	87	45	104	104
3	137	38	153	153
4	132	57	203	203
5	107	47	164	164
6	115	62	168	168
7	92	59	118	118
8	131	54	153	153

Tablo 45. TAA+SDKMKH grubu pre-post ALT pre-post AST ölçümleri

TAA+ SDKMKH	Pre-ALT U/L	Post-ALT U/L	Pre-AST U/L	Post-AST U/L
1	67	54	116	126
2	71	53	90	129
3	109	69	161	94
4	60	53	87	90
5	92	61	105	84
6	100	40	89	62
7	118	49	283	131
8	137	37	189	83

Tablo 46. TAA+SDKMKH (BA) grubu pre-post ALT pre-post AST ölçümleri

TAA+ SDKMKH (BA)	Pre-ALT U/L	Post-ALT U/L	Pre-AST U/L	Post-AST U/L
1	157	46	239	272
2	68	28	95	250
3	88	23	193	59
4	97	48	147	139
5	110	45	81	79
6	158	52	248	132
7	128	60	149	124
8	56	ex	113	ex

Tablo 47. TAA+SDKMKH (NaB) grubu pre-post ALT pre-post AST ölçümleri

TAA+ SDKMKH (NaB)	Pre-ALT U/L	Post- ALT U/L	Pre-AST U/L	Post-AST U/L
1	107	61	136	60
2	82	75	111	94
3	72	38	116	60
4	85	10	103	55
5	95	58	151	83
6	164	35	230	177
7	94	38	150	140
8	100	55	85	78

Tablo 48. Tüm grupların pre-post ALT pre-post AST ölçüm istatistik sonuçları

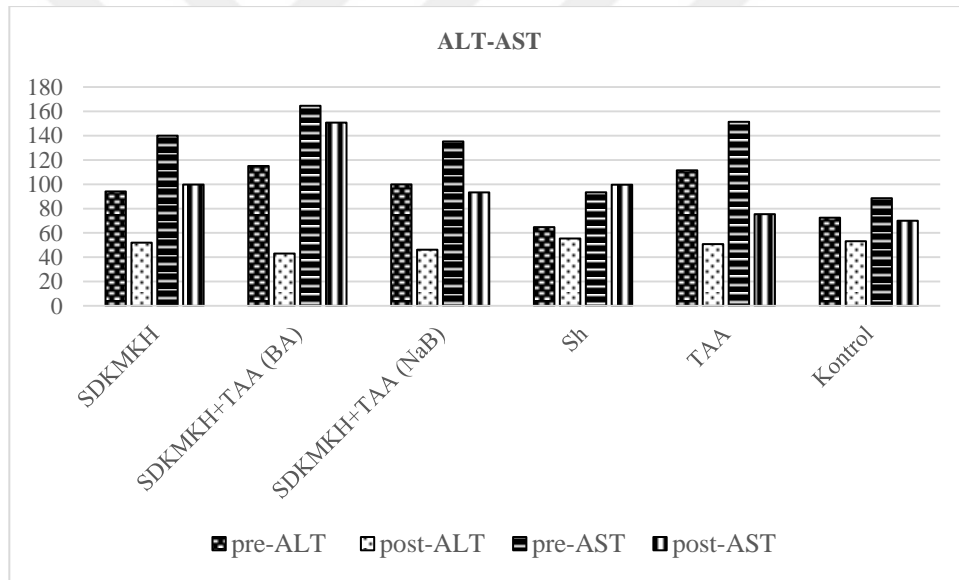
Değişkenler/Gruplar	N	Ortalama± Std.Sapma	F	p
Pre-ALT	Kontrol	8	71,75 ^b ±12,56	4,173 0,004
	TAA	8	111,50 ^a ±20,30	
	TAA+SDKMKH	8	94,25 ^{ab} ±27,00	
	TAA+SDKMKH (BA)	8	107,75 ^a ± 38,04	
	TAA+SDKMKH (NaB)	8	99,88 ^{ab} ±28,13	
	Sh	8	67,88 ^b ±18,57	
Post-Alt	Kontrol	7	53,29±10,67	0,819 0,544
	TAA	8	50,88±8,34	
	TAA+SDKMKH	8	52,00±10,38	
	TAA+SDKMKH (BA)	7	43,14±13,12	
	TAA+SDKMKH (NaB)	8	46,25±20,13	
	Sh	7	55,43±15,55	
Pre-AST	Kontrol	8	88,00 ^b ±13,38	3,848 0,006
	TAA	8	151,38 ^a ±30,42	
	TAA+SDKMKH	8	140,00 ^{ab} ±68,66	
	TAA+SDKMKH (BA)	8	158,13 ^a ±63,26	
	TAA+SDKMKH (NaB)	8	135,25 ^{ab} ±44,67	
	Sh	8	87,63 ^b ±18,31	
Post-Ast	Kontrol	7	70,00 ^b ±17,24	3,564 0,009
	TAA	8	75,50 ^b ±18,43	
	TAA+SDKMKH	8	99,88 ^b ±25,64	
	TAA+SDKMKH (BA)	7	150,71 ^a ±80,96	
	TAA+SDKMKH (NaB)	8	93,38 ^b ±43,44	
	Sh	7	99,71 ^b ±20,86	

Pre-ALT değerinin gruplara göre karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0,05$). Buna göre kontrol ve Sh gruplarının pre-ALT değerleri TAA ve TAA+SDKMKH (BA) gruplarına göre daha düşük olduğu belirlenmiştir.

Gruplar arası Post-ALT değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ($p>0,05$).

Pre-AST değerinin gruplara göre karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0,05$). Buna göre Kontrol ve SH gruplarının pre-AST değerleri TAA ve TAA+SDKMKH (BA) gruplarına göre daha düşük olduğu belirlenmiştir.

Post-AST değerinin gruplara göre karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0,05$). Buna göre TAA+SDKMKH (BA) grubunun post-AST değerleri TAA ve TAA+SDKMKH (NaB), Kontrol, TAA+SDKMKH ve Sh gruplarına göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.



Şekil 14. Grupların pre-post ALT ve pre-post AST değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 49. Kontrol grubu pre-ALT-AST, post-ALT-AST değerlerinin istatistiksel değerlendirilmesi

(Kontrol) Değişkenler	N	Ortalama±Std. Sapma	t	p
ALT	Pre-ALT	72,57±13,32	2,526	0,045
	Post-ALT	7		
AST	Pre-AST	88,57±14,35	2,059	0,085
	Post-AST	7		

Kontrol grubunun pre-ALT ve post-ALT değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0,05$). Buna göre post-ALT değeri daha düşüktür. Buna rağmen, pre-AST ve post-AST değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 50. Sh grubu pre-ALT-AST, post-ALT-AST değerlerinin istatistiksel değerlendirilmesi

(Sh) Değişkenler	N	Ortalama±Std. Sapma	t	p	
ALT	Pre-ALT	8	64,86±17,81	1,036	0,340
	Post-ALT	8	55,43±15,55		
AST	Pre-AST	8	93,43±8,77	-0,908	0,399
	Post-AST	8	99,71±20,86		

Sh grubunun pre-ALT ve post-ALT değerleri ve pre-AST ve post-AST değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 51. TAA grubu pre-ALT-AST, post-ALT-AST değerlerinin istatistiksel değerlendirilmesi

(TAA) Değişkenler	N	Ortalama±Std. Sapma	t	p	
ALT	Pre-ALT	8	111,50±20,29	7,862	0,001
	Post-ALT	8	50,87±8,33		
AST	Pre-AST	8	151,37±30,41	7,169	0,001
	Post-AST	8	75,50±18,43		

TAA grubunun pre-ALT ve post-ALT değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0,05$). Buna göre post-ALT değeri daha düşüktür. TAA grubunun pre-AST ve post-AST değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0,05$). Buna göre post-AST değeri daha düşüktür.

Tablo 52. TAA+SDKMKH grubu pre-ALT-AST, post-ALT-AST değerlerinin istatistiksel değerlendirilmesi

(TAA+SDKMKH) Değişkenler		N	Ortalama±Std. Sapma	t	p
ALT	Pre-ALT	8	94,25±27,00	3,730	0,007
	Post-ALT	8	52,00±10,37		
AST	Pre-AST	8	140,00±68,66	1,771	0,120
	Post-AST	8	99,87±25,64		

TAA+SDKMKH grubunun pre-ALT ve post-ALT değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0,05$). Buna göre post-ALT değeri daha düşüktür. ve pre-AST ve post-AST değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 53. TAA+SDKMKH (BA) grubu pre-ALT-AST, post-ALT-AST değerlerinin istatistiksel değerlendirilmesi

(SDKMKH+TAA(BA)) Değişkenler		N	Ortalama±Std. Sapma	t	p
ALT	Pre-ALT	7	115,14±34,32	7,080	0,001
	Post-ALT	7	43,14±13,12		
AST	Pre-AST	7	164,57±65,42	0,380	0,717
	Post-AST	7	150,71±80,95		

SDKMKH+TAA (BA) grubunun pre-ALT ve post-ALT değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0,05$). Buna göre post-ALT değeri daha düşüktür. SDKMKH+TAA (BA) grubunun pre ve post-AST değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).

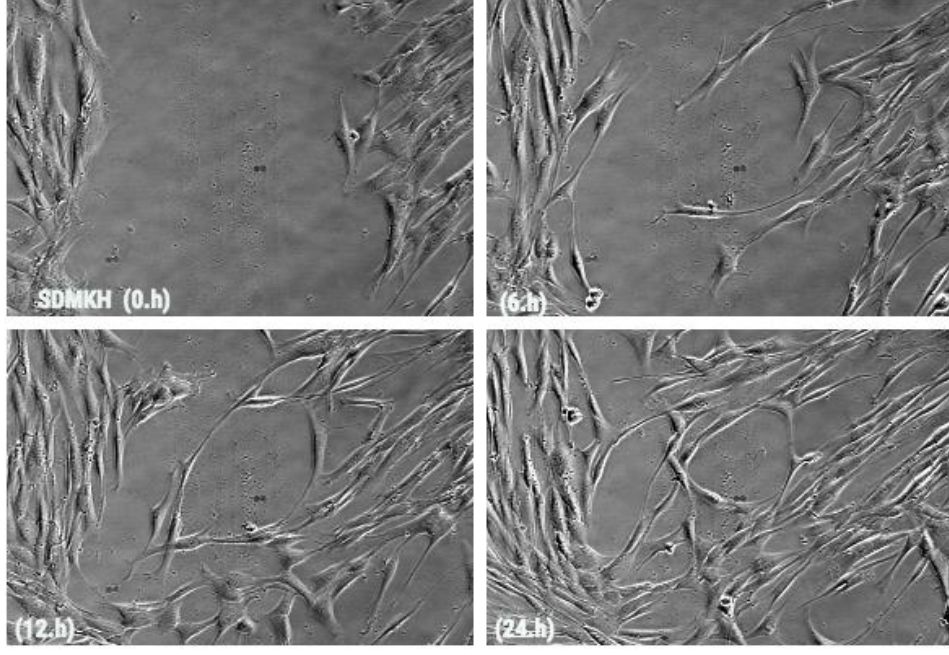
Tablo 54. TAA+SDKMKH (NaB) grubu pre-ALT-AST, post-ALT-AST değerlerinin istatistiksel değerlendirilmesi

(SDKMKH+TAA(NaB)) Değişkenler		N	Ortalama±Std. Sapma	t	p
ALT	Pre-ALT	8	99,88±28,13	4,204	0,004
	Post-ALT	8	46,25±20,13		
AST	Pre-AST	8	135,25±44,67	4,406	0,003
	Post-AST	8	93,38±43,44		

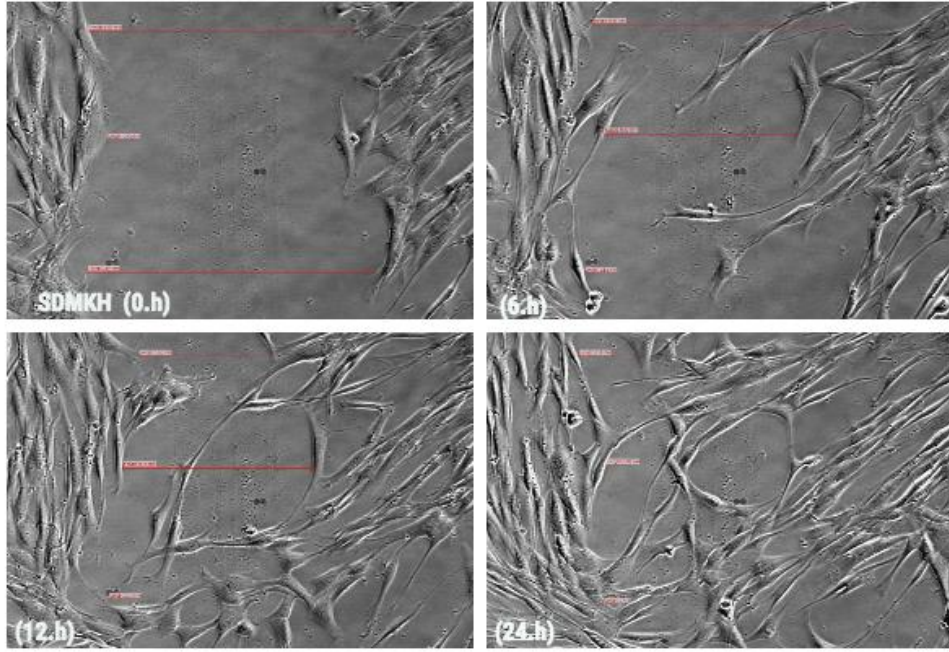
SDKMKH+TAA (NaB) grubunun pre-ALT ve post-ALT değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0,05$). Buna göre post-ALT değeri daha düşüktür. SDKMKH+TAA (NaB) grubunun pre-AST ve post-AST değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0,05$). Buna göre post-AST değeri daha düşüktür.

4.4. Scratch Deneyi (Çizik Deneyi)

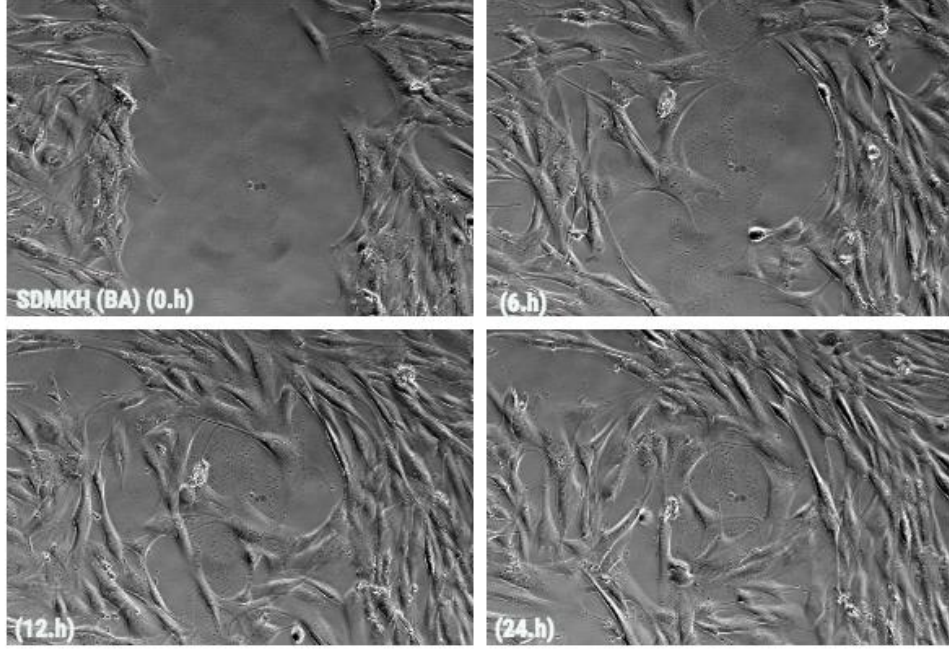
Scratch deneyi, in vitro hücre migrasyonu analizinde deneysel olarak geliştirilmiş ve kolay protokollerden biridir (Glaß ve ark, 2012). İki boyutlu in vitro hücre migrasyonunun ve proliferasyonun gözlenmesi amacıyla uygulanan bu deneyde hücreler en uygun hücre kültür ortamına ekilir, inkübe edilir. Hücreler monolayer olarak konfluens olduklarında sivri uçlu bir cisimle (pipet tip) çizik atılarak, kazıma yapılarak bu tabakanın bir bölgesini çizip kaldırıp, scratch olarak adlandırılan hücreden yoksun alan (Fronza ve ark, 2009; Arranz-Valseo ve ark, 2014), yapay yara oluşturulur (Glaß ve ark, 2012; Jin ve ark, 2016; Iwanabe ve ark, 2016; Johnston ve ark, 2016). Mekanik olarak oluşturulan bu yapay yara veya çizik şekli tipik olarak paralel kenarlı bir bölgedir (Şekil....resim) (Glaß ve ark, 2012) Hücre migrasyonu ve proliferasyonu hücre yayılımının, çizik atılan boş bölgeyi rekolonize kapasitesini araştırmak amacıyla görüntüleri alınır (Jin ve ark, 2016; Johnston ve ark, 2016). LCI cihazı her üç dakikada bir görüntü alıp kaydetmektedir, 0. dakika da ilgili alanı cihaza tanıtır, ilk görüntüyü aldıktan sonra, cihaz otomatik olarak üç dakikada bir görüntüyü kaydediyor. 0., 6., 12., 24. Saatlerde elde edilen görüntüler; 0.h de ilk görüntü, 6.h de (6*60=360:3=120. görüntü), 12.h de 240. görüntü, 24.h de 480. görüntüdür. Belirtilen bu saatlerde alınan her bir faz kontrast mikroskopik görüntüsünde her birinde üç farklı alan, 1. Üst nokta, 2. Orta nokta, 3. Alt nokta olarak belirtilen noktalarda yara çizik genişliği mm olarak ölçüldü ve her görüntüde aynı alan belirlendi.



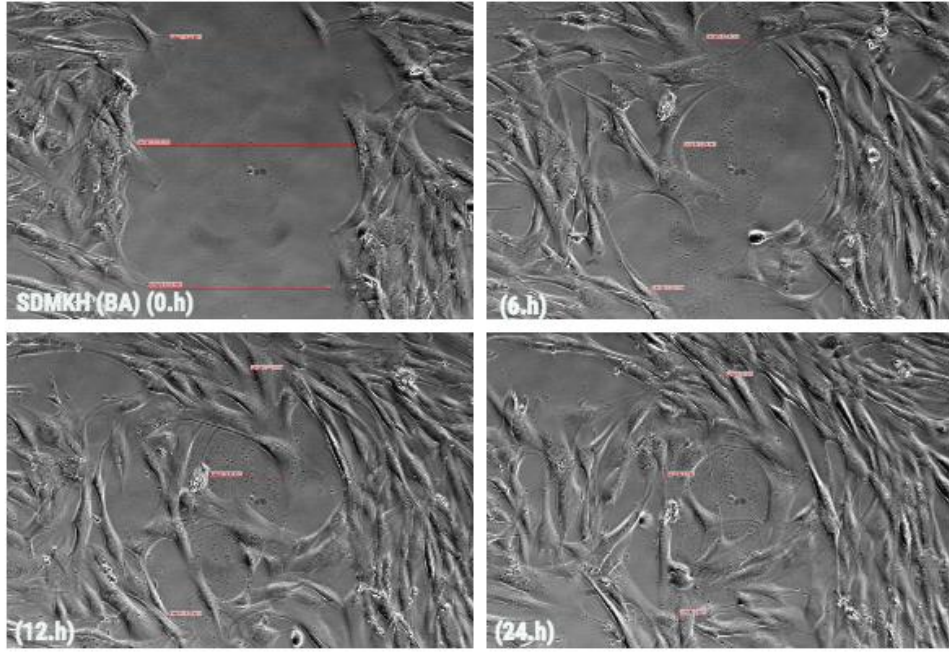
Resim 23. SDKMKH LCI cihazında 0., 6., 12., ve 24.h'lerde alınan görüntüler



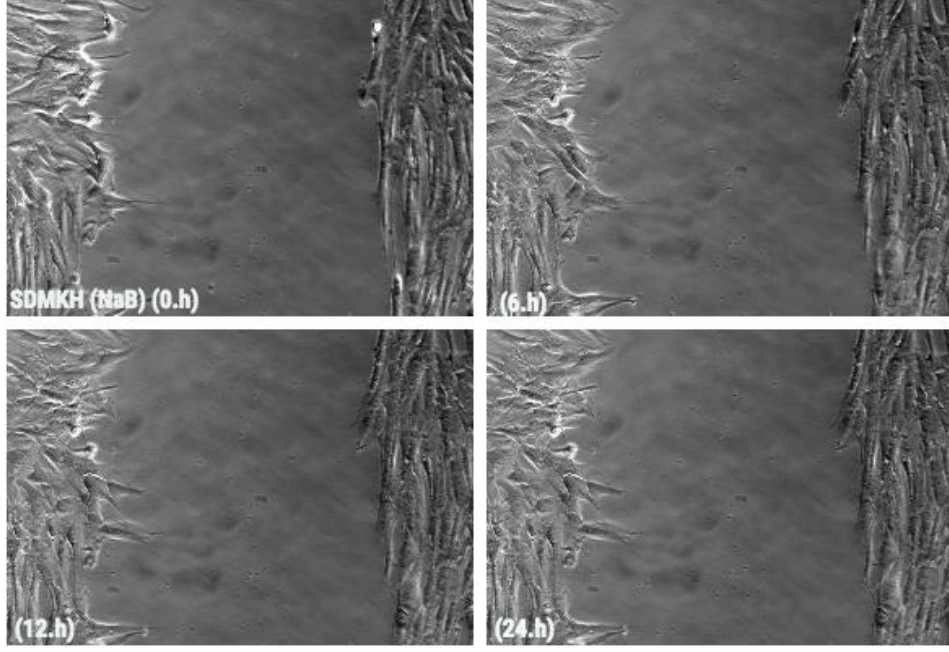
Resim 24. SDKMKH LCI cihazında 0., 6., 12., ve 24.h'lerde alınan görüntüler kapanma ölçümleri



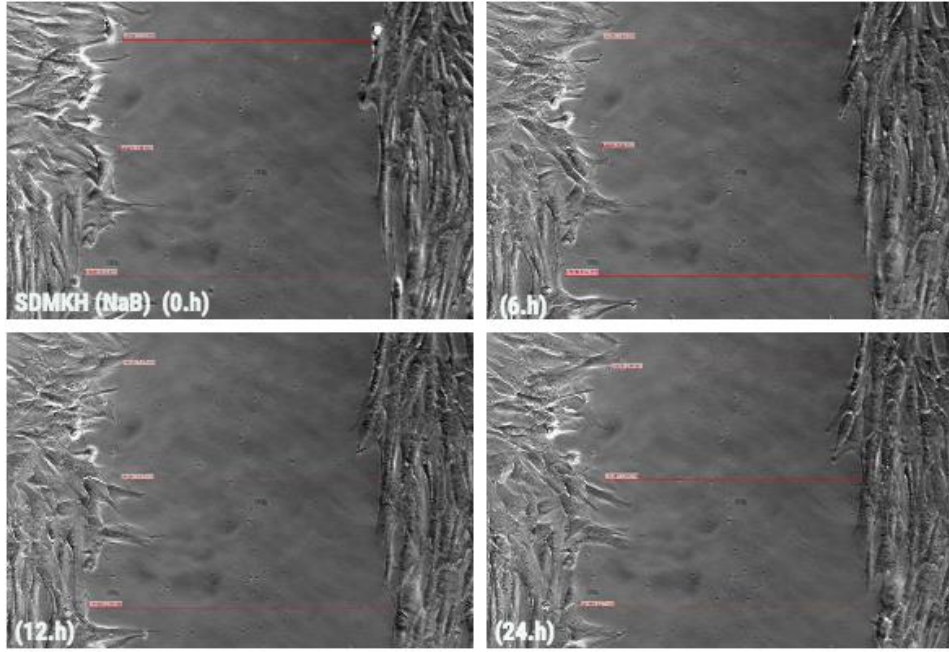
Resim 25. SDMKGH (BA) LCI cihazında 0., 6., 12., ve 24.h’lerde alınan görüntüler



Resim 26. SDMKGH (BA) LCI cihazında 0., 6., 12., ve 24.h’lerde alınan görüntüler kapama ölçümleri



Resim 27. SDMKGH (NaB) LCI cihazında 0., 6., 12., ve 24.h'lerde alınan görüntüler



Resim 28. SDMKGH (NaB) LCI cihazında 0., 6., 12., ve 24.h'lerde alınan görüntüler kapanma ölçümleri

Tablo 55. Scratch deneyi ölçüm sonuçları (LCI)

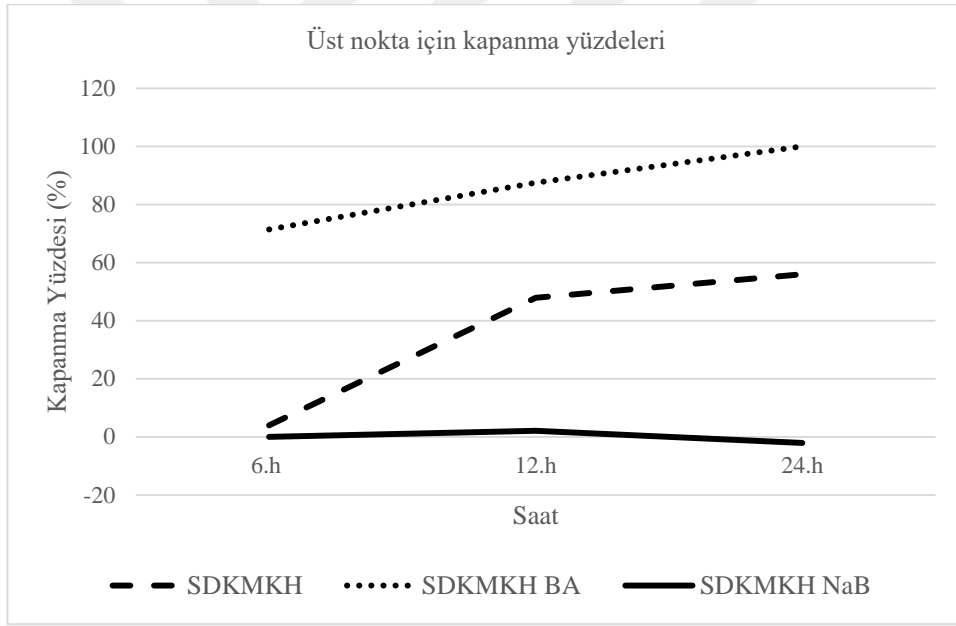
ÖLÇÜM (UZUNLUK:LENGHT)	NOKTALARI	0.h	6.h	12.h	24.h
		0,50 mm	0,48	0,25	0,11
	SDMKH	0,42	0,37	0,36	0,10
		0,55	0,52	0,11	0
1.ÜST NOKTA		0,28	0,08	0,01	0
2.ORTA NOKTA	SDMKH (BA)	0,42	0,29	0,14	0
3.ALT NOKTA		0,35	0,21	0,08	0
		0,48	0,48	0,47	0,46
	SDMKH (NaB)	0,49	0,49	0,49	0,49
		0,57	0,57	0,58	0,57

Tablo 56. Scratch deneyi kapanma aralığı ölçüm sonuçları (LCI)

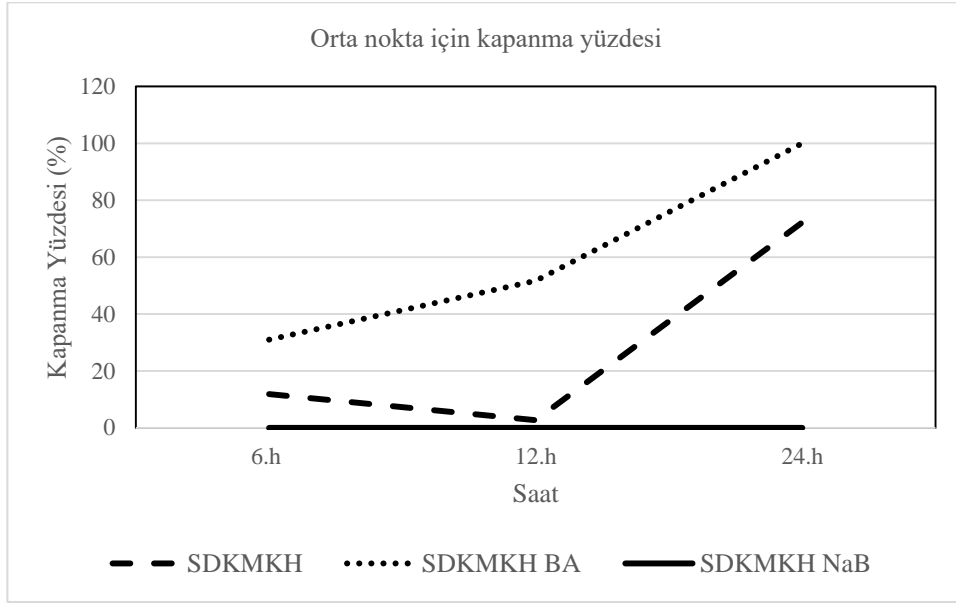
ÖLÇÜM (UZUNLUK:LENGHT)	NOKTALARI	0.h-6.h	6.h-12.h	12.h-24h
		0,02	0,23	0,14
	SDMKH	0,05	0,01	0,26
		0,03	0,41	0,11
1.ÜST NOKTA		0,20	0,07	0,01
2.ORTA NOKTA	SDMKH (BA)	0,13	0,15	0,14
3.ALT NOKTA		0,14	0,13	0,08
		0	0,01	-0,01
	SDMKH (NaB)	0	0	0
		0	0,01	-0,01

Tablo 57. Scratch deneyinde yapay yarannın 6.h., 12.h. ve 24.h kapanma oranları (yüzde değerleri, %)

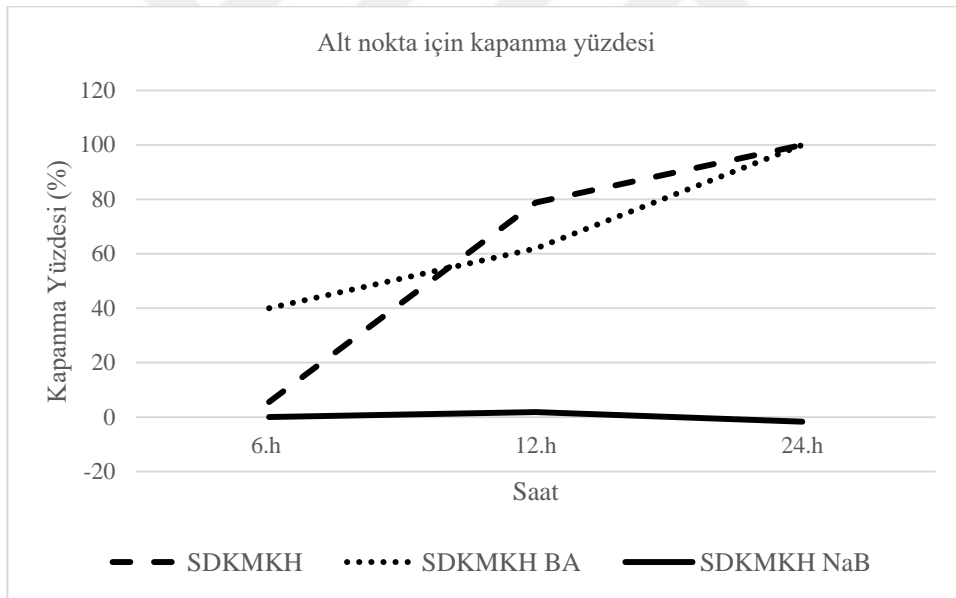
	6.h (%)	12.h (%)	24.h (%)
	4	47,9	56
SDKMKH	11,9	2,7	72,2
	5,5	78,8	100
SDKMKH BA	71,4	87,5	100
	31	51,7	100
	40	61,9	100
	0	2,1	-2,1
SDKMKH (NaB)	0	0	0
	0	1,8	-1,7



Şekil 15. Scratch deneyinde yapay yarannın üst nokta için 6.h., 12.h. ve 24.h kapanma oranları (yüzde değerleri, %).



Şekil 16. Scratch deneyinde yapay yaranın orta nokta için 6.h., 12.h. ve 24.h kapanma oranları (yüzde değerleri, %)

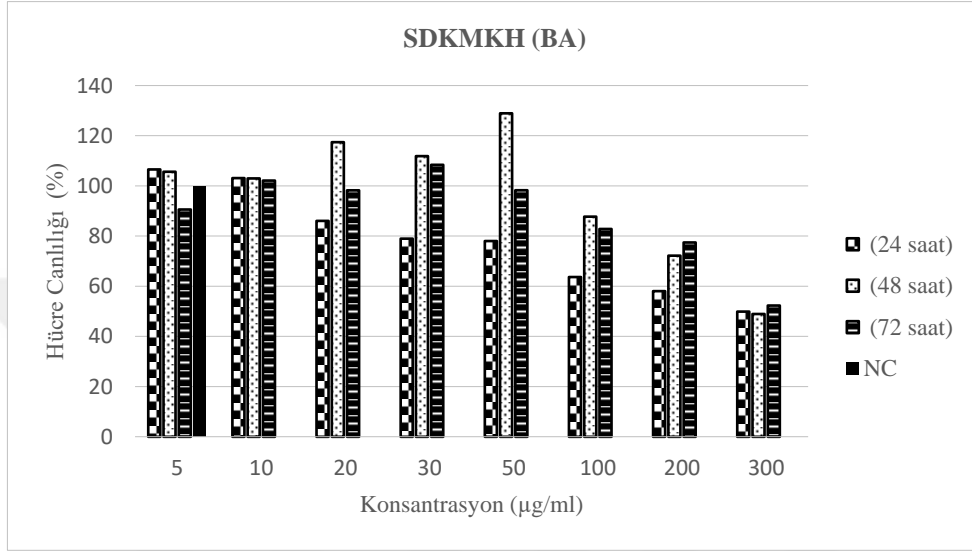


Şekil 17. Scratch deneyinde yapay yaranın alt nokta için 6.h., 12.h. ve 24.h kapanma oranları (yüzde değerleri, %)

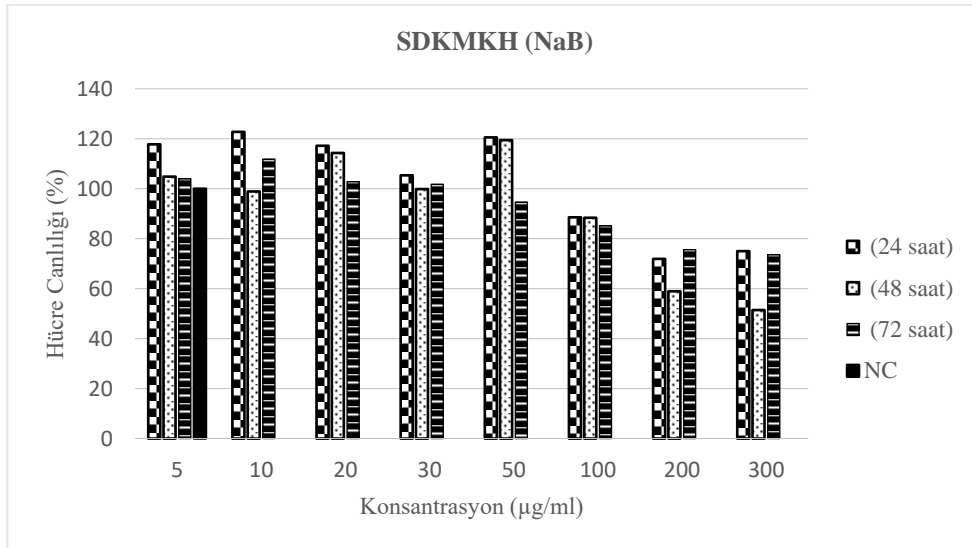
4.5. Sitotoksosite Deneyi (MTS)

BA ve NaB'in toksisitesi, 3 gün boyunca her 24 saatte bir 5, 10, 20, 30, 50, 100, 200 ve 300 (μg) olarak sekiz farklı konsantrasyonda MTS testi kullanılarak ölçüldü. 24, 48, 72 saat olarak kaydedilen her ölçümün ortalaması alınarak ve son olarak da üç kez tekrarlanan

ölçümlerin ortalamaları alınarak grafikler oluşturuldu. (Deney tek aşamada 4 tekrarlı (4 kuyucukta), üç kez tekrarlanmıştır). BA ve NaB'nin, SDKMKH'lerin hayatta kalması üzerindeki etkisi, SDKMKH'lerin, 72 saat boyunca 5-300 µg/ml arasında değişen farklı BA ve NaB dozlarıyla işlenmesiyle incelendi. 10 µg/ml'de BA, hücrelerin hayatta kalmasını 24 saatte %103,13 olarak değiştirmiştir, bu dozda hücre sağ kalımında herhangi bir değişiklik olmamıştır. Bu nedenle, deneylerin geri kalanında 10 µg/ml BA kullanılmıştır.



Şekil 18. SDKMKH'de 24, 48 ve 72. saatte BA'nın sitotoksitesi. Farklı BA konsantrasyonlarının toksisite sonuçları. NC negatif kontrol.

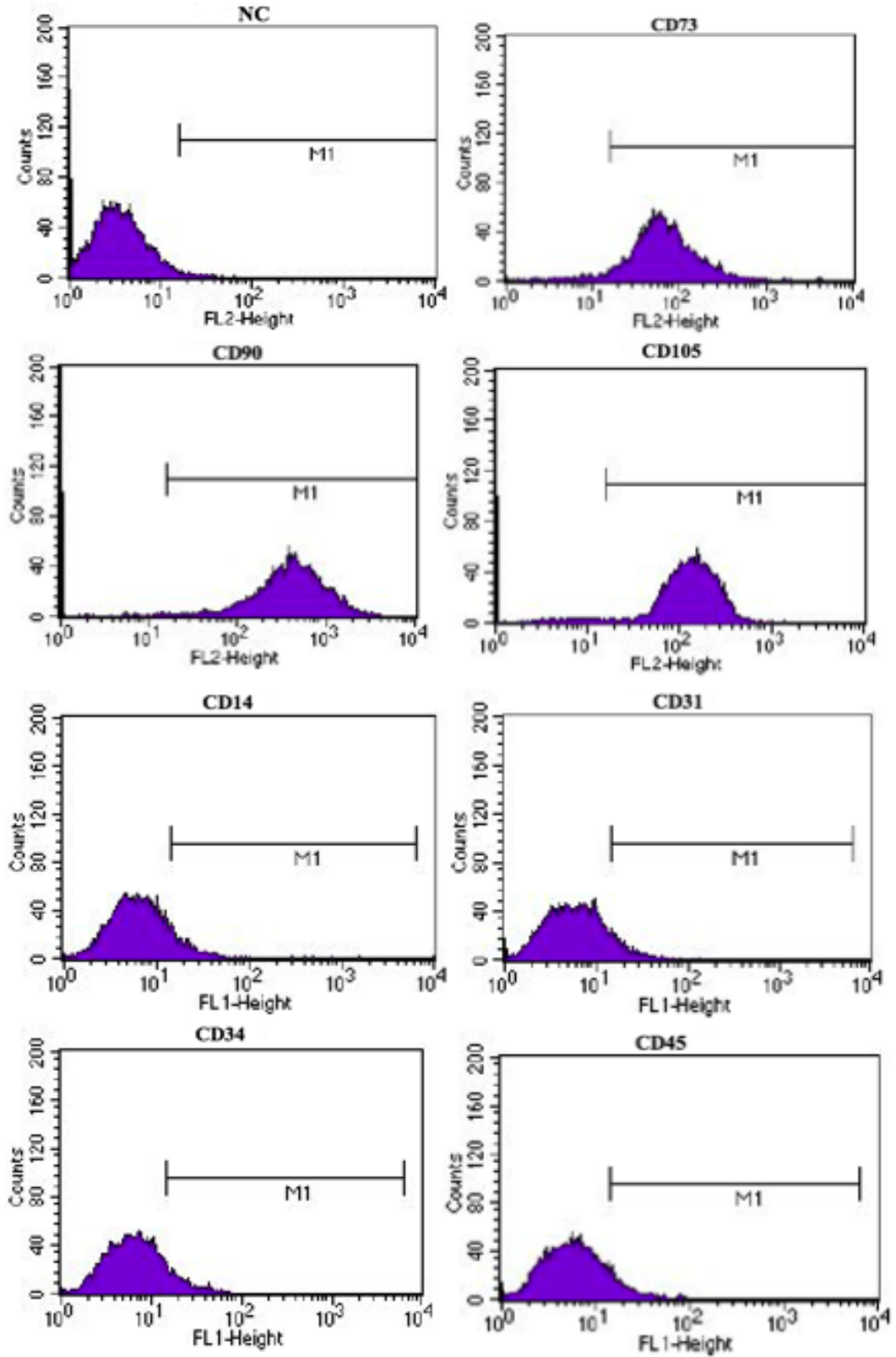


Şekil 19. SDKMKH'de 24, 48 ve 72. saatte NaB'nin sitotoksitesi. Farklı NaB konsantrasyonlarının toksisite sonuçları. NC negatif kontrol.

4.6. Akış Sitometri (Flow Sitometri)

Kültür ortamlarında morfolojik olarak incelendiklerinde fuziform şekilli, fibroblast benzeri görünümü olan SDKMKH'ler immunofenotipik özellikleri itibariyle CD14, CD31, CD34, CD45 gibi tipik hematopoietik belirteçleri göstermezler, buna karşın CD73, CD90, CD105 gibi non-hematopoietik hücre yüzey belirteçlerini eksprese ederler (Agha ve ark, 2017).

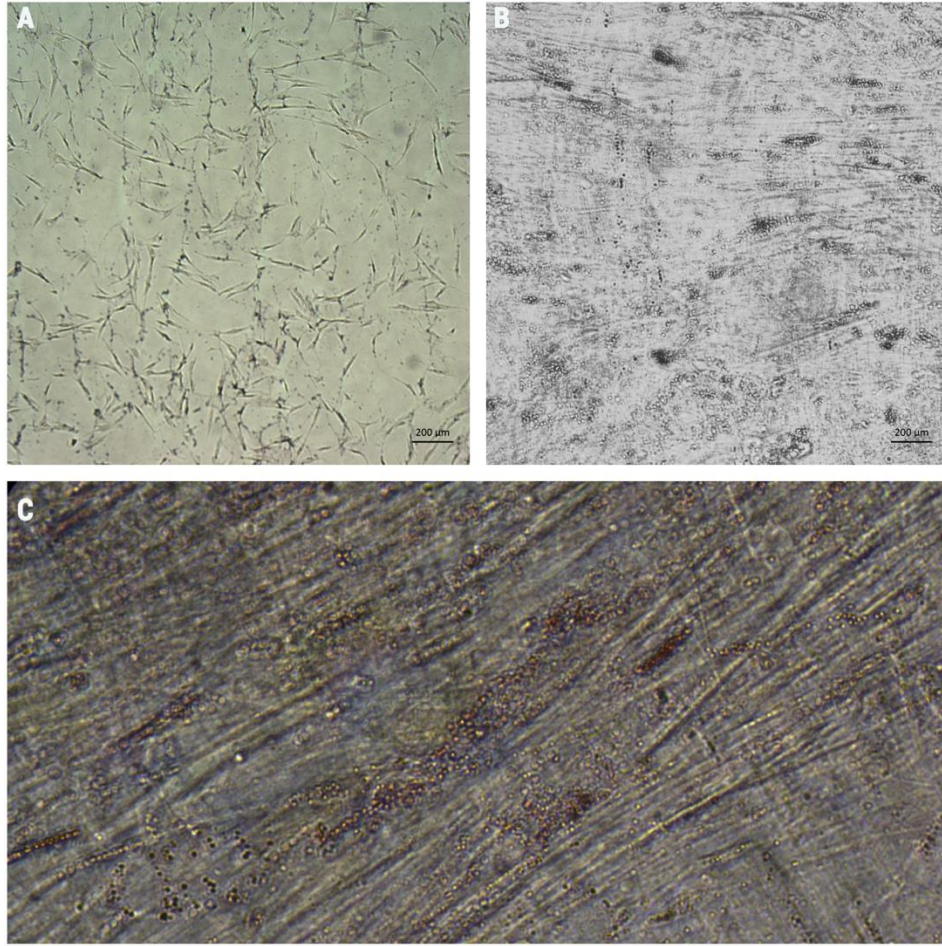




Şekil 20. İnsan sünet derisi kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonu.

SDKMKH'lerin mezenkimal kök hücre yüzey belirteçleri için pozitif (CD73, CD90, CD105) ve hematopoetik kök hücre yüzey belirteçleri için negatif (CD14, CD31, CD34 ve CD45), akış sitometri analizi ile tespit edildi. NC, negatif kontrol.

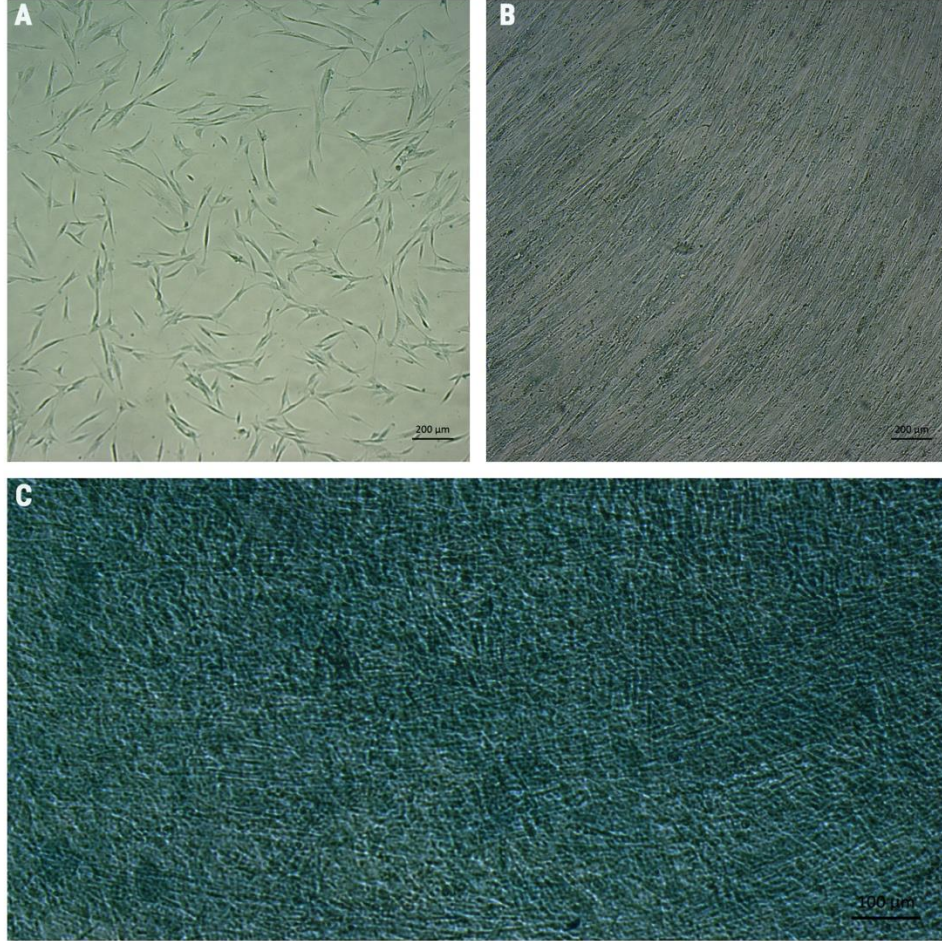
4.7. Kök Hücre Farklılaştırma Deneyi



Resim 29. Adipojenik farklılaştırma deneyi görüntüleri (ZEISS, Axio Vert.A1 invert mikroskobu ile görüntüleme (Yeditepe Üniversitesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Moleküler Diagnostik Laboratuvarı))

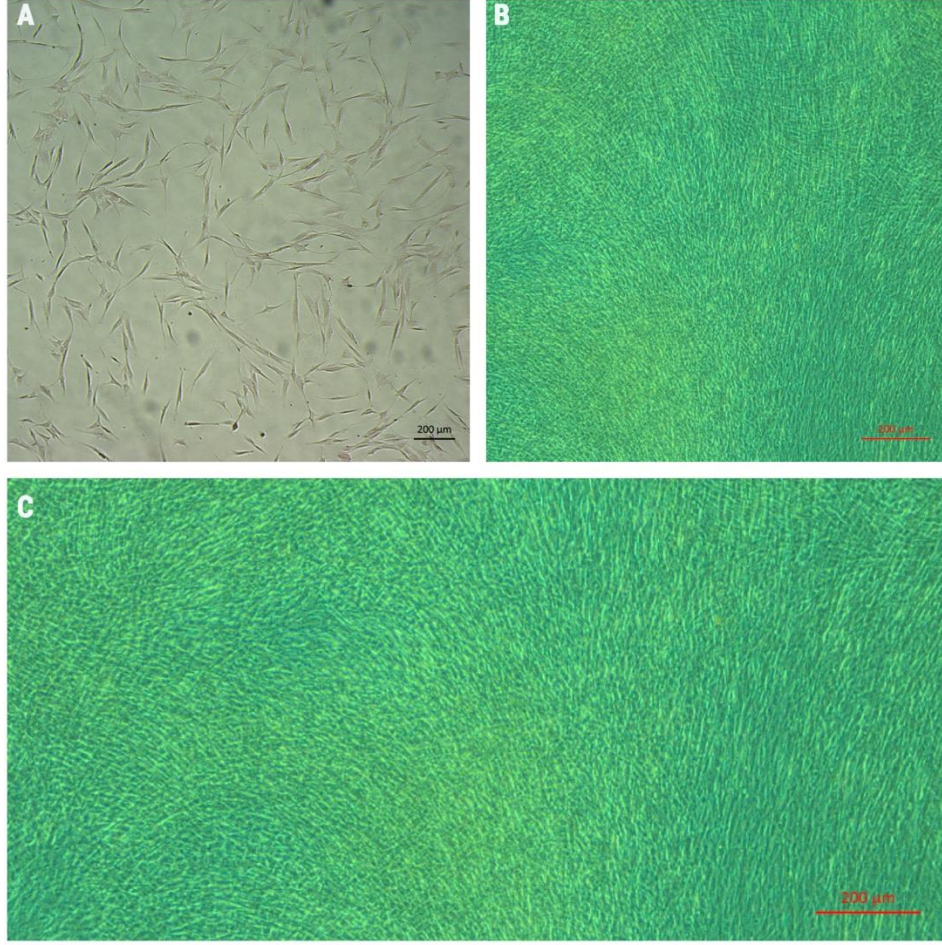
Yaklaşık 14 gün inkübasyon sonucunda Oil Red O boyası ile boyanan hücreler sarı-turuncu renge gözlemlenen yağ damlacıklarını içermektedir. A harfi ile belirtilen kontrol grubunda konfluans olmamış durumda görüntü alındığı için hücrelerin morfolojileri belirgin olmasına ve ayrı ayrı seçilememesine rağmen C harfi ile ifade edilen görüntüde ise 14 günlük bir adipojenik farklılaştırma deneyi sonrası hücre yoğunlu (over-konfluens) durumundan dolayı hücrelerin morfolojileri ayırt edilememekle birlikte bu hücreler Oil Red

O boyası ile sarı-turuncu renge gözlemlenen yağ damlacıkları içermektedirler. Burada Resim 29 A-B ve C deki görüntülerle adipojenik farklılaştırmanın gerçekleştiğinin göstergesidir.



Resim 30. Kondrojenik farklılaştırma deneyi görüntüleri (ZEISS, Axio Vert.A1 invert mikroskobu ile görüntüleme (Yeditepe Üniversitesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Moleküler Diagnostik Laboratuvarı))

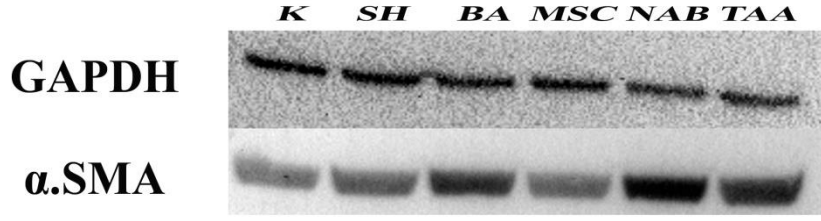
Resim 30-A, kontrol grubunda kondrojenik farklılaştırma besiyeri ile inkübe edilmeyen hücrelerde negatif bir alcian blue gözlemlenirken, bu deney sonucunda da alcian blue ile oldukça iyi boyanmış hücreleri gözlemlemekteyiz. Bu deneyimizde yaklaşık 21 gün boyunca devam etmektedir, hücrelerin 21 gün boyunca inkübasyonlarından dolayı morfolojileri kontrol grubu A resminde olduğu gibi ayrı ayrı seçilememektedir. Kondrojenik farklılaşmanın göstergesi olarak hücreler Resim 30-C'de olduğu gibi pozitif boyanmış olarak gözlemlenmektedir.



Resim 31. Osteojenik farklılaştırma deneyi görüntüleri (ZEISS, Axio Vert.A1 invert mikroskobu ile görüntüleme (Yeditepe Üniversitesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Moleküler Diagnostik Laboratuvarı))

Resim 31-A'da kontrol olarak isimlendirdiğimiz hücreleri 6 kuyucuklu platede yaptığımız Von Kossa boyaması sonucu hücrelerin boyanmadığını, farklılaştırma besiyerinde inkübe ettiğimiz platede Von Kossa boyaması ile boyanan hücreler osteojenik farklılaşmanın olduğunu göstermektedir. Yaklaşık 21 gün boyunca osteojenik farklılaşma için inkübe edilen hücrelerin aşırı konfluens durumları kaynaklı morfolojileri net seçilememekle birlikte boyanma özellikleri ile osteojenik olarak farklılaştıklarını Resim 31-B ve 31-C'de gözlemleyebilmekteyiz.

4.8. Western Blotlama



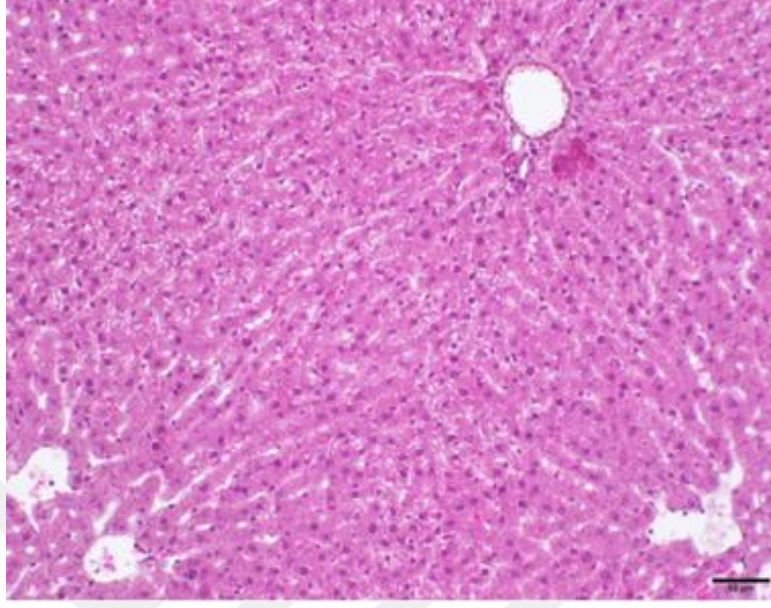
Şekil 20. Alfa-SMA antikoru western bandlaşma gösterimi

Şekil 20’de GAPDH ile normalize edilen western deneyimizde alfa SMA antikoru ile sonuca ulaşırken yaptığımız tekrarlamalarda kollajen 1 alfa antikorusunun deneyde bandlaşma göstermediğini gözlemledik.

4.9. Histopatolojik Bulgular

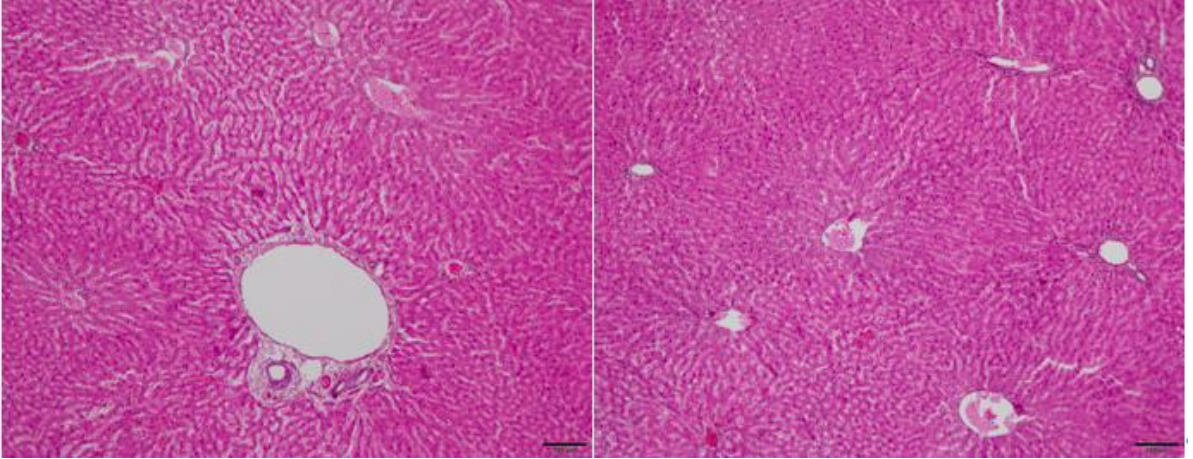
Karaciğer fibrozisi, rutin hematoxilen-eozin, pikro sirius kırmızısı ve anti-alfa düz kas aktin (α -SMA), kollajen 1 α (coll α) immünohistokimyasal boyaları kullanılarak değerlendirildi. Morfolojik görüntü değerlendirmesi yapabilmek ve inflamasyon alanlarının gözlemlenebilmesi içinde rutin hematoxilen eozin boyası yapıldı.

4.9.1. Kontrol Grubu Hematoksilen Eozin Boya Kesit Görüntülerini Morfolojik Olarak Değerlendirme



Resim 32. Kontrol grubu Hematoksilen-eozin, (20X).

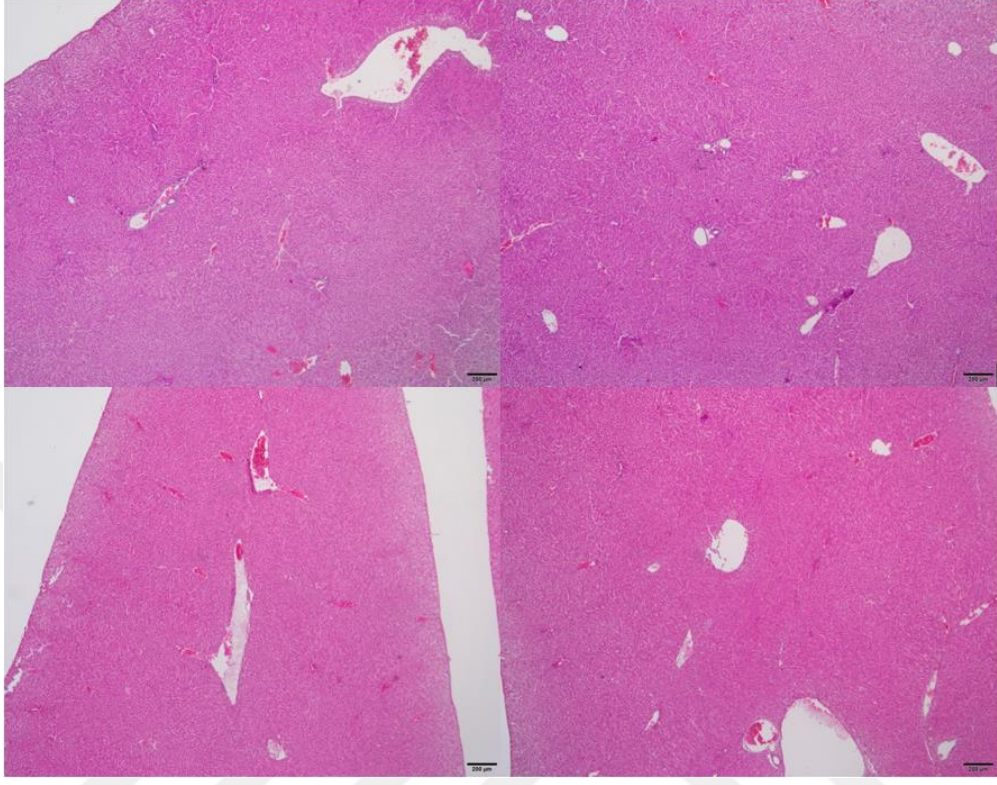
Resim 32’ de kontrol grubu, hematoksilen-eozin, kesit görüntüsünde portal alan ve sentral ven yapısında herhangi bir yapısal farklılık gözlenmemektedir (20X).



Resim 33. Kontrol grubu Hematoksilen-eozin, (10X).

Resim 33’de kontrol grubu hematoksilen-eozin kesit görüntülerinde portal alan ve sentral ven yapısında herhangi bir yapısal farklılık gözlenmemektedir. Hepatositler sağlıklı gözükmemektedirler. (Hematoksilen-eozin boyama, 10X).

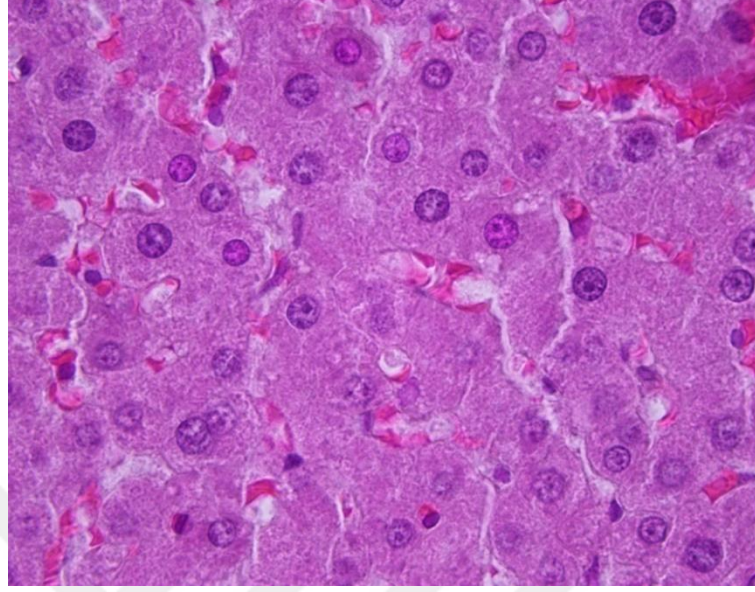
4.9.2. Sham Grubu Hematoksilen Eozin Boya Kesit Görüntülerini Morfolojik Olarak Değerlendirme



Resim 34. Sham grubu Hematoksilen-eozin, (4X).

Resim 34’de sham grubu, hematoksilen-eozin kesit görüntülerinde portal alan ve sentral ven yapısında herhangi bir yapısal farklılık gözlenmemektedir (4X).

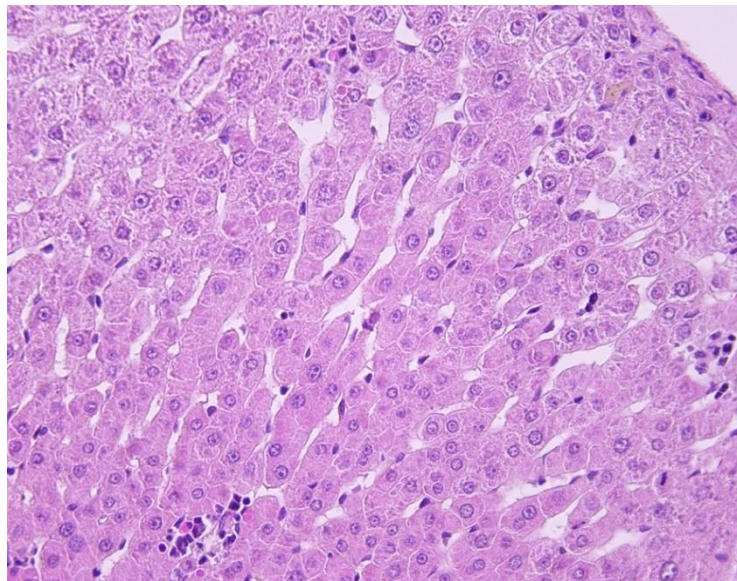
4.9.3. TAA Grubu Hematoksilen Eozin Boya Kesit Görüntülerini Morfolojik Olarak Değerlendirme



Resim 35. TAA grubu Hematoksilen-eozin, (100X).

Resim 35’de TAA grubu, hematoksilen-eozin kesit görüntülerinde gözlemlenen yapısal değişiklikler; hepatositlerde granüler dejenerasyonla birlikte hemorajik alanlardır (100X).

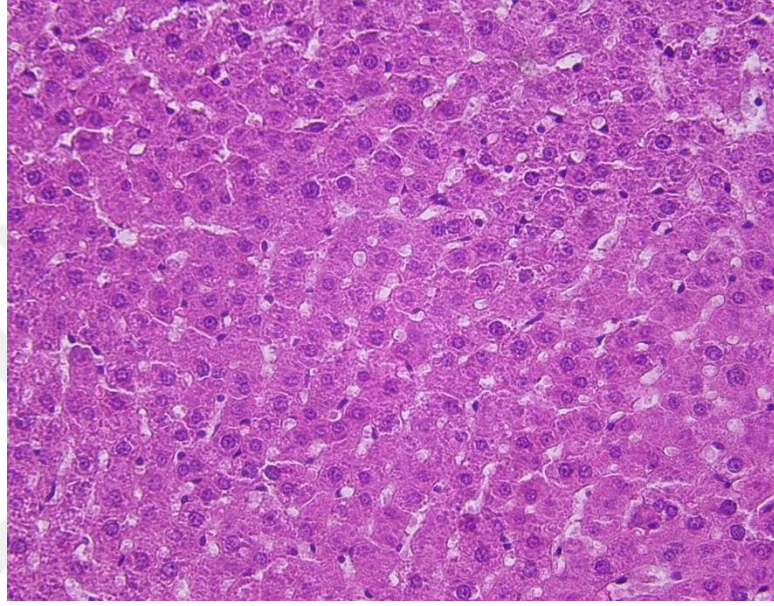
4.9.4. TAA+SDKMKH Grubu Hematoksilen Eozin Boya Kesit Görüntülerini Morfolojik Olarak Değerlendirme



Resim 36. TAA+SDKMKH Grubu Hematoksilen Eozin (40X).

Resim 36'da TAA+SDKMKH Grubu Hematoksilen Eozin boyama kesit görüntüsünde sinuzoidal dilatasyonlarla birlikte granüler dejenerasyon gözlenmektedir (40X).

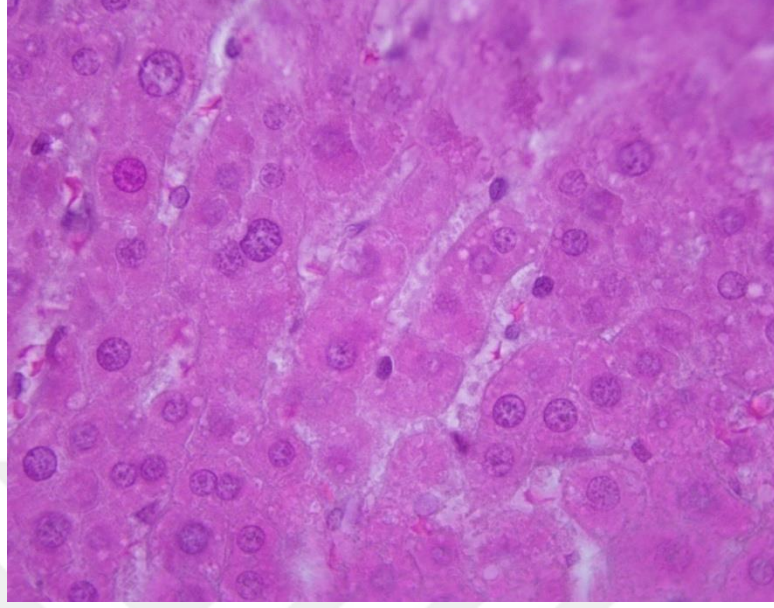
4.9.5. TAA+SDKMKH (BA) Grubu Hematoksilen Eozin Boya Kesit Görüntülerini Morfolojik Olarak Değerlendirme



Resim 37. TAA+SDKMKH (BA) Grubu Hematoksilen Eozin (40X).

Resim 37'de TAA+SDKMKH (BA) Grubu Hematoksilen Eozin boyası kesit görüntüsünde sinuzoidal dilatasyonlarla birlikte granüler dejenerasyon gözlenmektedir (40X).

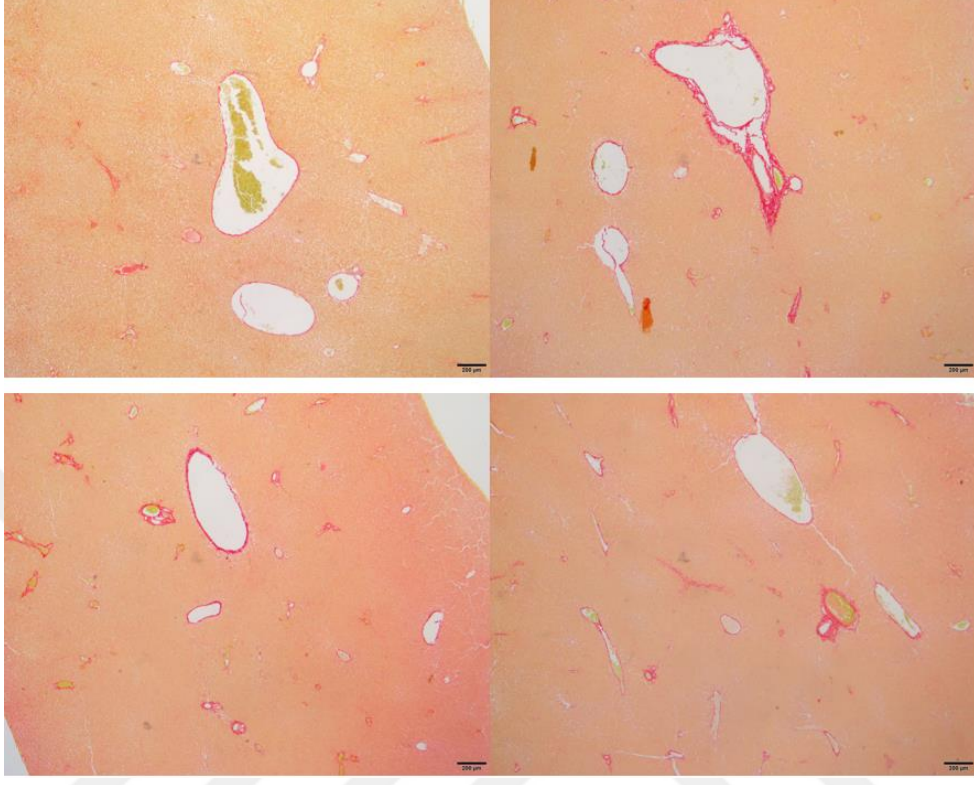
4.9.6. TAA+SDKMKH (NaB) Grubu Hematoksilen Eozin Boya Kesit Görüntülerini Morfolojik Olarak Değerlendirme



Resim 38. TAA+SDKMKH (NaB) Grubu Hematoksilen Eozin (100X).

Resim 38’de TAA+SDKMKH (NaB) Grubu Hematoksilen Eozin boyası kesit görüntüsünde sinuzoidal dilatasyonlarla birlikte vakuolar dejenerasyon gözlenmektedir (100X).

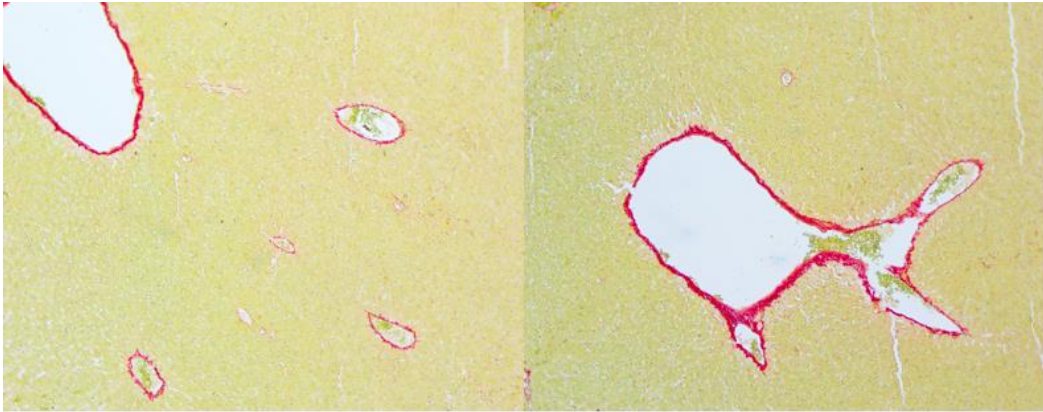
4.9.7. Kontrol Grubu Pikro Sirius Kırmızısı Boya Kesit Görüntülerinde Histopatolojik Değerlendirme



Resim 39. Kontrol grubu Pikro Sirius Kırmızısı, (4X).

Resim 39’da kontrol grubu, pikro sirius kırmızısı, kollajen lif birikimi perisentral ve portal alanda normal gözlemlenmektedir (4X).

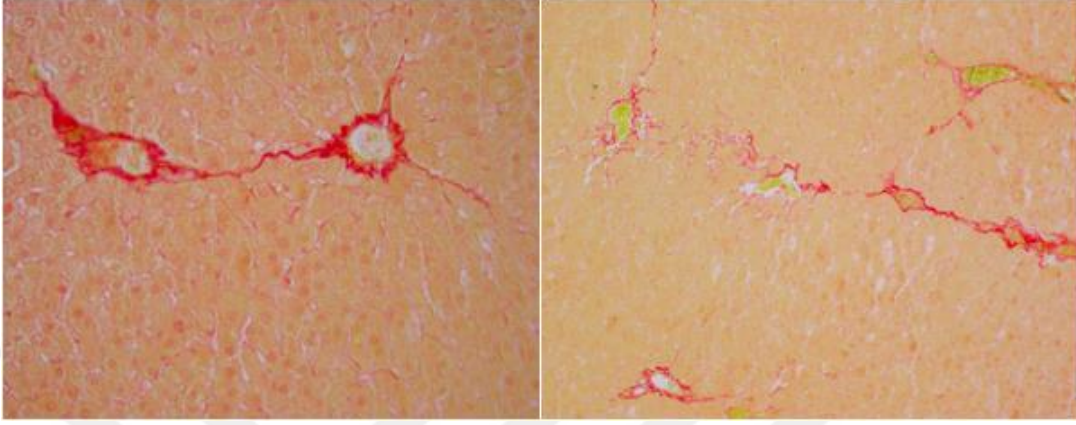
4.9.8. Sham Grubu Pikro Sirius Kırmızısı Boya Kesit Görüntülerinde Histopatolojik Değerlendirme



Resim 40. Sham grubu Pikro Sirius Kırmızısı, (10X).

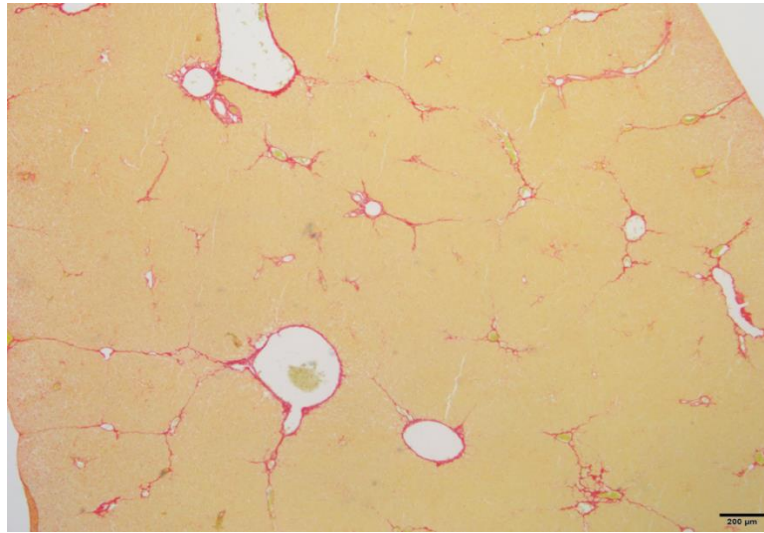
Resim 40'da sham grubu, pikro sirius kırmızısı, kollajen lif birikimi perisentral ve portal alanda normal gözlemlenmektedir (10X).

4.9.10. TAA Grubu Pikro Sirius Kırmızısı Boya Kesit Görüntülerinde Histopatolojik Değerlendirme



Resim 41. TAA grubu Pikro Sirius Kırmızısı, (40X-20X).

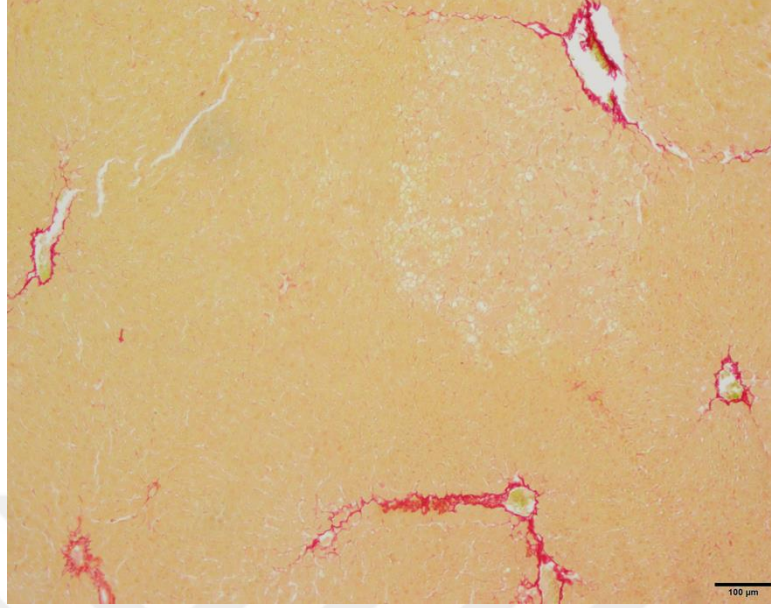
Resim 41'de, TAA grubu, pikro sirius kırmızısı, iki sentral ven arası bölgede ve sentral venden ışınal tarzda uzanan kollajen birikim alanları gözlemlenmektedir, perisinüzoidal alanda (Disse alanı) kollajen birikimi gözlenmektedir (40X-20X).



Resim 42. TAA grubu Pikro Sirius Kırmızısı, (4X) (++)

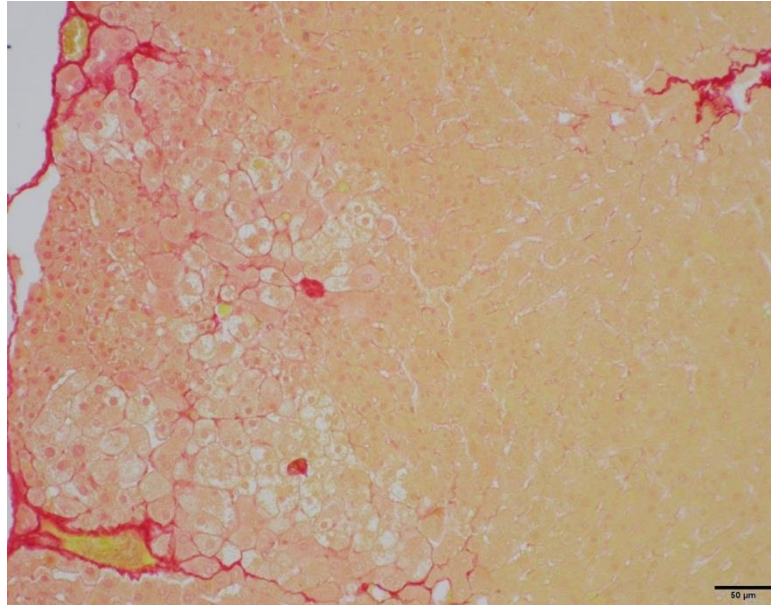
Resim 42'de TAA grubu pikro sirius kırmızısı, hepatik lobül etrafında hepatik septa artışları. TAA grubu, pikro sirius boyası, sıçan karaciğer dokusunda, kırmızı-pembe olarak boyanan çizgilenmeler kollajen birikim alanları, portal alanda artan kollajen birikimi ile birlikte portal-portal alan ve sentral-sentral ven arası orta şiddet köprüleşme söz konusudur.

Sentral ven etrafı, perisentral bölgede de kollajen artışı gözlenmektedir. Hepatik lobül etrafında ve hepatosit kordonları arasında kolajen birimi söz konusudur (4X).



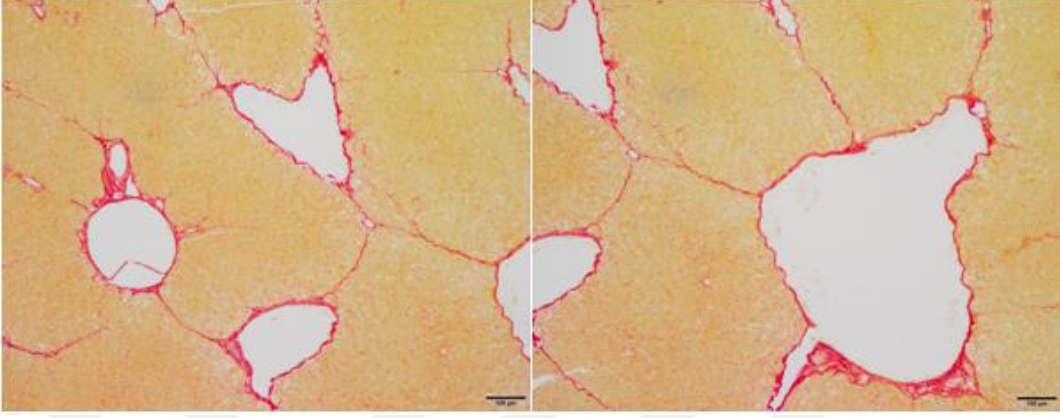
Resim 43. TAA grubu Picro Sirius Kırmızısı, (10X).

Resim 43’de TAA grubu, picro sirius kırmızısı, sentral ven etrafında kollajen artışı, birikimi ile birlikte sentral-sentral ven arası köprüleşme orta şiddettedir ve aynı şekilde sentral ven yakınında orta şiddette vakuolar dejenerasyon gözlenmekte ve bu dejeneratif bölgede hepatositler arası alanda kollajen artışı kırmızılı boyalı alanlarla tespit edilmektedir (10X).



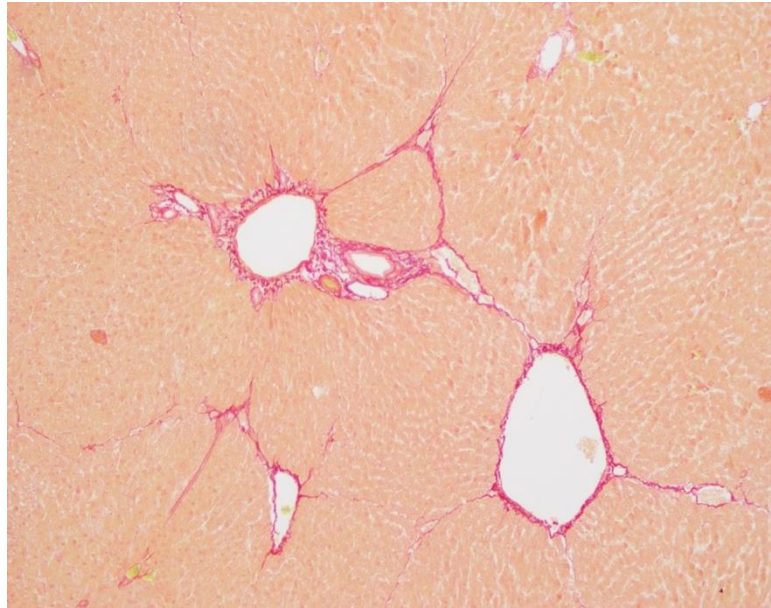
Resim 44. TAA grubu Picro Sirius Kırmızısı, (10X).

Resim 44’de TAA grubu, pikro sirius kırmızısı, orta şiddette vakuolar dejenerasyon gözlenmekte ayrıca dejeneratif hücrelerde yağ damlacıkları gözlemlenmekte ve bu dejeneratif bölgede hepatositler arası alanda kolajen artışı kırmızılı boyalı alanlarla tespit edilmektedir (40X).



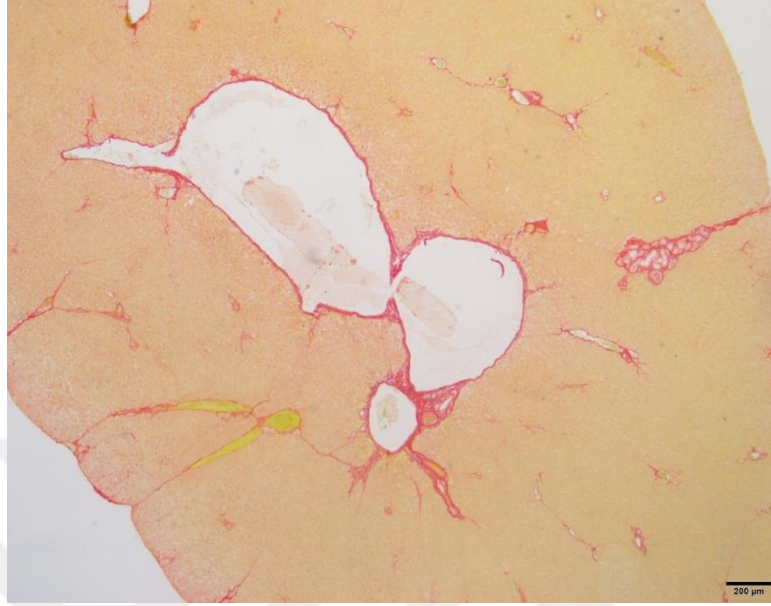
Resim 45. TAA grubu (Pikro Sirius Kırmızısı, 10X).

Resim 45’de TAA grubu, pikro sirius kırmızısı, kollajen birikiminde artışla birlikte, hepatik safra kanal proliferasyonu gözlenmektedir. Bu kesit görüntülerinde hepatik parankimde kollajen birikimi ile oluşan köprüleşmeler gözlenmektedir ve damarlar arasında köprüleşme şeklindedir (10X).



Resim 46. TAA grubu Pikro Sirius Kırmızısı, (4X).

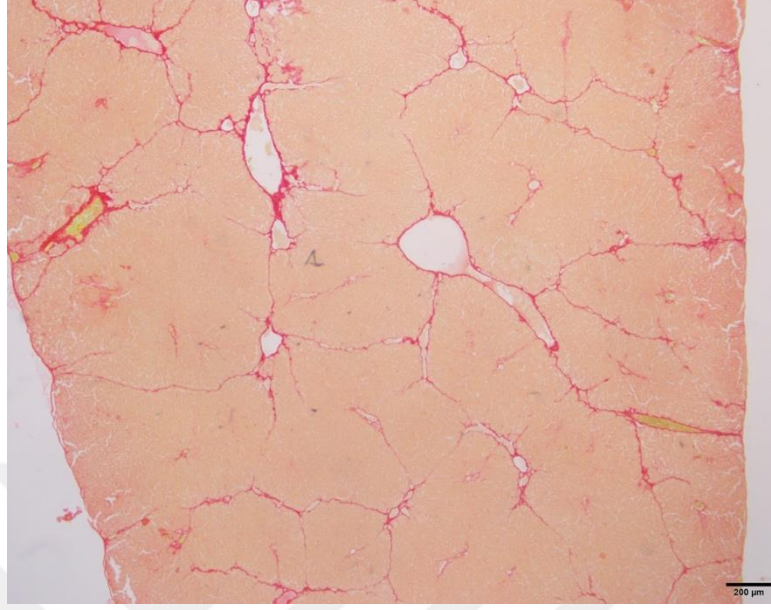
Resim 46'da TAA grubu, pikro sirius kırmızısı, orta şiddette portal alan köprüleşmesi mevcuttur. Damarlar çevresinde kollajen birikimi artışı belirginleşmiştir.



Resim 47. TAA grubu, Picro Sirius Kırmızısı, (4X).

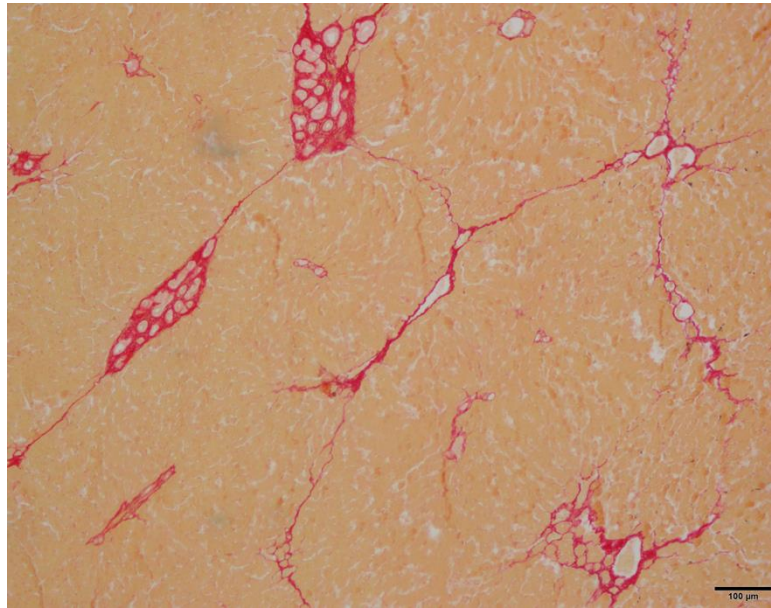
Resim 47'de TAA grubu, pikro sirius kırmızısı, periportal alanda kollajen artışı gözlenmektedir ve aynı zamanda portal triadda gözlenen hepatik safra kanal proliferasyonu ile birlikte hepatik parankim içinde de safra kanalı proliferasyonu ile birlikte kollajen birikimi gözlenmektedir.

4.9.11. TAA+SDKMKH Grubu Picro Sirius Kırmızısı Boya Kesit Görüntülerinde Histopatolojik Değerlendirme



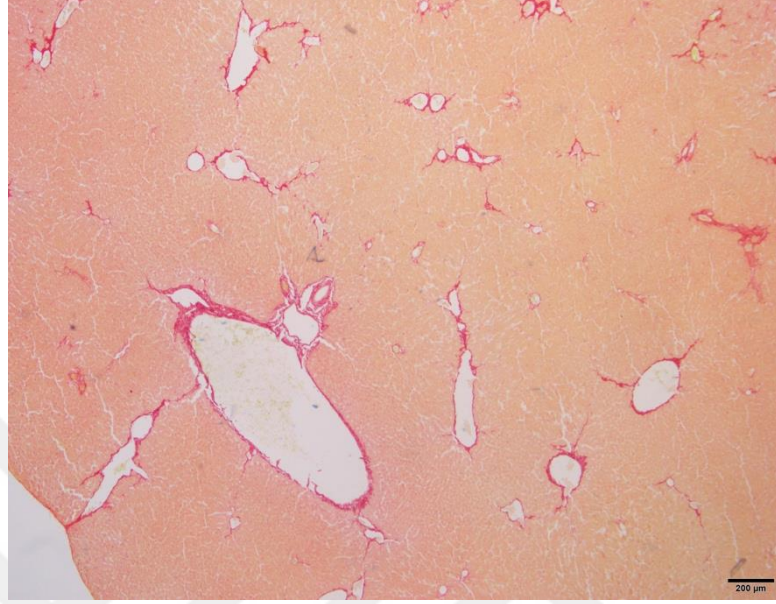
Resim 48. TAA+SDKMKH grubu Picro Sirius Kırmızısı, (4X).

Resim 48’de TAA+SDKMKH grubu, picro sirius kırmızısı, hepatic lobülleri belirginleştirir şekilde kollajen lif artışları gözlenmektedir, orta şiddette bir kollajen artışı gözlemlenmektedir (++) (4X).



Resim 49. TAA+SDKMKH grubu (++) Picro Sirius Kırmızısı, (10X).

Resim 49’da TAA+SDKMKH grubu, Pikro Sirius Kırmızısı, karaciğer kesit görüntülerinde portal alanda hepatik safra kanal proliferasyonu ve kanallar etrafında artan kollajen lif birikimi ile birlikte kolanjiyo-fibrozis gözlenmektedir (10X-20X).



Resim 50. TAA+SDKMKH grubu (+) Pikro Sirius Kırmızısı, (4X).

Resim 50’ de TAA+SDKMKH grubu, pikro sirius kırmızısı, damarların etrafını belirginleştirir şekilde kollajen lif artışları gözlenmektedir, hafif şiddette bir kollajen artışı gözlemlenmektedir (+) (4X). (TAA+SDKMKH grubu + ile ++ arasında değişmektedir).

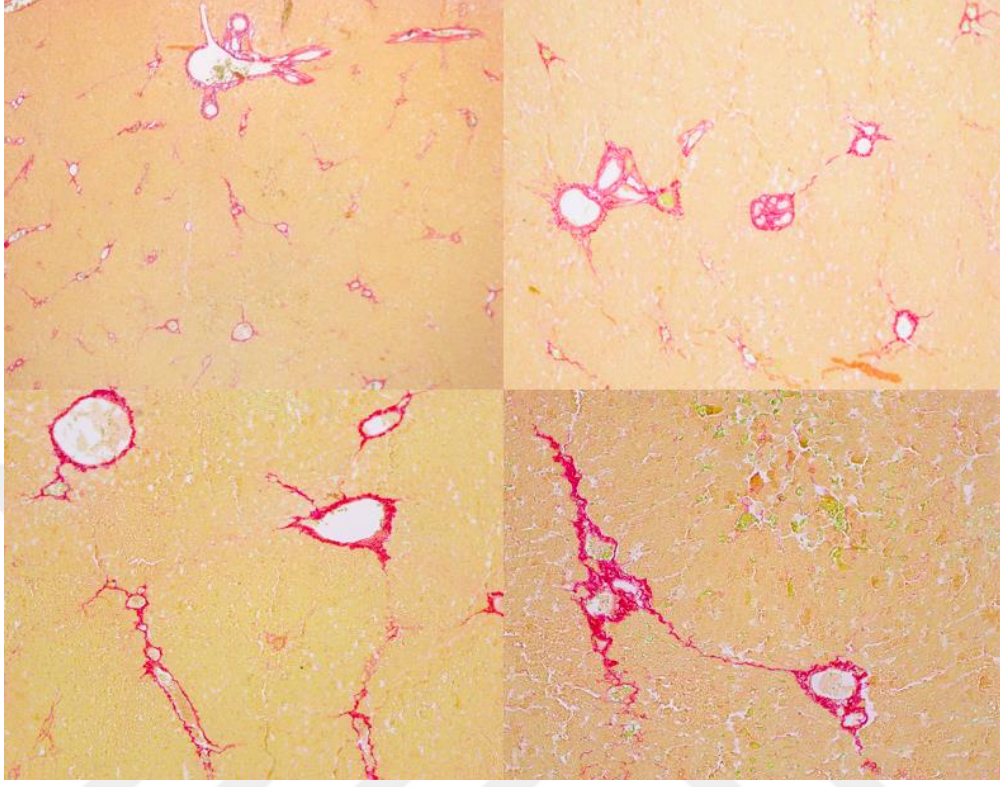
4.9.12. TAA+SDKMKH (BA) Grubu Pikro Sirius Kırmızısı Boya Kesit Görüntülerinde Histopatolojik Değerlendirme



Resim 51. TAA+SDKMKH (BA) grubu (+) Pikro Sirius Kırmızısı, (10X).

Resim 51’de TAA+SDKMKH (BA) grubunda, pikro sirius kırmızısı, TAA grubunda gözlemlediğimiz portal alanlarda kollajen lif artışını azalmış olarak gözlemlemekteyiz, ayrıca vakuolar dejenerasyonlar kaybolmakla birlikte granüler dejenerasyonlar izlenmektedir (10X).

4.9.13. TAA+SDKMKH (NaB) Grubu Pikro Sirius Kırmızısı Boya Kesit Görüntülerinde Histopatolojik Değerlendirme



Resim 52. TAA+SDKMKH (NaB) grubu (+ ile ++ arasında) Pikro Sirius Kırmızısı, (4X-10X-10X-20X).

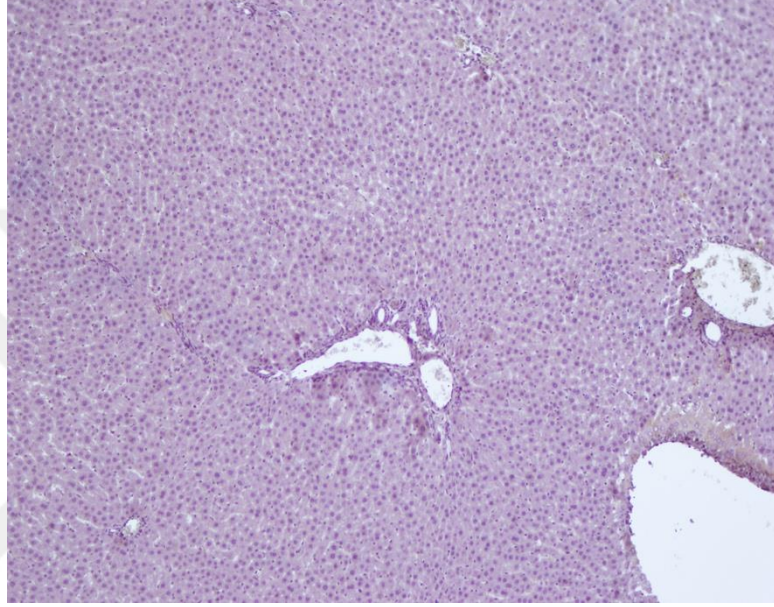
Resim 52’de TAA+SDKMKH (NaB) grubu, pikro sirius kırmızısı ile boyalı kesit görüntülerinde kollajen birikimi alanları özellikle portal alan etrafında gözlemlenmektedir. Portal-portal alan arası köprüleşmelerle birlikte artan sayıda hepatik safra kanalları gözlemlenmektedir (4X-10X-10X-20X). (TAA+SDKMKH (NaB) + ile ++ arasında değişmektedir).

4.10. Karaciğer doku örneklerinin immunohistokimyasal değerlendirilmesi

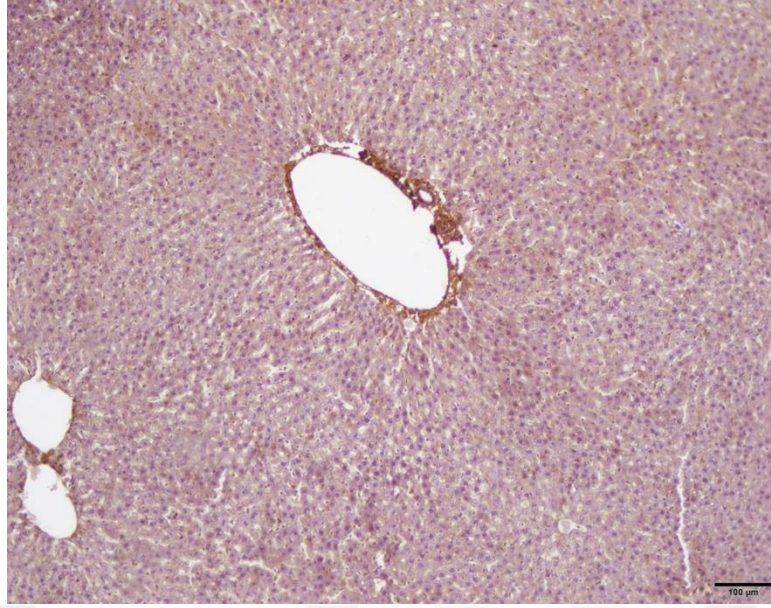
Karaciğer doku örnekleri, kit protokolüne göre formol ile fikse edilmiş, sonrasında uygun doku takibi aşamaları ile parafine gömülü olarak mikrotom cihazında kesit alınmıştır. 4 µm kalınlığında alınan doku kesit örnekleri anti-alfa düz kas aktin (anti α -SMA) ve anti-kollajen1 α 1 (anti-coll1 α 1) antikoları ile immünohistokimyasal olarak boyanmıştır.

Anti-alfa düz kas Aktin [EPR5368] (ab124964) ve anti-koll1 α 1 (ab34710) antikorları ile immunhistokimyasal olarak boyanan karaciğer dokusu kesit örneklerinin tüm gruplarda değerlendirilmesi.

4.10.1. Kontrol grubunda anti-alfa düz kas aktin (anti α -SMA) ve anti-kollajen1 α 1 (anti-coll1 α 1) antikorları ile boyanan kesit görüntülerinin immunhistokimyasal olarak değerlendirilmesi

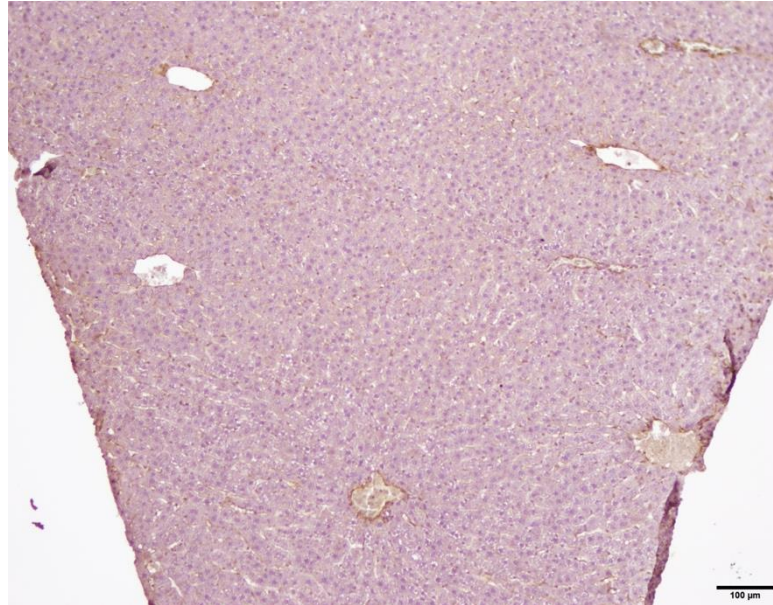


Resim 53. Kontrol grubu negatif kontrol (NC) immunohistokimyasal kesit görüntüsü (20X).



Resim 54. Kontrol grubu immunohistokimyasal kesit görüntüleri anti-kollajen1 α 1 (anti-coll1 α 1) (10X).

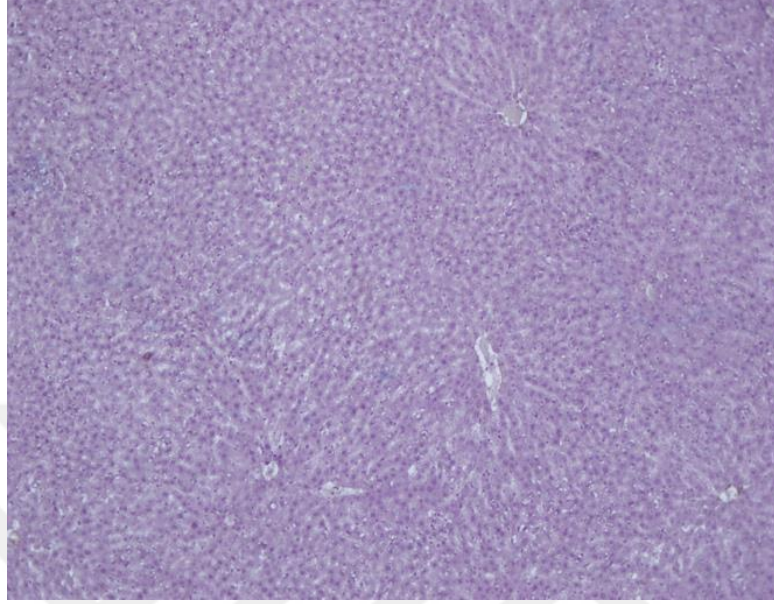
Resim 54'de Kontrol grubu damar etrafında anti-kollajen1 α 1 ile boyanan immunohistokimyasal kesit görüntüsünde kollajen birikimi normal seyrindedir, (10X).



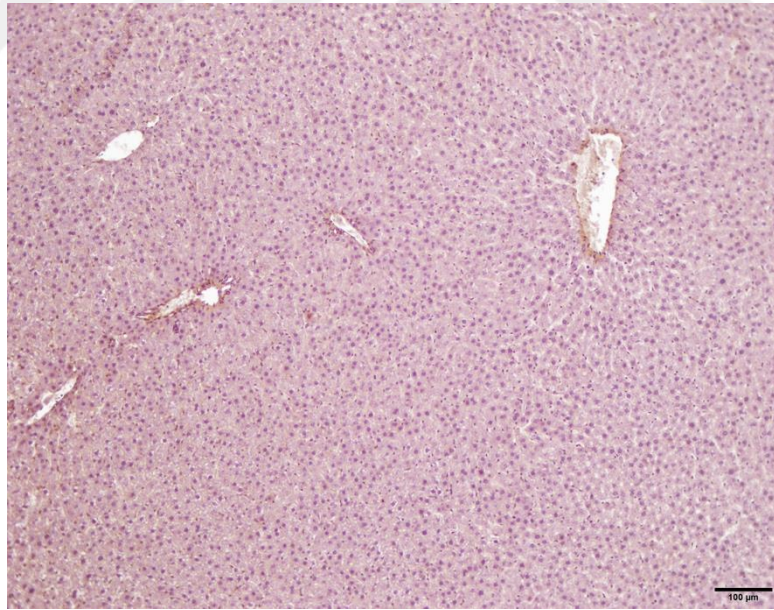
Resim 55. Kontrol grubu immunohistokimyasal kesit görüntüleri, anti α -SMA, (10X).

Resim 55'de Kontrol grubu immunohistokimyasal kesit görüntüleri (anti α -SMA, 10X) boyanma senral ven etrafında oldukça hafiftir.

4.10.2. Sham grubunda anti-alfa düz kas aktin (anti α -SMA) ve anti-kollajen1 α 1 (anti-coll1 α 1) antikorum ile boyanan kesit görüntülerinin immunohistokimyasal olarak değerlendirilmesi

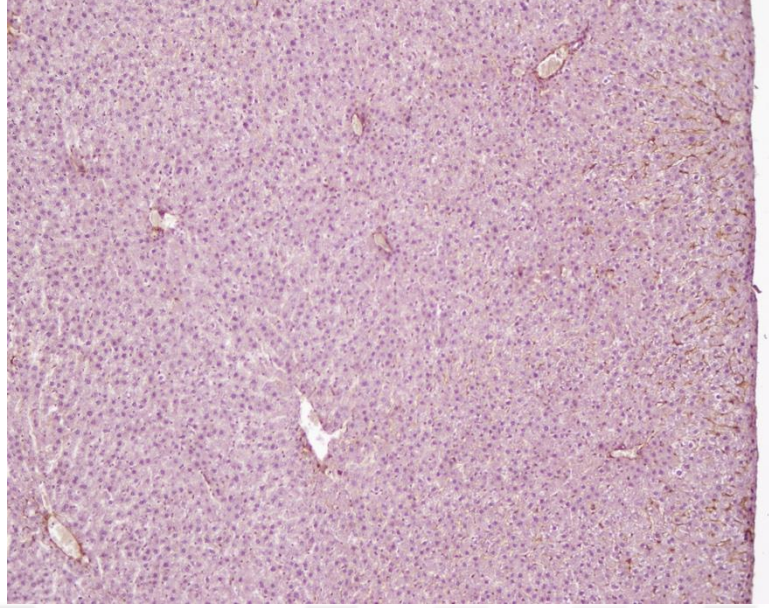


Resim 56. Sham grubu negatif kontrol (NC) immunohistokimyasal kesit görüntüsü, (10X).



Resim 57. Sham grubu immunohistokimyasal kesit görüntüleri anti-kollajen1 α 1 (anti-coll1 α 1), kollajen birikimi dokuda normal seyrindedir (10X).

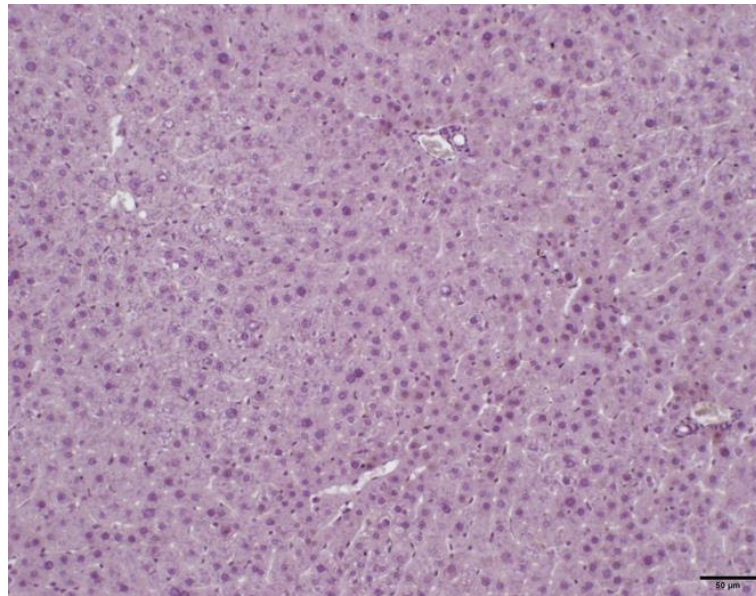
Resim 57’de sham grubu anti-kollajen1 α 1 (anti-coll1 α 1) ile immunohistokimyasal olarak boyanmış kesit görüntülerinde kollajen birikimi dokuda normal seyrindedir (10X).



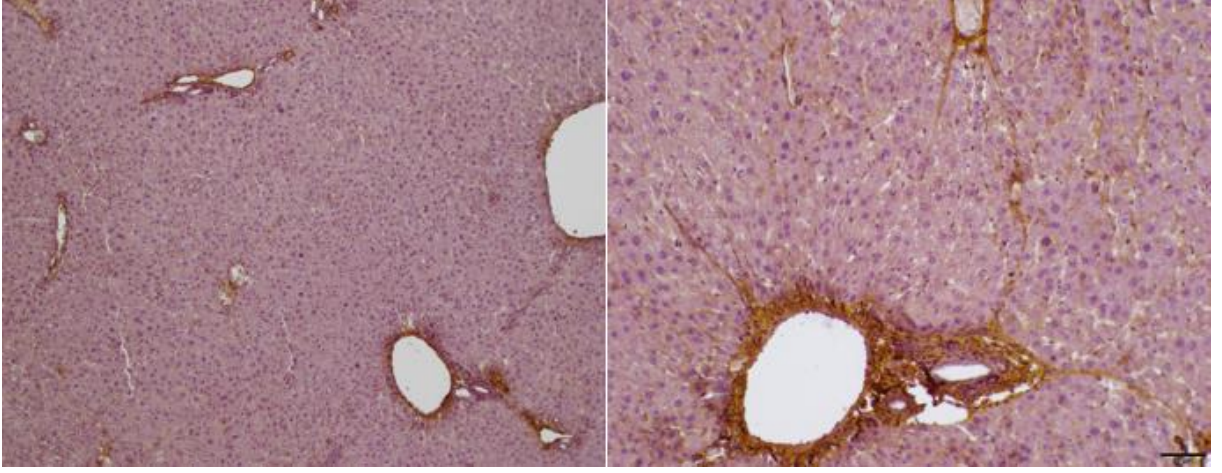
Resim 58. Sham grubu immunohistokimyasal kesit görüntüleri (anti α -SMA,10X).

Resim 58’de sham grubu immunohistokimyasal kesit görüntüleri (anti α -SMA,10X) boyanma senral ven etrafında oldukça hafiftir.

4.10.3. TAA grubunda anti-kollajen1 α 1 (anti-coll1 α 1) ve anti-alfa düz kas aktin (anti α -SMA) antikolları ile boyanan kesit görüntülerinin immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi

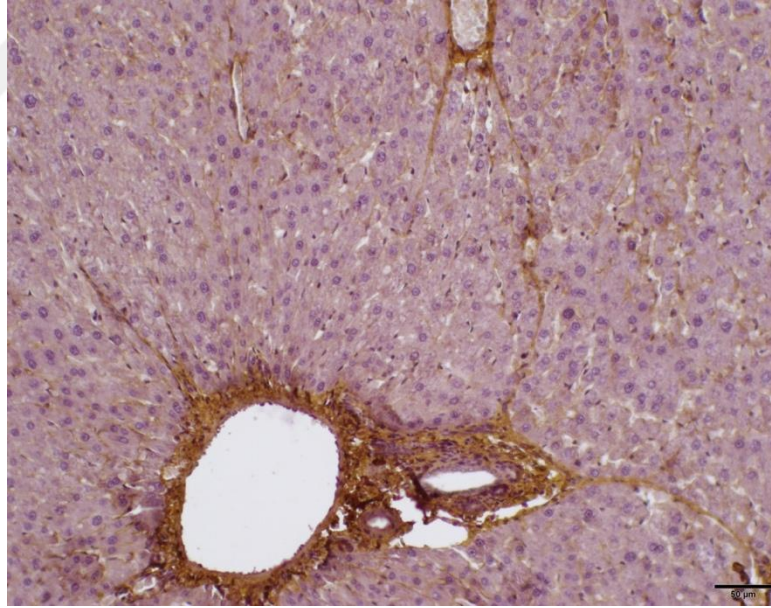


Resim 59. TAA grubu negatif kontrol (NC) immunohistokimyasal kesit görüntüsü (10X).



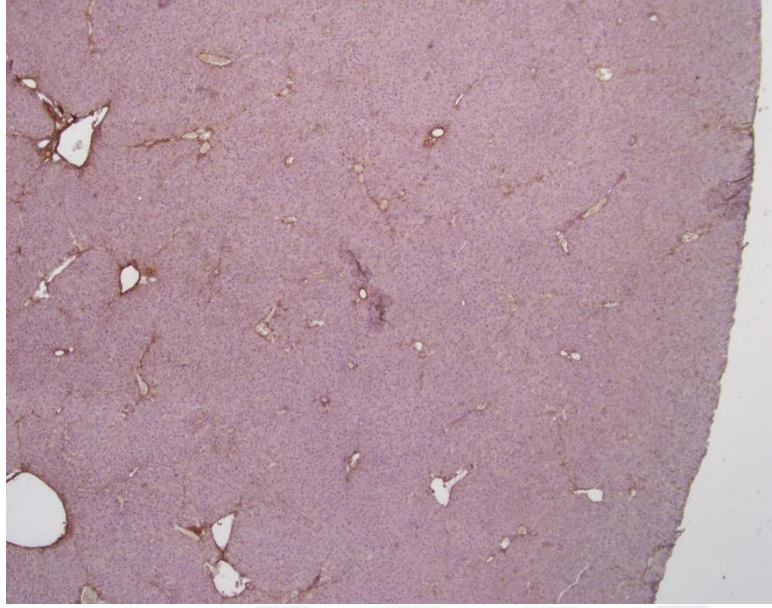
Resim 60. TAA grubu immunohistokimyasal kesit görüntüleri anti-kollajen1 α 1 (++) (anti-coll1 α 1), (10X-20X).

Resim 60' da TAA grubu immunohistokimyasal kesit görüntülerinde, anti-kollajen1 α 1 (anti-coll1 α 1), kollajen birikimi dokuda hepatositler arasında, damar etrafında ve özellikle portal alanda artmış olarak gözlemlenmektedir (10X-20X).



Resim 61. TAA grubu immunohistokimyasal kesit görüntüleri anti-kollajen1 α 1 (++) (anti-coll1 α 1), (20X).

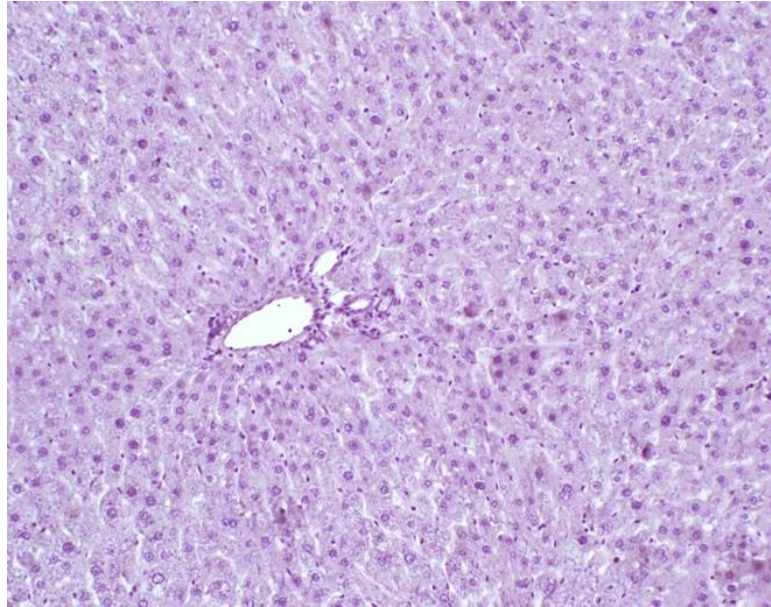
Resim 61' de TAA grubu immunohistokimyasal kesit görüntülerinde, anti-kollajen1 α 1 (anti-coll1 α 1), kollajen birikimi dokuda hepatositler arasında, damar etrafında ve özellikle portal alanda artmış olarak gözlemlenmektedir (20X).



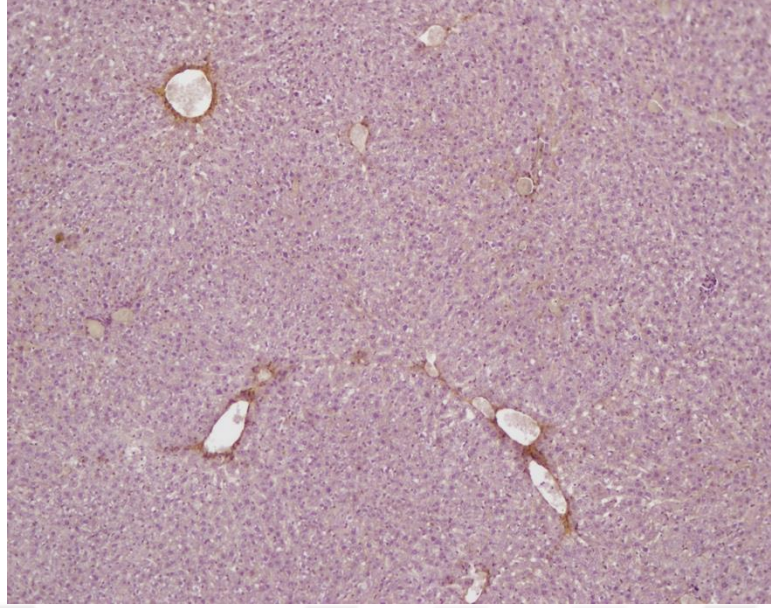
Resim 62. TAA grubu immunohistokimyasal kesit görüntüleri SMA (+) (anti α -SMA,4X).

Resim 62' de TAA grubu immunohistokimyasal kesit görüntüleri (anti α -SMA,10X) boyanma senral ven ve portal alan etrafında ve köprüleşmelerde gözlenmektedir (+).

4.10.4. TAA+SDKMKH grubunda anti-kollajen1 α 1 (anti-coll1 α 1), anti-alfa düz kas aktin (anti α -SMA) antikorları ile boyanan kesit görüntülerinin immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi

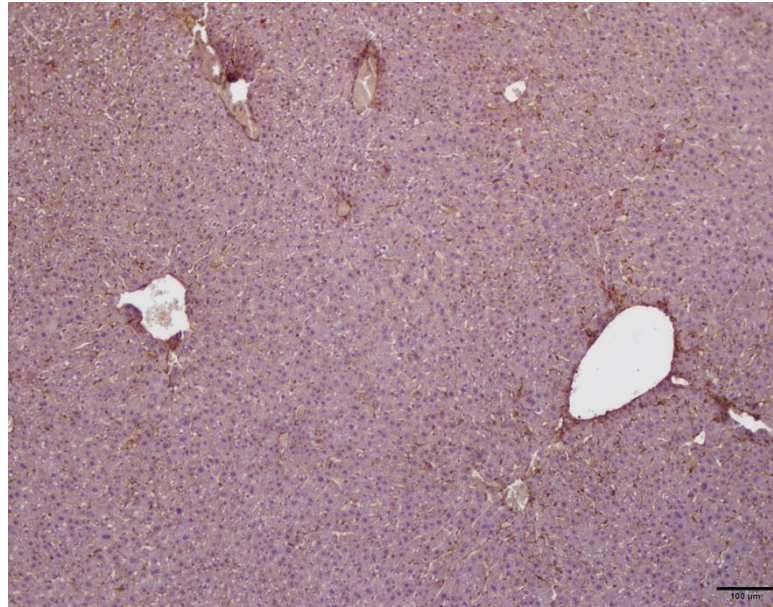


Resim 63. TAA+SDKMKH grubu negatif kontrol (NC) immunohistokimyasal kesit görüntüsü, (10X).



Resim 64. TAA+SDKMKH grubu anti-kollajen1 α 1 (anti-coll1 α 1) immunohistokimyasal kesit görüntüsü, (+) (10X).

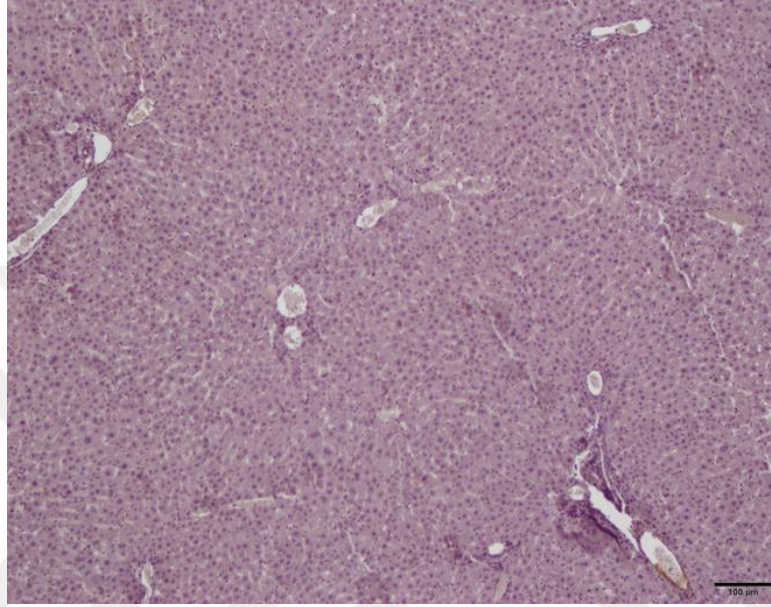
Resim 64' de TAA+SDKMKH grubu immunohistokimyasal kesit görüntüsünde anti-kollajen1 α 1 (anti-coll1 α 1) portal alan-portal alan arası hafif köprüleşmede kollajen birikimi anti-kollajen1 α 1 antikoru ile pozitif boyanmıştır.



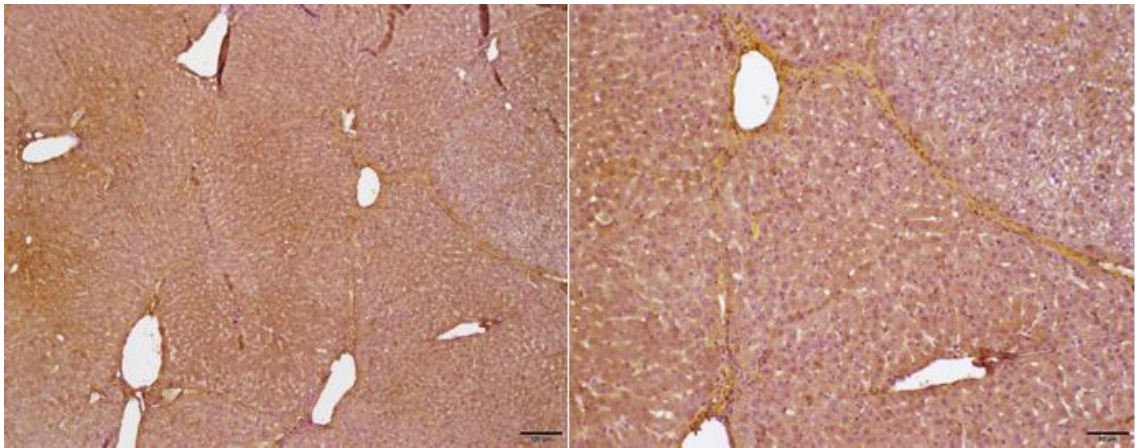
Resim 65. TAA+SDKMKH grubu immunohistokimyasal kesit görüntüleri, anti α -SMA, (10X).

Resim 65’ de TAA+SDKMKH grubu immunohistokimyasal kesit görüntüleri (anti α -SMA,10X) boyanma damarlar etrafında ve hepatik parankimde gözlenmektedir (+).

4.10.5. TAA+SDKMKH (BA) grubunda anti-kollajen1 α 1 (anti-coll1 α 1) ve anti-alfa düz kas aktin (anti α -SMA) antikorları ile boyanan kesit görüntülerinin immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi

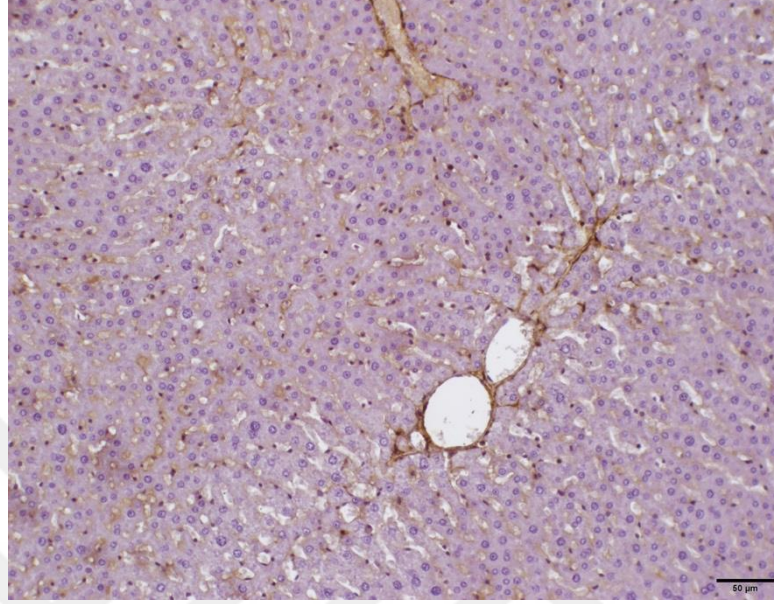


Resim 66. TAA+SDKMKH (BA) grubu negatif kontrol (NC) immunohistokimyasal kesit görüntüsü, (10X).



Resim 67. TAA+SDKMKH (BA) grubu immunohistokimyasal kesit görüntüleri anti-kollajen1 α 1 (anti-coll1 α 1) (10X).

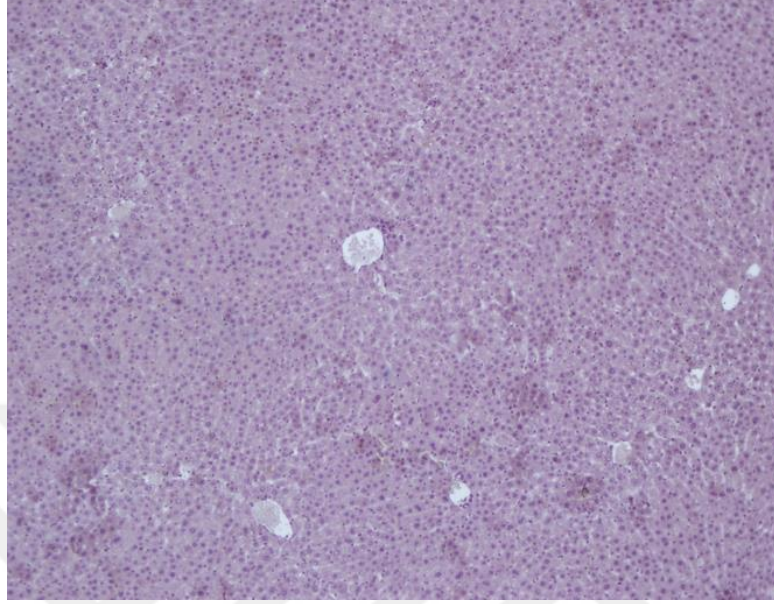
Resim 67' de TAA+SDKMKH (BA) grubu immunohistokimyasal kesit görüntüleri anti-kollajen1 α 1 (anti-coll1 α 1) ile portal alan-portal alan arası köprüleşmeleri anti-kollajen1 α 1 antikoru ile pozitif boyanmıştır (10X-20X).



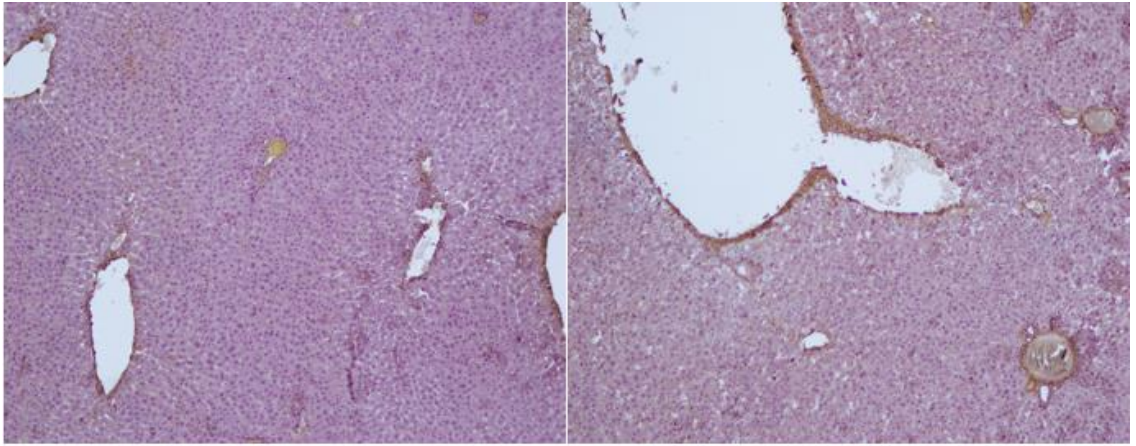
Resim 68. TAA+SDKMKH (BA) grubu immunohistokimyasal kesit görüntüleri (anti α -SMA, (20X).

Resim 68' de TAA+SDKMKH (BA) grubu immunohistokimyasal kesit görüntüleri (anti α -SMA, 20X) boyanma damarlar etrafında ve hepatik parankimde gözlenmektedir (+).

4.10.6. TAA+SDKMKH (NaB) grubunda anti-kollajen1 α 1 (anti-coll1 α 1) ve anti-alfa düz kas aktin (anti α -SMA) antikorları ile boyanan kesit görüntülerinin immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi

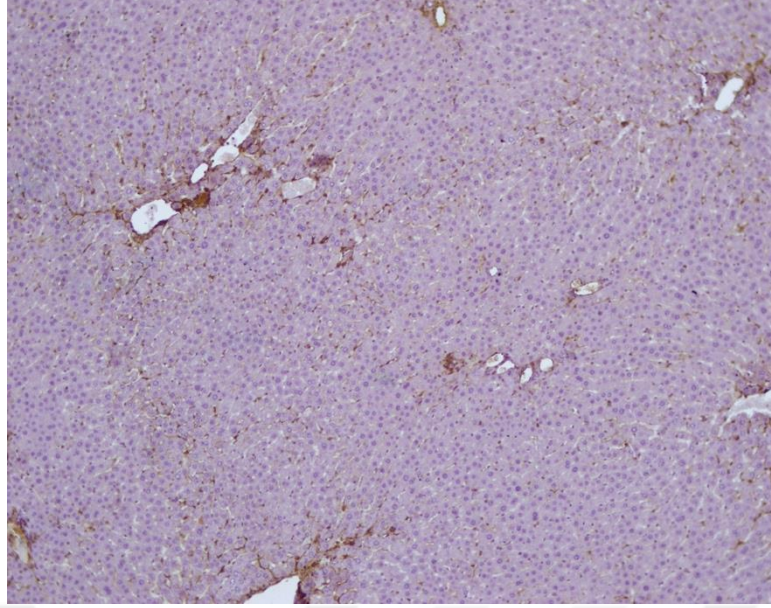


Resim 69. TAA+SDKMKH (NaB) grubu negatif kontrol (NC) immunohistokimyasal kesit görüntüsü, (10X).



Resim 70. TAA+SDKMKH (NaB) grubu immunohistokimyasal kesit görüntüleri, anti-kollajen1 α 1 (anti-coll1 α 1) (+) (10X).

Resim 70' de TAA+SDKMKH (NaB) grubu immunohistokimyasal kesit görüntüleri, anti-kollajen1 α 1 (anti-coll1 α 1), portal alan ve sentral ven çevresi normal seyrinde anti-kollajen1 α 1 antikoruna pozitif boyanmıştır (10X).



Resim 71. TAA+SDKMKH (NaB) grubu immunohistokimyasal kesit görüntüleri (+) (anti α -SMA, (10X).

Resim 71' de TAA+SDKMKH (NaB) grubu immunohistokimyasal kesit görüntüleri (anti α -SMA, 10X) boyanma damarlar etrafında ve hepatik parankimde gözlenmektedir (+'e yakındır).

Tablo 58. Karaciğer doku kesitlerinin pikro sirius kırmızısı histokimyasal boyama ile kollajen-1-alfa ve alfa-SMA immunohistokimyasal boyama sonuçlarının değerlendirilmesi

Grup	Pikro sirius kırmızısı	Kollajen1alfa	Alfa SMA
Kontrol	Normal seyrinde	Normal seyrinde	+
Sham	Normal seyrinde	Normal seyrinde	+
TAA	++	++	+
TAA+SDKMKH	+ ve ++ arasında	+	+
TAA+SDKMKH (BA)	+	+	+
TAA+SDKMKH (NaB)	+ ile ++ arasında	++	+

Tablo 59. alfa-SMA proteininin immunohistokimyasal boyama ile western blotlama sonuçlarının değerlendirilmesi

Grup	Alfa SMA immünohistokimya	Alfa SMA western blotlama
KONTROL	+	-
Sham	+	-
TAA	+	+
TAA+SDKMKH	+	+
TAA+SDKMKH (BA)	+	+
TAA+SDKMKH (NaB)	+	+

5. TARTIŞMA

Lif artışıyla karakterize olan fibrozis değişik organlarda görülmektedir. Bunlardan birisi de karaciğerdir. Deneysel modelle oluşturduğumuz karaciğer fibrozis üzerine etkisini araştırmak için SDKMKH ve ayrı ayrı BA ve NaB ile muamele edilmiş SDKMKH'ler kullanılmıştır. TAA, deneysel karaciğer fibrozis indükleyicisi olarak yaygın bir şekilde kullanılan bir hepatotoksik faktördür (Tennakoon ve ark, 2013; Buko ve ark, 2014). TAA reaktif metabolitlerinin proteinlere ve lipitlere kovalent olarak bağlanmasıyla, oksidatif stres ve sentrilobüler nekrozis oluşur. Ayrıca TAA, periportal alanda monolükleer infiltrasyona ve belirgin safra kanalı proliferasyonuna yol açar (Wallace ve ark, 2015). TAA, karaciğer fibrozisin ilerleyiş ve geri-dönüşüm mekanizmalarının incelenmesinde, antifibrotiklerin ve düzenleyicilerin test edilmesinde deneysel hayvan modeli oluşturmada kullanılan bilinen bir faktördür (Tennakoon ve ark, 2013; Buko ve ark, 2014).

Wallace ve ark (2015) fare ve sıçanlarda tiyoasetamid modeli oluşturma yolundaki çalışmalarında iki TAA modeli sunmuşlardır, bunlardan biri bu çalışmamızda uyguladığımız deney modelimizdir. Kemirgenlerde kronik karaciğer hasarı ve fibrozis modeli oluşturmada hem oral hem de ip yolla TAA uygulamanın güvenilir ve etkin bir yol olduğunu ileri sürmektedirler. Bilimsel topluluğun kullandığı yöntem, doz ve zaman uygulamasının çeşitliliğinden yola çıkıp ortak bir model oluşturma amacıyla yaptıkları çalışmada kemirgenlerde kronik karaciğer hasarı ve fibrozisi güvenilir ve tekrar oluşturulabilir bir şekilde indüklemekte başarılı oldukları iki TAA modeli sunmuşlardır. Bunlardan biri sıçanlarda TAA'nın 11 hafta boyunca haftada üç kez 150 mg/kg ip uygulanmasıdır. Yaptıkları araştırmalarla TAA'nın karaciğerde etkin bir fibrozis oluşturmaya için 8 ile 12 hafta aralığında uygulanmasını belirlemişlerdir. Aynı zamanda sıçanlarda karaciğer fibrozisi oluşturmak için doz aralığını ip uygulamada 100-200 mg/kg olarak ifade etmişlerdir. Fibrozisi belirlemede kullandıkları histokimyasal boyalardan biri rutin hematoksilen-eozin boyası ile kollajen lifleri kırmızı renge boyayan pikro sirius kırmızısı boyasıdır. Çalışmamızda kullandığımız deneysel karaciğer fibrozis modeli, 12 hafta boyunca haftada üç kez ip olarak uygulanan 150 mg/kg TAA'dır. Karaciğer doku kesitleri, yapı değişikliği düzeyinde; hematoksilen-eozin ve pikro sirius kırmızısı ile değerlendirilirken, immunohistokimyasal olarak da anti kollajen1 α ve anti α -SMA antikorları

kullanıldı. Biyokimyasal belirteçlerden serum ALT-AST değerlerine bakıldı. Western de ise anti α -SMA antikoruna bakıldı.

Kontrol ve Sh gruplarının sıçanlarının haftalara göre ağırlık artışı ile TAA uygulanan TAA, TAA+SDKMKH, TAA+SDKMKH (BA), TAA+SDKMKH (NaB) grubu sıçanlarının ağırlık artışı değişkenlik gösterdi. Bu değişkenlik istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Öyleki Kontrol ve Sh sıçanlarına ait ağırlıkların haftalara göre artışı TAA, TAA+SDKMKH, TAA+SDKMKH (BA), TAA+SDKMKH (NaB) sıçanlarının ağırlıklarından daha fazlaydı. Diğer taraftan bu dört deney grubu (TAA, TAA+SDKMKH, TAA+SDKMKH (BA), TAA+SDKMKH (NaB)) sıçan ağırlıklarının artışı arasında farklılık yoktu. Kontrol grubu ile deney grubu arasındaki ağırlık artışı farkının nedeni: TAA'nın hepatotoksik etkisiyle karaciğerde işlev bozukluğuna neden olmasıdır. Zararlı tiyoasetamid (TAA) metabolitlerinin oluşumu ve hepatositler üzerindeki etkileri için basitleştirilmiş bir model: İlk biyotransformasyon adımında, TAA, TAASO'ya geri dönüşümlü olarak metabolize edilir. İkinci adımında, yüksek oranda reaktif olan TAASO₂ oluşur. Daha sonra, TAASO₂ direkt olarak hücresel proteinler ve lipidler üzerindeki amin grupları (R-NH₂) ile reaksiyona girerek fonksiyonel bozukluğa neden olabilir. Ek olarak, TAA glutatyon tükenmesine ve yüksek seviyelerde reaktif oksijen türlerine (ROS), lipid peroksitlere, sitotoksosite ve mitokondriyal hasara yol açar. Bu olaylar bir arada, apoptoz, nekroz ve hepatoselüler karsinom ve kolanjiyokarsinom oluşumuna neden olabilir (Wallace ve ark, 2015). Dolaylı olarak hepatotoksin olarak davranan TAA, parankimal hücre nekrozuna sebep olur (Chilakapati ve ark, 2007; SC GAD, 2014). TAA'nın reaktif metaboliti, TASO₂, kovalent olarak, TAA kaynaklı hepatotoksik etkilerden sorumlu olan asetilimidolizisin türevlerinin oluşumu ile proteinlere bağlanır, TAA aynı reaktif ara madde vasıtasıyla asetamid de oluşturabilir, bununla birlikte, çalışmalar, asetamidin, TAA'dan çok daha büyük dozlarda verildiğinde bile, TAA için bildirilenler gibi hepatik lezyonlar üretmediğini göstermiştir ki (Chilakapati ve ark, 2007), yapılan bazı çalışma sonuçlarında da TAA'nın in vivo metabolizasyonu sonucu oluşan kanserojen olan asetamidin sonrasında asetata hidrolize olduğu ve bu yolla TAA'nın indüklediği karaciğer nekrozu, TAA'nın S-oksidede metabolik dönüşümünü ve ardından TAA-S-oksidin karaciğer makromoleküllerine bağlanabilen reaktif bir ara maddeye metabolize edilmesini veya asetamid ve polar ürünlere indirgenliğini açıklanmıştır. TAA'nın karaciğerdeki biyokimyasal etki örnekleri, TAA ile muamele edilen sıçanlarda glikoz-6 fosfat dehidrogenazın indüklenmesi ve hepatik karbamil fosfat sentetaz, ornitin transkarbamilaz ve arjinazın aktiviteleriyle üre ürününün seviyesi

düŖer. Böylece, TAA karaciğerde üre döngüsünde belirgin bozukluklara sebep olur. Ayrıca, sıçanlara uygulanan TAA, 24 saat sonrasında karaciğerlerden izole edilen mitokondrilerde fonksiyonel rahatsızlıklara yol açar ve mitokondrinin maksimum solunum aktivitesi de düşer, mitokondriyal Ca^{2+} içeriği önemli ölçüde artar ve hepatik mitokondriyonların Ca^{2+} transport davranışı değişir. Sonuçlar iç mitokondriyal membranların yapısal değişikliklerinin göstergesidir. TAA'nın karsinogenezin başlatılma evresindeki potansiyel rolü, RNA taşıma aktivitesine karşılık gelen bir artış ile hücre nükleer zarflarında nükleosit trifosfat aktivitesindeki bir artış ile ilişkilendirilebilir. Nükleer RNA dizilerinin taşınmasındaki değişiklikler, kanserojenlere erken yanıt olarak kabul edilir (SC GAD, 2014). Özet olarak, TAA, ROS aracılı bir yolla nispeten kısa bir sürede fibrozis, siroz ve HCC'yi indükleyen güçlü bir hepatotoksindir. Tiyoasetamidin (TAA) hepatotoksik etkisi, hepatik makromoleküllere kovalent olarak bağlanan ve hepatositlerin nekrozuna yol açan metabolik ara maddesi olan serbest bir radikal; tiyoasetamid-S-oksidine atfedilir. TAA hem bölge 1 hem de bölge 3 hepatositlerine zarar verir ve diğer toksinlere göre daha belirgin periportal hasar verir (Muriel ve ark, 2017).

Bu durumda organizmanın normal metabolizması devam edememektedir. Böylece gerekli kilo alımı gerçekleşmemektedir.

Yara iyileşmesinde, hücre proliferasyonu ile birlikte hücrelerin oluşturulan yapay yara bölgesine olan migrasyonuna bakıldığı scratch deneyinde (França ve ark, 2018) SDKMKH'lerin, SDKMKH (BA) ve SDKMKH (NaB)'lerin oluşturduğumuz yapay yara üzerine etkisini gözlemledik. LCI (Live Cell Imaging) cihazında alınan görüntüler ve yine aynı cihazda XCELLENCE RT programında ölçtüğümüz kapanma değerlerini kıyasladık.

6.h, 12.h ve 24.h' lerde alınan görüntüler üzerinde LCI cihazında XCELLENCE RT programında üç ayrı noktadan ölçümler (mm) aldık, bu ölçümleri yüzde (%) kapanma değerleri olarak hesapladık. Üst nokta için; SDKMKH'lerin 6.h' de %4, SDKMKH (BA)'ların %71,4, SDKMKH (NaB)'lerin %0 olduğu sonucunu bulduk. Orta nokta için; SDKMKH'lerin 6.h' de %11,9, SDKMKH (BA)'ların %31, SDKMKH (NaB)'lerin %0 olduğu sonucunu bulduk. Alt nokta için; SDKMKH'lerin 6.h' de %5,5, SDKMKH (BA)'ların %40, SDKMKH (NaB)'lerin %0 olduğu sonucunu bulduk.

Üst nokta için; SDKMKH'lerin 12.h' de %47,9, SDKMKH (BA)'ların %87,5, SDKMKH (NaB)'lerin %2,1 olduğu sonucunu bulduk. Orta nokta için; SDKMKH'lerin

12.h' de %2,7, SDKMKH (BA)'ların %51,7, SDKMKH (NaB)'lerin %0 olduğu sonucunu bulduk. Alt nokta için; SDKMKH'lerin 12.h' de %78,8, SDKMKH (BA)'ların %61,9, SDKMKH (NaB)'lerin %1,8 olduğu sonucunu bulduk.

Üst nokta için; SDKMKH'lerin 24.h' de %56, SDKMKH (BA)'ların %100, SDKMKH (NaB)'lerin %-2,1 olduğu sonucunu bulduk. Orta nokta için; SDKMKH'lerin 24.h' de %72,2, SDKMKH (BA)'ların %100, SDKMKH (NaB)'lerin %0 olduğu sonucunu bulduk. Alt nokta için; SDKMKH'lerin 24.h' de %100, SDKMKH (BA)'ların %100, SDKMKH (NaB)'lerin %-1,7 olduğu sonucunu bulduk. Bu sonuçlar in vitro düzeyde SDKMKH (BA)'ların yara iyileşmesinde daha etkin olduklarını göstermektedir, SDKMKH (BA) içeren kuyucukta kapanma 24 saatte gerçekleşmiştir. Bu deneyle hücre canlılığı için elde edilen sonuçlar, bor bileşiklerinden borik asitin (BA) hücre canlılığı üzerindeki pozitif etkisini gösteren yayınlanmış verilerle (Doğan ve ark, 2014) tutarlı iken NaB için böyle bir değerlendirme yapamamaktayız. Demirci ve ark (2014) insan diş germ kök hücrelerine, NaB uygulamasının, canlılıklarını ve mezenkimal kök hücre özelliklerini kaybetmeden, kısa ve uzun dondurma (kriyoprezervasyon) süresinden sonra hücre canlılığına katkıda bulunabileceğini göstermektedirler. Sonuçlar göstermektedir ki kök hücrelerin bor bileşikleri ile muamele edilmesi sırasında borun hücre metabolizma üzerindeki mekanizması daha da araştırılmalıdır.

Kültür ortamlarında morfolojik olarak incelendiklerinde fuziform şekilli, fibroblast benzeri görünümü olan SDKMKH'ler immunofenotipik özellikleri itibariyle CD14, CD31, CD34, CD45 gibi tipik hematopoietik belirteçleri göstermezler, buna karşın CD73, CD90, CD105 gibi non-hematopoietik hücre yüzey belirteçlerini eksprese ederler (Agha ve ark, 2017). Kültür ortamında SDKMKH'lerin invert mikroskop ile elde ettiğimiz görüntülerinde de morfolojik olarak kök hücre özelliğinde oldukları gibi SDKMKH'lerle yaptığımız akış sitometri sonuçlarına göre CD73, CD90, CD105 + iken, CD14, CD31, CD34, CD45 + olarak ifade edildi, bu da kök hücre olduklarının kanıtıydı.

Kök hücreler işlevsel olarak kendini yenileme ve farklılaşabilme kapasitelerine göre tanımlanırlar. Kök hücrelerin farklılaşma özelliklerinden dolayı deneyimizde kullandığımız sünnet derisi kökenli kök hücreleri adipojenik, kondrojenik ve osteojenik olarak üçlü farklılaştırma düzeyine gittik. Oil Red O ile boyadığımız adipojenik farklılaştırdığımız hücrelerin stoplazmalarında çok sayıda küre şeklinde kırmızı boyanmış yağ damlacıklarını gözlemledik. Kondrojenik farklılaştırmada hücre yoğunluğu ile birlikte Alsiyan mavisi ile

mavi boyanmış kıkırdak ekstrasellüler matriks bileşenlerini invert mikroskop ile gözlemledik. Son olarak da Von kossa boyası ile osteojenik farklılaştırmada hücre yoğunluğu ile birlikte kalsiyum depozitlerinin (hidroksiapatit kristallerinin) yeşil boyandığını gözlemledik. Kontrol olarak değerlendirdiğimiz ve farklılaştırma besiyeri ile muamele etmediğimiz kuyucuklardan elde ettiğimiz boyama görüntüleri ile kıyasladığımızda deney kuyucuklarındaki boyanma özellikleri ile elde ettiğimiz sonuçlarla kullandığımız hücrelerin kök hücre özelliğini gösterdiklerini kanıtladık.

Kontrol grubu ve Sham grubu için rutin hematoksilen-eozin boya kesitlerini değerlendirdiğimizde karaciğerin normal yapısını gözlemlemiştik. TAA' da granüler dejenerasyonla birlikte hemorajik alanlar gözlemledik. TAA+SDKMKH ve TAA+SDKMKH (BA) gruplarında ise karaciğer kesitlerinde hematoksilen-eozin boyama kesit görüntüsünde sinuzoidal dilatasyonlarla birlikte granüler dejenerasyon gözlemledik, aynı zamanda TAA+SDKMKH (NaB) grubu hematoksilen eozin boyası kesit görüntüsünde sinuzoidal dilatasyonlarla birlikte vakuolar dejenerasyon gözlemledik. Uygulanan tiyoasetamid yüksek seviyelerde reaktif oksijen türlerine (ROS), lipid peroksitlere, sitotoksosite ve mitokondriyal hasara yol açar (Wallace ve ark, 2015). Bu olaylar bir arada karaciğer dokusunda yapısal değişikliklere neden olmuştur. Rutin boyamada ışık mikroskobu görüntülerinde, kullanılan SDKMKH, SDKMKH (BA), TAA+SDKMKH (NaB) gruplarında TAA'nın oluşturduğu hepatotoksositeye bağlı yapısal değişiklikler üzerine etkisinin olmadığını söyleyebiliriz.

TAA ile oluşturulan kollajen birikimi pikro sirius kırmızısı kesit görüntülerinde iki pozitifken (++), SDKMKH ve SDKMKH (NAB) de bir ile iki pozitif arasında bir değerlendirme yapmıştık, dolayısıyla bu iki grupta TAA'ya yakın bir kollajen birikimini gözlemlemiştik. Fakat diğer taraftan kollajen birikimini SDKMKH (BA) grubunda bir pozitif (+) olarak tespit etmiştik. Burada BA ile muamele ettiğimiz kök hücre grubunda fibrozisin TAA' ya göre biraz gerilediğini söyleyebiliriz. Fakat diğer iki grupta fibrozisin gerilemesinde belirgin bir farklılık yoktu. Bu sonuçlarla birlikte borik asitin, lipid peroksidasyonuna, oksidatif strese ve DNA hasarına karşı koruyucu olabileceğini Bozkurt ve ark (2019) da epidural fibrozis çalışmaları sonuçlarından yararlanarak söyleyebiliriz. BA'nın biyokimyasal mekanizması tam olarak anlaşılmamasına rağmen, çoğu çalışma 2 mekanizmaya odaklanmıştır: hücre-membran fonksiyonları ve özellikle oksidatif metabolizmada enzim aktivitelerinin düzenlenmesi. BA, aldehit dehidrojenaz, sitokrom-b

redüktaz, nitrik oksit sentaz, peptidazlar, proteazlar ve ksantin oksidaz gibi enzimler üzerinde inhibe edici bir etkiye sahiptir. BA'nın hem antiinflamatuvar hem de antioksidan bir ajan olarak rol oynadığı düşünülmektedir. Serin proteazlar için inhibitör görevi gören BA, bağ dokusu yapılarının ve zar bileşenlerinin bozunumunu azaltarak iltihaplanmayı önlemektedir. Bor, proinflamatuvar sitokinlerin nükleer faktör kB transkripsiyon faktörü ile aktivasyonunu önler ve bu nedenle inflamasyon sürecini bloke eder. Hayvan sistemlerindeki çeşitli bor bileşiklerinin düşük dozları, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon-S-transferaz, glutatyon redüktazlar ve glukoz-6-fosfat dehidrojenaz gibi enzimlerin aktivitesini artırarak antioksidan kapasiteyi artırabilir. Aynı zamanda lipid peroksidasyonunu azaltır ve antioksidan savunma seviyelerini artırır. BA'nın apoptoz üzerinde dolaylı olarak önleyici bir etkisi olabilir. Bor, çevrede temel bir form olarak mevcut değildir; genellikle boratlar, boraks, BA, kolemanit veya uleksit olarak bulunur. Elma, üzüm, kereviz, domates, soya unu, kuru meyve, baklagiller, fındık, badem, avokado ve muz gibi meyve ve sebzelerde önemli miktarda bulunur. Bor, içme suyundan ve bitki kaynaklı yiyeceklerden alınan gastrointestinal sistem tarafından tamamen absorbe edilebilir ve kanda BA olarak dolaşımda bulunur. Daha önce yayınlanmış olan çalışmalar tutarlı bir şekilde, borun bitkiler için önemli bir unsur olduğunu ve insanlar için belirli konsantrasyonlarda faydalı olduğunu belirtmiştir. Bor takviyesi kemik mineral yoğunluğu, beyin fonksiyonu, bilişsel performans, normal inflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde etkili olabilir (Bozkurt ve ark, 2019).

TAA ile oluşturulan kollajen birikimi, kollajen1alfa immünohistokimyasal kesit görüntülerinde iki pozitifken (++), SDKMKH ve SDKMKH (BA) de bir pozitif olarak değerlendirme yapmıştık, dolayısıyla bu iki grupta kollajen birikiminin TAA'ya göre azaldığını gözlemlemiştik. Fakat diğer taraftan kollajen birikimini SDKMKH (NaB) grubunda iki pozitif (++) olarak tespit etmiştik. Burada NaB ile muamele ettiğimiz kök hücre grubunda fibrozisin TAA' ya benzer ve TAA'ya göre fibrozisde gerileme olmadığını söylebiliriz.

Disse alanında bulunan, karaciğer non-parankimal hücrelerinden, hepatik stellat hücreler karaciğer hasarında aktifleşerek myofibroblast benzeri hücrelere dönüşürler ve kollajen ve alfa SMA ekspresyonu gerçekleştirirler (Polat ve ark, 2017). Çalışmamızda anti-alfa SMA antikoru ile immunohistokimyasal olarak boyadığımız karaciğer kesitlerinin değerlendirilmesinde alfa SMA'nın Kontrol ve Sham gruplarında gösterimi

değerlendirilmeyecek kadar az iken diğer gruplarımızda (TAA, SDKMKH, SDKMKH (BA), SDKMKH (NaB)) bir + olarak ifadesini gözlemledik. Karaciğer fibrozisi çok etkenli bir durumdur, bu sonuç da fibrozis de tek etken faktörün HSH'ler olmadığını göstermekle birlikte, uygulanan SDKMKH, SDKMKH (BA), SDKMKH (NaB) faktörlerinin etkinliğinin belirgin olmadığını göstermektedir. 12 hafta süresince uygulanan TAA etkisine karşı yüksek rejeneratif kapasitasyona sahip karaciğer organının etkinliğini gözlemlemekteyiz.

Karaciğerin en ilginç, benzersiz ve ilgi uyandıran özelliklerinden birisi de kendi büyüklüğünü yeniden oluşturma ve düzenleme yeteneğidir. Karaciğer, cerrahi rezeksiyon veya kimyasal veya viral bir enfeksiyonla başlatılan yaralanmaya bağlı hücre ölümünden sonra yenilenebilir. Karaciğer rejenerasyonu, karaciğerdeki tüm hücre tiplerinin çoğaltılmasını ve kan damarlarının, safra ağacının ve hücre dışı matriksin yeniden yapılmasını içerir. Çok yönlü bir işlemdir ve çok sayıda sinyal yolu ile çok iyi ayarlanmış ve ince ayar yapılmıştır. Kemirgenlerde ve bazı memelilerde yapılan kapsamlı deneyler sonrası, cerrahi rezeksiyonun ardından karaciğer rejenerasyonunun, başladığı boyuta ulaşana kadar devam ettiğini ve boyutuna ulaştığında rejenerasyonun durduğunu göstermektedir. Karaciğer biyolojisinde en çok tartışılan sorulardan biri, karaciğerdeki kök hücrelerin varlığı ve karaciğer rejenerasyonundaki rolleridir. Karaciğerin Herring Kanalları adı verilen terminal safra kanallarında bulunan, histolojik kesitlerde görünüşleri nedeniyle oval hücreler olarak da adlandırılan hepatik progenitör hücrelere sahip olduğu konusunda genel bir fikir birliği vardır. Bununla birlikte, Progenitör hücrelerin rezeksiyon sonrası rejenerasyona katılmadıkları gösterilmişken kimyasal hasar sonrası karaciğer rejenerasyonundaki aktivasyonu, sayıca artışı kaydedilmiştir, ancak karaciğer rejenerasyon sürecinin tamamlanmasındaki rolleri hala araştırılmaya devam etmektedir. Karaciğerin yaklaşık %65-70'ini oluşturan hepatositler, gereksinim olduğunda hızla çoğalabilen oldukça farklılaşmış hücreler olmaları bakımından benzersizdirler. Bu nedenle, normal karaciğerdeki karaciğer rejenerasyonunun çoğunluğu, hepatositlerin çoğalmasıdır. Bununla birlikte, hepatositlerin bölünemediği ve karaciğer rejenerasyonunun hepatik progenitör hücreler tarafından gerçekleştiğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Yapılan çalışmalar progenitör hücrelerin hepatositlere farklılaştıkları yönündedir (Apte, 2015).

Western yöntemi ile değerlendirdiğimiz SMA proteininin TAA, TAA+SDKMKH, TAA+SDKMKH (BA), TAA+SDKMKH (NaB) gruplarında yoğunluğunun eşit olduğunu gözlemledik. Dolayısıyla Western deneyi, immünohistokimyasal olarak değerlendirdiğimiz

alfa SMA sonucu ile uyumlu olduğunu göstermektedir. İmmunohistokimyasal olarak açıkladığımız SMA sonucu ile western deneyi sonrası band yoğunluğu ile gözlemlediğimiz alfa SMA protein yoğunluğu aynı sonucu vermektedir. Burada bu sonuca göre TAA ile oluşturduğumuz fibrozis modelinde 4 haftalık bir iyileşme diliminden sonra fibrozisin geri dönüşümünün tüm gruplarda gerçekleştiğini, ancak TAA, TAA+SDKMKH, TAA+SDKMKH (BA), TAA+SDKMKH (NaB) gruplarında bir farklılık olmadığının sonucuna varabiliriz. Alfa SMA, fibrozis sürecinde HSH'ler tarafından salgılanan bir belirteçtir ve fibrozis sürecindeki HSH'lerin etkinliği ile fibrozisin varlığının göstergesidir. Yine burada tek etken olarak değerlendirilemez.

Serum ALT ve AST karaciğer fonksiyonunun belirteçlerindedir, hepatosit hasarı hücre geçirgenliğini değiştirerek karaciğer işlev bozukluğu ve karaciğer nekrozis ve inflamasyonun karakteristiğini gösteren AST ALT proteinlerinin seruma sızmasına neden olur (Sun ve ark, 2018). Polat ve ark (2017) yaptıkları fibrozis çalışmasında serum ALT, AST işaretleyicilerini değerlendirmişlerdir, biz de bu çalışmamızda, TAA ile indüklediğimiz fibrozis modelimizde serum ALT ve AST'lerinin değerlendirmelerini yaptık.

Kontrol grubu için;

12. haftanın sonunda alınan serum alanin aminotransferaz enzimi (pre-ALT) miktarı ile deneyin sonlandığı 16. haftanın sonunda (post-ALT) yani sakrifikasyon öncesi alınan serum örneğindeki miktarlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p < 0,05$). Post-ALT değerleri daha düşüktür.

Serum aspartat aminotransferaz enzimi (AST), pre-AST ve post-AST değerlerinde ise istatistiksel anlamlı bir farklılık yoktur ($p > 0,05$).

Sham grubu için;

Sham grubundaki sıçanların serum pre-ALT değerleri ile post-ALT değerleri ve pre-AST değerleri ile post-AST değerleri arasında istatistiksel bir farklılık yoktur ($p > 0,05$).

Tiyoasetamid grubu için;

Bu grupta hem pre-ALT değerleri ile post ALT değerleri ve pre-AST değerleri ile post-AST değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık söz konusudur ($p < 0,05$) ve ALT ve AST değerlerinde 12. Hafta ile 16. Hafta arasında bir düşüş vardır. Bu da karaciğer

fibrozisinin geri-dönüşümlü olduğunun göstergesi olabilir. Buko ve ark (2014) karaciğer TAA kaynaklı fibrozisin tersine çevrilebilirliğini (reversible) farklı çalışmalarla göstermişlerdir. Daha önce aynı deney modelinde TAA'nın uygulanması bitiminin, karaciğer fibrozisinin dört hafta içinde kısmi spontan geri dönüşümüne yol açtığını ve bu durumun azalmış fibrozis oranı ile karakterize olduğunu bulmuşlardır. 12.haftada yüksek olan ALT değeri 4 hafta geçtikten sonra bir düşüş gösteriyor. Bu durum tiyoasetamidin ilk başlangıçta oluşturduğu toksisitenin bir sonucu 12. Haftada ALT değerinin artışına daha sonra geçen 4 hafta boyunca taa ya maruz kalmayınca rejenerasyon süreci ile birlikte ALT değerinde bir düşüş görülmesi normaldir. 12. haftada TAA grubunda hem ALT değerinin hem de AST değerinin kontrol grubuna göre yüksekliği oluşturduğumuz fibrozisi modelinin bir sonucudur.

12. hafta süresince tiyoasetamid ile indüklenen karaciğer fibrozisli sıçanlara 12. Hafta sonunda verilen sünnet derisi kökenli kök hücre grubunda ise (TAA+SDKMKH);

12. Hafta ile 16. Hafta aralığında ALT değerlerindeki düşüş istatistiksel olarak anlamlı iken ($p<0,05$) pre-AST ile post-AST değerleri istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$). (Gruplar arası kıyasladığımızda Kontrol ve Sh grubuna göre bu değerler yüksektir ve istatistiksel olarak bu yükseklik anlamlıdır, $p<0,05$; TAA+SDKMKH (BA) grubuna göre bu değerler düşüktür ve bu düşük değer de istatistiksel olarak anlamlıdır, $P<0,05$).

TAA+SDKMKH (BA) grubu için;

12. haftanın sonunda alınan serum alanin aminotransferaz enzimi (pre-ALT) miktarı ile deneyin sonlandığı 16. haftanın sonunda (post-ALT) yani sakrifikasyon öncesi alınan serum örneğindeki miktarlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0,05$). Post-ALT değerleri daha düşüktür, pre-AST değerleri ile post-AST değerleri arasında ise istatistiksel bir farklılık yoktur ($p>0,05$). Gruplar arasında ise post-AST değeri en yüksek gruptur, bu durum istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$).

TAA+SDKMKH (NaB) grubu için;

12. haftanın sonunda alınan serum alanin aminotransferaz enzimi (pre-ALT) miktarı ile deneyin sonlandığı 16. haftanın sonunda (post-ALT) yani sakrifikasyon öncesi alınan serum örneğindeki miktarlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0,05$). Post-ALT değerleri daha düşüktür, aynı şekilde 12. haftanın sonunda alınan serum alanin aspartat

enzimi (pre-AST) miktarı ile deneyin sonlandığı 16. haftanın sonunda (post-AST) yani sakrifikasyon öncesi alınan serum örneğindeki miktarlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p < 0,05$). Post-AST değerleri daha düşüktür.

TAA+SDKMKH, TAA+SDKMKH (BA), TAA+SDKMKH (NaB) gruplarında ALT değerlerinde 12. haftadan 16. haftaya gelindiğinde düşüş gözlenmişti. TAA hepatotoksitesinin 4 hafta boyunca devam etmemesi sonucunda karaciğer rejenerasyonu ile birlikte SDKMKH, SDKMKH (BA), SDKMKH (NaB)'nin rejenerasyonu artırıcı etkisini fonksiyonel testlerinde gözlemlemekteyiz, Gruplar arası pre-ALT değerleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde TAA, ie TAA+SDKMKH (BA) grubunun eşit oranda yüksek olan pre-ALT değerleri 4 haftanın sonucunda aynı oranda düşüş göstermiştir, bu iki grubun post-ALT değerlerinin düşüş oranı istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0,05$). TAA+SDKMKH ve TAA+SDKMKH (NaB) grubunun pre-ALT değerleri birbirine yakındır, post-ALT değer düşüşlerinde istatistiksel olarak anlamlılık yoktur ($p > 0,05$).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

TAA uygulanarak oluşturulan deneysel karaciğer fibrozisinin yapı düzeyinde geliştiğini 12 hafta da tespit ettik. Fakat biz deneyi 16. haftaya kadar devam ettirdiğimiz için bu süreç içerisinde karaciğerde rejenerasyon gelişmiştir. SDKMKH (BA)'nın kısmen karaciğer rejenerasyonuna katkı sağlayabileceğini söyleyebiliriz.

TAA ile oluşturulan deneysel karaciğer fibrozisinde yapı düzeyinde SDKMKH ve SDKMKH (NaB)'nin katkılarının fibrozisin gerilemesinde etkin olmadığını SDKMKH (BA)'nın ise kısmen fibrozisin gerilemesinde etken olabileceği kanaatine vardık.

Biyokimyasal belirteçlerden ALT bu sonuçlarımızı desteklemekte fakat AST değerlerinde yapısal değişimlerle biyokimyasal parametrelerden AST de bu uyumu gözlemleyemedik. Dolayısıyla karaciğer toksisitesinde birinci derecede önemli olan belirteç ALT, ikinci derecede AST olduğu için bir problem olacağını düşünmüyoruz. Neticede TAA ile oluşturulan toksisitede önce hasar oluşmakta sonraki süreçte rejenerasyon gelişmektedir. Bu bağlamda gerek TAA gerekse TAA ile birlikte vermiş olduğumuz faktörlerde önce işlevsel düzeyde daha sonra yapı düzeyinde düzelme olduğu kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

Agha EE, Kramann R, Schneider RK, Li X, Seeger W, Humphreys BD, Bellusci S. Mesenchymal Stem Cells in Fibrotic Disease. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2017.07.011>.

Arranz-Valsero I, Soriano-Romani L, García-Posadas L, Lopez-Garcia A, Diebold Y. IL-6 as a corneal wound healing mediator in an in vitro scratch assay. *Experimental Eye Research* 2014, 125, 183-192.

Bai T, Yang Y, Wu Y-L, Jiang S, Lee JJ, Lian L-H, Nan J-X. Thymoquinone alleviates thioacetamide-induced hepatic fibrosis and inflammation by activating LKB1-AMPK signaling pathway in mice. *International Immunopharmacology* 2014, 19, 351-357.

Bodzin AS, Baker TB. Anatomy and Physiology of the Liver. In: Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract, Eight edition, Yeo CJ, DeMeester SR, McFadden DW, Matthews JB, Fleshman JW. Philadelphia, 2019, 1386-1397.

Bozkurt H, Bektasoglu PK, Ali Borekci6, Öztürk ÖÇ, Kertmen H, Egilmez R, Mehmet Fatih Yuce F, Bora Gurer B. Antifibrotic Effect of Boric Acid in Rats with Epidural Fibrosis. *World Neurosurgery* 2019, 122, 989-994.

Bu FT, Chen Y, Yu HX, Chen X, Yang Y, Pan XY, Wang Q, Wu YT, Huang C, Meng XM, Li J. SENP2 alleviates CCl4-induced liver fibrosis by promoting activated hepatic stellate cell apoptosis and reversion. *Toxicology Letters* 2018, (289), 86-98.

Buko VU, Lukivskaya OY, Naruta EE, Belonovskaya EB, Tauschel HD. Protective Effects of Norursodeoxycholic Acid Versus Ursodeoxycholic Acid on Thioacetamide-induced Rat Liver Fibrosis. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology* 2014, 4, 293-301.

Campana L, Iredale JP. Extracellular Matrix Metabolism and Fibrotic Disease. In: Matrix Pathobiology, Liu Y. *Current Pathobiology Report* 2014, 2, 217-224.

Cattley RC, Cullen JM. Liver and Gall Bladder (Chapter 8). In: Fundamentals of Toxicologic Pathology, 3rd Edition, Wallig MA, Haschek WM, Colin G. Rousseaux CG, Brad Bolon B, 2018, 125-151.

Chilakapati J, Korrapati MC, Hill RA, Warbritton A, Latendresse JR, Mehendale HM. Toxicokinetics and toxicity of thioacetamide sulfoxide: a metabolite of thioacetamide. *Toxicology* 2007, 230, 105-116.

Copple BL, Roth K, Welch TP. Mechanism of Liver Fibrosis. *Comprehensive Toxicology* 2018, 2, 397-408

Demirci S, Doğan A, Şişli B, Sahin F. Boron increases the cell viability of mesenchymal stem cells after long-term cryopreservation. *Cryobiology* 2014, 68, 139-146.

Doğan A, Demirci S, Apdik H, Bayrak OF, Gulluoglu S, Tuysuz EC, Gusev O, Rizvanov AA, Nikerel E, Şahin F. A new hope for obesity management: Boron inhibits adipogenesis in progenitor cells through the Wnt/ β -catenin pathway. *Metabolism Clinical and Experimental* 2017, 69, 130-142.

Doğan A, Demirci S, Bayir Y, Halici Z, Karakus E, Aydin A, Cadirci E, Albayrak A, Demirci E, Karaman A, Ayan AK, Gundogdu C, Şahin F. Boron containing poly-(lactide-co-glycolide) (PLGA) scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering* 2014, 44, 246-253.

Du Y, Li N, Long M. Liver sinusoid on a chip (Chapter 6). *Methods in Cell Biology*, 2018, 146, 105-134. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2018.06.002>

Ellis H. Anatomy of the liver. *Surgery (Oxford)*, 2011. 29, 12, 589-592.

Foster JR. Liver (Chapter 9). In: *Boorman's Pathology of The Rat (Second Edition)*, Suttie AW, 2018, 81-105.

França AJBV, Faveri R, Nunes R, Steimbach VMB, Santin JR, Quintao NLM. The role of kinins in the proliferation of fibroblast primed with TNF in scratch wound assay. ^[1]_{SEP} Kinins and Cell Proliferation *International Immunopharmacology* 2018, 65, 23-28.

Fronza M, Heinzmann B, Hamburger M, Laufer S, Merfort I. Determination of the wound healing effect of Calendula extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts *Journal of Ethnopharmacology* 2009, 126, 463-467.

Gao W, Zhang L, Zhang Y, Sun C, Chen X, Wang Y. Adipose-derived mesenchymal stem cells promote liver regeneration and suppress rejection in small-for-size liver allograft.

Transplant Immunology 2017, 45, 1-7.

Glaß M, Möller B, Zirkel A, istinWachter K, Hüttelmaier S, Posch S. Cell migration analysis: Segmenting scratch assay images with level sets and support vector machines. Pattern Recognition 2012, 45, 3154-3165.

Golan-Gerstl R, Valitsky, Oren R, Brazowski E, Hayardeni L, Reif S. The anti-fibrotic effect of Aramchol on rat liver fibrosis induced by TAA and in vitro on primary hepatic stellate cells. Journal of Hepatology 2018, 68, 365-604.

He J, Gong J, Ding Q, Tan Q, Han P, Liu J, Zhou Z, Tu W, Xia Y, Yan W, Tian D. Suppressive effect of SATB1 on hepatic stellate cell activation and liver fibrosis in rats. FEBS Letters 2015, 589, 1359-1368.

Higashi T, Friedman SL, Hoshida Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. Advanced Drug Delivery Reviews 2017, 121, 27-42.

Huang S, Wu S, Zhang Z, Deng W, Fan J, Feng R, Kong W, Qi J, Chen W, Tang X, Yao G, Feng X, Wang D, Chen H, Sun L. Mesenchymal stem cells induced CD4+ T cell apoptosis in treatment of lupus mice. Biochemical and Biophysical Research Communications 2018, 507, 30-35.

Iwanabe Y, Masaki C, Tamura A, Tsuka S, Mukaibo T, Kondo Y, Hosokawa R. The effect of low-intensity pulsed ultrasound on wound healing using scratch assay in epithelial cells. Journal Prosthodont Research 2016, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpor.2016.03.002>.

Jang YO, Kim SH, Cho MY, Kim KS, Park KS, Cha SK, Kim MY, Chang SJ, Baik SK. Synergistic effects of simvastatin and bone marrow-derived mesenchymal stem cells on hepatic fibrosis. Biochemical and Biophysical Research Communications 2018, 497, 264-271.

Jin W, Shah ET, Penington CJ, McCue SW, Chopin LK, Simpson MJ. Reproducibility of scratch assays is affected by the initial degree of confluence: Experiments, modelling and model selection. Journal of Theoretical Biology 2016, 390, 136-145.

Johnston S, Ross JV, Binder BJ, McElwain DLS, Haridas P, Simpson MJ. Quantifying the effect of experimental design choices for in vitro scratch assays. Journal of Theoretical

Biology 2016, 400, 19-31.

Kock JD, Vanhaecke T, Biernaskie J, Rogiers V, Snykers S. Characterization and hepatic differentiation of skin-derived precursors from adult foreskin by sequential exposure to hepatogenic cytokines and growth factors reflecting liver development. *Toxicology in Vitro* 2009, 23, 1522-1527.

Koike N. The Role of Stem Cells in the Hepatobiliary System and in Cancer Development: A Surgeon's Perspective (Chapter 11). In: *Stem Cells and Cancer in Hepatology*. Zheng Y-W. 2018, 211-253.

Kruepunga N, Hakvoort TBM, Hikspoors JPJM, S. Köhler E, Lamers WH. Anatomy of rodent and human livers: What are the differences? *BBA-Molecular Basis of Disease* 2019, 1865, 869-878.

Lackner C, Tiniakos D. Fibrosis and alcohol-related liver disease. *Journal of Hepatology* 2019, 70, 294-304.

Lei Y, Qing-lan Wang Q, Shen L, Tao Y, Liu C. MicroRNA-101 suppresses liver fibrosis by downregulating PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology* 2019. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2019.02.003>.

Lemos DR, Duffield JS. Tissue-resident mesenchymal stromal cells: Implications for tissue-specific antifibrotic therapies. *Science Translational Medicine* 2018, 10, 1-9.

Li MH, Feng X, Ba DJD, Chen C, Ruan LY, Xing YX, Chen LY, Zhong GJ, Wang JS. Hepatoprotection of *Herpetospermum caudigerum* Wall. against CCl₄-induced liver fibrosis on rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2019, 229, 1-14.

Li Y, Zhao Y, Cheng Z, Zhan J, Sun X, Qian H, Zhu W, Xu W. Mesenchymal stem cell-like cells from children foreskin inhibit the growth of SGC-7901 gastric cancer cells. *Experimental and Molecular Pathology* 2013, 94, 430-437.

Lobritto S. Organogenesis and Histologic Development of the Liver (Section XV, Liver and Bilirubin Metabolism). In: *Fetal and Neonatal Physiology (5th Edition)*. Polin RA, Abman SH, Rowitch DH, Benitz WE, Fox WW. 2017, 909-913.

Lord MS, Tang F, Rnjak-Kovacina J, James GW, Smith JGW, Melrose J, Whitelock

JM. The multifaceted roles of perlecan in fibrosis. *Matrix Biology* 2018, 68, 69, 150-166.

Mack M. Inflammation and fibrosis. *Matrix Biology* 2018, 68–69, 106-121.

Mahadevan V. Anatomy of the liver. *Surgery* 2014, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpsur.2014.10.004>.

Matsuda M, Tanaka M. Stem/Progenitor Cells in Chronically Injured Liver and the Surrounding Microenvironment (Chapter 12). In: *Stem Cells and Cancer in Hepatology*. Zheng Y-W. 2018, 255-272.

Matz-Soja M. Hedgehog Signaling and Liver Lipid Metabolism (Chapter 15). Section II *Molecular Biology of the Cell*, 2019, 201-212. *The Molecular Nutrition of Fats*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811297-7.00015-9>.

McCuskey RS, Wisse E. Hepatic Sinusoidal Cells: Endothelial Cells, Kupffer Cells, Stellate Cells, and Liver-Associated Lymphocytes. DOI: 10.1016/B978-0-08-046884-6.01003-4. *Comprehensive Toxicology*, 2010, 31-42.^[1]

Meier RPH, Mahou R, Morel P, Meyer J, Montanari E, Muller YD, Christofilopoulos P, Wandrey C, Gonelle-Gispert C, Bühler LH. Microencapsulated human mesenchymal stem cells decrease liver fibrosis in mice. *Journal of Hepatology* 2015, 62, 634-641

Mitra V, Metcalf J. Functional anatomy and blood supply of the liver. *Anaesthesia&Intensive Care Medicine* 2012, 13, 2, 52-53.

Miyamura N, Nishina H. Molecular Mechanisms of Liver Development: Lessons From Animal Models (Chapter 1). In: *Stem Cells and Cancer in Hepatology*. Zheng Y-W. 2018, 1-20.

Muriel P, Ramos-Tovar E, Montes-Paez G, Buendia-Montano LD. Experimental Models of Liver Damage Mediated by Oxidative Stress (Chapter 40). In: *Liver Pathophysiology. Therapies and Antioxidants*, Muriel P. 2017, 529-546.

Nicolas CT, Joo DJ, Nelson ED, Zhang Y, Nyberg SL. Stem Cell Therapies for Liver Diseases. In: *Reference Module in Biomedical Sciences, Encyclopedia of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, McQueen CA, Boron WF, Boulpaep EL, Bradshaw RA, Bylund DB, Enna SJ, Hart G, Hughes KT, Kulkarni S, Maloy S, Narayan RJ,

Quah SR, Ratcliffe MR, Stahl PD, Tang YW. 2019, 137-145.

Nishio T, Hu R, Koyama Y, Liang S, Rosenthal SB, Yamamoto G, Karin D, Baglieri J, Ma HY, Xu J, Liu X, Dhar D, Iwaisako K, Taura K, Brenner DA, Kisseleva T. Activated Hepatic Stellate Cells and Portal Fibroblasts contribute to cholestatic liver fibrosis in MDR2 knockout mice. *Journal of Hepatology* 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.04.012>.

Nishio T, Hu R, Koyama Y, Liang S, Rosenthal SB, Yamamoto G, Karin D, Baglieri J, Ma HY, Xu J, Liu X, Dhar D, Iwaisako K, Taura K, Brenner DA, Kisseleva T. Activated Hepatic Stellate Cells and Portal Fibroblasts contribute to cholestatic liver fibrosis in MDR2 knockout mice. *Journal of Hepatology* 2019, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.04.012>.

Ozono Y, Shide K, Toyoshima F, Takaishi Y, Tsuchimochi M, Kamiunten A, Kameda T, Nakamura K, Miike T, Kusumoto K, Iwakiri H, Hasuike S, Nagata K, Sawaguchi A, Shimoda K. Monocyte-derived fibrocytes elimination had little contribution on liver fibrosis. <https://doi.org/10.1016/j.hbpd.2019.02.002>.

Pajarinen J, Lin T, Gibon E, Kohno Y, Maruyama M, Nathan K, Lu L, Yao Z, Goodman SB. Mesenchymal stem cell-macrophage crosstalk and bone healing. *Biomaterials* 2019, 196, 80-89.

Parola M, Pinzani M. Liver fibrosis: Pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues. *Molecular Aspects of Medicine* 2019, 65, 37-55.

Parola M, Pinzani M. Liver fibrosis: Pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues. *Molecular Aspects of Medicine* 2019, 65, 37-55.

Paşa S, Aydın S, Kalaycı S, Boğa M, Atlan M, Bingul M, Şahin F, Temel H. The synthesis of boronic-imine structured compounds and identification of their anticancer, antimicrobial and antioxidant activities. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 2016, 39-48.

Pinzani M, Rombouts K. Liver fibrosis: from the bench to clinical targets. *Digestive and Liver Disease* 2004, 36, 231-242.

Pritchard MT, Apte U. Models to Study Liver Regeneration. *Basic Mechanisms, Liver*

Regeneration, Relevant Models and Clinical Applications, Apte U, Academic Press is an imprint of Elsevier 2015, 15-40.

Ray D, Han Y, Maroni L, Marzoni M, Meng F, Alpini G, Glaser S. Liver Regeneration: The Biliary Perspective (Chapter 16) In: Liver Regeneration, Basic Mechanisms, Relevant Models and Clinical Applications, Apte U. (page 232) <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-420128-6.00016-6>.

Sarra-Bournet F, Grouix B, Hince K, Felton A, Tremblay M, Abbott S, Duceppe J.S, Zacharie B, Laurin P, Gagnon L. PBI-4547 decreases hepatic stellate cell activation via AMPK signaling pathway, and reduces fibrosis in carbon tetrachloride (CCL₄)-induced hepatic fibrosis model. *Journal of Hepatology* 2018, 68, 365-604.

SC Gad, Gad Consulting Services, Cary, NC, USA. Encyclopedia of Toxicology.2014, 4, 5549-550. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00939-8> 549

Schaefer L. Decoding fibrosis: Mechanisms and translational aspects. *Matrix Biology* 2018, 68,69, 1-7.

Selvarajah B, Azuelos I, Plate M, Guillotin D, Forty EJ, Contento G, Woodcock HV, Redding M, Taylor A, Brunori G, Durrenberger PF, Ronzoni R, Blanchard AD, Mercer PF, Anastasiou DA, Chambers RC. mTORC1 amplifies the ATF4-dependent de novo serine-glycine pathway to supply glycine during TGF- β_1 -induced collagen biosynthesis. *Science Signalling*.2019, 12, 582, eaav3048, 1-16. DOI: 10.1126/scisignal.aav3048

Shao C-H, Chen S-L, Dong T-F, Chai H, Yu Y, Deng L, Wang Y, Cheng F. Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after regional hepatic irradiation ameliorates thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. *Journal of Surgical Research* 2014, 186, 408-416.

Sun, J., Wu, Y., Long, C., He, P., Gu, J., Yang, L., Liang, Y., Wang, Y. Anthocyanins isolated from blueberry ameliorates CCl₄ induced liver fibrosis by modulation of oxidative stress, inflammation and stellate cell activation in mice. *Food and Chemical Toxicology* (2018), doi: 10.1016/j.fct.2018.07.048.

Tanimizu N, Mitaka T. Plasticity of Liver Epithelial Cells in Healthy and Injured Livers

(Chapter 3). In: Stem Cells and Cancer in Hepatology. Zheng Y-W. 2018, 35-54.

Taura K, Minicis S, Seki E, Hatano E, Iwaisako K, Osterreicher CH, Kodama Y, Miura K, Ika I, Uemoto S, Brenner DA. Hepatic Stellate Cells Secrete Angiopoietin 1 That Induces Angiogenesis in Liver Fibrosis. *Gastroenterology* 2008, 135, 1729-1738.

Tennakoon AH, Izawa T, Wijesundera KK, Golbar HM, Tanaka M, Ichikawa C, Kuwamura M, Yamate J. Characterization of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-expressing hepatic stellate cells and myofibroblasts in thioacetamide (TAA)-induced rat liver injury. *Experimental and Toxicologic Pathology* 2013, 65, 1159-1171.

Thabut D, Shah V. Intrahepatic angiogenesis and sinusoidal remodeling in chronic liver disease: New targets for the treatment of portal hypertension? *Journal of Hepatology* 2010, 53, 976-980.

Tiyaboonchai A, Su Y, Li B. Stem Cells in the Liver Cancer and the Organ Size Control (Chapter 4). In: Stem Cells and Cancer in Hepatology. Zheng Y-W. 2018, 55-76.

Tomita H, Kanayama T, Niwa A, Noguchi K, Tanaka T, Hara A. The Stem Cells in Liver Cancers and the Controversies (Chapter 13). In: Stem Cells and Cancer in Hepatology. Zheng Y-W. 2018, 273-287.

Tsutsumi V, Nakamura T, Ueno T, Torimura T, Aguirre-Garcia J. Structure and Ultrastructure of the Normal and Diseased Liver (Chapter 2). In: Liver Pathophysiology, Therapies and Antioxidants, Muriel P. 2017, 23-44.

Wallace MC, Hamesch K, Lunova M, Kim Y, Weiskirchen R, Strnad P, Friedman SL. Standard Operating Procedures in Experimental Liver Research: Thioacetamide model in mice and rats. *Laboratory Animals* 2015, 49 (S1) 21-29. ^[L]_{SEP}

Walraven M, Hinz B. Therapeutic approaches to control tissue repair and fibrosis: Extracellular matrix as a game changer. *Matrix Biology* 2018, 71,72, 205-224.

Wettere AJV. Histologic Patterns of Hepatotoxic Injury. In: *Comprehensive Toxicology* (Third Edition), McQueen CA, 2018, 2, 97-136.

Xu DD, Li XF, Li YH, Liu YH, Huang C, Meng XM, Li J. TIPE2 attenuates liver fibrosis by reversing the activated hepatic stellate cells. *Biochemical and Biophysical Research*

Communications 2018, 498, 199-206.

Yang H, Li N, Du Y, Tong C, Lü S, Hu J, Zhang Y, Long M. Neutrophil adhesion and crawling dynamics on liver sinusoidal endothelial cells under shear flow. *Experimental Cell Research* 2017, 351, 91-99.

Yao Q, Lin Y, Li X, Shen X, Wang J, Tu C. Curcumin ameliorates intrahepatic angiogenesis and capillarization of the sinusoids in carbon tetrachloride-induced rat liver fibrosis. *Toxicology Letters* 2013, 222, 72-82.

Yu F, Ji S, Su L, Wan L, Zhang S, Dai C, Wang Y, Fu J, Zhang Q. Adipose-derived mesenchymal stem cells inhibit activation of hepatic stellate cells in vitro and ameliorate rat liver fibrosis in vivo. *Journal of the Formosan Medical Association* 2015, 114, 130-138.

Zhang X, Xu Y, Qi Y, Han X, Yin L, Xu L, Liu K, Peng J. Potent effects of dioscin against thioacetamide- induced liver fibrosis through attenuating oxidative stress in turn inhibiting inflammation, TGF- β /Smad and MAPK signaling pathways. *Journal of Functional Foods* 2015, 16, 436-447.

Zoubek ME, Christian Trautwein C, Pavel Strnad P. Reversal of liver fibrosis: From fiction to reality. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2017, 31, 129-141.

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : Erdem Koç, Gülüna
Uyruk : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : Çatalca / 26.03.1985
Telefon : 05079674978
E-mail : gkoc@gantep.edu.tr / gulunarerdem@hotmail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Doktora	ADÜ	17/07/2019
Y.Lisans	OMÜ	13/02/2014
Lisans	OMÜ	08/09/2008

BURSLAR ve ÖDÜLLER:

AKADEMİK YAYINLAR

1. MAKALELER

1. Erdem Koç Gülüna, Aydın Isinsu, Kaplan Süleyman, Onger Mehmet Emin, Altunkaynak Zuhul, Deniz Ömür Gülsüm, Gümüş Hasan, Altun Gamze (2016). Neuroprotective effects of melatonin and omega 3 on hippocampal cells prenatally exposed to 900 MHz electromagnetic fields. International Journal of Radiation Biology, 92(10), 590-595., Doi: 10.1080/09553002.2016.1206223

2. Ulubay Mahmud, Yahyazadeh Ahmad, Deniz Ömür Gülsüm, Kıvrak Elfide Gizem, Altunkaynak Berrin Zuhul, Erdem Koç Gülüna, Kaplan Süleyman (2015). Effects of prenatal 900 MHz electromagnetic field exposures on the histology of rat kidney. International Journal of Radiation Biology, 91(1), 35-41., Doi: 10.3109/09553002.2014.950436

3. Bulut Emel, Baş Burcu, Altunkaynak Berrin Zuhul, Bekçioğlu Burak, Erdem Koç Gülüna, Gönülol Emrah, Önger Mehmet Emin, Kaplan Süleyman (2014). Efficacy of Ankaferd Blood Stopper on bone healing in diabetic rats a stereological and histopathological study. *Biotechnic & Histochemistry*, 89(7), 535-543, Doi:10.3109/10520295.2014.906657

2. PROJELER

1. Prenatal dönemde elektromanyetik alana maruz bırakılan sıçan hipokampusunda melatonin ve omega 3'ün etkilerinin stereolojik yöntemlerle araştırılması (Investigation of melatonin and omega-3 effects on prenatal exposure of 900 mhz electromagnetic field in the rat hippocampus using stereological methods)

2. Tiyaoasetamid ile İndüklenmiş Sıçan Karaciğer Fibrozisine Bor Bileşikleri ile Muamele Edilmiş Sünnet Derisi Kökenli Mezenkimal Kök Hücrenin Etkisi (The effect of foreskin-derived mesenchymal stem cells treated with boron compounds in thioacetamide-induced rat liver fibrosis)

3. BİLDİRİLER

A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

B) Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler

1. Süleyman Kaplan*, Gülünar Erdem, B. Zuhul Altunkaynak, Ö. Gülsüm Deniz, Elif Kayhan, M. Eyüp Altunkaynak. Histopathological examination of the Purkinje cells in the cerebellum of newborn rats following prenatal exposure to 900 MHz electromagnetic field

(Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Ondokuz Mayıs University, Samsun, Turkey).

2. Mahmut Ulubay, Ahmad Yahyazadeh, Ö. Gülsüm Deniz, Elfide Gizem Kıvrak, B. Zuhul Altunkaynak, Gülünar Erdem, Süleyman Kaplan. Histopathological examination of glomerulus in the kidney of newborn rats following prenatal exposure to 900 MHz electromagnetic field. Department of Urology, Medical Park Hospital, Samsun, Turkey^[1]
Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Ondokuz Mayıs University, Samsun, Turkey