



T.C.

AYDIN ADNAN MENDERES
ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**DOKSORUBİSİN UYGULANAN SIÇANLARDA
APELİN-13 MOLEKÜLÜNÜN KARACİĞERE
ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. ERHAN BAYRAK

DANIŞMAN

Prof. Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN

AYDIN-2020

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES
ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**DOKSORUBİSİN UYGULANAN SIÇANLARDA
APELİN-13 MOLEKÜLÜNÜN KARACİĞERE
ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. ERHAN BAYRAK**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN**

AYDIN-2020

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF-19018 proje numarası ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tezimin her aşamasında, maddi ve manevi desteğini ve bilgi ve birikimini benimle paylaşan danışman hocam Prof. Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN'e ve gerek tezim gerekse uzmanlık eğitimim sırasında her sorunumu çözmemde her türlü yardımı esirgemeyen ikinci danışman hocam olan Dr. Öğr. Üyesi K.Murat GÜRSES'e teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim sürecinde üzerimde emeği olan, geniş bilgi, deneyim ve imkanlarından faydalandığım sayın hocalarım Prof. Dr. Kemal ERGİN, Dr. Öğr. Üyesi H.Kübra BAŞALOĞLU, Dr. Öğr. Üyesi Tülin UYSAL, Dr. Öğr. Üyesi Erkan GÜMÜŞ'e teşekkür ederim.

Denizli Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde üremeye yardımcı teknikler eğitimi aldığım süre zarfında her zaman yardımcı olan sayın hocalarım Prof.Dr. Gülçin ABBAN METE, Dr. Öğr. Üyesi Nazlı ÇİL, Dr. Öğr. Üyesi Murat Serkant ÜNAL'a teşekkür ederim. ÜYTE eğitimim sırasında yardımcı olan Arş. Gör. Dr. Mutlu YAKA ve Biyolog Gürkan TURHAN'a teşekkür ederim.

Tez sürecinde sürekli yanımda olan Uzm. Dr. Bahadır KAYHAN, Arş. Gör. Dr. Cevat GENÇER ve Arş. Gör. Dr. Serhan ÇAMOĞLU başta olmak üzere tüm histoloji ve embriyoloji ABD araştırma görevlilerine, Biyokimya ABD araştırma görevlileri Ömer ERDOĞAN ve Fatih BİRTEKOCAK'a ve Parazitoloji ABD Dr. Öğr. Üyesi Erdoğan MALATYALI'ya teşekkür ederim.

Bugünlere ulaşmam da büyük emekleri geçen sevgili annem, babam ve kız kardeşime teşekkür ederim. Beni daima destekleyen, her zaman her koşulda yanımda olan ve sevgisini her zaman hissettiğim hayat arkadaşım Arş. Gör. Dr. Esmâ KARADUMAN BAYRAK'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
KISALTMALAR DİZİNİ	iv
RESİMLER DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ.....	viii
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.Karaciğer	3
2.1.1.Karaciğer Anatomisi.....	3
2.1.2.Karaciğer Embriyolojisi	9
2.1.3.Karaciğer Histolojisi.....	11
2.1.3.1.Stroma.....	12
2.1.3.2.Parankim.....	12
2.1.3.3.Hepatositler.....	14
2.1.3.4.Karaciğerin Diğer Hücreleri	16
2.1.3.5.Biliyer Ağaç.....	18
2.1.4. Karaciğerin Fizyolojisi	19
2.1.4.1. Safra Yapımı ve Salgılanması	20
2.1.4.2. Bilirubin Metabolizması	20
2.1.4.3. Vasküler ve Hematolojik Fonksiyonları.....	21
2.1.4.4. Besinlerin Metabolizması	21
2.1.4.4.1. Karbonhidrat Metabolizması	21
2.1.4.4.2. Lipid Metabolizması.....	22
2.1.4.4.3. Protein Metabolizması.....	22

2.1.4.5 Toksik Metabolitlerin Detoksifikasyonu	22
2.1.4.6. Mineral ve Vitaminlerin Depolanması	23
2.1.4.7. Endokrin İşlevleri	23
2.1.4.8. İmmunolojik İşlevleri	24
2.2.Sıçan Karaciğerinin Yapısı.....	24
2.3.Doksorubisin(DOX)	25
2.3.1.Doksorubisin Metabolizması.....	26
2.3.2.Doksorubisin Hepatotoksisitesi	27
2.3.3.Doksorubisin Hepatotoksisitesinde Histopatoloji	28
2.4.Apelin-13.....	28
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
3.1.Deney Hayvanlarının Temini ve Bakımı.....	32
3.2.Deney Gruplarının Planlanması.....	32
3.3.Doksorubisin Uygulanması	33
3.4.Apelin-13 Uygulanması.....	33
3.5.Deneyin Sonlandırılması	33
3.6.Doku Takibi.....	33
3.7.Histokimyasal Analizler	34
3.7.1.Hematoksilen-Eozin Boyama	34
3.7.2.Masson Trikrom Boyama	35
3.7.3.Pikro Sirius Boyama.....	36
3.8.İmmünohistokimyasal Boyama	37
3.9.Biyokimyasal Analizler	39
3.9.1.Doku Hidroksiprolin Analizi	39
3.9.2.Doku Total Antioksidan Status(TAS) Ölçümü	40
3.9.3.Doku Total Oksidan Status(TOS) Ölçümü.....	40

3.10.İstatistiksel Analizler	41
4.BULGULAR	42
4.1.Hematoksilen-Eozin Değerlendirmesi.....	42
4.1.1.Kontrol Grubu H&E Değerlendirmesi	42
4.1.2.DOX Grubu H&E Değerlendirmesi	44
4.1.3.DOX+Apelin-13 Grubu H&E Değerlendirmesi.....	46
4.2.Masson Trikrom Değerlendirmesi.....	48
4.2.1.Kontrol Grubu Masson Trikrom Değerlendirmesi	48
4.2.2.DOX Grubu Masson Trikrom Değerlendirmesi.....	50
4.2.3.DOX+Apelin-13 Grubu Masson Trikrom Değerlendirmesi	52
4.3.Pikro Sirius Değerlendirmesi	54
4.3.1.Kontrol Grubu Pikro Sirius Değerlendirmesi.....	54
4.3.2.DOX Grubu Pikro Sirius Değerlendirmesi.....	56
4.3.3.DOX+Apelin-13 Grubu Pikro Sirius Değerlendirmesi	58
4.4.İmmünohistokimyasal Olarak NF-κB Değerlendirmesi.....	60
4.4.1.Kontrol Grubu NF-κB Değerlendirmesi.....	60
4.4.2.DOX Grubu NF-κB Değerlendirmesi	62
4.4.3.DOX+Apelin-13 Grubu NF-κB Değerlendirmesi	64
4.5.Biyokimyasal Değerlendirmeler.....	66
5.TARTIŞMA.....	68
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	72
ÖZET	73
ABSTRACT	75
KAYNAKLAR.....	77

KISALTMALAR DİZİNİ

- ADH: Vazopressin, antidiüretik hormon
AKR1A: Aldo keto redüktaz 1a
ALT: Alanin amino transferaz
APJ: Anjiotensin II reseptör like 1
AST: Aspartat amino transferaz
CAT: Katalaz
CBR1: Karbonil redüktaz 1
CRH: Kortikotropin releasing hormon
DOX: Doksorubisin
ECM: Ekstraselüler matrix
ERK: Ekstraselüler sinyal bağımlı kinaz
FGF: Fibroblast büyüme faktörü
gER: Granüllü endoplazmik retikulum
GPX: Glutasyon peroksidaz
H&E: Hematoksilen-eozin
GHRH: Büyüme hormonu releasing hormon
IFN- γ : İnterferon gama
IL: İnterlökin
IP: İntraperitoneal
LPS: Lipopolisakkarid
MDA: Malondialdehit
MMP: Matrix metalloproteinazı
NF- κ B: Nükleer faktör kappa B
NK: Natural killer
OATP: Organik anyon taşıyıcı peptid
PAS: Periyodik asid-Schiff
PDGFRB: Platelet kaynaklı büyüme faktörü reseptör B
ROS: Reaktif oksijen türleri
SOD: Süperoksit dismutaz
 α -SMA: Alfa düz kas aktini

STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3

TAS: Toplam antioksidan kapasite

TIMP: Doku inhibitör matrix metalloproteinazı

TNF α : Tümör nekrozis faktör alfa

TOS: Toplam oksidan kapasite

T4: Tiroksin



RESİMLER DİZİNİ

- Resim 1. Karaciğer anatomisi
- Resim 2. Karaciğer yüzleri ve konumu
- Resim 3. Trunkus çölyakus ve dalları
- Resim 4. İntrahepatik damar ve kanal sistemi
- Resim 5. Karaciğerde kan ve safra akımı
- Resim 6. Karaciğer gelişiminin başlangıcı
- Resim 7. Gelişimin 5.-6. haftası
- Resim 8. Klasik lobül, portal lobül ve karaciğer asinüsü
- Resim 9. Karaciğer klasik lobül yapısı
- Resim 10. Karaciğer asinüsü ve zonları
- Resim 11. Hepatosit plağı
- Resim 12. Hepatik sinüzoidin elektron mikroskobu görüntüsü
- Resim 13. Hepatik, pankreatik ve safra kanalları arasındaki ilişki
- Resim 14. Sıçan karaciğeri
- Resim 15. Doksorubisin kimyasal yapısı
- Resim 16. Doksorubisin metabolizması
- Resim 17. Apelin/APJ'nin karaciğer fibrozisindeki ve karaciğer rejenerasyonundaki etkileri
- Resim 18. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu (H&E, 10x büyütme)
- Resim 19. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu (H&E, 40x büyütme)
- Resim 20. DOX grubuna ait karaciğer dokusu (H&E, 10x büyütme)
- Resim 21. DOX grubuna ait karaciğer dokusu (H&E, 40x büyütme)
- Resim 22. DOX+apelin-13 grubuna ait karaciğer dokusu (H&E, 10x büyütme)
- Resim 23. DOX+apelin-13 grubuna ait karaciğer dokusu (H&E, 40x büyütme)
- Resim 24. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu (Masson trikrom, 10x büyütme)
- Resim 25. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu (Masson trikrom, 40x büyütme)
- Resim 26. DOX grubuna ait karaciğer dokusu (Masson trikrom, 10x büyütme)
- Resim 27. DOX grubuna ait karaciğer dokusu (Masson trikrom, 40x büyütme)
- Resim 28. DOX+apelin-13 grubuna ait karaciğer dokusu (Masson trikrom, 10x büyütme)
- Resim 29. DOX+apelin-13 grubuna ait karaciğer dokusu (Masson trikrom, 40x büyütme)
- Resim 30. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu (Pikro sirius, 10x büyütme)
- Resim 31. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu (Pikro sirius, 40x büyütme)

- Resim 32. DOX grubuna ait karaciğer dokusu (Pikro sirius, 10x büyütme)
- Resim 33. DOX grubuna ait karaciğer dokusu (Pikro sirius, 40x büyütme)
- Resim 34. DOX+apelin-13 grubuna ait karaciğer dokusu (Pikro sirius, 10x büyütme)
- Resim 35. DOX+apelin-13 grubuna ait karaciğer dokusu (Pikro sirius, 40x büyütme)
- Resim 36. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu (NF-κB, 10x büyütme)
- Resim 37. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu (NF-κB, 40x büyütme)
- Resim 38. DOX grubuna ait karaciğer dokusu (NF-κB, 10x büyütme)
- Resim 39. DOX grubuna ait karaciğer dokusu (NF-κB, 40x büyütme)
- Resim 40. DOX+apelin-13 grubuna ait karaciğer dokusu (NF-κB, 10x büyütme)
- Resim 41. DOX+apelin-13 grubuna ait karaciğer dokusu (NF-κB, 40x büyütme)



TABLULAR DİZİNİ

Tablo I. Deney grupları

Tablo II. Doku takip protokolü

Tablo III. Hematoksilen-eozin boyama protokolü

Tablo IV. Masson trikrom boyama protokolü

Tablo V. Pikro sirius boyama protokolü

Tablo VI. İmmünohistokimya boyama protokolü

Tablo VII. Doku hidroksiprolin analizi

Tablo VIII. Kontrol, DOX ve DOX+apelin-13 gruplarının ALT, AST, TAS, TOS ve hidroksiprolin değerleri açısından bazal değerleri



1.GİRİŞ VE AMAÇ

Karaciğer insan vücudunda bulunan en büyük iç organ olup, büyük bölümü sağ üst kadranda, küçük bir bölümü ise sol üst kadranda yer almaktadır. Proteinlerin sentezi, kandan besinlerin alınması ve depolanması gibi fonksiyonları yerine getirmektedir. Gerek oral gerekse parenteral yolla alınan ilaçların, toksik maddelerin metabolizmasında ve detoksifikasyonunda görev alır (Crawford JM. 2015). Ayrıca vitaminlerin depolanmasında ve safranın sentezinde rol alır (Ahsan MR ve ark. 2009). Bağ dokusu tarafından sarılmış 4 lobtan oluşur. Diğer pek çok organ gibi bağ dokusu yapısındaki stroma ve organize fonksiyonel hücre grubu olan parankimden oluşur (Kierszenbaum AL. 2006).

Tüm bu işlevler nedeniyle, karaciğer hastalıkları halk sağlığına yönelik temel tehditler arasında yer almaya devam etmektedir ve dünya çapında önemli bir sorundur (Adewusi EA ve ark. 2010, Asha VV ve ark. 1998). Karaciğer hastalığı; hücelere, dokulara, yapıya veya karaciğer fonksiyonlarına zarar gelmesi olarak tanımlanabilir. Bu zarar bakteri, virüs veya parazit gibi biyolojik faktörlerden; primer biliyer siroz gibi otoimmün hastalıklardan; çeşitli ilaçların, toksik içerikli bileşiklerin ya da alkolün alımından kaynaklanmaktadır (Casafont-Morencos F ve ark. 2008, Deshwal N ve ark. 2011).

Doksorubisin çeşitli lenfoma, lösemi, sarkoma ve solid organ tümörlerinin tedavisinde kullanılan en etkili antineoplastik ilaçlardan biridir (Shabalala S ve ark. 2017, Gewitz DA. 1999, Minotti G ve ark. 2004, Mross K 1991, Sayed-Ahmed M.M. ve ark. 2010). Yaygın kullanımına rağmen doksorubisinin sitotoksik etkileri çok yönlüdür ve en çok kardiyotoksisite ve hepatotoksisite yapmaktadır (Carvalho C ve ark. 2009). Doksorubisinin toksik etkileri; DNA üzerinde değişime sebep olması, serbest radikaller ve oksidatif stres üretimiyle gerçekleşmektedir (Granados-Principal S ve ark. 2010). Vücutta oluşan oksidatif strese karşı antioksidan savunma sistemi aktif hale geçer; ancak reaktif oksijen türlerinin artmaya devam etmesi bu dengeyi bozar. Buna paralel olarak doksorubisin kullanılan deneysel hayvan çalışmalarında antioksidan enzim seviyelerinde düşüşler gözlenmiştir (Othman AI ve ark. 2008). Doksorubisine bağlı toksisitenin patogeneğinde serbest radikaller ve antioksidanların rol oynadığına dair çalışmaların artmasıyla birlikte doksorubisin toksisitesi üzerine çeşitli etken maddeler, antioksidanlar ve antioksidan özelliği sergileyen maddelerin kullanım

denemeleri gündeme gelmiştir (Gokcimen A ve ark. 2007, Çeçen E ve ark. 2011, Saleem MT ve ark. 2014).

Apelin-13 molekülü etkilerini APJ adlı reseptörü ile gösteren bir adipositokindir. Apelin-12, apelin-13 ve apelin-36 gibi formları bulunan molekülün en potent formu apelin-13 tür. APJ reseptörü; merkezi sinir sistemi, akciğerler, kardiyovasküler sistem, gastrointestinal sistem başta olmak üzere pek çok dokuda bulunmaktadır (O'Dowd BF ve ark. 1993). Hepatik hasarı olan sıçanlarda apelin-13 uygulanmasıyla alanin amino transferaz, aspartat amino transferaz ve laktat dehidrogenaz enzim seviyelerinde düşüş saptanmıştır. Apelin-13 uygulaması sonrası proinflamatuvar sitokinlerin(interlökin-1, interlökin-6) seviyesinde düşüş, antiinflamatuvar sitokin olan interlökin-10 seviyesinde ise artış gösterilmiştir (Emam MN ve ark. 2016). Egzojen olarak verilen apelinin karaciğer doku hasarının düzelmesi üzerinde olumlu etkileri gösterilmiştir. Platelet kaynaklı büyüme faktörü ve proinflamatuvar sitokinlerin, stellat hücrelerde APJ nin ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir (Yokomori H ve ark. 2011).

Tüm bu kaynaklardan yola çıkılarak çalışmamızda doxorubisin ile indüklenmiş hepatotoksisite üzerine apelin-13 molekülünün etkisinin histokimyasal, immunohistokimyasal ve biyokimyasal yönden araştırmayı planladık. Elde edeceğimiz bulgular ışığında yapılacak yeni çalışmalarda, ilaca bağımlı karaciğer hasarı gelişen hastalarda apelin-13 kullanılarak oluşan hasarın azaltılması yönünde faydalı olacağı kanaatindeyiz.

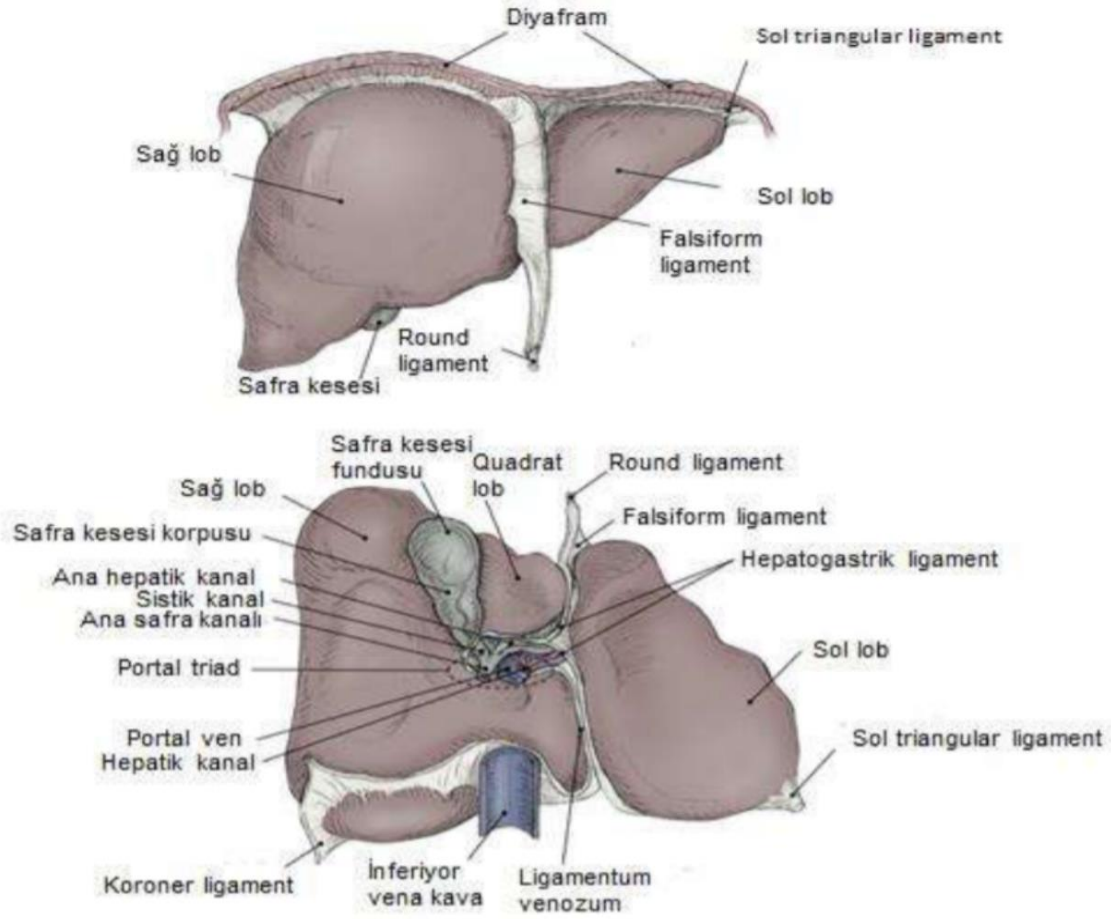
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğer

2.1.1. Karaciğer Anatomisi

Karaciğer vücutta bez yapıdaki en büyük iç organ olup besinlerin metabolizmasını ve metabolizma sonucu üretilen toksik atıkların detoksifikasyonunu sağlar (Ozougwu ve ark. 2014). Karaciğerin ağırlığı kadınlarda ortalama 1200 ile 1400 gr erkeklerde ise 1400 ile 1800 gr arasında olup erişkin vücut ağırlığı toplamının yaklaşık % 2.5' unu oluşturur (Kaplan ve ark. 2014, Ross ve ark. 2014).

Karaciğer karın boşluğunun sağ üst çeyreğinde bulunan hemidiyafragmanın altındaki göğüs kafesi tarafından korunup, mevcut konumunu etrafındaki organ ve yapılara ligamentöz bağlarla bağlanarak korur (Sherif ve ark. 2010). Visseral ve diafragmatik yüz olmak üzere iki yüzü vardır. Diafragmatik yüzde; sağ üstte plevra ve akciğerle, sol üstte kalp ve perikardla, önde kostalar ve processus xiphoideusla, arkada ise vena cava inferior, glandula suprarenalis ve özefagusla komşudur. Visseral yüz ise konkav yapıda olup karın iç organları ile komşudur. Facies visceralise komşu olan yapılar; vena cava inferior, vesica biliaris, sağ böbrek ve böbrek üstü bezi, duodenumun 2. kıtası, flexura coli dekstra ve midedir. Visseral yüzün ortalarında porta hepatis denilen büyük bir geçit bulunur. Buradan portal ven ve etrafındaki sinir ağı ile birlikte arteria hepatica propria, safra kanalları ve lenf kanallarını geçer (Kaplan ve ark. 2014).

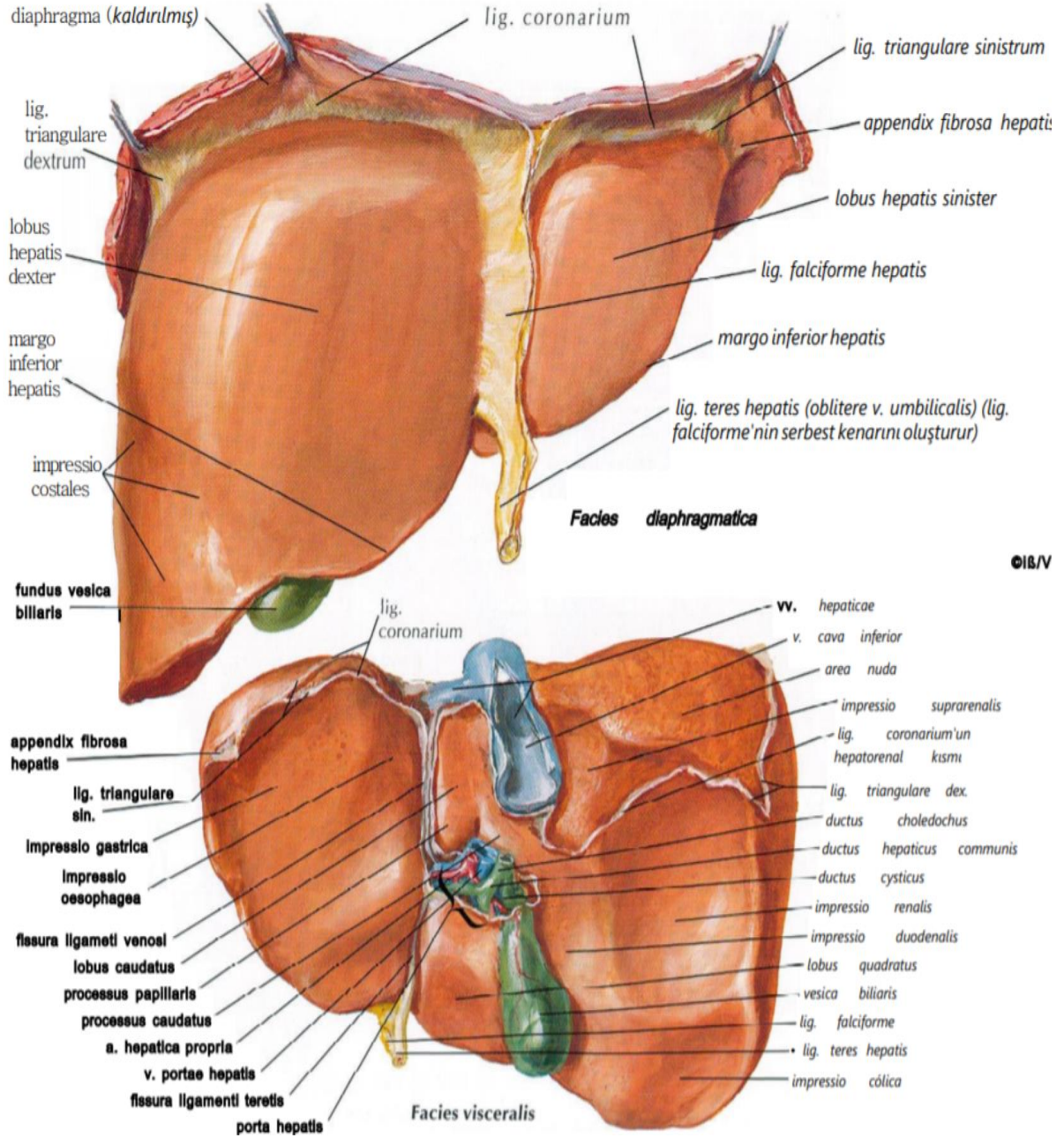


Resim 1. Karaciğer Anatomisi (Busti AJ. 2015)

Karaciğer dıştan parlak fibröz yapıda Glisson kapsülü (kapsula fibroza) adı verilen yapıyla kaplıdır. Kapsülü de dıştan karaciğerin direk temas ettiği diyafragma ve visseral organlara yapıştığı yerler dışında seröz bir kılıf sarar. Buna visseral periton denir (Ross ve ark. 2014). Karaciğer; fossa vesica biliaris, area nuda, sulcus vena cava, fissura ligamenti teretis, fissura ligamenti venosi ve porta hepatis hariç peritonla kaplıdır (Kaplan ve ark. 2014).

Karaciğer, diafragma ve karın ön duvarına 6 adet ligament aracılığıyla bağlanır (Kaplan ve ark. 2014, Cumhuriyet ve ark. 2001). Yukarıda sağ ve sol trianguler ligamentleri oluşturmak üzere dışa doğru ilerleyen koronar ligament tarafından diaframa, önde falciform ligament ve porta hepatis ile gastrohepatik ve hepatoduodenal ligamentler tarafından karın ön

duvarına bağlanır. Hepatoduodenal ligament hepatic arter, portal ven ve ekstrahepatik safra duktusları dahil tüm porta hepatis sarar (Juza ve ark. 2014, Schulick ve ark. 2006).



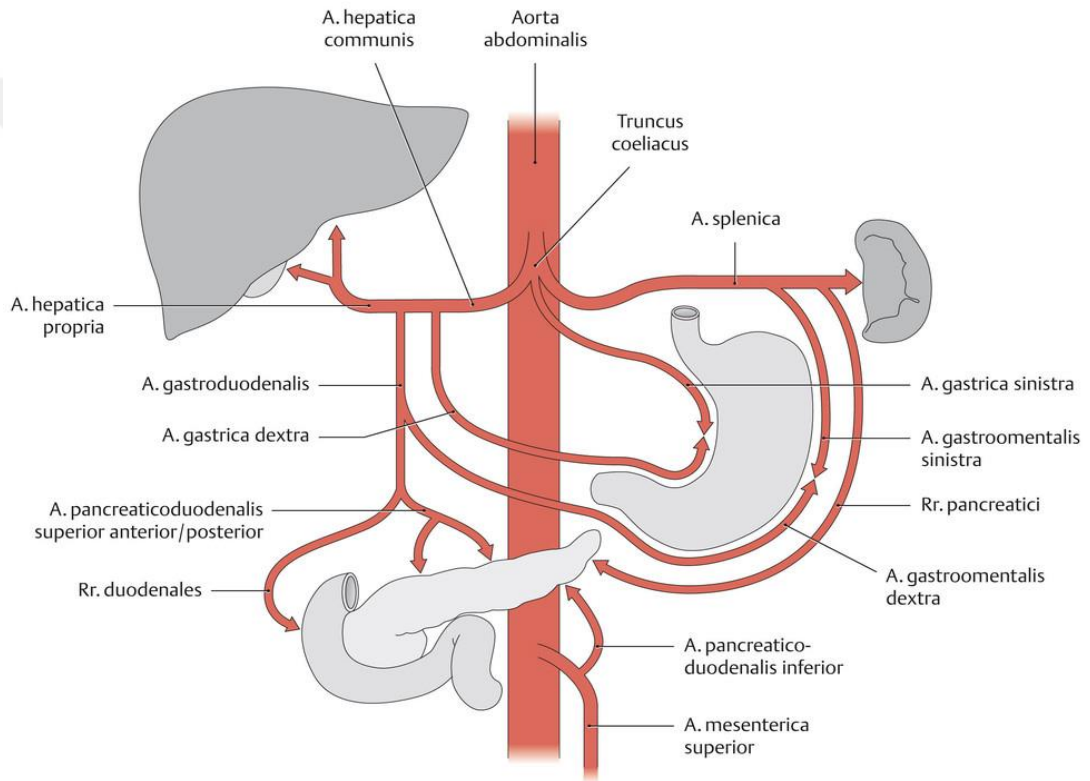
Resim 2. Karaciğerin Yüzleri ve Konumu (Netter FH. 2006).

Karaciğer ağır bir organ olduğundan batin içindeki mevcut pozisyonunu koruması sadece ligamentel bağlantılarıyla sınırlanamaz. Ek olarak birçok faktör karaciğerin konumunu korumasına yardım eder. Örneğin; diafragmanın altındaki negatif basınç karaciğeri yerinden

tutan faktörler arasında en önemlisidir. Yine batin içi organların üzerine oturması ve karın kaslarının mevcut tonusu karaciğeri yerinde tutan etmenler arasındadır (Kaplan ve ark. 2014).

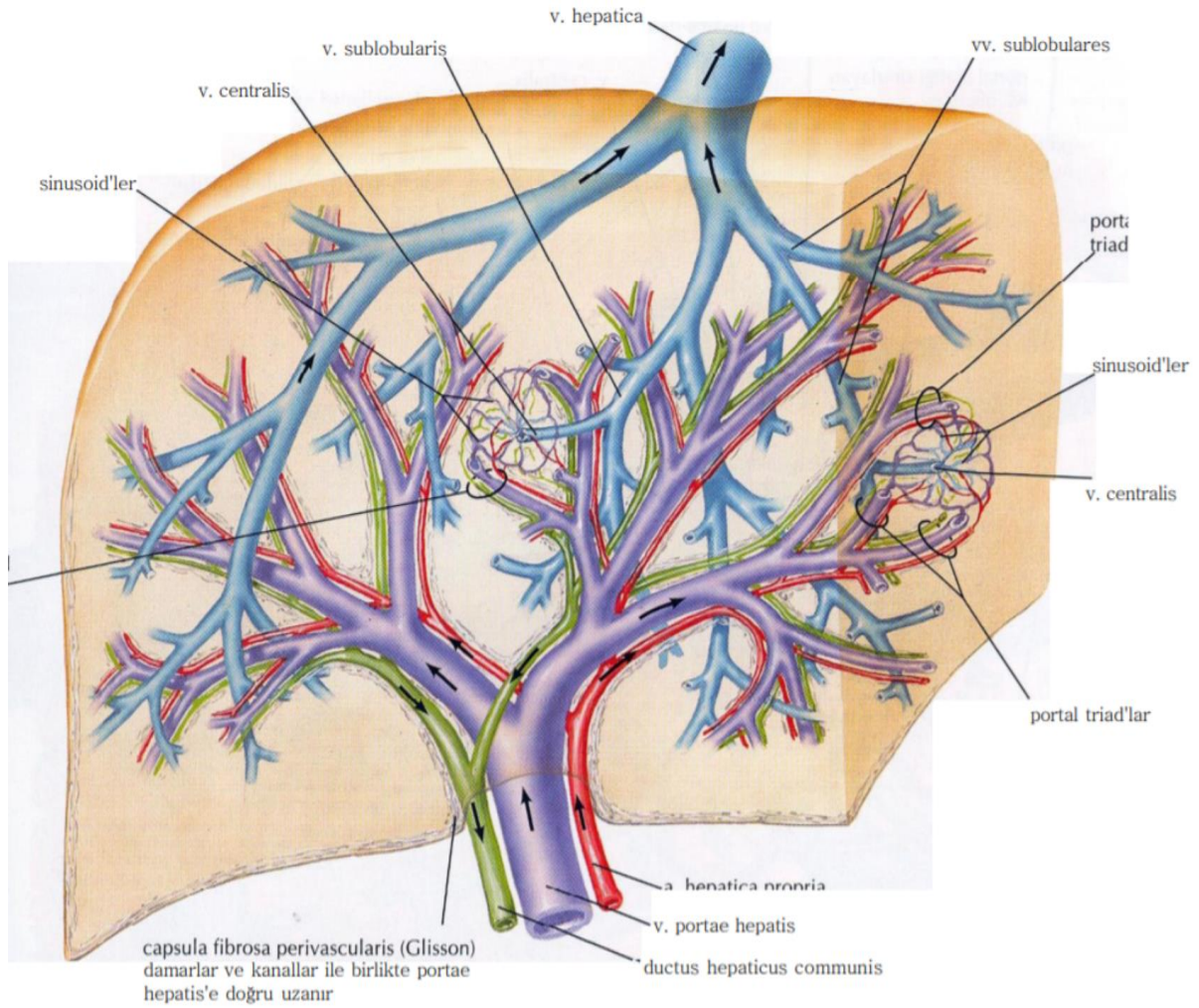
Karaciğer zengin bir damar ağ sistemine sahip olup istirahat esnasında toplam kardiyak outputun %25'ini alır (Ortuğ ve ark. 2002). Hem hepatik arterden (%20-40) hem de portal venden (%60-80) gelen benzersiz ikili kanlanma sistemi sayesinde 1500 cc/dk kan girişi olur.

Çölyak trunkus; diaframın arasından, T12 - L1 seviyesinde, abdominal aortun ön yüzeyinden çıkarak common hepatik arter, splenik arter ve sol gastrik arter olmak üzere 3 dal veren kısa bir yapıdır (yaklaşık 1 cm) (Agur ve ark. 2013) (Resim 3).



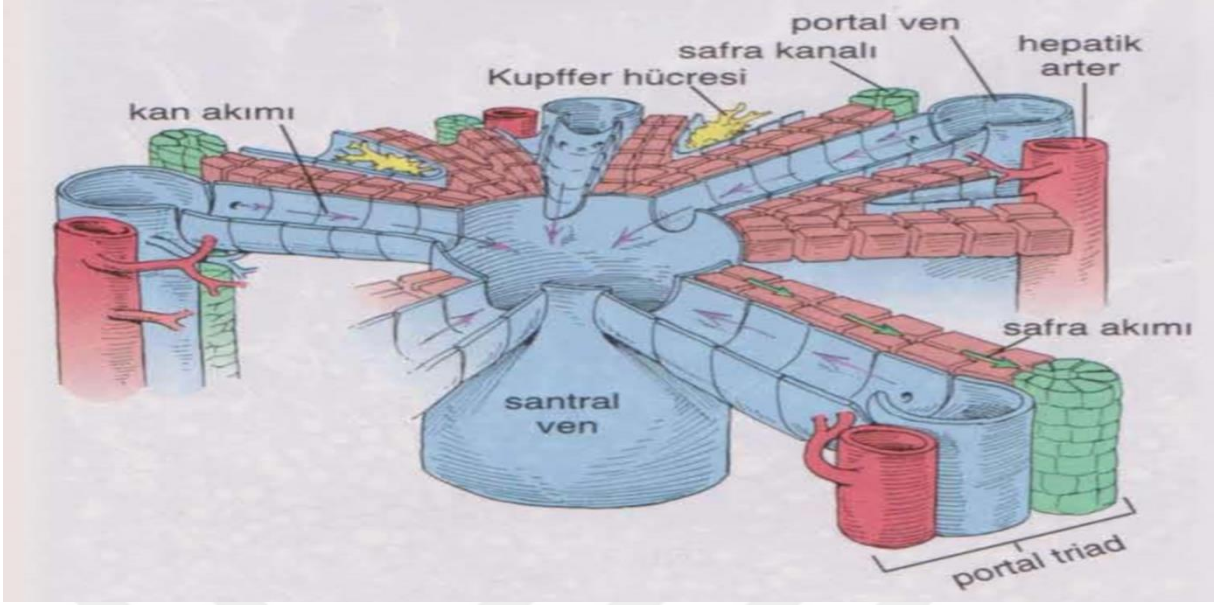
Resim 3. Truncus Çölyakus ve Dalları (Schünke M ve ark. 2009)

Hepatik arter karaciğere portal ven ve hepatik kanallarla birlikte portal kapıdan girip dallara ayrılır. Glisson kapsülünde, oradaki damar ve duktus katlarının beslenmesini sağlayan vaginal dalları verir. Ayrıca organ yüzeyinde uzanan ve stellat pleksusun fibröz tabakasında biten kapsüler dallar verir. Son olarak, interlobuler venlerin ve eşlik eden safra kanallarının duvarlarını beslemek için her lobül dışında bir pleksus oluşturan interlobüler dallar verir. Bu pleksustan gelen interlobüler dallar lobüle hücre aralarındaki sinüsoidlerden girerek sonlanır (Gray ve ark. 2000, Netter FH. 2006).



Resim 4. İntrahepatik Damar ve Kanal Sistemi (Netter FH. 2006)

Karaciğerin diğer besleyici damarı olan portal ven ise pankreas boynunun arkasında superior mezenterik ven ve splenik venin birleşmesiyle oluşur. Vena porta'ya bağlanan ek venöz dallar arasında; koroner(sol gastrik) ven, cystic ven ve sağ gastrik ven ile pankreatikoduodenal venin dalları yer alır (Abdel-Misih ve ark. 2010). Daha sonra portal ven hepatik arterle birlikte ligamentum hepatoduodenale içinde uzanarak porta hepatis'e gelir. Karaciğerde hepatik arter dalları ile birlikte seyredip vena centralise açılır. Santral venler birleşerek vena hepatica'ları oluşturur. Bu venler portal venden gelen kanları inferior vena kavaya taşır (Kaplan ve ark. 2014, Netter FH. 2006).



Resim 5. Karaciğerde Kan Ve Safra Akımı (Ross MH ve ark. 2014)

Portal ven basıncı 3-5 mmHg arasında olan düşük basınçlı bir sistem olup valv içermez. Koroner (sol gastrik) ven, portal hipertansiyon geliştiğinde büyük bir porto-sistemik şant haline geldiğinden ve oluşan gastroözofageal varisi beslediğinden klinik olarak özellikle önemlidir (Skandalakis ve ark. 2004). Bu portosistemik bağlantılar vücutta gastroözofageal bölgede (sol gastrik venin dalı ile azygos veni arasında), rektumda (üst, orta ve inferior rektal ven arasında), periumbilikal bölgede (sol portal, umbilikal, paraumbilikal ven ve yüzeysel ile derin epigastrik ven arasında) ve retroperitoneal (kolon ve dalak venleri ile renal, suprarenal ve gonadal venlerin arasında) bulunur (Agur ve ark. 2013).

Safra; su, kolesterol, fosfatidilkolin (lesitin), safra tuzları (en önemlileri taurokolik asit ve deoksikolik asit tuzları), safra pigmentleri (bilirubin ve biliverdin) ve elektrolitlerin birleşimiyle oluşur. Karaciğer intrahepatik safra kanal sistemi, hepatositlerde üretilen safranın duodenuma taşınmasından sorumlu olan ve portal venöz sistemi takip eden çoklu kanallardan oluşur (Ross MH ve ark. 2014, Blumgart LH ve ark. 2007). Hepatosit kenarlarından çıkan bu ilk safra kanalcıklarını (canaliculus biliferi) sadece karaciğer hücre duvarları sınırlar. Canaliculus biliferiler daha sonra diğerleriyle birleşerek büyür, duvarları kalınlaşır ve ductus biliferileri oluştururlar. Bunlar da karaciğer lobülleri arasındaki (Kierman aralığı) ductus interlobularis biliferiye dökülür. Ductus interlobularis biliferiler de birleşerek nihayetinde sağ ve sol ana hepatik duktus olarak porta hepatis'e ulaşır (Kaplan ve ark. 2014). Sağ ve sol ana hepatik duktus bir araya gelerek ductus hepaticus communis'i oluşturur. Ductus hepaticus

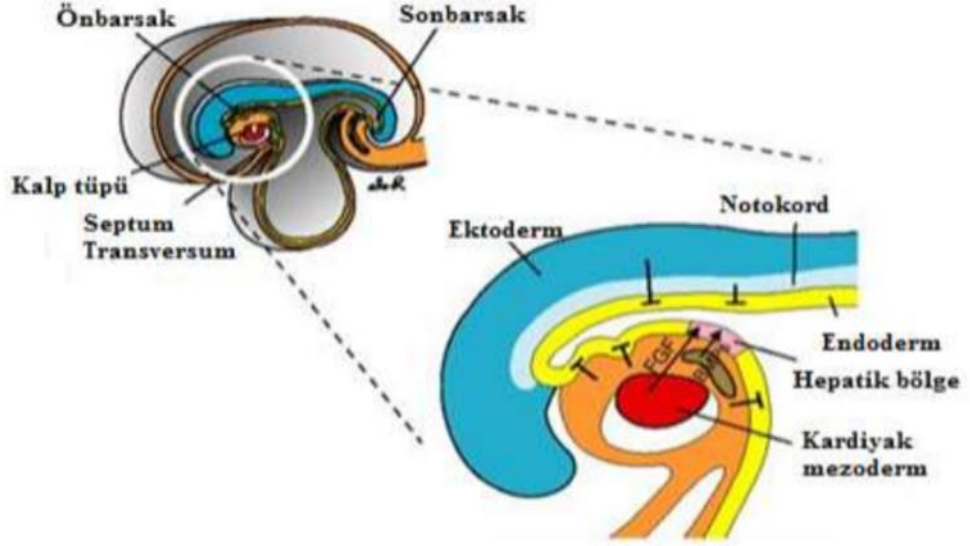
communis de hepatoduodenal ligamentin içinde ductus cysticus ile birleşerek koledok kanalını oluştururlar (Northover ve ark. 1979, Terblanche ve ark. 1983).

Karaciğer, bünyesinde üretilen lenfatik drenajın sirkülasyona katıldığı yüzeysel ve derin lenfatik ağa sahiptir (Skandalakis ve ark. 2004). Derin lenfatik ağ; hepatic venler yoluyla lateral frenik nodlara ve portal ven dalları ile hilusa dökülen daha büyük bir lenfatik drenajdan sorumludur (Blumgart ve ark. 2007). Superfisiyal lenfatik drenaj ise Glisson kapsülünün ön ve arka yüzeyindeki lenfatik akım iletiminden sorumludur. Karaciğer ön yüzündeki lenfatik drenaj, frenik lenf nodlarına oradan da mediastinal ve internal mammarial lenf nodlarına dökülür. Arka yüzeydeki lenfatik ağ; sistik kanal, koledok kanalı ve peripankreatik lenf nodlarının yanı sıra perikardiyal ve çölyak lenf nodlarıyla birlikte hiler lenf düğümüne drene olurlar (Abdel-Misih ve ark. 2010).

Karaciğerin sempatik ve parasempatik olmak üzere iki tip innervasyonu vardır (Ger ve ark. 1989). Sempatikleri nervi splanchnici'den parasempatikleri ise sağ ve sol nervus vagustan gelir. Sempatik ve parasempatiklerden gelen lifler önce çölyak pleksusu oluşturur. Çölyak pleksustan çıkan lifler hepatic arter ve portal ven etrafında pleksus hepaticus oluşturarak karaciğer girer. Hepatic damarlarda sadece sempatik lifler bulunurken, safra kesesi ve safra kanallarında sempatik ve parasempatik lifler beraber seyrederek. Duyu lifleri sempatik liflerle beraber uzanır ve T8-11 segmentleri arasında medulla spinalis'e girer. Bu nedenle karaciğer kaynaklı ağrılar 10. interkostal sinir dermatomunda hissedilir (Kaplan ve ark. 2014). Ek olarak karaciğerin üzerini kaplayan paryetal peritonun duyusu nervus phrenicus tarafından alınır (Roncati ve ark. 2017). Bu nedenle karaciğer paryetal peritonu kaynaklı ağrılar da sağ omuz bölgesinde hissedilir (Kaplan ve ark. 2014).

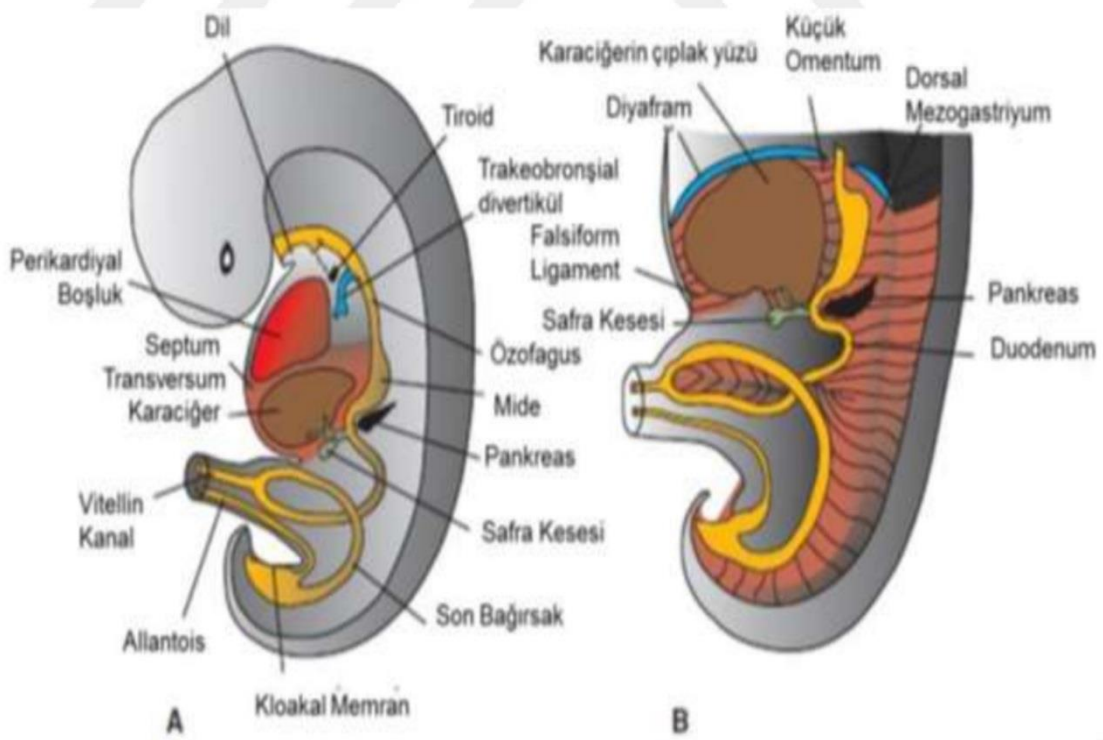
2.1.2.Karaciğer Embriyolojisi

Karaciğer tomurcuğu ya da diğer adıyla hepatic divertikül, 3. haftanın ortası ile 4. haftanın başı arasında ön bağırsağın kaudalinden ventral yönde bir çıkıntı olarak belirir (Sadler TW. 2012, Moore KL ve ark. 2016). Hepatic öncül progenitör hücreler, Wnt/ β -katenin sinyal yolağı aracılığıyla hepatositlere farklılaşır ve proliferasyon olurlar. Hepatic divertikülün embriyonik endoderme ait iki farklı hücre grubundan geliştiği düşünülmektedir. Embriyonik dönemde gelişmekte olan kalpten salgılanan fibroblast büyüme faktörü(FGF), bipotent hücreleri uyarır ve karaciğer tomurcuğu oluşumunu indükler (Monga SPS. 2014, Lade AG ve ark. 2011).



Resim 6. Karaciğer Gelişiminin Başlangıcı (Sadler TW. 2012)

Hepatik divertikül ventral mezogastriyum bölgesinde iki parçaya ayrılır. Hepatik divertikülün karaciğer taslağını oluşturan kısmı daha geniş olan kranial parçasıdır. Endodermal hücreler çoğalmaya devam eder ve hepatosit kordonları ile intrahepatik safra kanallarını döşeyen epiteli oluşturur. Hepatik kordonlar belirli bir düzenle ağ şeklinde yayılarak hepatic sinüzoidlerin taslağını oluştururlar. Karaciğerin geriye kalan hematopoetik dokusu, fibröz dokusu ve Kupffer hücreleri septum transversum mezenkiminden gelişir. Hızla büyüyen karaciğer, gelişimin 5. ile 10. haftaları arasında üst abdominal kavitenin çok büyük bir kısmını kaplar. Başlangıçta karaciğerin iki ana lobu olan sağ ve sol lobun büyüklükleri aynıdır, zamanla sağ lob sol loba göre daha fazla büyür ve erişkinlerdeki sağ-sol lob arasındaki gibi bir fark oluşmaya başlar. Hematopoez nedeniyle 6. haftadan itibaren kırmızı bir renk alan karaciğer, 9. hafta itibariyle fetüsün toplam vücut ağırlığının yaklaşık %10'unu oluşturur. 12. haftada hepatositler safra üretimine başlar (Moore KL ve ark. 2016, Sadler TW. 2012).



Resim 7. Gelişimin 5.-6. Haftası (Sadler TW. 2012).

Karaciğer tomurcuğunun küçük olan kaudal parçası safra kesesini, tomurcuğun sapı ise sistik kanalı oluşturur. Başlangıçta epitel hücreleriyle tıkalı olan ekstrahepatik safra kanalları, zamanla bu hücrelerin dejenerasyonu sonucu vakuolleşerek kanal yapısını oluşturur. Koledok kanalı(safra kanalı), hepatic ve sistik kanalları duodenuma bağlayan kordondan gelişir. 13. haftadan sonra kanaldan geçip duodenuma ulaşan safra, mekonyumun koyu yeşil bir renge bürünmesini sağlar (Keplinger KM ve ark. 2014, Vakili K ve ark. 2008).

2.1.3. Karaciğer Histolojisi

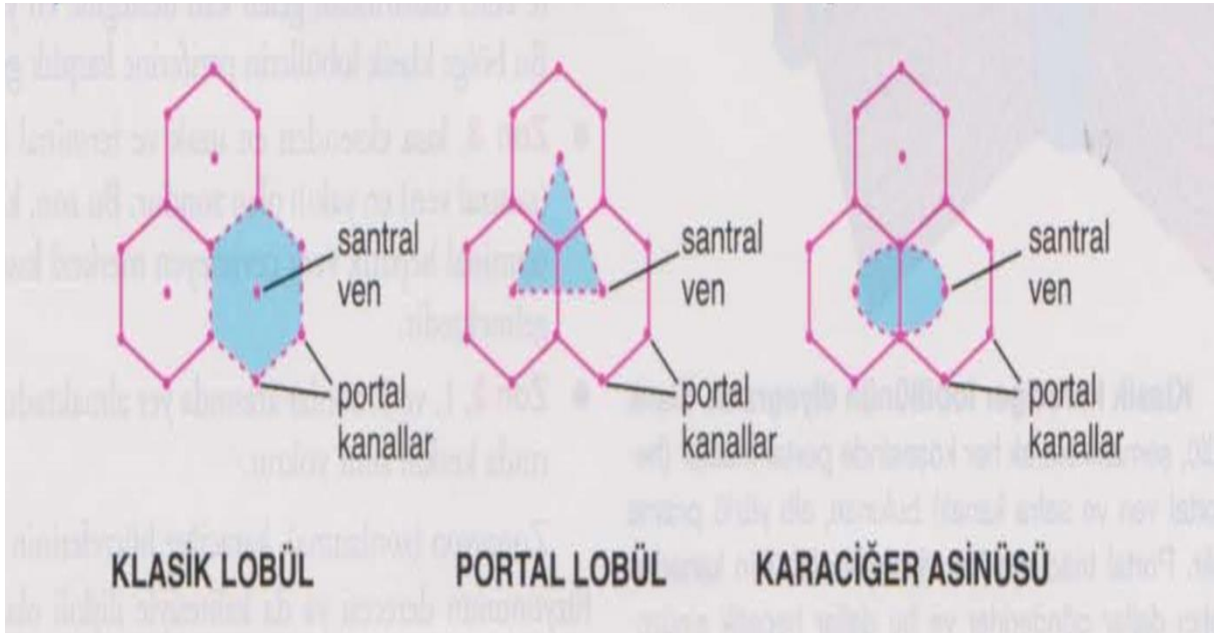
Karaciğer insan vücudunda bulunan en büyük ekzokrin bez olup, büyük bölümü sağ üst kadranda, küçük bir bölümü ise sol üst kadranda yer almaktadır. Proteinlerin sentezi, kandan besinlerin ve vitaminlerin alınması ve depolanması ve ayrıca dağıtılması fonksiyonlarını yerine getirmektedir. Gerek oral gerekse parenteral yolla alınan ilaçların, toksik maddelerin metabolizmasında ve detoksifikasyonunda görev alır (Crawford JM. 2015). Bağ dokusu tarafından sarılmış 4 lobtan oluşur. Diğer pek çok organ gibi bağ dokusu yapısındaki stroma ve organize fonksiyonel hücre grubu olan parankimden oluşur (Kierszenbaum AL. 2006, Ross MH ve ark 2014, Junqueira LC ve ark. 2003, Ovalle WK ve ark. 2009).

2.1.3.1.Stroma

Karaciğer dıştan visseral periton adı verilen seröz zarla kaplıdır. Visseral periton tek katlı yassı epitel diğer bir adıyla mezotelyum yapısındadır ve altında ince bir bağ dokusu yer alır. Visseral peritonun hemen altında karaciğeri saran fibröz bağ dokusu yapısında bir kapsül vardır. Bu kapsüle Glisson kapsülü adı verilir. Glisson kapsülü hilum bölgesinden içeri doğru ilerleyip, portal ven damar ağını ve safra kanallarını takip eden bir bağ dokusu olarak devam eder. Böylece karaciğer loblara ve lobüllere bölünmüş olur. Lobüllerin birbirleriyle birleştiği alanlarda bağ dokusunun kalınlığı artmıştır ve enine kesitlerde üçgen şeklinde gözlenen bu bölgelere portal aralık veya portal triad adı verilir. Burada hepatik arterin dalı, portal venin dalı ve safra kanalı yer almaktadır. Arter, daha düzgün lümenli ve daha kalın duvarlıdır. Venin ise lümeni daha düzensiz ve damar duvarı daha incedir. Safra duktusu tek katlı kübik epitele sahip olduğundan arter ve venden ayırt edilebilmektedir (Ovalle WK ve ark. 2009, Parker Ş. 1993).

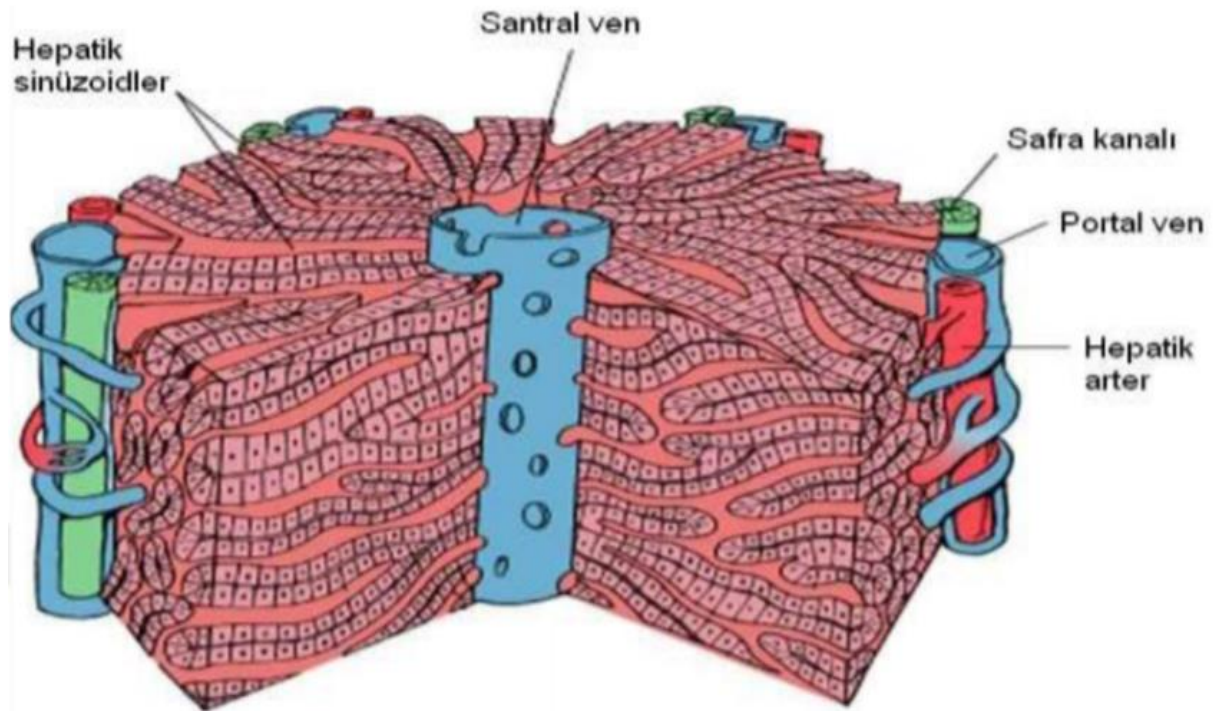
2.1.3.2.Parankim

Organize hepatosit kordonlarından oluşur. Bu kordonlar erişkinde tek hücre kalınlığındadır ve sinüzoidal kapillerler tarafından birbirinden ayrılmışlardır. 6 yaşına kadar ise bu kordonlar iki hücre kalınlığında düzenlenmişlerdir. Karaciğerin yapısı fonksiyonel açıdan incelenmesi için klasik lobül, portal lobül ve karaciğer asinüsü olmak üzere 3 farklı şekilde incelenir.



Resim 8. Klasik Lobül, Portal Lobül ve Karaciğer Asinüsü (Ross MH ve ark. 2014)

Klasik lobül; altıgen şeklindeki doku kitlesidir. Lobülün merkezinde santral ven(terminal hepatic venül) yer alır. Altıgenin köşelerinde portal triadlar yer alır. Hepatosit kordonları, klasik lobülün merkezindeki santral venden, lobülün periferine doğru ışınal tarzda uzanır. Hepatosit kordonlarının arasındaki sinüzoidler merkezdeki santral vene drene olmaktadır. Portal kanal, lobülün en dışındaki hepatositlerce sınırlandırılır; bu bölgedeki hepatositlerle bağ dokusu yapısındaki stroma arasında periportal aralık(Mall aralığı) adı verilen bir aralık vardır. Periportal aralık karaciğer lenfatik drenajından sorumlu yerlerden biridir. Domuz gibi bazı türlerde klasik lobül yapısı daha belirgindir; insanda ise klasik lobülün sınırları çok belirgin değildir.

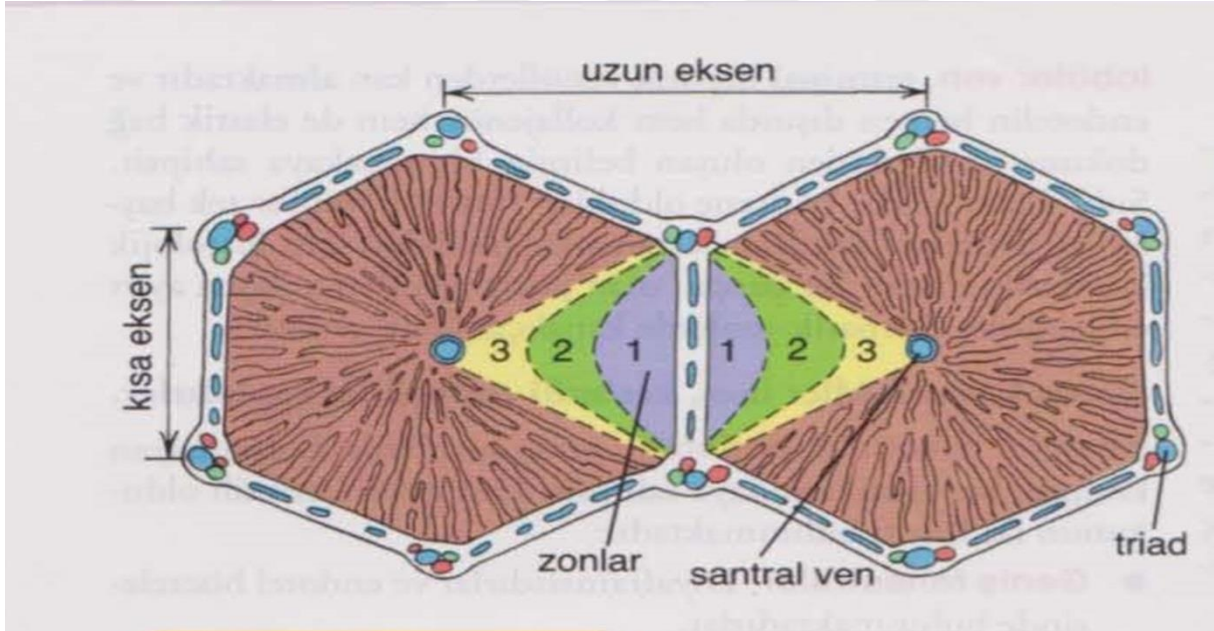


Resim 9. Karaciğer Klasik Lobül Yapısı (Ross MH ve ark. 2014)

Portal lobül; merkezi portal alandaki safra duktusu olan, dış kenarları ise aynı portal alana en yakın 3 santral ven arasındaki sanal çizgilerdir. Portal alandaki safra kanalına drene olan safrayı üreten alanı tanımlar ve karaciğerin ekzokrin fonksiyonunu gösterir.

Karaciğer asinüsü; eşkenar dörtgen şeklindeki karaciğerin en küçük fonksiyonel birimidir. Bu eşkenar dörtgen, komşu 2 klasik lobül arasındaki 2 santral ven ve bu 2 santral venin arasında kalan 2 portal triadın olduğu yeri tanımlar. Karaciğer asinüsü, karaciğer patolojisi, kan perfüzyonu ve metabolik faaliyet yönünden en iyi korelasyonu sağlayan yapısal birimdir. Karaciğer asinüsündeki hepatositler, kısa ekseni çevreleyen 3 konsantrik zon halinde bulunurlar. Zon 1, kısa eksene ve hepatic arterin dalı ile portal venin dalından gelen

kan desteğine en yakın olandır. Zon 1, klasik lobülün en periferine karşılık gelir. Portal triada en yakın olan zon olması dolayısıyla sinüzoidal kandan gelen toksinlere, besin maddelerine, oksijene daha çok maruz kalan bölgedir. Dolaşım bozulduğunda bile sinüzoidal kana yakın pozisyonda olmalarından dolayı en son ölen ve ilk ölen hücrelerdir. Ancak safra kanal tıkanıklığı ve toksinler bu zonu etkiler. Zon 3, kısa eksene en uzak ama santral vene en yakın olan zon ifade eder. Zon 3'teki hücreler, zon 1'in tersine kan perfüzyonundaki azalma sonucu iskemik nekroza ve yağ birikimine ilk uğrayan zondur. Toksik maddelere ve safra tıkanıklığına ise en geç maruz kaldığından en son yanıt veren hücreler zon 3'tedir. Zon 2 ise keskin sınırlarla belirli olmamasına rağmen zon 1 ve zon 3 arasında yer alan, morfolojik ve fizyolojik açıdan zon 1 ve 3'teki hücelere göre orta düzeyde olan bölgedir (Ross MH ve ark. 2014).



Resim 10. Karaciğer Asinüsü ve Zonları (Ross MH ve ark. 2014)

Sinüzoidlerde kan santral vene yani merkeze doğru akmaktadır. Santral ven klasik karaciğer lobülünün merkezi boyunca ilerler ve bir sublobüler vene boşalır. Birkaç sublobüler ven hepatik venleri oluşturarak, vena kava inferiora boşalır. Hepatik sinüzoidler ince ve kesintili bir bazal laminaya sahiptir. Buradaki endotel hücreleri diyaframsız ve geniş fenestralıdır (William KO ve ark. 2009).

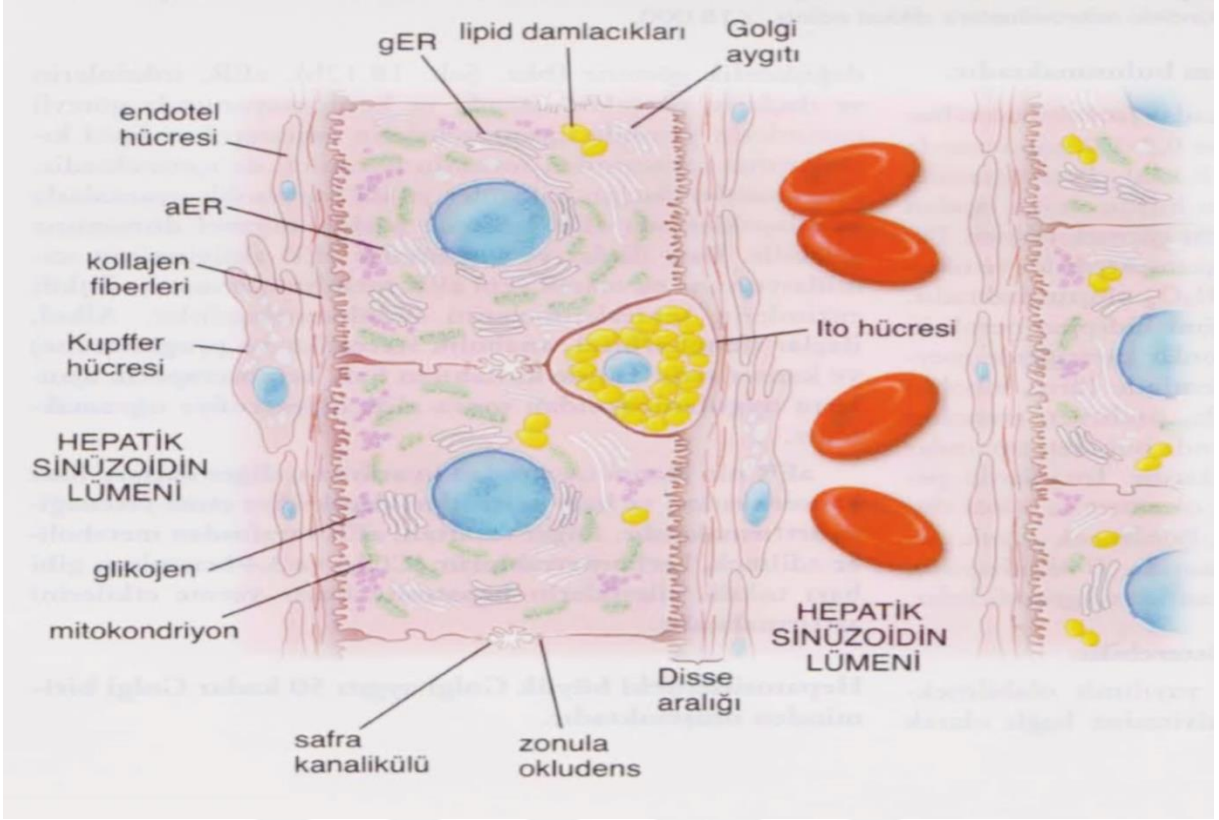
2.1.3.3. Hepatositler

Karaciğerdeki hücrelerin yaklaşık %80'ini oluşturan hepatositler geniş, poligonal ve her düzlemde 20-30 µm boyutundaki hücrelerdir (Ross MH ve ark. 2014). Hepatositlerin

merkezinde yer alan nükleusları geniş ve küre şekillidir. Hepatositler yaklaşık %20'si çift nükleusludur. Her nükleusta iyi gelişmiş en az 2 adet nükleolus bulunur. Sitoplazması genellikle asidofilik boyanma özelliği gösterir. Hepatositler kordon ya da plak olarak adlandırılan düzenli bir yapıda organize olmuşlardır (Junqueira LC ve ark. 2003, Ovalle WK ve ark. 2009).

Çeşitli boyama teknikleriyle hepatositler organel düzeyinde incelenebilmektedir. Her hepatositte sayısı 1000'e kadar çıkabilen mitokondriler, çok sayıda peroksizom, küçük çoklu golgi kompleksleri, bazofilik olarak gözüken granüllü endoplazmik retikulumlar(gER) ve serbest ribozomlar bulunur. Bunlar dışında Periyodik asit-Schiff(PAS) yöntemi ile gösterilebilen glikojen birikimleri, toluidin mavisi ya da Sudan Black boyası ile gözlenebilen lipid damlacıkları ve lizozomlarda bulunan yaşlılık pigmenti olarak da bilinen lipofuskin pigmenti gözlenebilir. Her hepatositte yaklaşık 200-300 adet peroksizom bulunur. Yapısında katalaz, D-amino asit oksidaz ve alkol dehidrogenaz enzimleri içermektedir. Özellikle hidrojen peroksitin parçalanıp, toksik etkilerinin ortadan kaldırılmasında peroksizomda yer alan katalaz enzimi büyük bir role sahiptir. Hepatositlerde düz endoplazmik retikulum sayısı, o sırada karaciğerin maruz kaldığı ilaç ve toksinlere göre değişkenlik gösterebilmektedir. Çünkü toksinlerin ve ilaçların metabolize edilmesinde görev alan enzimleri içermektedir (Ross MH ve ark. 2014, Ovalle WK ve ark. 2009, Hiatt JL ve ark. 2013).

Hepatositler çok yüzeyle olmalarına rağmen, kolaylık bakımından 6 yüzeyle olarak tanımlanır. Bu yüzeylelerden ikisi perisinüzoidal aralığa bakar. Perisinüzoidal aralığa bakan kısımda bolca mikrovillus bulunmaktadır. Diğer 4 yüzü ise safra kanaliküllerine ve komşu hepatositlere bakar.

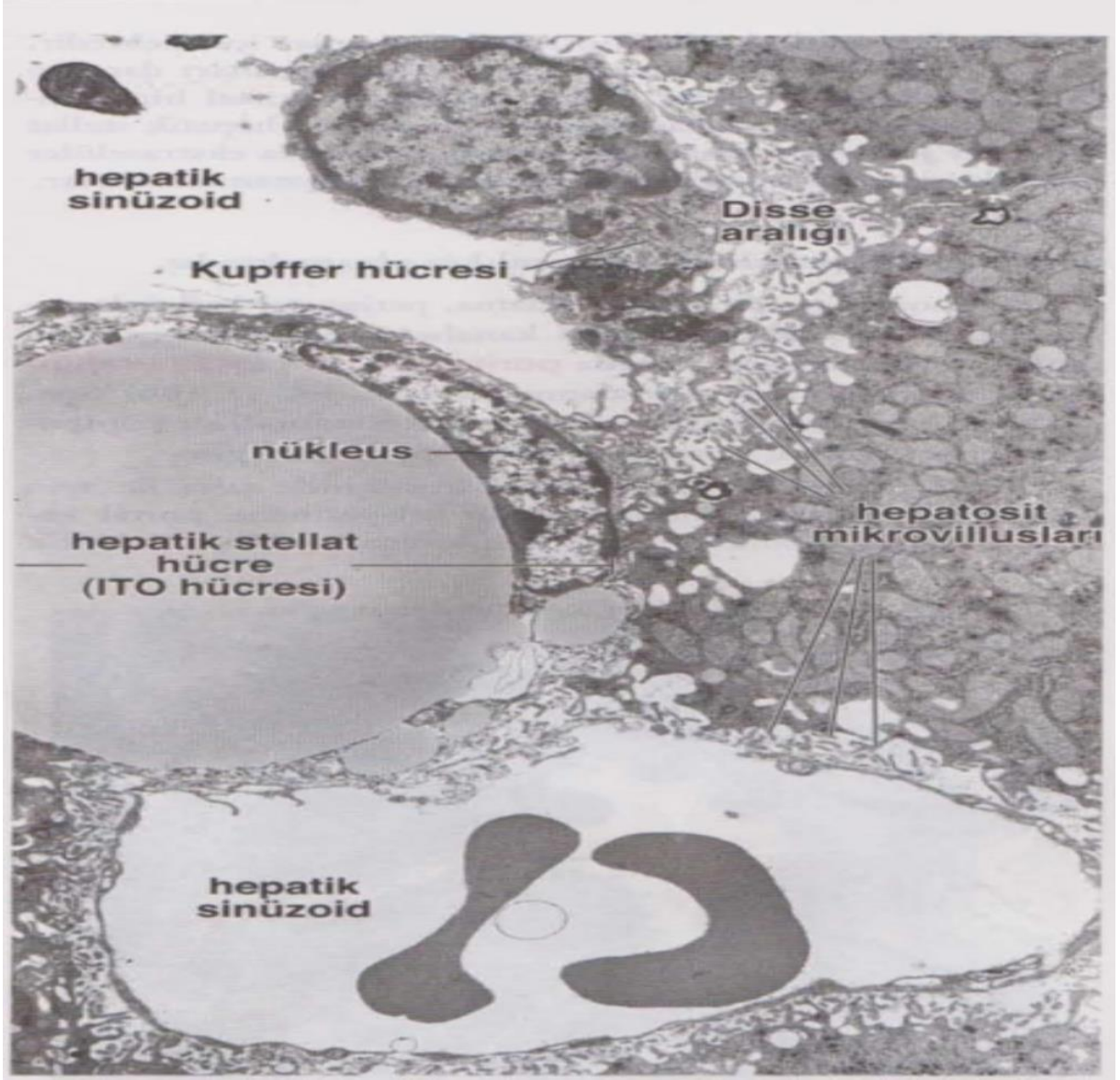


Resim 11. Hepatosit Plağı (Ross MH ve ark. 2014).

2.1.3.4. Karaciğerin Diğer Hücreleri

Hepatik sinüzoidler diğer sinüzoidlerden farklı olarak duvarlarında Kupffer hücreleri bulundurur. Kupffer hücreleri mononükleer fagositik sistemin üyesi olan özelleşmiş bir makrofajdır. Endotel hücrelerine göre daha büyük olan bu hücreler, yaşlı eritrositlerin son yıkımlarında görevlidir (Ross MH ve ark. 2014, Hiatt JL ve ark. 2013).

Endotel hücreleri hepatic sinüzoidleri kaplar. Kesintili bir bazal laminası vardır. Diyaframsız olan endotel hücreleri geniş fenestralara sahiptir ve diğer komşu endotel hücreleriyle aralarında geniş boşluklar bulunmaktadır. Hepatositlerin bazal yüzeyleri ile sinüzoidleri döşeyen Kupffer hücreleri ve endotel hücreleri arasında Disse aralığı da denilen perisinüzoidal aralık bulunmaktadır. Disse aralığı, karaciğer ile kan hücreleri arasında madde alışverişi yapılan bölgedir. Hepatositlerin bazal yüzeylerinden Disse aralığına doğru düzensiz, küçük mikrovilluslar uzanır. Bu mikrovilluslar sayesinde yüzey alanı 6 kat artar ve emilim artırılmış olur. Endotel hücrelerin kesintili bir bazal laminası olması sayesinde burada madde alışverişi bariyer olmaksızın gerçekleşebilmektedir (Ross MH ve ark. 2014, Hiatt JL ve ark. 2013).



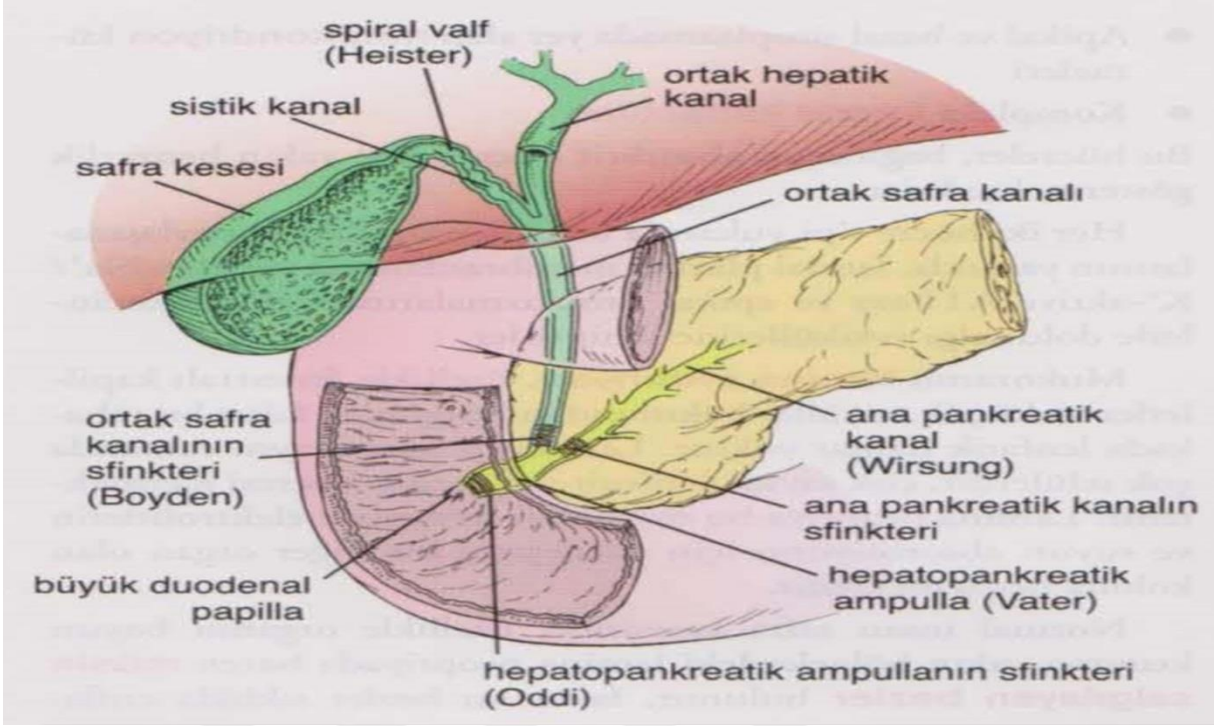
Resim 12. Hepatik Sinüzoidin Elektron Mikroskopik Görüntüsü (Ross MH ve ark. 2014)

Stellat hücreler(Ito hücreleri), disse aralığında bulunur. Endotel hücrelerine yakın konumda bulunurlar ve hepatositlerin bazal yüzeylerinde yer alan mikrovillullara gömülü halde bulunurlar. Lipid içeren bu hücreler mezenşim kaynaklıdır ve A vitamininin metabolizmasında ve depolanmasında görev alırlar (Kierszenbaum AL. 2006). Retinil esterleri halinde depolanan A vitamini, stellat hücrelerden alkol formu olan retinol şeklinde retinol-bağlayıcı bağlayıcı proteine bağlı olarak salınır. Daha sonra retinaya giden retinol, izomeri olan 11-cis retinalin opsin proteinine bağlanmasıyla retinanın rod ve koni hücrelerinin görme ile ilgili pigmenti olan rodopsine dönüşür (Ross MH ve ark. 2014).

2.1.3.5. Biliyer Ağaç

Kolanjiyosit adı verilen epitel hücreleri ile döşeli olan biliyer ağaç; safranın üretildiği yer olan hepatositlerden safra kesesine ve daha sonrasında bağırsağa döküldüğü yere kadar olan ve çapı gittikçe artan kanal sistemidir. Kolanjiyositler hepatositlere benzer olarak apikal bölgelerinde lümene uzanan mikrovilluslar içerir. En küçük safra kanalları tek katlı kübik epitelle döşeli iken, safra kanalının çapı arttıkça epitel hücrelerinin boyutu büyür ve prizmatikleşir (Ross MH ve ark. 2014, Ovalle WK ve ark. 2009, Hiatt JL ve ark. 2013).

Safra kanalikülleri biliyer ağacın en küçük dallarıdır. Zonula adherens ve desmozomlar aracılığıyla hücrenin diğer kısımlarından ayrılmışlardır. Safra akışı kan akımının tersine merkezden periferine doğrudur, yani santral ven bölgesinden portal triada doğrudur. Safra kanalikülü lobül içersinde ilerleyip portal kanala ulaştığında Hering kanallarına dönüşür. Hering kanallarının döşemesinde hem kolanjiyositler hem de hepatositler bulunur. Hering kanalı kontraktildir, bu sayede safranın akışı sağlanır. Hepatositler ve kolanjiyositler arasındaki bu bölgede yer aldığından karaciğer kök hücrelerinden oluştuğu ya da karaciğer kök hücrelerini de ihtiva ettiği düşünülmektedir. Hering kanalındaki safra, tamamen kolanjiyositlerden oluşan intrahepatik safra kanalından akmaya devam eder. İntrahepatik safra kanalları ise safrayı portal triadın bir kısmını oluşturan interlobüler safra kanallarına taşır. Bu kanallar tek katlı kübik yapıdaki kolanjiyositlerce döşenmiştir. Safra kanalları genişleyip ilerledikçe epiteli hem kübikten prizmatığe doğru büyür hem de elastik lifler içeren sıkı bir bağ dokusu ile sarılırlar. Bu kanallar hilusa ulaştıklarında bu bağ dokusu içerisinde düz kas lifleri de görülmeye başlar. İnterlobüler kanallar birleşerek sağ ve sol hepatik kanalları, sağ ve sol hepatik kanallar da birleşerek duktus hepatikus kommunisi(ortak hepatik kanal) oluşturur. Duktus hepatikus kommunis 3 cm uzunluğundadır ve yüksek prizmatik epitelle döşelidir. Duktus hepatikus kommunis sistik kanal aracılığıyla safra kesesi içine ve dışına taşır. Sistik kanal ve duktus hepatikus kommunis birleşerek ortak safra kanalını oluşturur ve ampulla vateriye kadar uzanır. Ampullada burada Oddi sfinkterini oluşturur. Oddi sfinkteri ortak safra kanalı ve pankreatik kanalın duodenuma geçişini düzenleyen bir kapak görevi görür (Ross MH ve ark. 2014, Ovalle WK ve ark. 2009, Hiatt JL ve ark. 2013, Abdel-Misih SR ve ark. 2010).



Resim 13. Hepatik, Pankreatik ve Safra Kesesi Kanalları Arasındaki İlişki (Ross MH ve ark. 2014)

2.1.4. Karaciğerin Fizyolojisi

Karaciğer vücuttaki en büyük solid ve bez organ olmasının yanı sıra; besin maddelerinin metabolizmasında ve oluşan toksik atıklarının atılmasında görev alan en hayati organdır (Ozougwu ve ark. 2014). İşlevsel yapıdaki en küçük birimi 0.8-2 mm çapında ve birkaç milimetre uzunluğunda silindirik yapıda olan karaciğer lobülüdür. İnsan karaciğerinde yaklaşık 50.000-100.000 adet lobül bulunur (Hall J.E. 2017).

Karaciğerin birincil fonksiyonu sindirim sisteminden emilen maddelerin dolaşıma katılmadan önceki kontrolünü sağlamaktır (Allen ve ark. 2002). Sindirim sisteminden emilen kan karaciğere portal ven aracılığıyla ulaşır. Bu kan hepatositler ve arasındaki sinüsoidlerde süzülerek hepatik venlere oradan da vena cavaya dökülür. Karaciğer tabakaları arasından geçen kanın kimyası büyük ölçüde değiştirilir (Barret ve ark. 2015). Süzülen kandan besinlerin ve vitaminlerin; alınması, dağıtılması ve depolanmasında rol oynamaktadır (Ross ve ark. 2014).

Karaciğerin başlıca görevleri:

- Safra yapımı ve salgılanması

- Bilirubin metabolizması
- Vasküler ve hematolojik fonksiyonları
- Besinlerin metabolizması
- Toksik metabolitlerin detoksifikasyonu
- Mineral ve vitaminlerin depolanması
- Endokrin fonksiyonları
- İmmünolojik fonksiyonları (Retiküloendotelyal komponent) (Ozougwu JC. 2017).

2.1.4.1. Safra Yapımı ve Salgılanması

Karaciğer günde 700 ila 1200 cc safra salgılayarak bağırsakta besin sindirimine yardımcı olur (Ozougwu JC. 2017). Safra altı ana bileşenden oluşur: safra tuzları, lesitin(fosfotidilkolin), bikarbonat, kolesterol, safra pigmentleri, az miktarda metabolik son ürünler ve eser metaller (Widmaier E.P. ve ark. 2014). Konjuge safra asitleri olan safra tuzları, yağların ince bağırsakta emülsifikasyonu ve emilimi için gereklidir. Hepatositler tarafından oluşturulup karaciğer içindeki safra kanaliküllerine salgılanır (Ozougwu JC. 2017). Daha sonra bu safra kanalikülleri birleşerek duktus hepatikus oluştururlar. Duktus hepatikustan sistik kanala akan safra, safra kesesine taşınıp burada yoğunlaştırılır (Ross ve ark. 2014). Safra kesesinden gelen duktus sistikus, duktus hepatikusla birleşerek koledok kanalını oluşturur. Daha sonra pankreas kanalıyla birleşerek ya da ayrı ayrı olarak duodenumun 2. kısmına açılırlar (Kaplan ve ark. 2014). Yağ sekresyon ve emilimi kolaylaştırıldıktan sonra çoğu safra tuzu terminal ileumdan aktif olarak geri emilir ve resekresyon için portal dolaşım ile karaciğere geri döner (Ozougwu JC. 2017). Karaciğerden intestinlere ve oradan tekrar karaciğere olan bu yol enterohepatik dolaşım olarak bilinir (Widmaier E.P. ve ark. 2014).

2.1.4.2. Bilirubin Metabolizması

Ortalama yaşam süresi 120 gün olan eritrositlerin yaşam sonunda frajiliteleri artar ve RES (Retiküloendotelyal Sistem)'te yer alan doku makrofajları tarafından parçalanırlar. Bu parçalanma sonucunda hemoglobinin açığa çıkar. Fagositoz sonrası ortaya çıkan bu hemoglobin hem ve globine ayrılır (Hall J.E. 2017). Globin daha sonra yeni proteinlere dönüşmek üzere parçalanır. Hem grubu demirin enzimatik yolla ayrılması sonucu biliverdine dönüşür. Demir plazmada transferrine bağlanıp karaciğerde depolanabilir veya kemik iliği tarafından yeni kırmızı kan hücreleri yapmak için kullanılabilir. Biliverdin makrofajlar tarafından fagosite

edilip enzimatik yolla bilirubine dönüştürülür. Plazmada bilirubin albümine bağlanıp unkonjuge(indirek=serbest) bilirubine dönüşür (Ozougwu JC. 2017). Serbest bilirubin organik anyon taşıyıcı peptid(OATP) grubuna üye bir molekül tarafından karaciğere alınıp sitoplazmik proteinlere bağlanır. Ardından daha çok endoplazmik retikulumda bulunan, UDP-Glukronil Transferaz enziminin katalizlediği reaksiyonla konjuge(direk) bilirubine dönüştürülür (Barret ve ark. 2015). İndirek bilirubin konjuge edildiğinde; zırları geçebilen, lipitte çözünebilen bir maddeden; safra yoluyla atılabilen ve suda çözünen bir maddeye dönüşür. Konjuge bilirubin distal ileum ve kolona ulaştığında, mevcut flora bakterileri tarafından dekonjuge edilir ve ürobilinojene dönüştürülür. Oluşan ürobilinojenin çoğu idrarla az bir kısmı da feçes yoluyla atılır (Ozougwu JC. 2017).

2.1.4.3. Vasküler ve Hematolojik Fonksiyonları

Karaciğer elastik bir organ olduğu için genişleyebilir ve kan damarlarında mevcut kapasitesinden daha fazla miktarda kan depolayabilir. Karaciğerin toplam kan hacmi (karaciğer sinüs ve venleriyle birlikte) 450 ml'dir ve bu miktar vücudun toplam kan hacminin %10'u kadardır (Hall J.E. 2017). Karaciğer kan depo özelliği sayesinde hemoraji durumlarında sistemik dolaşım hacmini korumak için kan serbest bırakır. Karaciğer sinüzoidlerindeki kuppfer hücreleri portal kan yoluyla karaciğere giren bakterileri ve yabancı partikülleri fagosite ederek enterohepatik siklustan kaynaklanabilecek enfeksiyonları önler (Ozougwu JC. 2017). Karaciğer ayrıca fibrinojen (faktör 1), protrombin (faktör 2), faktör 7 ve birçok pıhtılaşma faktörünün yapımında kilit rol oynamaktadır. Faktör 2, 7, 9 ve 10'nun yapımı K vitamini gerektirir. K vitamini eksikliğinde bu pıhtılaşma faktörleri azalacağından koagülasyon pathwayi bloke olur ve pıhtılaşma engellenir (Hall J.E. 2017).

2.1.4.4. Besinlerin Metabolizması

Hepatositler yüksek metabolizma hızına sahip hücreler olup, karaciğerde kimyasal aktif bir alan oluştururlar (Hall J.E. 2017). Diyetle alınan nutrientleri vücudun kullanabileceği maddelere dönüştürür, bu maddeleri depolar ya da gerektiğinde hücrelere enerji kaynağı olarak gönderir (Schmidt ve ark. 2011).

2.1.4.4.1. Karbonhidrat Metabolizması

Karaciğerin karbonhidratlar üzerinde; glikojen halinde depolama, galaktoz ve fruktozu glukozu çevirme, glikoneogenez ve karbonhidrat metabolizması ara ürünlerinden birçok önemli biyolojik molekülleri sentezleme gibi fonksiyonları vardır (Hall J.E. 2017). Karaciğer

ayrıca hipoglisemi durumlarında glukozu kana serbestleştirerek, hiperglisemi durumlarında da kandaki yüksek glukozu alıp glikojen ya da yağ halinde depolayarak kan şekeri stabilitesine katkıda bulunur. Karaciğer tüm glikojen depoları kullanıldığında; aminoasitleri ve gliserolü enerji kaynağı olarak kullanmak üzere glukozu çevirebilir (glukoneogenez) (Ozougwu JC. 2017).

2.1.4.4.2. Lipid Metabolizması

Karaciğerin yağ metabolizmasında da aktif rolü vardır. Yağ asidi oksidasyonunu sağlayarak kendisine ve tüm vücuda enerji kaynağı oluşturur. Aminoasit ve karbonhidrat metabolizması sonucu açığa çıkan iki karbonlu birimler de depolanmak ve ihtiyaç halinde kullanılmak üzere yağa dönüştürülür (Barret ve ark. 2015). Kolesterolün biyosentezi ve kandan karaciğere transportunu sağlamak da karaciğerin önemli bir fonksiyonudur. Karaciğerde sentezlenen lipoproteinlerin yapısına katılan, safra tuzlarının oluşumunda ve organellerin biyosentezinde kullanılan kolesterolün, karaciğer tarafından vücut içi homeostazı sağlanır (Barret ve ark. 2015, Ross ve ark. 2014).

2.1.4.4.3. Protein Metabolizması

Albumin ve globülin dahil olmak üzere (gamaglobülin hariç) tüm plazma proteinleri karaciğerde sentezlenir. Karaciğer ayrıca alanin aminotransferaz, aspartat aminotransferaz, alkalen fosfataz ve laktat dehidrogenaz gibi serum enzimleri ile esansiyel olmayan aminoasitleri sentezler (Ozougwu JC. 2017). Tüm bu işlevlerine ek olarak protein ve nükleik asitlerin yıkımı sonucu açığa çıkan amonyum iyonlarından vücuttaki üreyi sentezler. (üre siklusu) (Ross MH ve ark. 2014).

2.1.4.5 Toksik Metabolitlerin Detoksifikasyonu

Hepatositler; toksinlerin, ilaçların ve vücuda beslenme yoluyla aldığımız yabancı proteinler olan ksenobiyotiklerin indirgenmesinde görevlidir (Ross ve ark. 2014). Karaciğerin bu işlevinin bir kısmı fiziksel olup vücuda alınan bakteri ve partiküllerin sinüzoidlerde bulunan Kupffer hücreleri tarafından fagosite edilmesiyle mümkündür. Diğer bölümü ise biyokimyasal olup hepatositlerde bulunan çok sayıdaki sitokrom p450 enzimi ve diğer enzimlerin katalizlediği reaksiyonlarla mümkündür (Barret ve ark. 2015). Bu reaksiyonlar faz 1 ve faz 2 reaksiyonlar olarak adlandırılır. Faz 1 enzim ailesinin amacı, lipofilik moleküllerin hidroksil gruplarına polar gruplar ekleyerek onları hidrofilik hale getirmektir (Park ve ark. 1995). Faz 2 enzimlerinin ana işlevi; faz 1 enzimleri tarafından moleküllere eklenen hidrofilik

yapıdaki polar gruba kovalent olarak bağlanmaktadır. Genellikle bu moleküller glukronik asit veya glutatyon gibi şekerlerdir (Liu ve ark. 2004). Bu reaksiyonlar sonucunda faz 1 de hidrosillenerek hidrofilitesi arttırılan ürün, faz 2 sonucu suda daha çözünebilir hale getirilip böbrekler tarafından kolayca vücuttan uzaklaştırılır (Ross ve ark. 2014).

2.1.4.6. Mineral ve Vitaminlerin Depolanması

Karaciğer demir ve bakır gibi bazı mineral ve vitaminleri ihtiyaç halinde kana salıvermek üzere depolar. Birkaç ay boyunca B12 ve D vitaminini, birkaç yıl boyunca da A vitaminini depolayabilir (Ozougwu JC. 2017).

A vitamini; görme mekanizmasında rol oynayan bir molekül olup rodopsin sentezi için gerekli olan retinalin prekürsörüdür. Karaciğerde stellat hücrelerde depo edilip ihtiyaç halinde kana salınır.

D vitamini, iskelet sistemi ve dişlerin gelişip büyümesi için gerekli bir vitamindir. Karaciğer D3 vitaminini hidrosilleyerek D vitamininin baskın formu olan 25-OH D3'e dönüştürür. Daha sonra 25-OH-D3 böbrekte tekrar hidrosillenerek 1-25 (OH)2 D3'e yani D vitaminin en potent formuna dönüşür (Ross ve ark. 2014).

Hemoglobin içindeki demir hariç vücuttaki demirin büyük bir kısmı karaciğerde ferritin şeklinde depo edilir. Kandaki demir düzeyi düştüğünde karaciğerdeki ferritin demiri serbestlenir. Böylece karaciğer, kan demirinin dengesini sağlar (Hall J.E. 2017).

2.1.4.7. Endokrin İşlevleri

Karaciğer diğer endokrin organlar tarafından salınan hormonları etkileyerek işlevlerini düzenler:

- Vit D'yi hidrosilleyerek baskın formuna dönüştürür.
- Tiroid bezi tarafından kana salınan tiroksini (T4) deiyoidinize ederek periferik dokularda etkin formu olan T3'e dönüştürür.
- Büyüme hormonunun salınımını regüle eden GHRH (Growth Hormon Releasing Hormon) karaciğerde üretilmektedir.
- İnsülin ve glukagon lüzum halinde birçok organ indirgenerek etkinlikleri modifiye edilebilir ancak bu hormonların en çok indirgendiği iki organ böbrek ve karaciğerdir (Ross ve ark. 2014).

2.1.4.8. İmmunolojik İşlevleri

Karaciğer doğal bağışıklık hücreleri açısından zengin olup bağırsak mikrobiyotasından kaynaklı çok sayıda antijen ve endotoksinlere maruz kalan merkez yapıdaki immünolojik bir organdır (Heymann ve ark. 2016). Buradaki ana hücre tipleri: Kupffer hücreleri ve NK (Naturel Killer) hücreleridir. Karaciğer lenfositlerinin yaklaşık %30'u NK hücreleri olup karaciğer immünesine büyük katkıları vardır (Mechal ve ark. 2001). NK hücreleri karaciğerin en fazla interferon-gama(IFN- γ) üreten hücre grubu olup LPS (lipopolisakkarit)'ye cevap olarak bu sitokini üretirler. Bu olay da kısmen kupffer hücrelerinden salınan interlökin-12(IL-12)'nin NK hücrelerini aktive etmesi sayesinde gerçekleşir (Ozougwu J.C. 2017).

Kupffer hücreleri kanda dolaşan monositlerden üretilir ve ihtiyaç durumunda karaciğerde inflamatuvar sürecin başlatılmasında büyük rol oynar. Kupffer hücrelerinin işlevleri periportal ve perivenöz olmalarına göre farklılık gösterir. Periportal hücreler; daha büyüktür ve portal dolaşım yoluyla bağırsaktan kan dolaşımına girerek karaciğere gelen bakterilere karşı ilk savunma hattını oluşturmada daha aktiftir (Itoh ve ark. 1992). Diğer yandan perivenöz kupffer hücreleri daha küçük olup prostaglandinlerin yanı sıra büyük miktarlarda nitrik oksit üretirler (Ozougwu J.C. 2017).

NK hücreler ve kupffer hücreleri bağışıklık sistemini aktive ederek Th1 benzeri sitokin salgırlar. IL-10 gibi immun sistemi baskılayan sitokinler ise stellate hücre ve regülatör T hücreler tarafından salgılanır. Ama aynı zamanda NK hücreler ve kupffer hücreleri tarafından da salgılanabilir (Erhardt ve ark. 2007).

2.2.Sıçan Karaciğerinin Yapısı

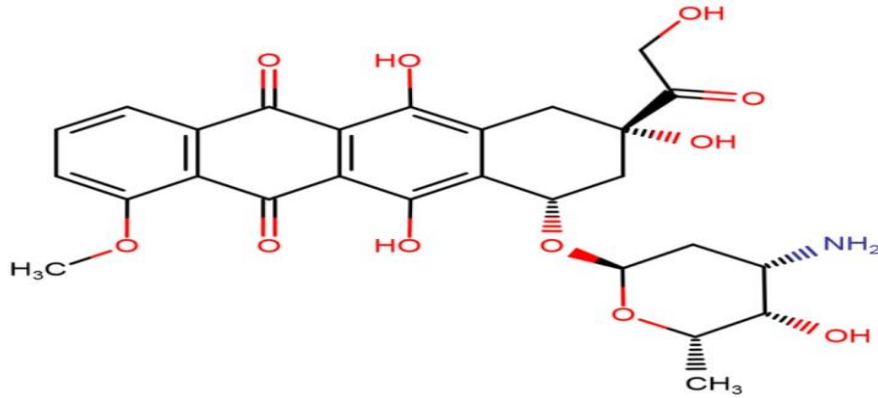
Sıçanlarda karaciğer karın boşluğunun sağ üst bölgesinde yer alır ve yaklaşık 10 gramdır. Area nuda bölgesi hariç tamamen peritonla kaplıdır. Sağ ve sol lob olarak 2 büyük lobu ve kaudat ve orta lob olarak 2 küçük lobu olmak üzere 4 lobdan oluşur. Sıçanlarda safra kesesi bulunmadığından karaciğerde üretilen safra, hepatik kanalla doğrudan duodenuma boşaltılır. Sıçan karaciğeri büyük ölçüde insan karaciğeriyle benzerlikler göstermektedir (Çay M. 2012) (Resim 14).



Resim 14. Sıçan Karaciğeri (Duan XY ve ark. 2014)

2.3.Doksorubisin(DOX)

Doksorubisin kimyasal formülü $C_{27}H_{29}NO_{11}$ olan antrasiklin yapıda bir antibiyotiktir (Resim 15)



Resim 15. Doksorubisinin kimyasal yapısı (Livertox 2018)

Doksorubisin çeşitli lenfoma, lösemi, sarkoma ve solid organ tümörlerinin tedavisinde kullanılan en etkili antineoplastik ilaçlardan biridir (Shabalala S ve ark. 2017, Gewitz DA. 1999, Minotti G ve ark. 2004, Mross K 1991, Sayed-Ahmed M.M. ve ark. 2010). Yaygın kullanımına rağmen doksorubisinin sitotoksik etkileri çok yönlüdür ve en çok kardiyotoksisite ve hepatotoksisite yapmaktadır. Bu etkilerini azaltmak için 2000'e yakın analogu bulunmuştur. Örneğin, epirubisin, bir karbonunda hidrosil grubunun aksiyel epimerizasyonu ile elde edilen yarı sentetik bir doksorubisin türevidir. Epirubisindeki bu pozisyonel değişiklik, antineoplastik aktivitenin spektrumu ve etki şekli olarak doksorubisin ile pek fark oluşturmamaktadır; ancak farmakokinetik olarak bazı değişikliklere neden olmaktadır. Bu sebeple epirubisinin daha geniş bir dağılım hacmi olmaktadır ve toplam vücut klerensinin

artışıyla beraber epirubisin daha kısa yarılanma ömrüne sahip olmaktadır (Carvalho C ve ark. 2009).

Doksorubisin, toz olarak 10, 20, 50, 100, 150 ve 200 mg'lık şişelerde (2 mg / mL) ve jenerik olarak Adriamisin ismiyle sıvı çözelti halinde piyasada mevcuttur. Doksorubisin tipik olarak 21 ila 28 günde bir 60-75 mg/m² vücut yüzey alanı dozlarında intravenöz olarak verilmektedir. İlaç dozu; endikasyona, vücut yüzey alanına ve karaciğerin fonksiyon durumuna göre değişmektedir. Yaygın yan etkiler; kemik iliği supresyonu, bulantı, kusma, mukozit, ishal, baş ağrısı, baş dönmesi, konfüzyon, nöropati, alopesi, deri döküntüsü ve ateştir. Doksorubisin ile yüksek dozda veya uzun süreli tedavi, ciddi kardiyak toksisiteye ve karaciğer hasarına ve dolayısıyla doz kısıtlayıcı yaklaşımlara neden olmaktadır. DOX tedavisi sırasında ilacın damar dışına sızması ciddi lokal doku hasarına neden olmaktadır. Tedavi edilen hastalar üzerinde yapılan uzun süreli çalışmalar, (kümülatif yani) biriken toplam olarak yüksek dozlarda doksorubisin alanlarda ikincil malignitelerin daha sık ortaya çıkabileceğini düşündürmektedir (Livertox 2018).

DOX tedavisine bağlı; kemik iliği toksisitesi, kardiyotoksisite, hepatotoksisite, nefrotoksisite, üreme sistemi ve sinir sistemi toksisiteleri geliştiğini gösteren sayıda deneysel model vardır (Mihailović-Stanojević N ve ark. 2009, Roomi MW ve ark. 2014, Dragojević-Simić V ve ark. 2013, Pugazhendhi A ve ark. 2018, Saad YS ve ark. 2000, Ibrahim SZ ve ark. 2010).

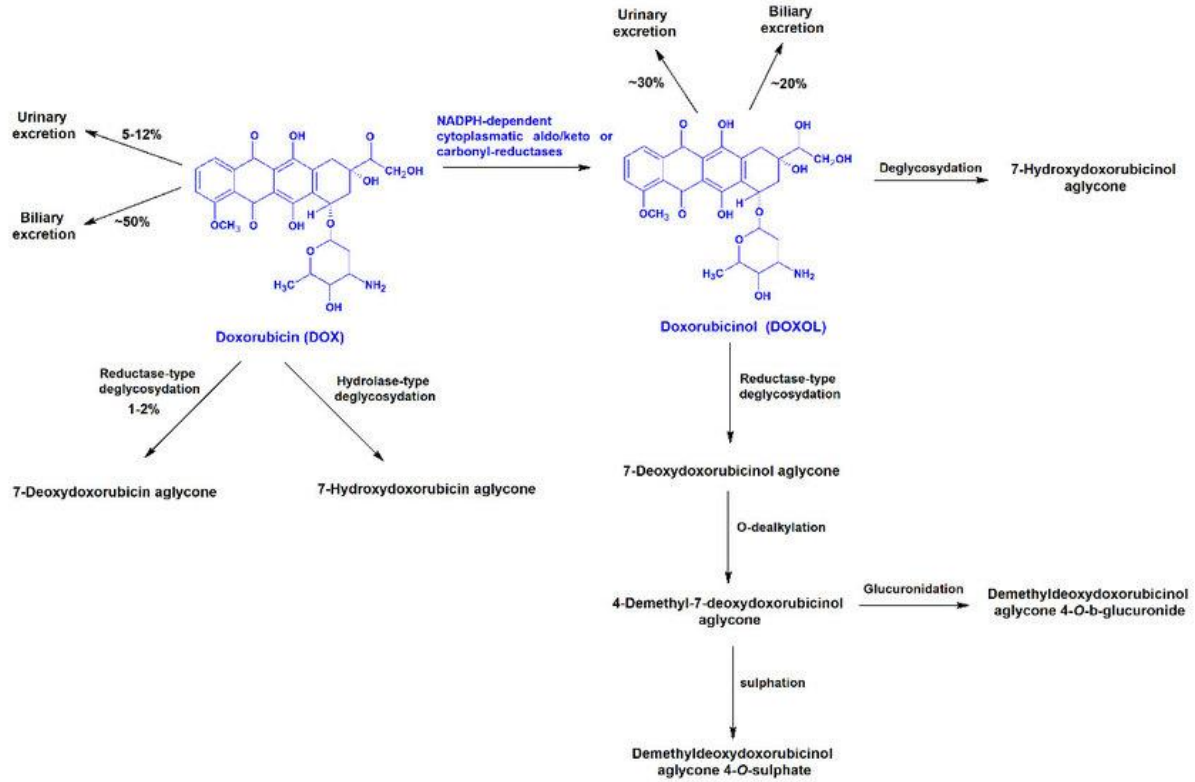
2.3.1.Doksorubisin Metabolizması

Doksorubisin ağırlıklı olarak CYP3A4 gibi karaciğer mikrozomal enzimleriyle metabolize edilir (Camaggi CM ve ark. 1988, Ganey PE ve ark. 1988) ve ana metaboliti doksorubisinole ve birkaç hepatotoksik aglikon metabolitine dönüştürülür (Ballet F ve ark. 1987, Dodion P ve ark. 1987). (Resim 2) Bununla birlikte, yaklaşık % 50 oranında doksorubisinin büyük bir kısmı değişmeden vücuttan atılır (Thorn CF ve ark. 2011).

Doksorubisinin 2 elektron indirgenmesiyle oluşan sekonder alkol yapısındaki doksorubisinol majör metabolitidir (Mordente A ve ark. 2009). Bu yolakta vücuttaki farklı hücre tiplerinde farklı enzimler görev almaktadır. DOX'un karaciğerdeki metabolizması sırasında karbonil redüktaz 1(CBR1) enzimi daha aktifken; kalpteki metabolizması sırasında aldo-keto redüktaz 1a(AKR1A) enzimi daha aktiftir (Kassner N ve ark. 2008, Mordente A ve ark. 2003).

Diğer bir yolak DOX'un çeşitli oksidoredüktazlar aracılığıyla 1 elektron indirgenmesiyle DOX semikinon radikalleri oluşmasıdır (Minotti G. 1989). Bu yolakta görev alan enzimler içerisinde; sarkoplazmik retikulum ve mitokondride yer alan NADH dehidrogenaz (Nohl H ve ark. 1998, Thornalley PJ ve ark. 1986), NADPH dehidrogenaz (Pawlowska J ve ark. 2003), ksantin oksidaz (Gustafson DL ve ark. 1991) ve nitrik oksit sentazlar(NOS) görev alır (Fogli S ve ark. 2004, Vásquez-Vivar J ve ark. 1997). Oluşan DOX semikinon radikallerinin DOX'a tekrar oksidasyonu, reaktif oksijen radikalleri(ROS) ve hidrojen peroksit oluşumuna yol açar (Minotti G ve ark. 1998). Oksidatif strese neden olan ROS, glutatyon peroksidaz(GPX), katalaz(CAT) ve süperoksit dismutaz(SOD) ile deaktive edilebilir (Miyamoto Y ve ark. 2003).

DOX'un çok az %1-2 kadarı ise deglikozidasyonla metabolize olur. Bu yolakta indirgenme sonucu 7-deksidoksorubisin aglikonu oluşurken; hidrolitik tip glikozidasyonu ile de 7-hidroksidoksorubisin aglikonu oluşur (Licata S ve ark. 2000).



Resim 16. Doksorubisin Metabolizması (Reis-Mendes A ve ark. 2019)

2.3.2. Doksorubisin Hepatotoksitesi

DOX metabolizmasında gerçekleşen lipid oksidasyonu nedeniyle oluşan ROS, dokulara zarar vermektedir (Singla S ve ark. 2014). Karaciğer ilaçlara en çok maruz kalan

dokudur; çünkü DOX'un da içlerinde yer aldığı kemoterapötik ilaçlar da dahil pek çok ilacın metabolize edildiği organdır (Bagchi D ve ark. 1995). Karaciğerin birçok ilacın metabolizmasında ve biyotransformasyonunda görev alması nedeniyle karaciğerin fonksiyonlarına yönelik bir hasarı çok daha önemli kılmaktadır (Li S ve ark. 2015). Karaciğer fonksiyonlarında gelişen hasarın temel sebebi oksidatif stres ve apoptozdur (Jung HA ve ark. 2014). DOX serbest radikaller üreterek, oksidatif stres oluşumuna neden olmaktadır. Antioksidan enzim seviyelerinde düşüşe neden olması da bu etkisini güçlendirmektedir (Kockar MC ve ark. 2010, Menna P ve ark. 2010, Damodar G ve ark. 2014). ROS hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri üretir ve bunların oluşumu DNA hasarına, oksidasyonuna ve dolayısıyla hem normal hem de tümoral dokularda apoptozise neden olur (Said M ve ark. 2014). DOX toksisitesindeki bir diğer olası mekanizma, demirin dahil olduğu non-enzimatik mekanik reaksiyonlar aracılığıyla olmaktadır. Serbest demirin DOX ile yaptığı DOX-demir kompleksi ROS oluşumuna neden olan bir diğer yoldur (Al-Zubaidy AA ve ark. 2014, Mansouri E ve ark. 2017).

Bazı çalışmalar DOX kaynaklı ROS'un tümör supresör gen olan p53'ü baskıladığını, sitokrom C salınımını ve kaspaz-3 sentezini artırarak apoptozu indüklediğini göstermiştir (Mukherjee S ve ark. 2004, Morsi M ve ark. 2006, Paweorn A ve ark. 2015). Ek olarak, nükleer faktör κ B (NF- κ B) etkisi baskılandığında, DOX kaynaklı kardiyotoksistide inflamatuvar yanıtın arttığı gözlenmiştir (Ashikawa K ve ark. 2004, Austin R ve ark. 2016, Zhang X ve ark. 2019).

Bu nedenlerle; oksidatif stres, inflamasyon ve apoptozun eşzamanlı inhibisyonu, DOX kaynaklı hepatotoksisteyi tedavi etmede kilit noktadır (Song S ve ark. 2019).

2.3.3. Doksorubisin Hepatotoksitesinde Histopatoloji

DOX nedeniyle oluşan karaciğer hasarında genel olarak hücrel lezyonlarda artış, hepatik doku düzeninde kayıp ve inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu ile karakterizedir (Afsar T ve ark. 2019). DOX'un karaciğer üzerinde; fokal nekroza, fibrozise, sinüzoidal atrofiye, ödeme ve son olarak karaciğer ağırlığında azalmaya neden olabilir (Martinel Lamas DJ ve ark. 2015).

2.4. Apelin-13

Anjiotensin II receptor-like 1 (APJ), 1993 yılında O'Dowd BF ve ark. tarafından keşfedildi. APJ'yi kodlayan gen bölgesi intronsuzdur ve bu bölge APLNR olarak adlandırılır.

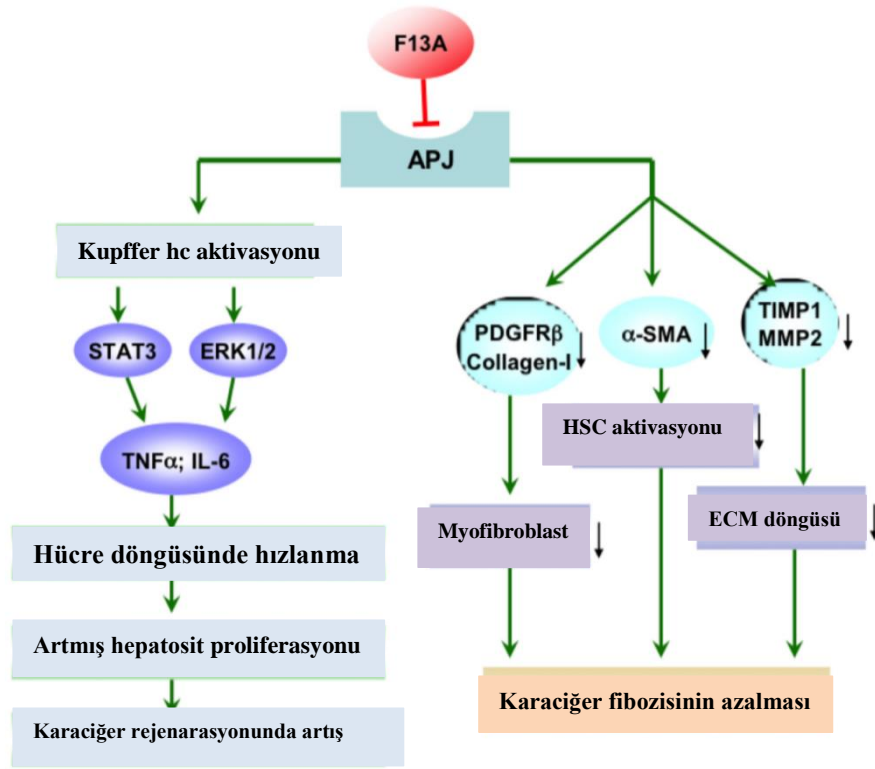
İnsanlarda APLNR, 11q12 kromozomunda yer alır ve 380 aminoasit kodlar (O'Carroll AM ve ark. 2013). İnsanda bulunan APJ, G proteini kenetli bir reseptördür ve anjiotensin II reseptör tip 1 ile %31 benzerlik göstermektedir; ancak anjiotensin APJ reseptörüne bağlanmaz (O'Dowd BF ve ark. 1993).

Apelin ilk olarak sığır midesinden izole edilmiş ve APJ reseptörünün endojen bir ligandı olarak düşünülmüştür. Xq25-26 kromozomu üzerinde yer alan insan apelin geni 77 aminoasitlik bir prepropeptid olan preproapelinini ifade eder (Tatemoto K ve ark. 1998). Oluşan preproapelin posttranslasyonel modifikasyonlarla apelin-12, apelin-13, apelin-17, apelin-31, apelin-36 ve piroglutamine apelin-13 gibi formlara farklılaşır (Hosoya M ve ark. 2000, O'Carroll AM ve ark. 2000, Kawamata Y ve ark. 2001, Lv SY ve ark. 2013). Apelin-13 ve piroglutamine apelin-13 bu farklı apelin formları arasında APJ aktivasyonu yönünden en potent olanlarıdır ve apelin-12, APJ'yi aktive edebilen en küçük apelin formudur. Apelin-36'nın ise APJ afinitesi daha düşüktür (Tatemoto K ve ark. 2001, Habata Y ve ark. 1999, Medhurst AD ve ark. 2003).

İnsanda ve kemirgenlerde apelin ve APJ; merkezi sinir sistemi, karaciğer, böbrekler, akciğerler, yağ doku ve kardiyovasküler sistem gibi pek çok doku, organ ve sistemde bulunur (Kleinz MJ ve ark. 2005, Emam MN ve ark. 2016, Antushevich H ve ark. 2016). Sıçan karaciğerinde özellikle santral ven ve portal ven endoteli ile Kupffer hücrelerinde apelin bulunduğu immünohistokimyasal olarak gösterilmiştir (Lv SY ve ark. 2017). Siroz gelişmiş insan ve sıçan karaciğerinde APJ ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir. Bu nedenle apelin ve APJ'nin karaciğer fizyolojisinde önemli yeri vardır (Principe A ve ark. 2008, Melgar-Lesmes P ve ark. 2011).

Apelin/APJ vücutta çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde görev almaktadır. İskemi-reperfüzyon hasarı (Yang Y ve ark. 2015), hem embriyonik hem de tümoral anjiogenez (Kälın RE ve ark. 2007), damar düz kas hücrelerinin proliferasyonu (Lv XR ve ark. 2013), hipotalamustan kortikotropin releasing hormon (CRH) ve vazopressin (ADH) salınımının stimülasyonu (Taheri S ve ark. 2002) gibi pek çok süreçte bulunur.

Apelin/APJ karaciğer fibrozisindeki ve karaciğer rejenerasyonundaki etkileri Resim 17'de gösterilmiştir.



Resim 17. Apelin/APJ'nin Karaciğer Fibrozisindeki Ve Karaciğer Rejenarasyonundaki Etkileri (Lv SY ve ark. 2017). F13A, apelin-13(F13A); PDGFR β , platelet-kaynaklı büyüme faktör reseptör β ; α -SMA, α -düz kas aktin; TIMP, doku baskın matriks metalloproteinazı; MMP, matriks metalloproteinaz; HSCs, hepatik stellat hücreler; ECM, ekstraselüler matriks; STAT3, signal transduser ve aktivator of transkription 3; ERK, ekstraselüler signal-bağımlı kinaz; TNF, tümör nekrozis faktör; IL-6, interlökin-6; ↓, azalma.

Karbontetraklorür ile oluşturulan sıçan fibrozis modelinde apelin verilmesi; karaciğerdeki kollajen miktarını azalttığı, ortalama arteryel basıncı ve portal basıncı azalttığı, hücre canlılığını artırdığı ve anjiogenezi inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu etkileri PDGFR β , α -SMA ve matriks metalloproteinazlar üzerindeki inhibitör etkisiyle oluşturur (Reichenbach V ve ark 2012).

Emam MN ve ark (2016) apelinin hepatik hasarı olan sıçanlarda; ALT, AST, LDH, kaspaz-3, TNF- α ve MDA seviyelerini düşürdüğünü; GSH ve CAT seviyelerini ise artırdığını göstermiştir. Aynı çalışmada apelinin bu etkisini gösterirken IL-10 gibi antiinflamatuvar sitokinleri artırdığı, IL-6, IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokinleri ise azalttığı gösterilmiştir.

Dolaşımdaki apelin düzeyi, sirozlu hastalarda sağlıklı kişilere göre artmıştır (Principe A ve ark. 2008). Yapılan klinik çalışmalarda sirozu olan hastalarda sirozun şiddetiyle serumda bulunan apelin seviyeleri arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (Lim YL ve ark. 2016).

Sıçanlarda yapılan hepatik iskemi-reperfüzyon hasar modelinde apelin-13 verilmesi; ALT, AST, MDA ve kaspaz-3 düzeylerinde düşüşe neden olduğu gösterilmiş (Sabry MM ve ark. 2019). Apelinin trigliserit miktarını azaltarak lipit birikimini ve dolayısıyla steatozisi azalttığı gösterilmiştir (Huang J ve ark. 2017).



3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Deney Hayvanlarının Temini ve Bakımı

Çalışmamızda Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edilen yaklaşık 7-8 haftalık 250-300 gram Wistar albino cinsi 30 adet erkek sıçan kullanılmıştır. Çalışmamız Adnan Menderes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu 64583101/2018/131 sayılı onayını almıştır. Çalışmanın deneysel aşamaları Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Merkez Laboratuvarı ve Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri Merkez Laboratuvarı bünyesinde bulunan Biyokimya laboratuvarında gerçekleştirildi. Deney süresince sıçanlar 12;12 aydınlık/karanlık ışıklandırması olan, ısı (21 ± 1 °C) ve nemi (%45-65) otomatik olarak ayarlanmış odalarda yaşatılmışlardır. Deney başlangıcından bir hafta süreyle hayvanların ortam koşullarına adaptasyonu sağlanmıştır. Adaptasyon süresi boyunca tüm sıçanlar polikarbon şeffaf kafeslerde (n=5) standart sıçan yemi ve çeşme suyu ile ad libitum olarak beslenmiştir. Adaptasyon sürecinin ardından sıçanlar rastgele bir şekilde gruplara ayrılmıştır. Kafeslerin temizliği haftada 3 kez olacak şekilde yapıldı.

3.2.Deney Gruplarının Planlanması

Sıçanların uyum süreçlerinin tamamlanmasının ardından, sıçanlar rastgele olacak şekilde 3 eşit gruba(n=10) ayrıldı. DOX ve apelin-13 ilaçları intraperitoneal(IP) olarak verildi. Deney grupları tabloda verilmiştir.

Tablo I. Deney grupları

	Konrol grubu(I)	Dox(II)(IP)	Dox+Apelin(III)(IP)
1. gün	Saline 3 ml/kg	5 mg/kg dox	5mg/kg dox
5. gün	Saline 3 ml/kg	5 mg/kg dox	5mg/kg dox
6.gün	Saline 3 ml/kg		
7.gün	Saline 3 ml/kg		15µg/kg apelin
8.gün	Saline 3 ml/kg		15µg/kg apelin
9. gün	Saline 3 ml/kg	5 mg/kg dox	5mg/kg dox + 15µg/kg apelin
10.gün	Saline 3 ml/kg		15µg/kg apelin
11.gün	Saline 3 ml/kg		15µg/kg apelin
12.gün	Saline 3 ml/kg		15µg/kg apelin
13. gün	Saline 3 ml/kg	5 mg/kg dox	5mg/kg dox + 15µg/kg apelin
15.gün	Sakrifikasyon	Sakrifikasyon	Sakrifikasyon

3.3.Doksorubisin Uygulanması

Grup II ve grup III'te yer alan sıçanlara, 5 mg/kg doksorubisin 4 günde 1 olacak şekilde toplam 20 mg/kg (Bilgiç ve ark. 2019) olacak şekilde intraperitoneal olarak uygulandı.

3.4.Apelin-13 Uygulanması

Grup III'te yer alan sıçanlara 2.haftanın başlangıcından itibaren 15 µg/kg apelin-13 (Kim ve ark. 2017; Principe ve ark. 2008) intraperitoneal olarak 7 gün boyunca verildi.

3.5.Deneyin Sonlandırılması

Deney sonunda sıçanlara ksilazin 5mg/kg, ketamin 100 mg/kg verilerek anestezi altında sakrifiye edildi. Sakrifiye edilen sıçanlardan alınan karaciğer örnekleri %10 nötral formalinle tespit edildi.

3.6.Doku Takibi

Deney sonunda sakrifiye edilen sıçanların karaciğerleri alınıp 72-96 saat %10 nötral formalinle fikse edildikten sonra 4-5 saat akarsu altında bırakılarak fiksasyon malzemesinin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Yıkama işleminden sonra manuel olarak yaptığımız takip tabloda verilmiştir.

Tablo II. Doku Takip Protokolü

Kimyasallar	Süre
%60'lik alkol	30 dakika
%70'lik alkol	30 dakika
%80'lik alkol	1 saat
%96'lik alkol	1 saat
>%99,5'luk alkol	1 saat
Aseton	20 dakika
Aseton	20 dakika
Ksilol (etüvde 60°C)	1 saat
Ksilol (etüvde 60°C)	1 saat
Parafin (etüvde 60°C)	1,5 saat
Parafin (etüvde 60°C)	1,5 saat
Blok gömme	

Eriyik parafinle gömülen karaciğer dokuları gruplara göre isimlendirildi. Buzlukta yeterince sertleşen parafin bloklardan optimal kesim aralığından mikrotom ile 5 µm kalınlıkta kesitler alındı. Alınan kesitlere histopatolojik değerlendirme için Hematoksilen-eozin, bağ dokusu bileşenlerini göstermek için Masson trikrom ve Picro sirius boyamaları yapıldı. Alınan kesitlerin bir kısmı polilizinli lamlara alınarak immünohistokimyasal olarak değerlendirme yapıldı.

3.7.Histokimyasal Analizler

3.7.1.Hematoksilen-Eozin Boyama

Histokimyasal boyamalar için 5 µm kalınlığında alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 60 °C etüvde 3 saat bekletildi. Deparafinizasyon sonrası uygulanan Hematoksilen-eozin boyama protokolü tabloda verilmiştir.

Tablo III. Hematoksilen-eozin boyama protokolü

Kimyasallar	Süre
Ksilol	3 dk
Ksilol	4 dk
>%99,5'luk alkol	1 dk
%80'lik alkol	1 dk
Distile su	4 dk
Harris's hematoksilen	2 dk
Akarsu altında yıkama	2 dk
Eozin	1 dk
%80'lik alkol	1 dk
>%99,5'luk alkol	1 dk
Ksilol	4 dk
Ksilol	4 dk
Entellan ile kapama	

3.7.2.Masson Trikrom Boyama

Histokimyasal boyamalar için 5 µm kalınlığında alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 60 °C etüvde 3 saat bekletildi. Deparafinizasyon sonrası uygulanan Masson trikrom boyama protokolü tabloda verilmiştir.

Tablo IV. Masson Trikrom Boyama Protokolü

Kimyasallar	Süre
Ksilol	5 dk
Ksilol	5 dk
%100'lük alkol	2 dk
%80'lik alkol	2 dk
Distile su	5 dk
Solüsyon A+ Solüsyon B	10 dk
Distile su	5 sn
Solüsyon C	4 dk
Distile su	5 sn
Solüsyon D	4 dk
Distile su	30 sn
Solüsyon E	10 dk
Distile su	5 sn
Solüsyon F	10 dk
Distile su	30 sn
%80'lik alkol	20 sn
%100'lük alkol	1 dk
Ksilol	1 dk
Entellan ile kapama	

3.7.3.Pikro Sirius Boyama

Histokimyasal boyamalar için 5 µm kalınlığında alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 60 °C etüvde 3 saat bekletildi. Deparafinizasyon sonrası uygulanan Pikro sirius boyama protokolü tabloda verilmiştir.

Tablo V. Pikro Sirius Boyama Protokolü

Kimyasallar	Süre
Ksilol	2 dk
Ksilol	2 dk
%100'lük alkol	2 dk
%80'lik alkol	2 dk
Distile su	2 dk
Pikro Sirius	60 dk
Asetik asit	1-2 sn
Asetik asit	1-2 sn
%80'lik alkol	2 dk
%100'lük alkol	2 dk
Ksilol	1 dk
Ksilol	2 dk
Entellan ile kapama	

3.8.İmmünohistokimyasal Boyama

İmmünohistokimyasal boyama için polilizinli lamlara 5 µm kalınlığında alınan kesitler 1 gece önceden 45°C ye ayarlanan etüve bırakıldı. Ertesi gün 60 °C ye alınan etüvde 1 saat daha bekletilerek deparafinizasyonu tamamlanan kesitler direkt olarak ksilol ile dolu şalelere alındı ve apopitoz, oksidatif stres gibi proinflamatuvar süreçlerde artan ve bir transkripsiyon faktörü olan Nuclear Factor kappa B (NF-κB)'yi (Lawrence T. 2009) belirlemek için NF-κB antikoruna ile immünohistokimyasal boyama yapıldı. Uygulanan immünohistokimya protokolü tabloda verilmiştir.

Tablo VI. İmmünohistokimya Boyama Protokolü

Kullanılan materyal	süre
Ksilol	30 dk
>%99,5'luk alkol	2 dk
%96'lık alkol	2 dk
%80'lik alkol	2 dk
%70'lik alkol	2 dk
%60'lık alkol	2 dk
Distile su	5 dk
PBS	5 dk
PBS	5 dk
Citrate buffer	5dk/350W
Hidrojen peroksit+metanol	6 dk
PBS	1 dk
Solüsyon A	45 dk
Primer antikorlar damlatıldı	
Over-night	20 saat
PBS	10 dk
Solüsyon B	45 dk
PBS	10 sn
Solüsyon C	30 dk
PBS	10 dk
DAB solüsyonu	3 dk
Distile su	1 dk
Mayer's hematoksilen	15 sn
Akarsu da bekletme	10 dk
>%99,5'luk alkol	20 sn
%96'lık alkol	20 sn
%80'lik alkol	20 sn
Ksilol	7 dk
Entellan ile kapama	

3.9.Biyokimyasal Analizler

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri Merkez Laboratuvarı bünyesinde bulunan Biyokimya laboratuvarında; sıçanlardan alınan kan örnekleri üzerinde karaciğerdeki hepatositlerin hasarını belirlemek için Alanin Amino Transferaz(ALT) ve Aspartat Amino Transferaz(AST) seviyelerine bakıldı.

3.9.1.Doku Hidroksiprolin Analizi

Hidroksiprolin, kollajenin yaklaşık olarak %13,4'ünü oluşturmaktadır. Hepatik fibroz oluştuğunda, karaciğerde temel olarak miktarı artan bileşen kollajen fiberleridir. Kollajen fiberlerine spesifik aminoasit ise hidroksiprolindir. Hidroksiprolin, elastinde eser miktarda bulunmakla birlikte diğer proteinlerde bulunmamaktadır. Bu yüzden, hepatik fibrozun derecesini belirlemek için karaciğer dokusunun hidroksiprolin içeriği hesaplanmaktadır (Lopes JD ve ark. 2002). Bu çalışmada, DOX uygulanan sıçanların karaciğer dokusunun hidroksiprolin içeriğini hesaplamak için kolorimetrik kit (Elabscience, E-BC-K061) kullanılmıştır. Kit protokolüne göre aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulanmıştır.

- 80-100 mg karaciğer dokusu tartılarak 2 mL'lik ependorf tüpe alındı.
- Üzerine 1 mL hidroliz solüsyonu (Reagent 5) eklendi.
- 20 dakika boyunca 95 °C'de inkübe edildi.
- Ependorf tüpler soğutulduktan sonra üzerine 10 µL indikatör (Reagent 6) eklendi.
- Bu karışım 15 mL'lik falkon tüpe aktarılarak üzerine 1 mL pH düzenleyici reagent A (Reagent 7) eklendi. Bu esnada renk kırmızıya döndü
- Falkon içerisine, pH düzenleyici reagent B'den (Reagent 8) damla damla kırmızı renk kaybolana kadar eklendi (Bu esnada pH 6-6.8 aralığına getirildi).
- Distile su ile hacim 10 mL'ye tamamlandı.
- Hacmi 10 mL'ye tamamlanan çözeltilerden 2 mL alınarak ependorf tüpe aktarıldı. Üzerine 20-30 mg aktif karbon eklendi, karıştırıldıktan sonra 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
- Numune ölçümü için süpernatanttan 1 mL alındı. Ayrıca kör ve standart ölçümü için aşağıdaki tabloda belirtildiği miktarlarda Reagent 1, 2 ve 3 eklendi. Reagent 1 eklendikten sonra 10 dakika ve Reagent 2 eklendikten sonra 5 dakika tüpler oda sıcaklığında inkübe edildi. Kurulan reaksiyonlar tabloda verilmiştir.

Tablo VII. Doku Hidroksiprolin Analizi

	Kör Tüpü	Standart Tüpü	Örnek Tüpü
Distile Su	1 mL		
5µg/mL hidroksiprolin standardı		1 mL	
Hazırlanan Örnek			1 mL
Reagent 1	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL
Reagent 2	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL
Reagent 3	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL

- Tablodaki gibi kurulan reaksiyonlar sonrasında numuneler 60 °C’de 15 dakika inkübe edildi.
- Soğutulduktan sonra 3500 rpm’de 10 dakika boyunca santrifüj edildi.
- 96’lık plakalara her bir numune, kör ve standart tüpünden 200 µL alınarak spektrofotometrik olarak 550 nm’ de absorbanlar okundu.
- Doku hidroksi prolin miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Hidroksiprolin Miktarı } (\mu\text{g}/\text{mg yaş doku}) = (\text{OD Örnek} - \text{OD Kör}) \div (\text{OD Standart} - \text{OD Kör}) \times \text{Standart Konsantrasyonu} \frac{x(\text{hidroliz solüsyonunun total hacmi (10 mL)})}{\text{Doku Yaş Ağırlığı (mg)}}$$

3.9.2.Doku Total Antioksidan Status(TAS) Ölçümü

Dokuların TAS düzeyi, Rel Assay marka ticari kit (Rel Assay Kit Diagnostics) kullanılarak ölçüldü. Kalibratör olarak E vitamininin suda çözünür bir analogu olan Trolox kullanıldı. Sonuçlar mmol Trolox equiv./lt hesaplandı.

3.9.3.Doku Total Oksidan Status(TOS) Ölçümü

Dokuların TOS düzeyi, Rel Assay marka ticari kit (Rel Assay Kit Diagnostics) kullanılarak ölçüldü. Kalibratör olarak hidrojen peroksit kullanıldı. Sonuçlar µmol H2O2 equiv./lt olarak hesaplandı.

3.10.İstatistiksel Analizler

Her üç grupta yer alan hayvanların son vücut ağırlıkları, karaciğer ağırlıkları istatistiksel olarak değerlendirildi. Sakrifikasyon sırasında sıçanların kalbinden alınan kandan elde edilen ALT, AST değerleri istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Alınan karaciğer dokularından ELISA yöntemiyle bakılan TAS, TOS ve hidroksprolin değerleri istatistiksel olarak karşılaştırıldı. İstatistiksel analizler SPSS (SPSS for Windows version 13) paket programı kullanılarak yapıldı.

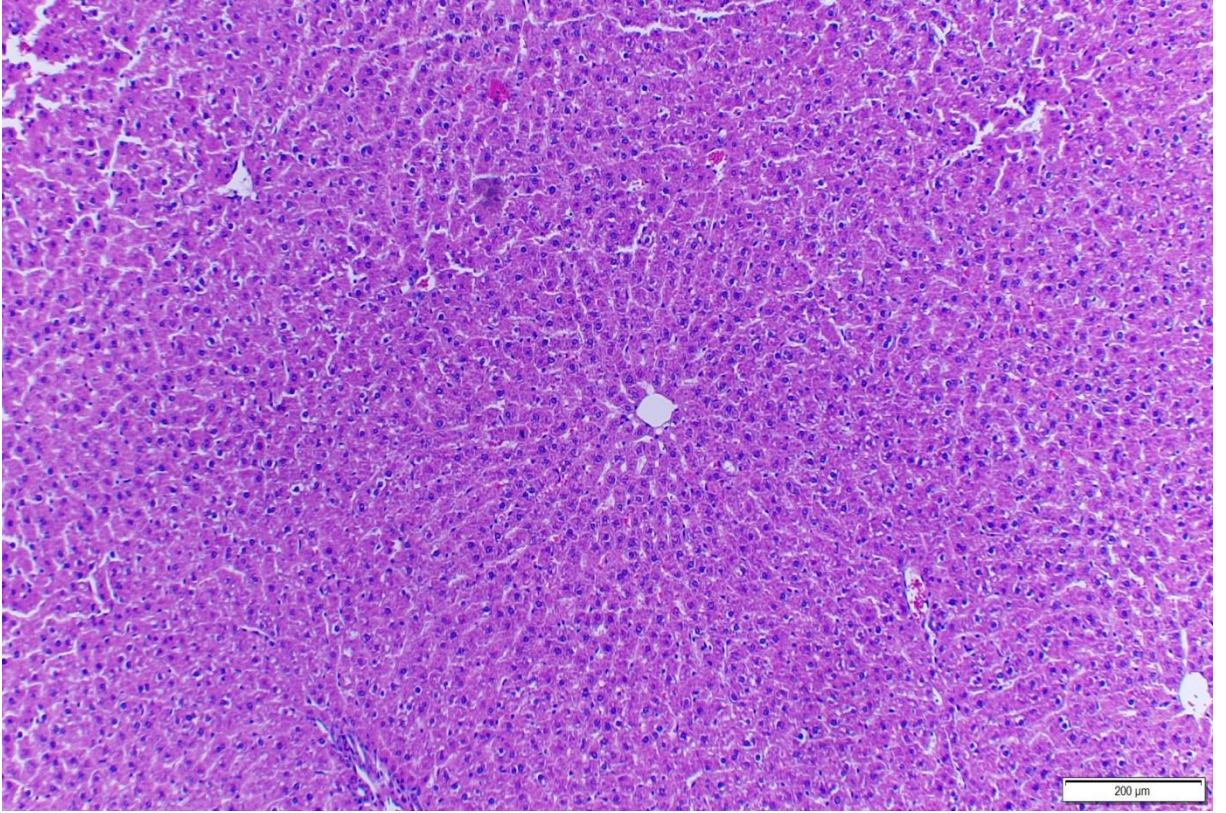


4.BULGULAR

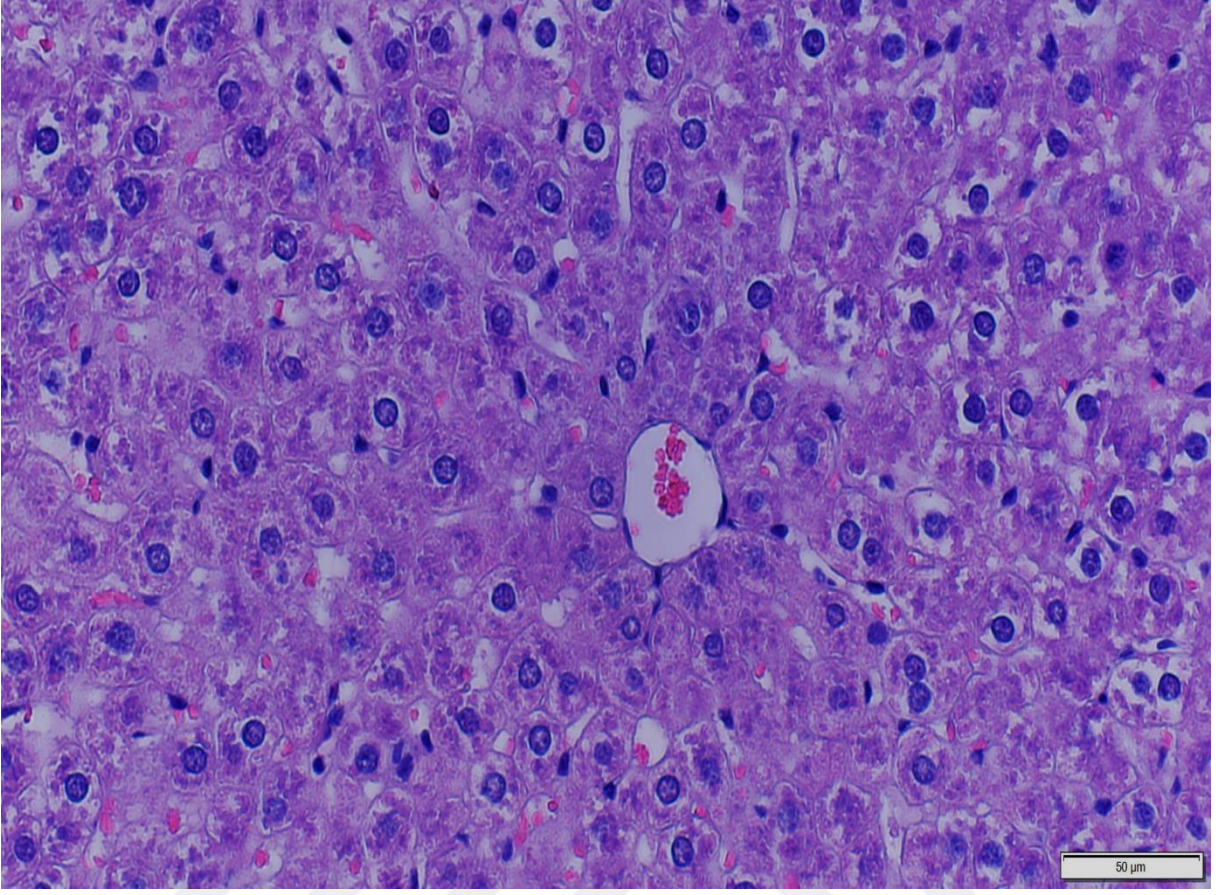
DOX grubundaki sıçanlardan 1 tanesi deneyin 12. gününde, 1 tanesi deneyin 13. gününde olmak üzere 2 tanesi ölmüştür. DOX+apelin-13 grubundaki sıçanlardan 1 tanesi deneyin 13. gününde ölmüştür. Kontrol grubunda ölüm gözlenmemiştir. Sıçanların son vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre hem DOX grubunda hem de DOX+apelin-13 grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptanmıştır ($p<0.001$ ve $p<0.001$). Sıçanların karaciğer ağırlıkları karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre hem DOX grubunda hem de DOX+apelin-13 grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptanmıştır ($p=0.001$, $p=0.015$). DOX grubu ve DOX+apelin-13 grupları arasında son vücut ağırlığı ve karaciğer ağırlığı karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır ($p=0.395$ ve $p=0.171$).

4.1.Hematoksilen-Eozin Değerlendirmesi

4.1.1.Kontrol Grubu H&E Değerlendirmesi

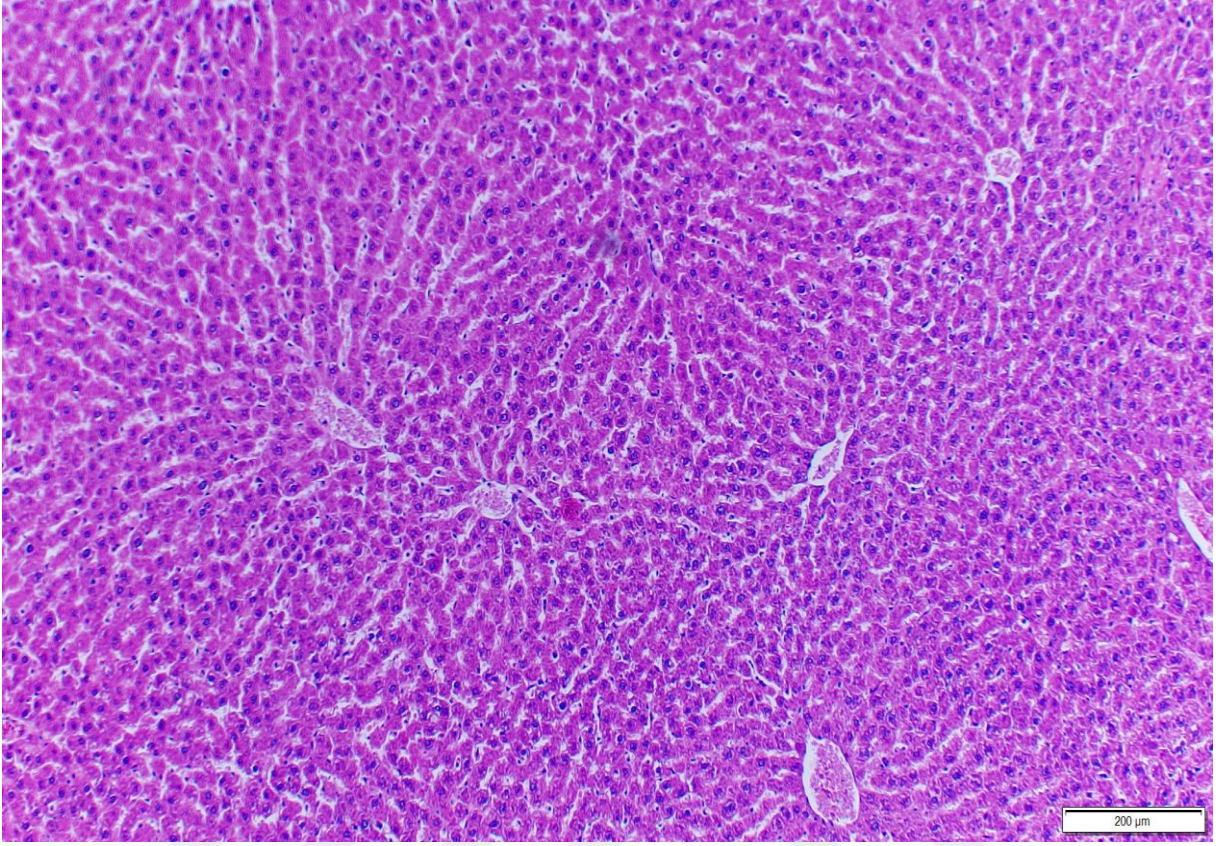


Resim 18. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu. Normal karaciğer histolojik yapısı gözlenmektedir (Hematoksilen- Eozin, x10).

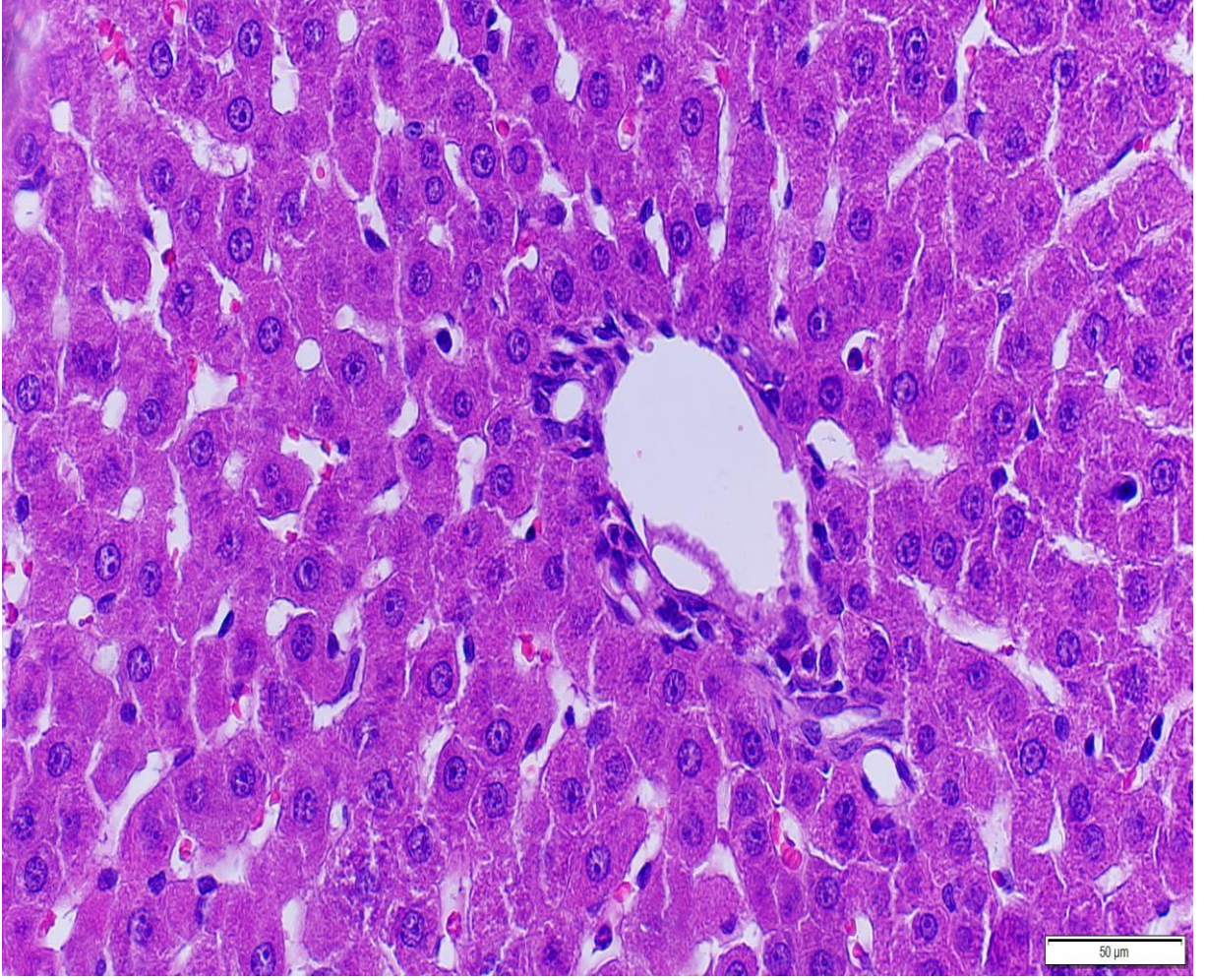


Resim 19. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu. Normal hepatosit kordon yapısı ve sinüzoidal alanlar izlenmektedir (Hematoksilen- Eozin, x40).

4.1.2.DOX Grubu H&E Değerlendirmesi

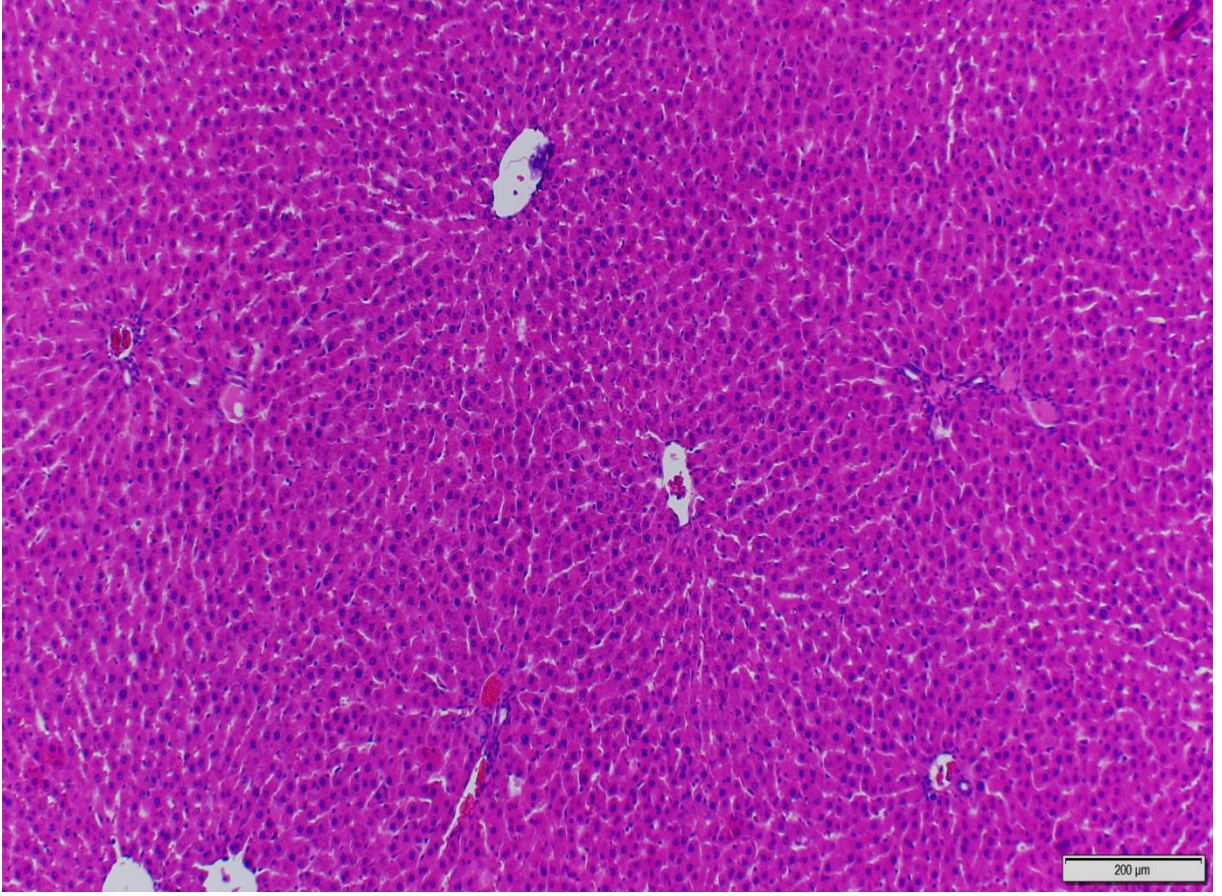


Resim 20. DOX grubuna ait karaciğer dokusu. Sinüzoidal dilatasyonlar görölmektedir (Hematoksilen- Eozin, x10).

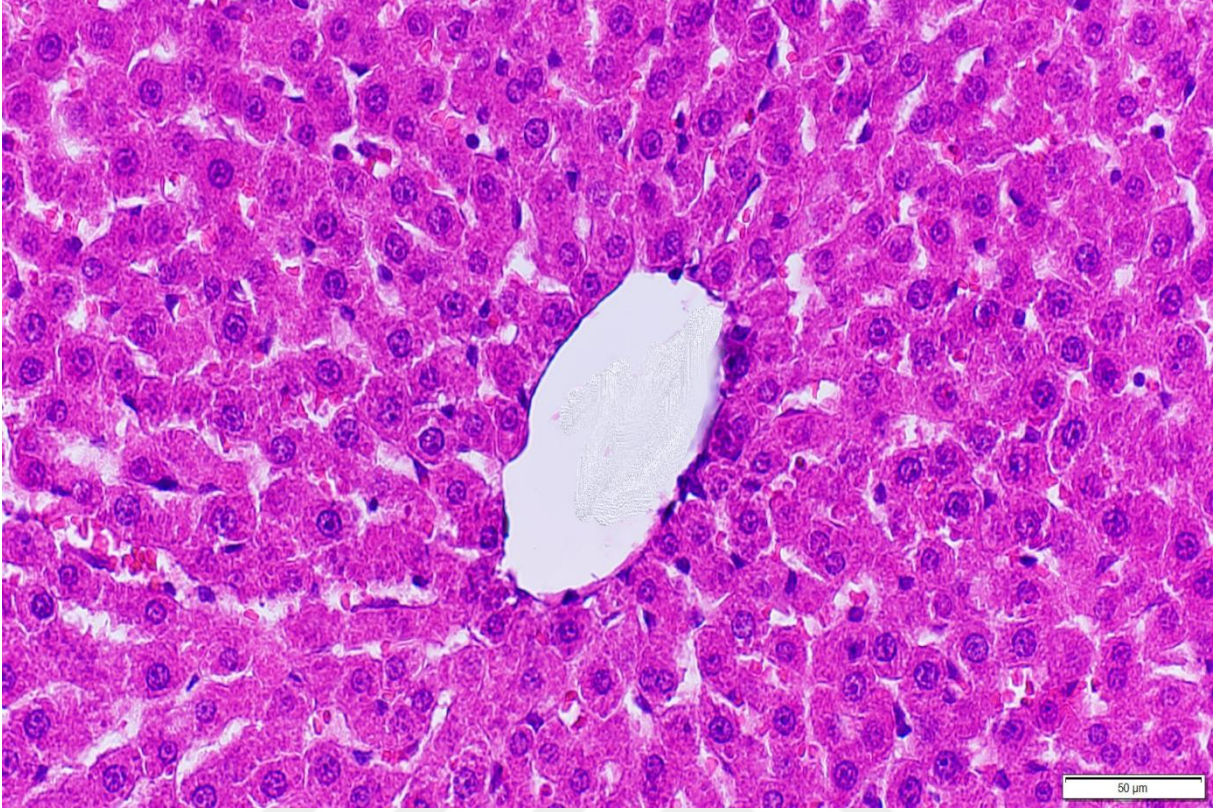


Resim 21. DOX grubuna ait karaciğer dokusu. Hepatositlerde yaygın granüler dejenerasyon olup, piknotik çekirdekler ve nekrotik alanlar mevcuttur. Bol miktarda yağ damlacıkları görülmektedir (Hematoksilen- Eozin, x40).

4.1.3.DOX+Apelin-13 Grubu H&E Değerlendirmesi



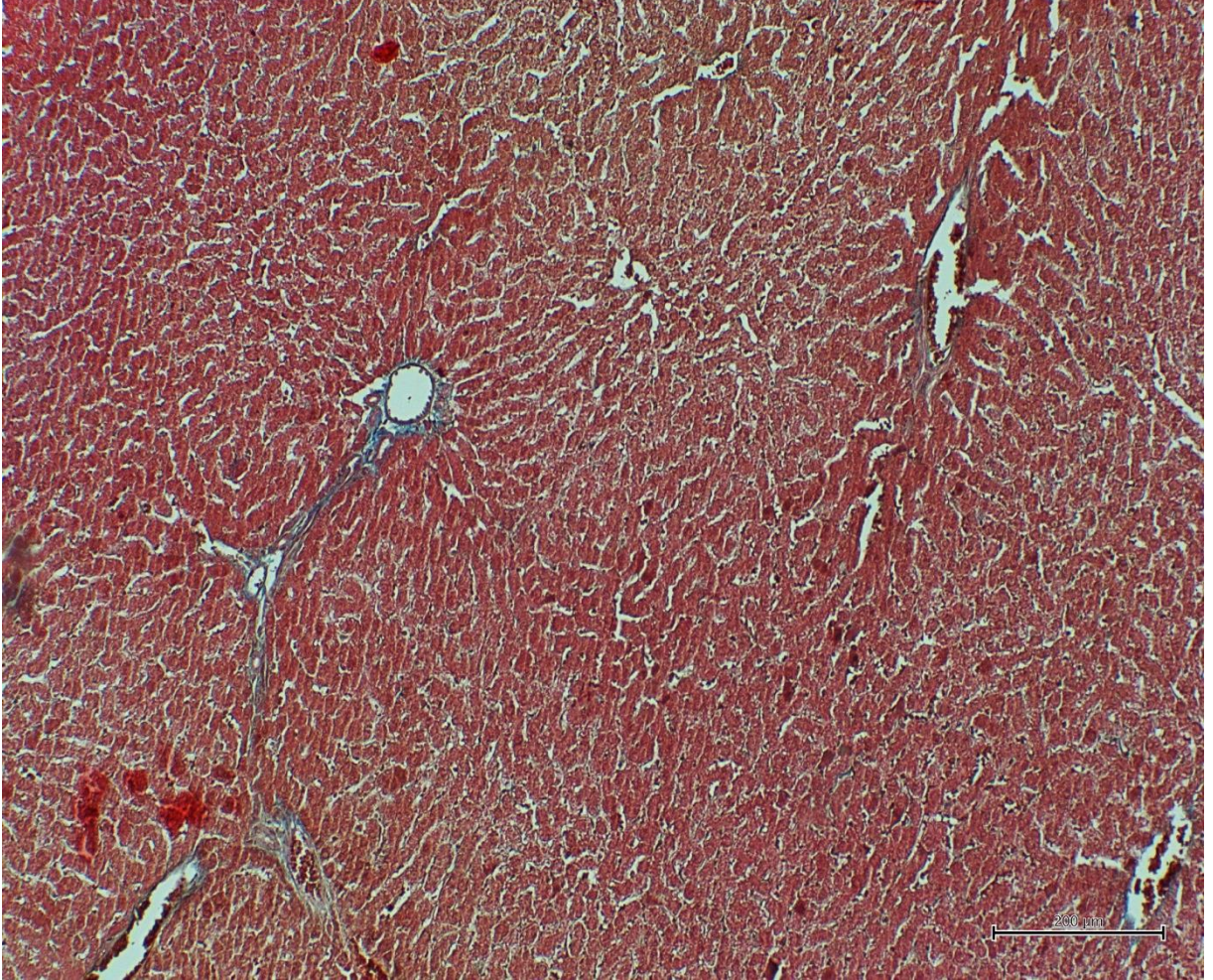
Resim 22. DOX+apelin-13 grubuna ait karaciğer dokusu. Sinüzoidal dilatasyonların daha az olduğu görölmektedir (Hematoksilen- Eozin, x10).



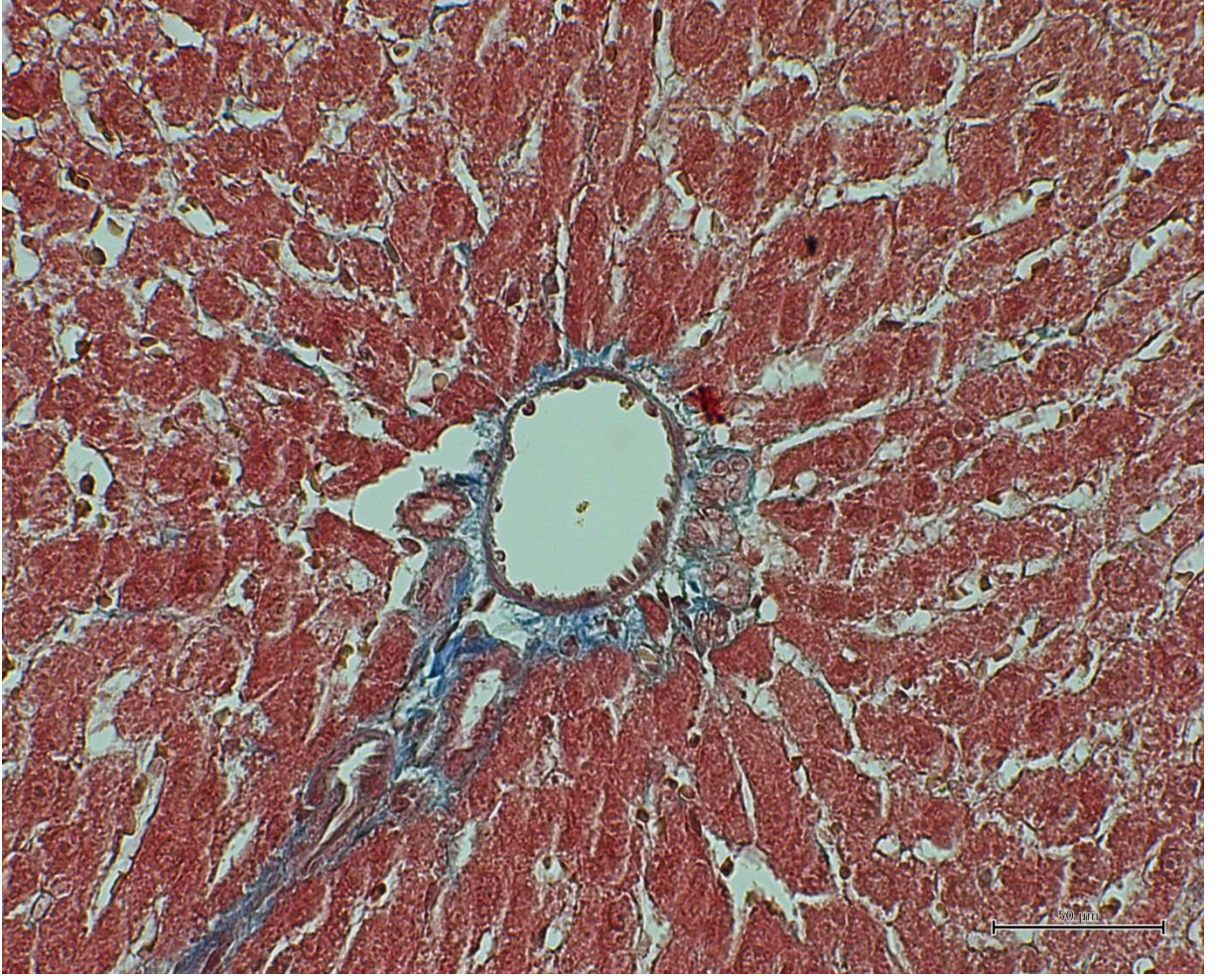
Resim 23. DOX+apelin-13 grubuna ait karaciğer dokusu. Az sayıda piknotik çekirdek görülmektedir. Hepatositlerde hafif dejenerasyon mevcuttur (Hematoksilen- Eozin, x40).

4.2. Masson Trikrom Değerlendirmesi

4.2.1. Kontrol Grubu Masson Trikrom Değerlendirmesi

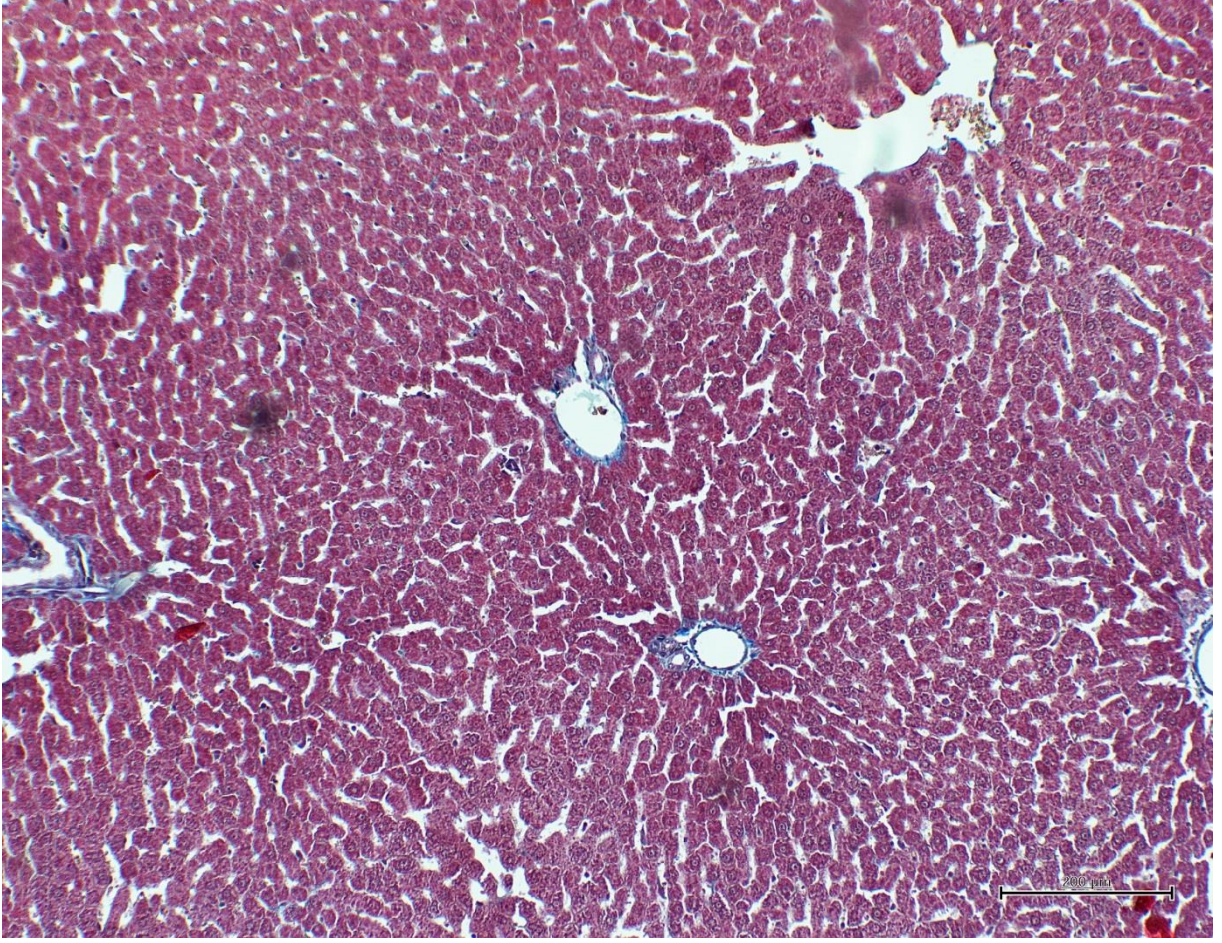


Resim 24. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu. Normal karaciğer histolojik yapısı grlmektedir (Masson trikrom, x10).

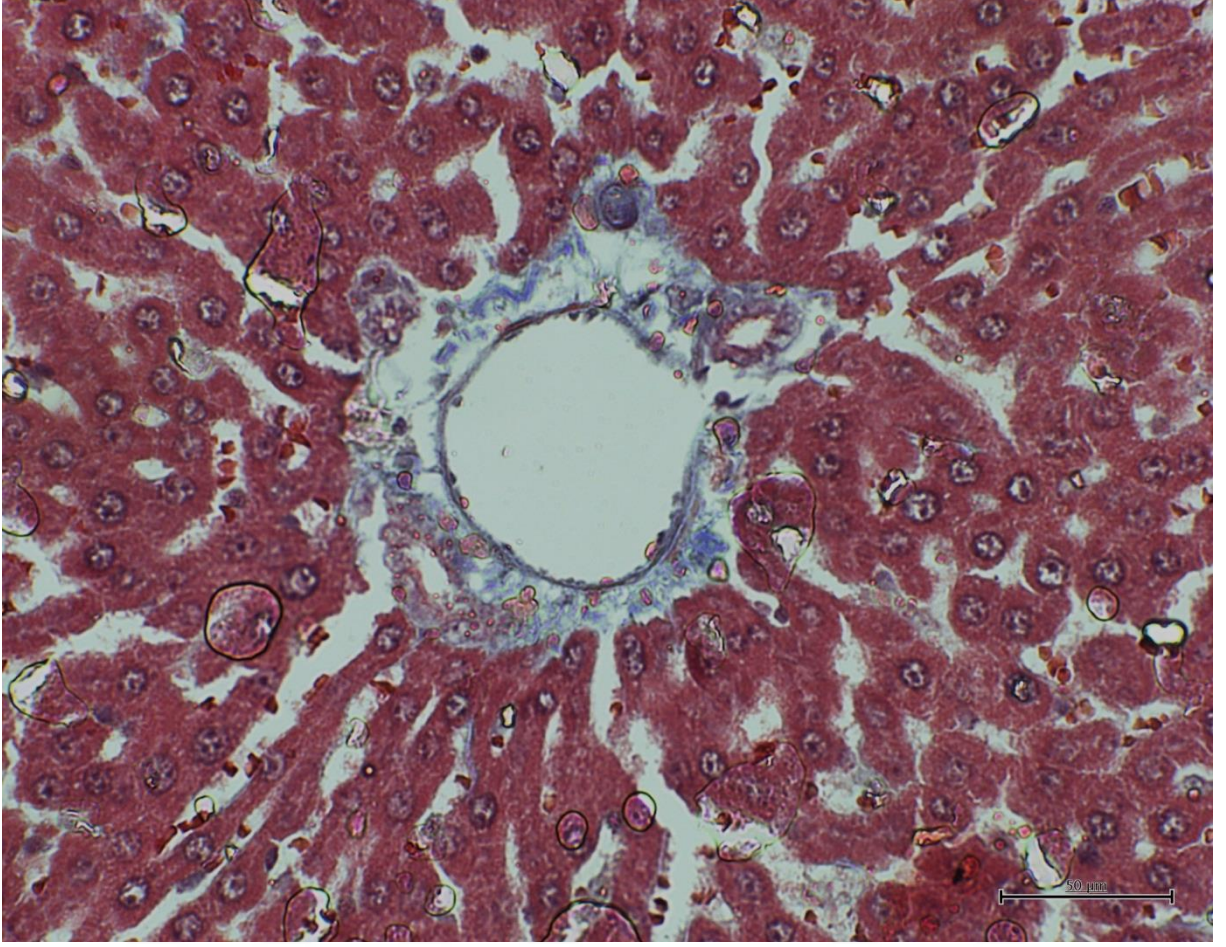


Resim 25. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu. Santral ven çevresinde daha yoğun bağ dokusu boyandığı gözlenmiştir (Masson trikrom, x40).

4.2.2.DOX Grubu Masson Trikrom Değerlendirmesi

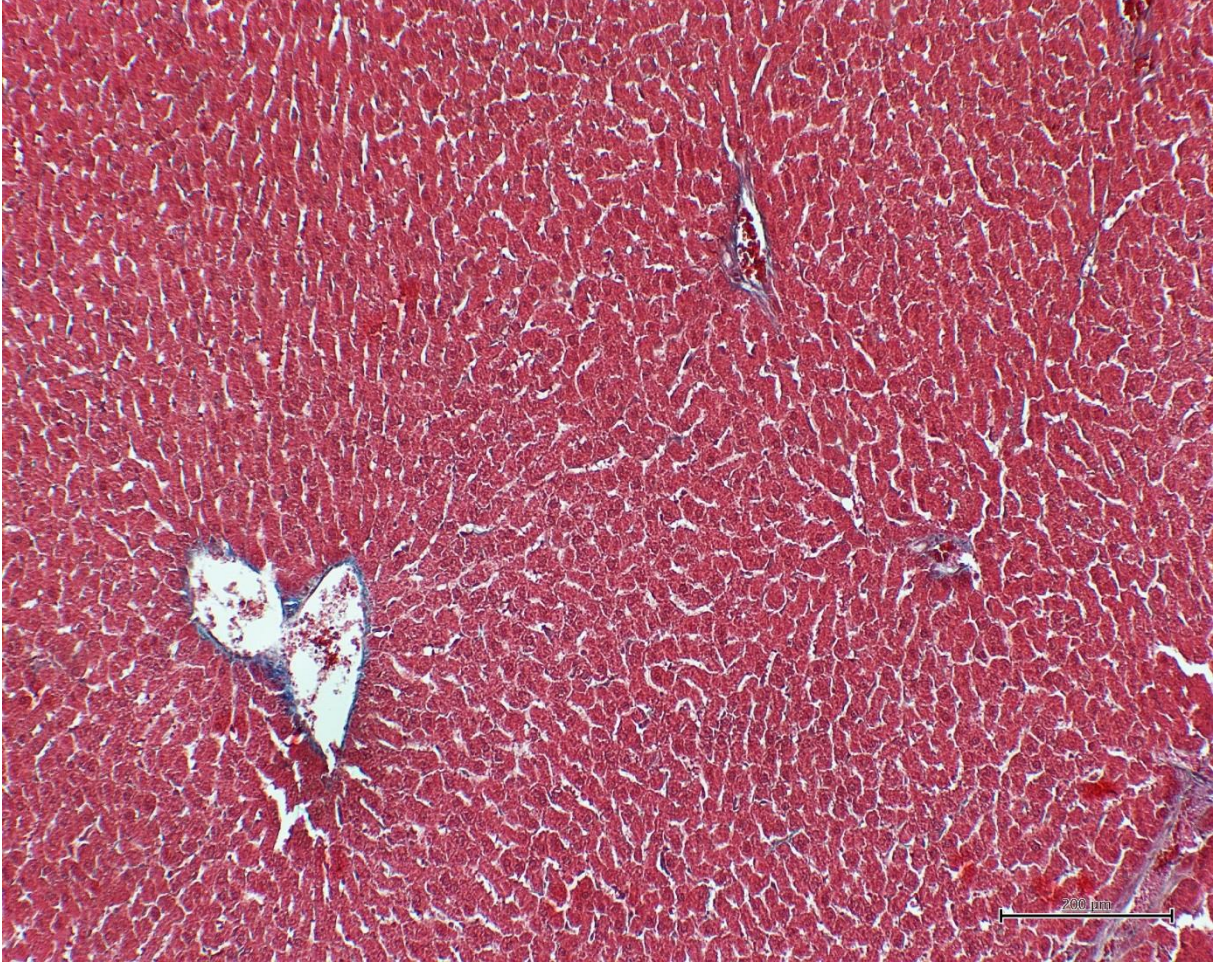


Resim 26. DOX grubuna ait karaciğer dokusu. Damar çevrelerinde daha yoğun bağ dokusu boyanma gözlenmiştir. Sinüzoidal dilatasyonlar grlmektedir (Masson trikrom, x10).

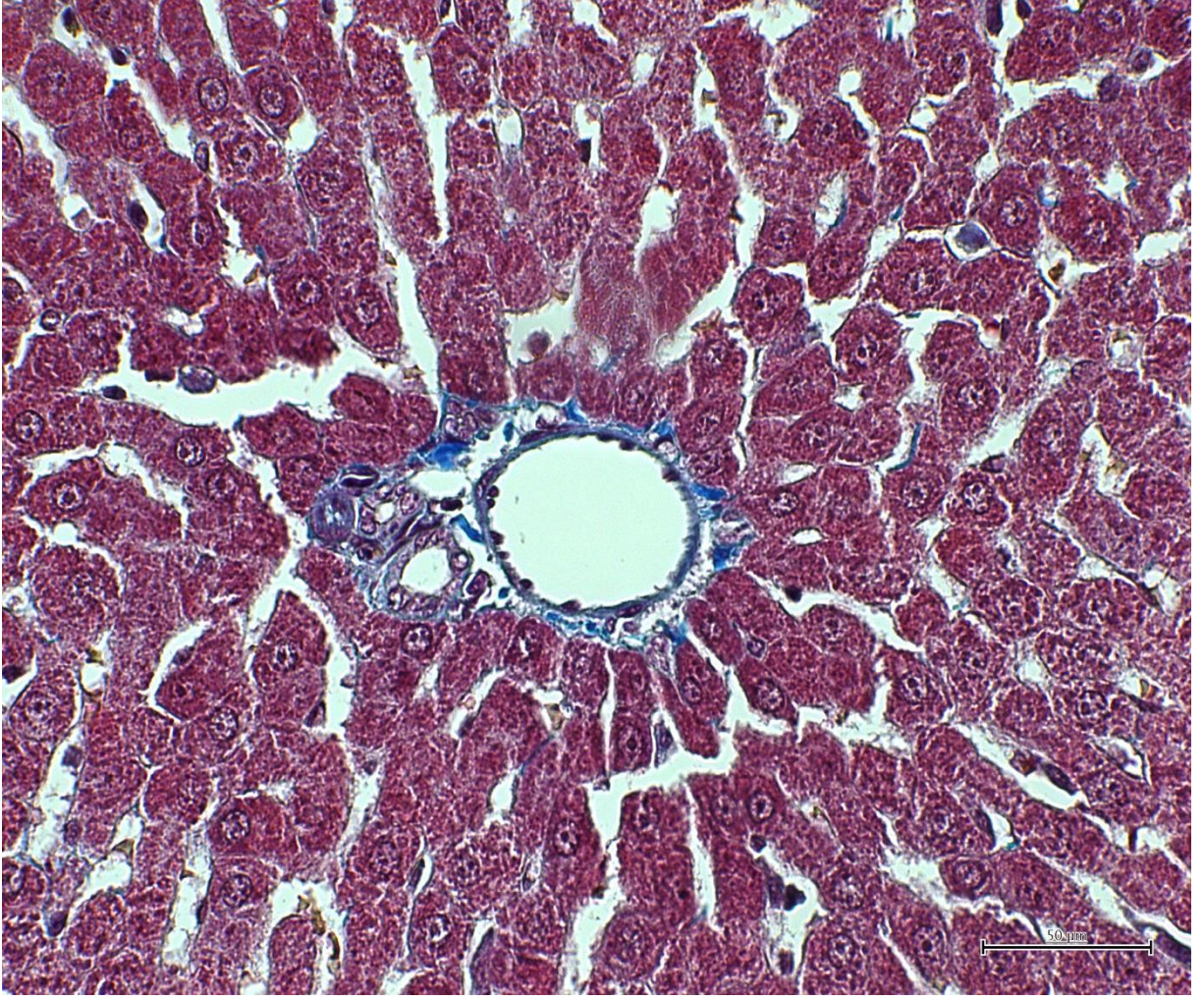


Resim 27. DOX grubuna ait karaciğer dokusu. Hepatosit kordonlarının düzensiz sıralandığı ve sinüzoidal dilatasyonlar olduğu görülmektedir. Santral ven çevresi kollajen içeriğinin artışına bağlı olarak daha yoğun bağ dokusu boyanmış olarak izlenmektedir (Masson trikrom, x40).

4.2.3.DOX+Apelin-13 Grubu Masson Trikrom Değerlendirmesi



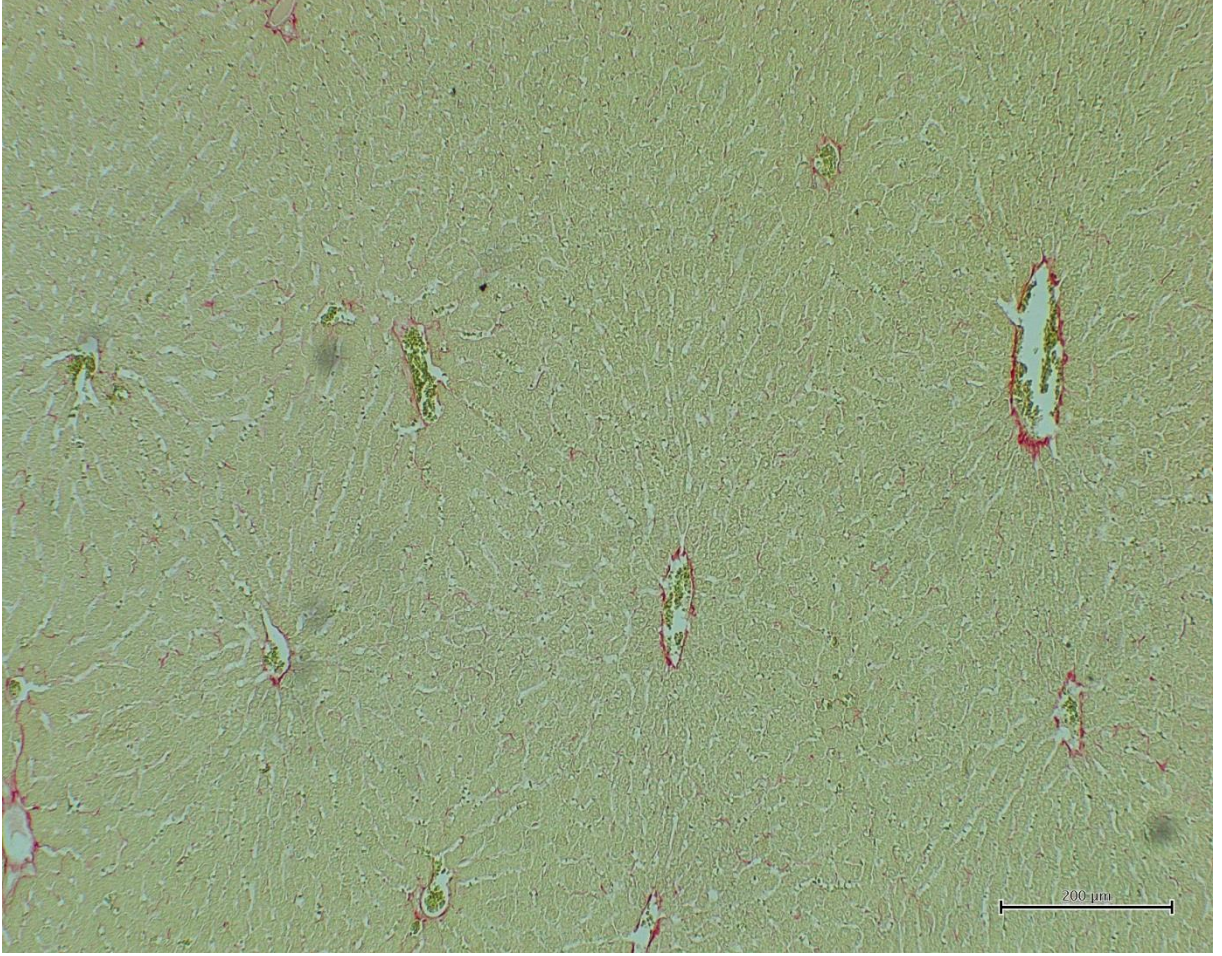
Resim 28. DOX+Apelin-13 grubuna ait karaciğer dokusu. Sinüzoidal dilatasyonların azaldığı ve damar çevresinde hafif yoğun bağ dokusu boyanma olduğu izlenmektedir (Masson trikrom, x10).



Resim 29. DOX+Apelin-13 grubuna ait karaciğer dokusu. Santral ven çevresinde yoğun boyanma ve az miktarda sinüzoidal dilatasyon izlenmektedir (Masson trikrom, x40).

4.3.Pikro Sirius Değerlendirmesi

4.3.1.Kontrol Grubu Pikro Sirius Değerlendirmesi

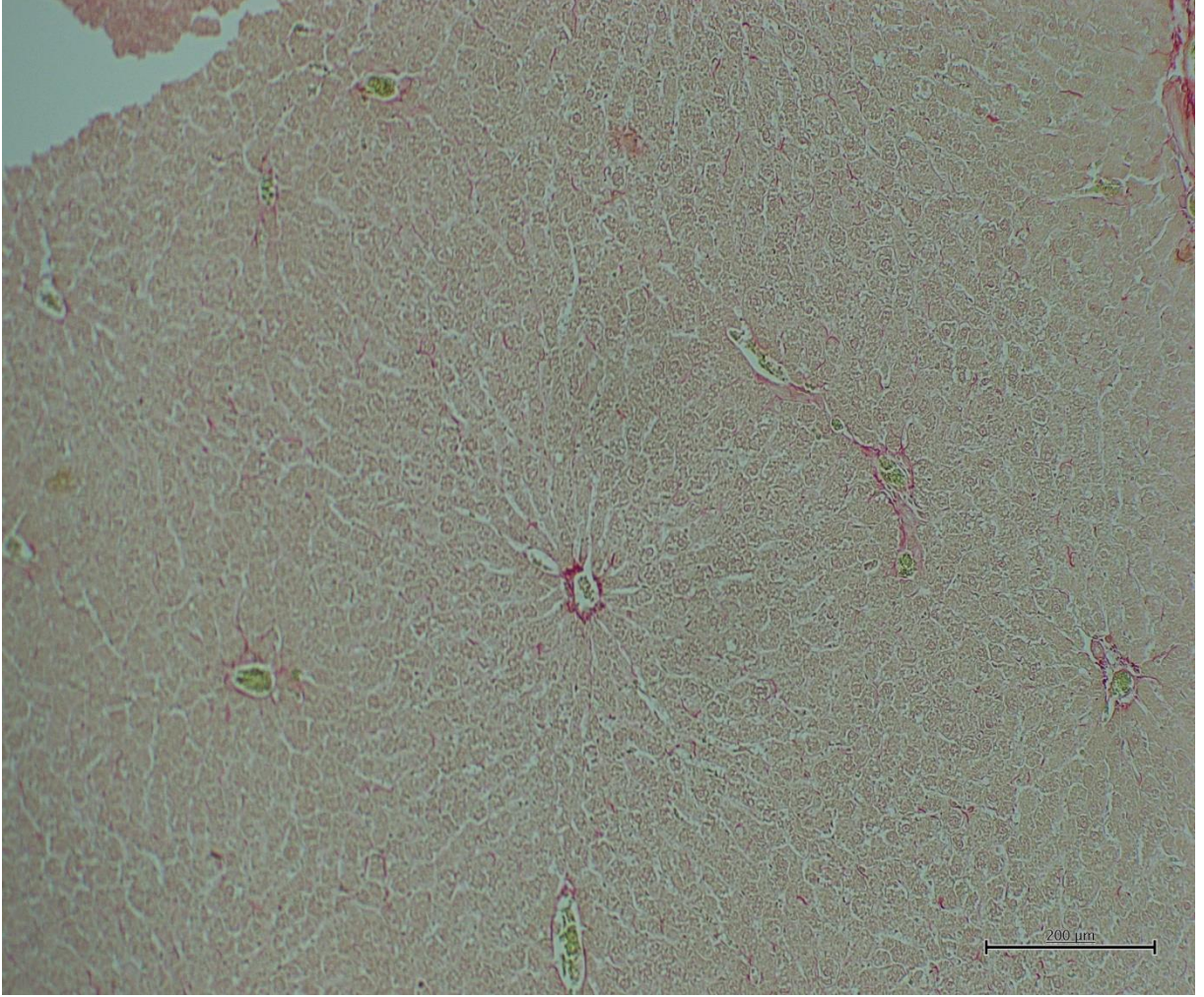


Resim 30. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu. Santral ven çevresinde yoğun boyanma izlenmektedir (Pikro sirius, x10).

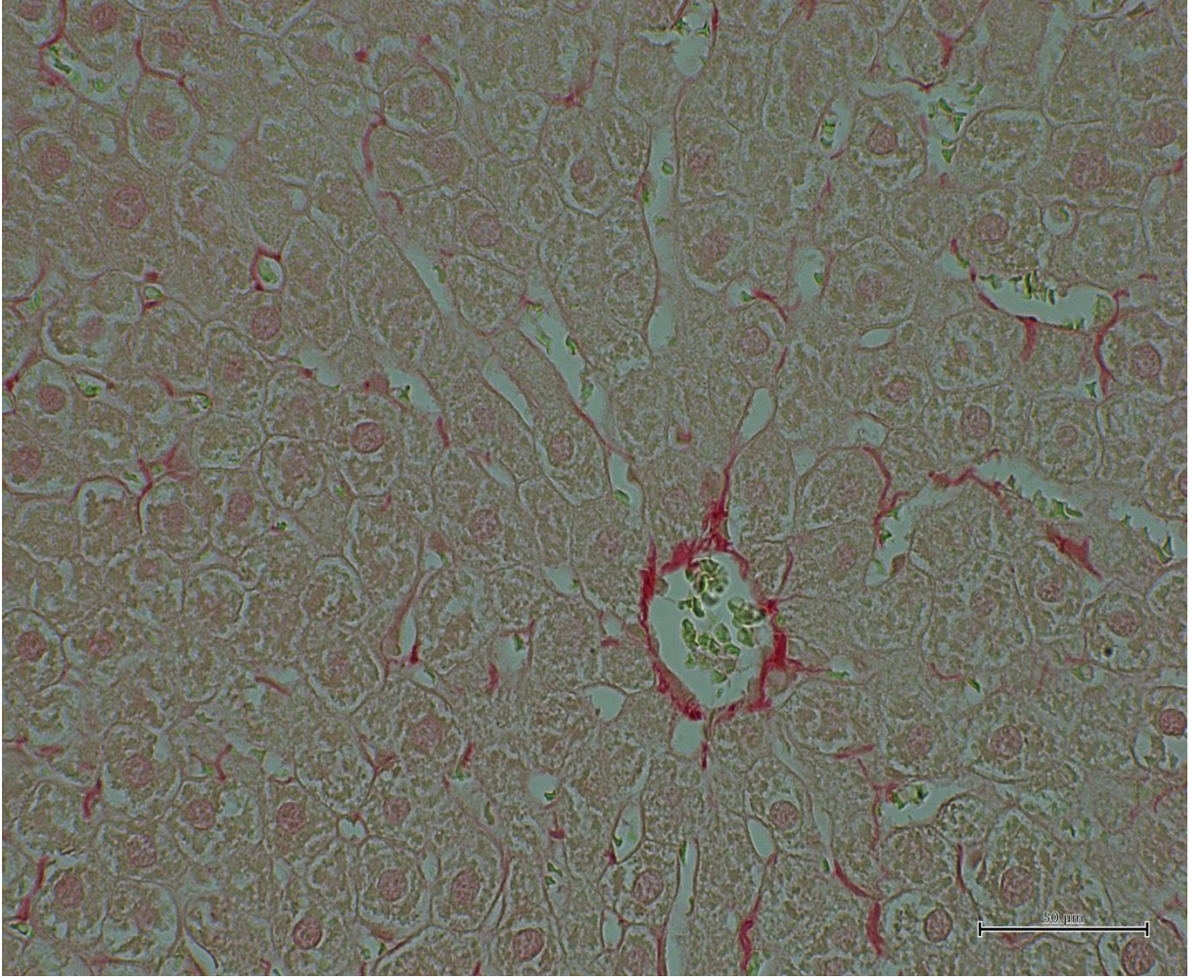


Resim 31. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu. Santral ven çevresinde yoğun boyanma izlenmektedir (Pikro sirius, x40).

4.3.2.DOX Grubu Pikro Sirius Değerlendirmesi

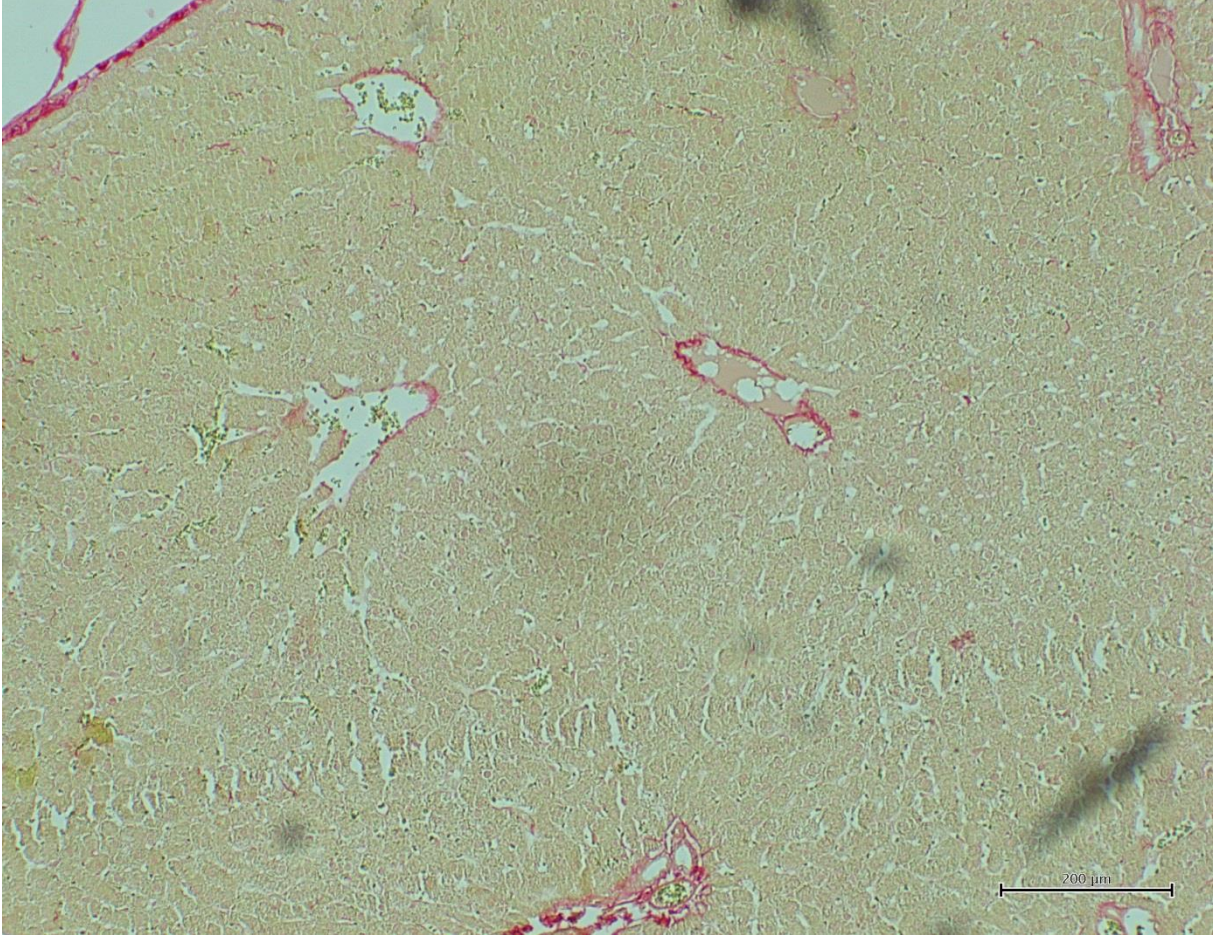


Resim 32. DOX grubuna ait karaciğer dokusu. Santral ven ve portal alan çevresinde yoğun boyanmalar izlenmektedir (Pikro sirius, x40).

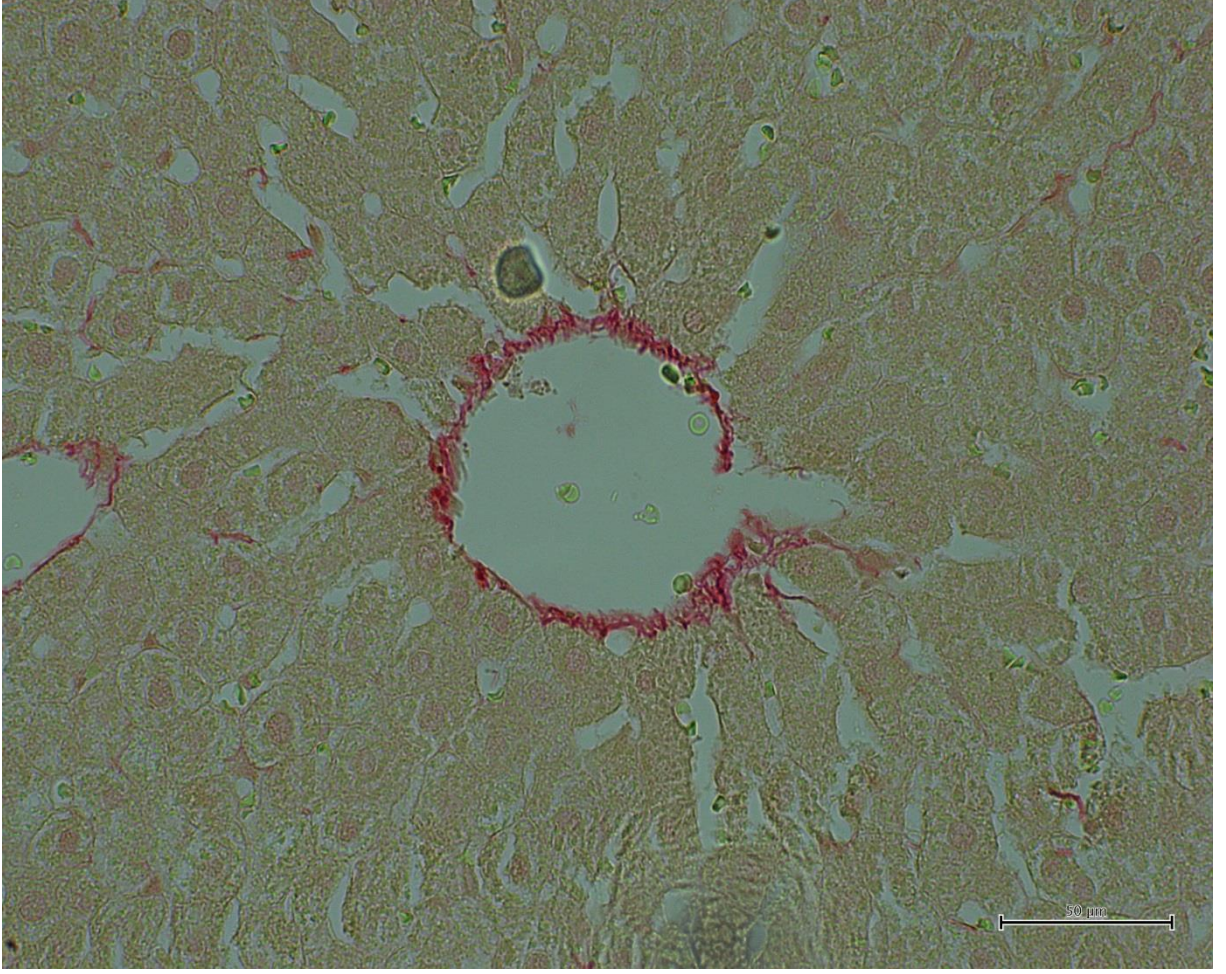


Resim 33. DOX grubuna ait karaciğer dokusu. Santral ven çevresinde ve hepatosit kordonlarında yoğun boyanmalar izlenmektedir (Pikro sirius, x40).

4.3.3.DOX+Apelin-13 Grubu Pikro Sirius Değerlendirmesi



Resim 34. DOX+apelin-13 grubuna ait karaciğer dokusu. Santral ven çevresinde ve portal alanlarda yoğun boyanmalar izlenmektedir (Pikro sirius, x40).



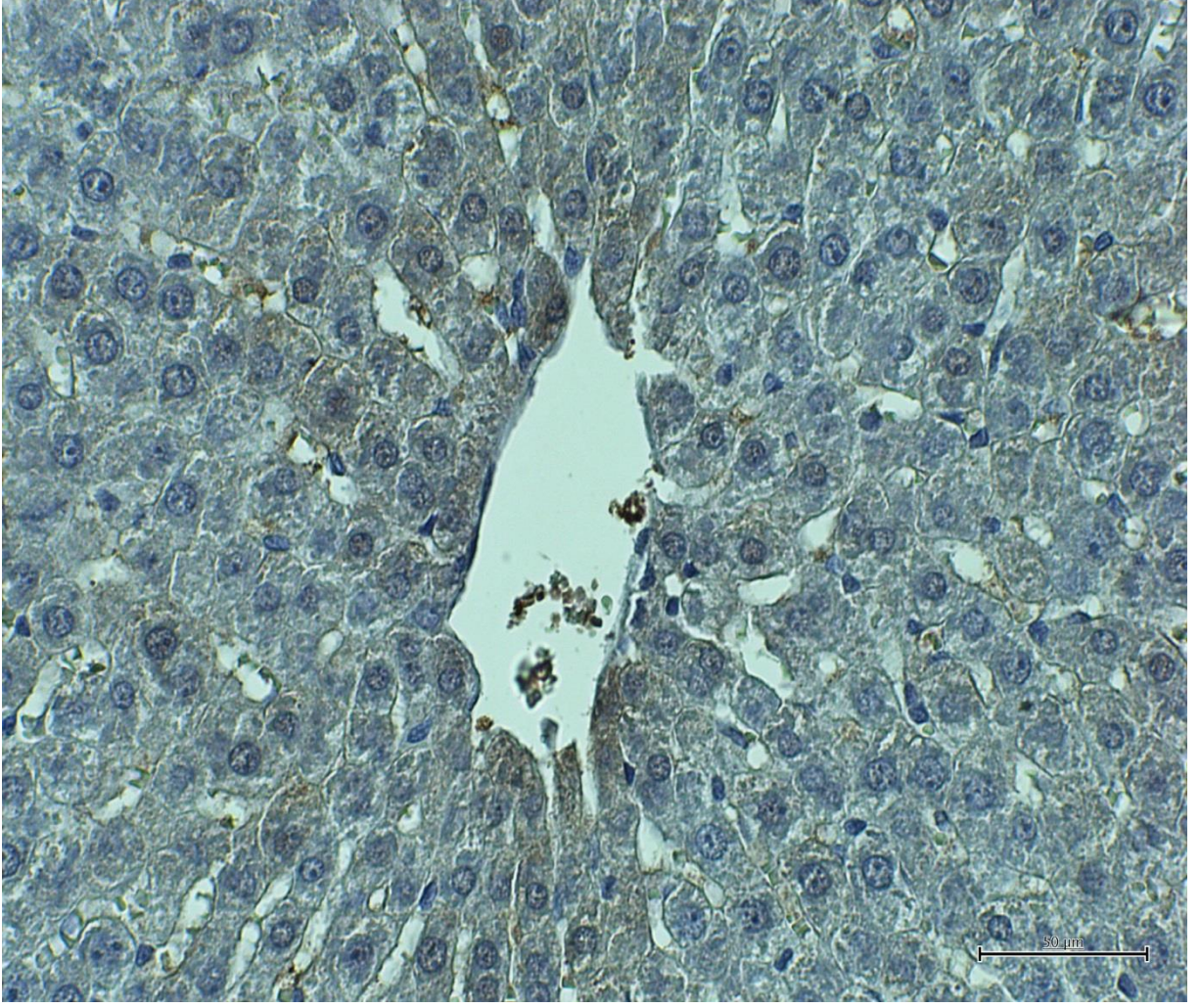
Resim 35. DOX+apelin-13 grubuna ait karaciğer dokusu. Santral ven çevresinde yoğun boyanmalar ve bazı hepatositlerde dejenerasyonlar izlenmektedir (Pikro sirius, x40).

4.4.İmmünohistokimyasal Olarak NF-κB Değerlendirmesi

4.4.1.Kontrol Grubu NF-κB Değerlendirmesi

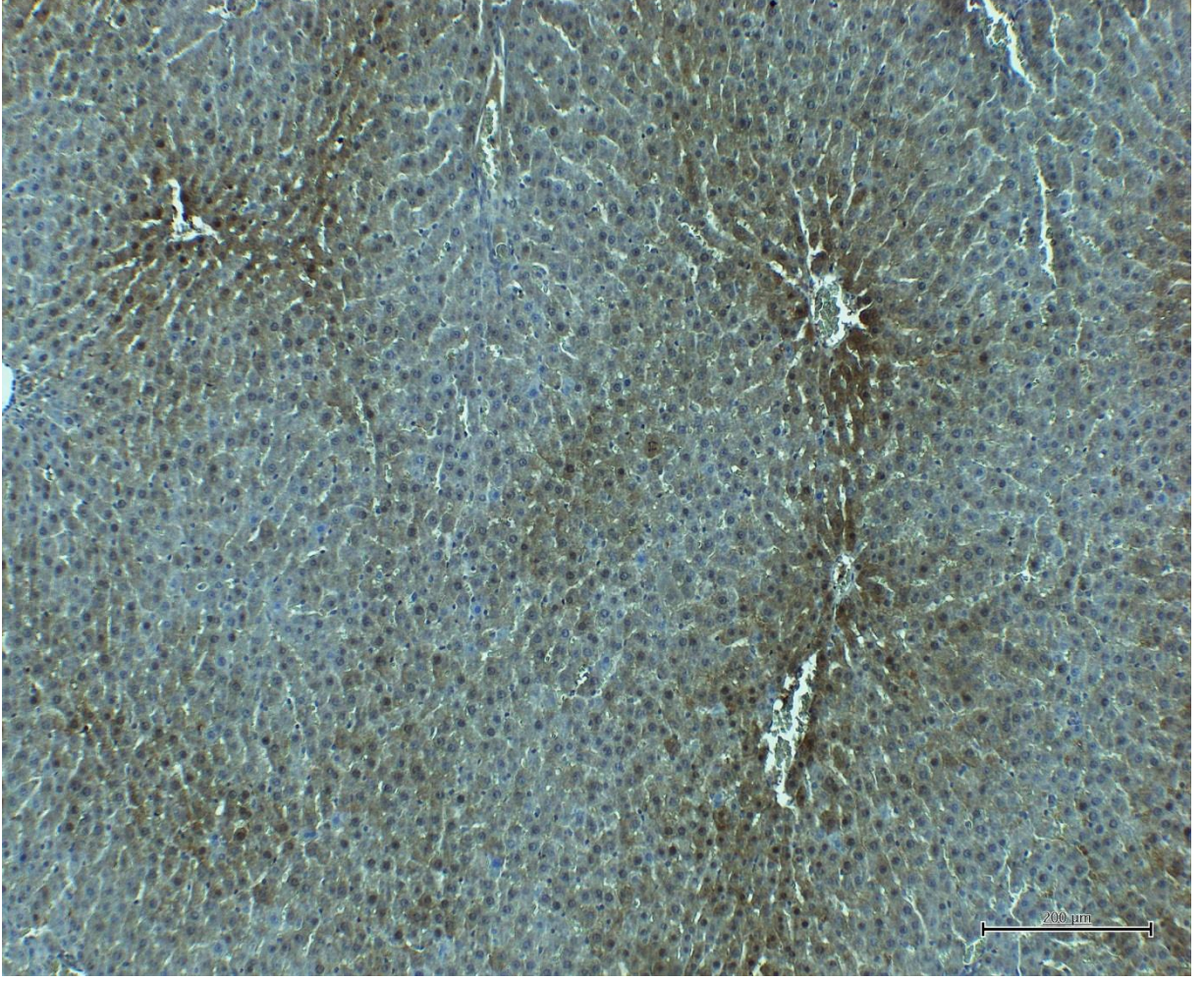


Resim 36. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu. Normal karaciğer histolojik yapısı görülmektedir (NF-κB, x10).

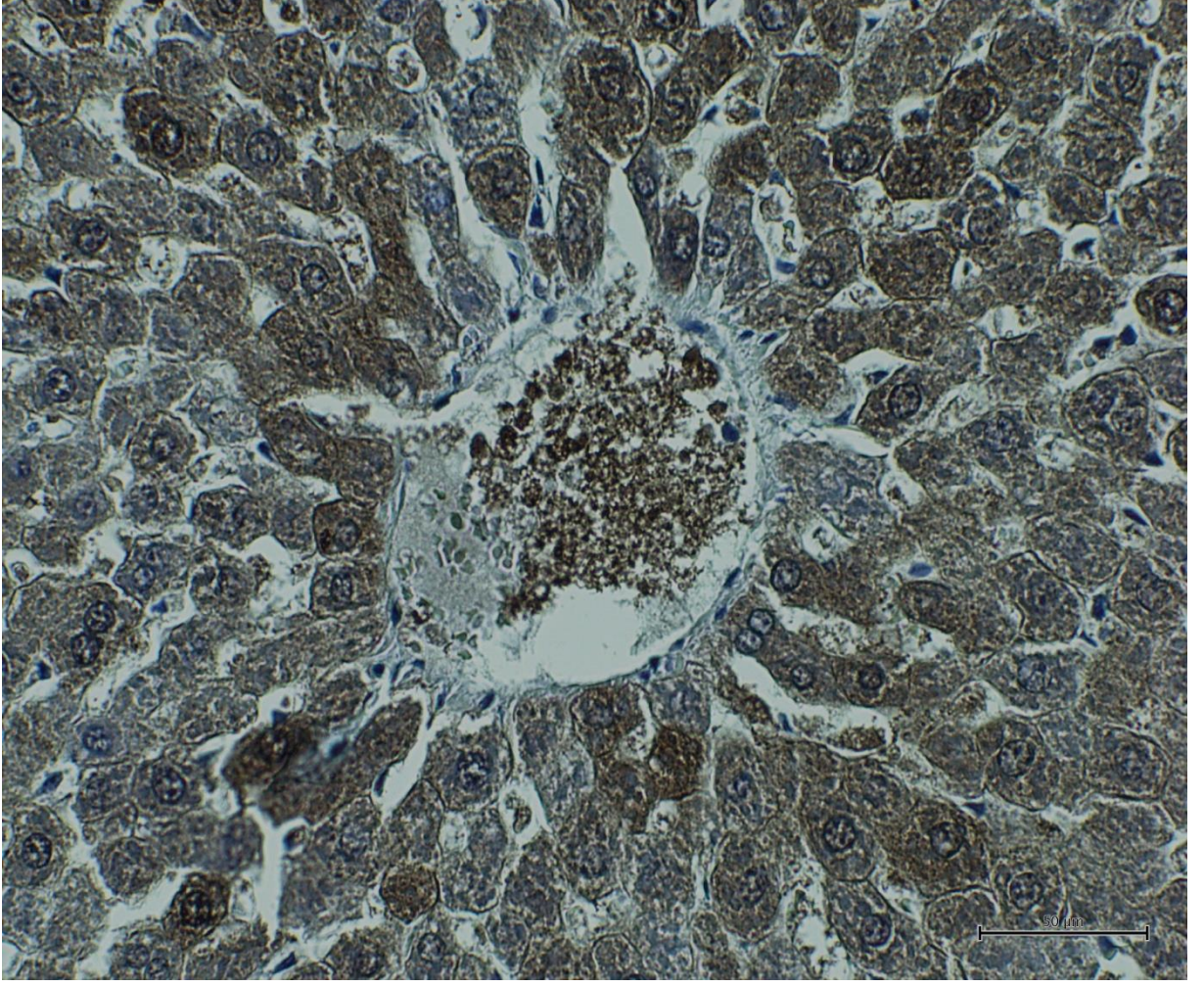


Resim 37. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu. Santral ven çevresinde açık kahverengi boyanma düşük derecede inflamasyon olduğunu göstermektedir (NF- κ B, x40).

4.4.2.DOX Grubu NF- κ B Değerlendirmesi

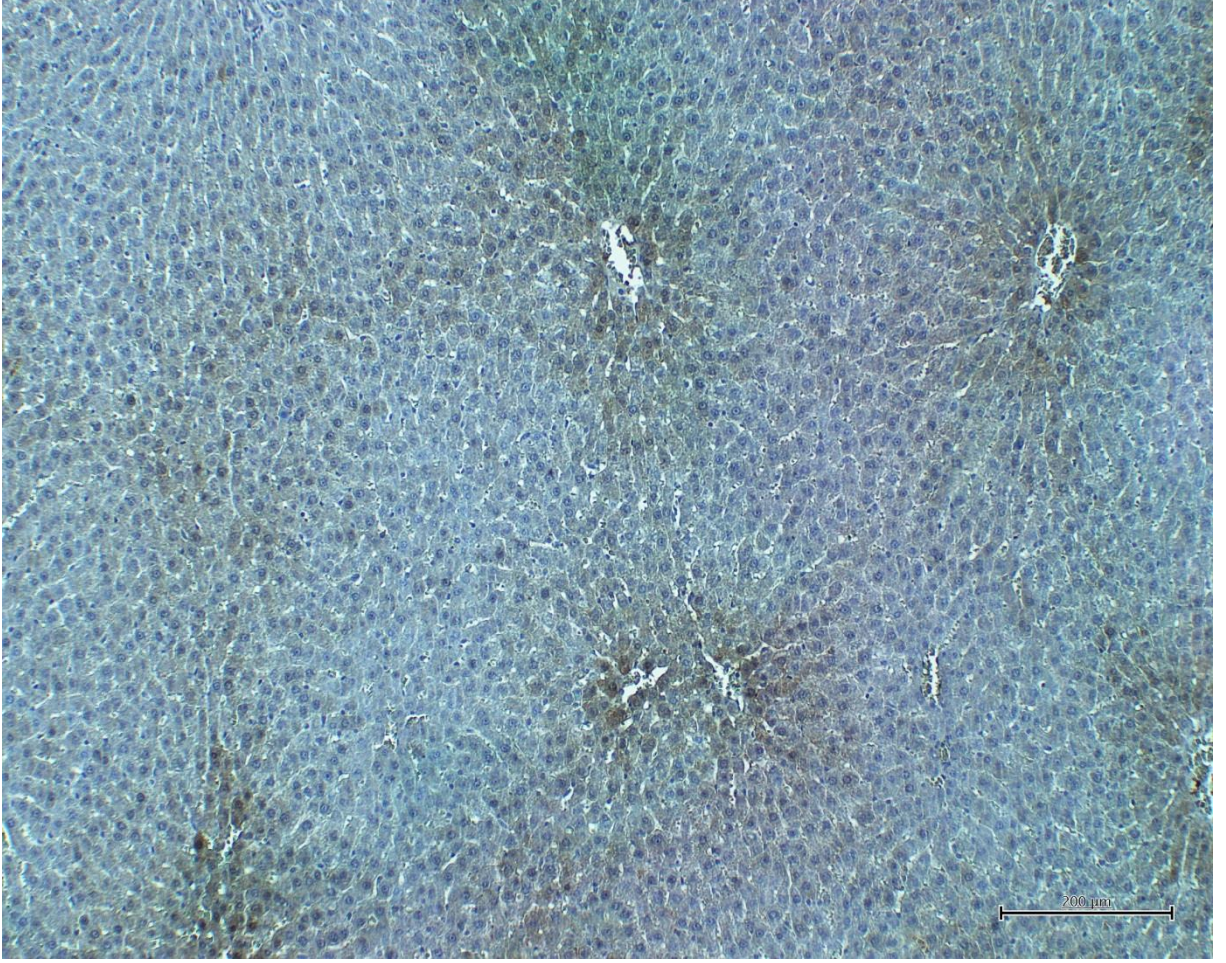


Resim 38. DOX grubuna ait karaciğer dokusu. Santral ven çevrelerinde yoğun inflamasyona bağlı olarak koyu kahverengi renkte boyanmalar izlenmektedir (NF- κ B, x10).

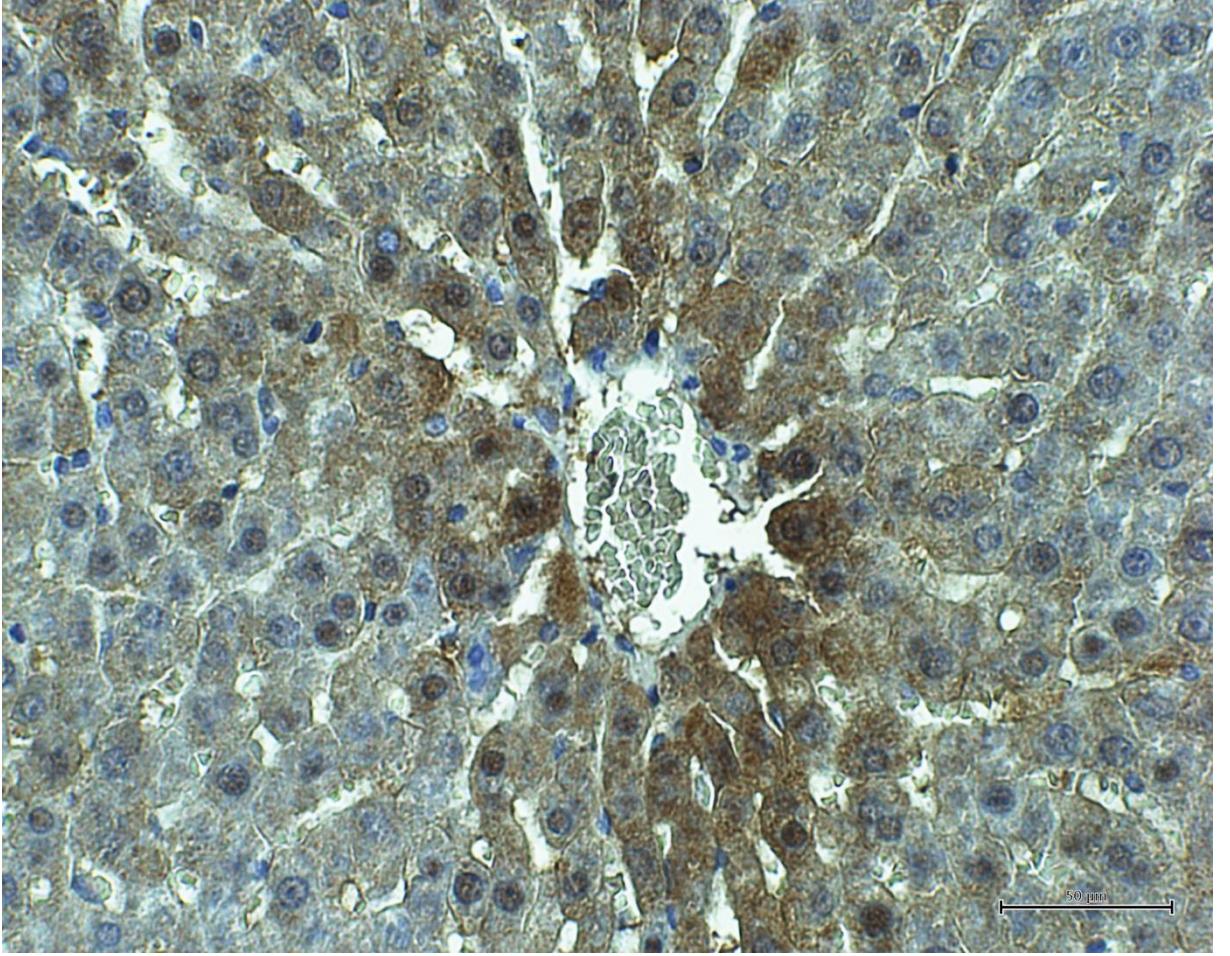


Resim 39. DOX grubuna ait karaciğer dokusu. Santral ven çevresinde kontrol grubuna göre belirgin düzeyde artmış inflamasyona bağlı boyanma izlenmektedir (NF-κB, x40).

4.4.3.DOX+Apelin-13 Grubu NF- κ B Değerlendirmesi



Resim 40. DOX+apelin-13 grubuna ait karaciğer dokusu. DOX grubuna gore daha az yoğun boyanma izlenmektedir (NF- κ B, x10).



Resim 41. DOX+apelin-13 grubuna ait karaciğer dokusu. DOX grubuna göre boyanmada belirgin bir azalma görülmektedir. Bu da inflamasyonun DOX grubuna göre daha az olduğunu göstermektedir (NF-κB, x10).

4.5.Biyokimyasal Değerlendirmeler

Biyokimyasal değerlendirmeleri yapabilmek için kan ve karaciğer dokusu numuneleri alınmıştır. Kandan ALT ve AST değerleri ölçülmüştür. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında DOX grubunda ALT değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı [48.00(33.00-53.00) vs 63.50(53.00-86.00),p:0,001]. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında DOX grubunda AST değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı [108.00(70.00-117.00) vs 185.50 (118.00-227.00),p<0,001]. DOX grubuyla karşılaştırıldığında DOX+apelin-13 grubunda ALT değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı [63.50(53.00-86.00) vs 49.00(37.00-64.00),p:0,013]. DOX grubuyla karşılaştırıldığında DOX+apelin-13 grubunda AST değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanmadı(p:0,142). Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında DOX+apelin-13 grubunda ALT(p:0,442) ve AST(p:0,109) değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanmadı.

Alınan karaciğer doku örneklerinde ELISA yöntemi ile TAS, TOS ve hidroksiprolin seviyeleri ölçülmüştür. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında DOX grubunda TAS değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı [2.07(1.92-2.16) vs 1.93(1.67-1.98),p:0,021]. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında DOX grubunda TOS değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı [1.18(0.48-1.67) vs 2.20(1.14-3.29),p:0,002]. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında DOX grubunda hidroksiprolin değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı [0.80(0.58-1.05) vs 1.39(1.10-1.66),p:0,001]. DOX grubuyla karşılaştırıldığında DOX+apelin-13 grubunda TOS değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı [2.20(1.14-3.29) vs 1.19(0.53-2.16),p:0,006]. DOX grubuyla karşılaştırıldığında DOX+apelin-13 grubunda TAS(p:0,252) ve hidroksiprolin(p:0,005) değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanmadı. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında DOX+apelin-13 grubunda hidroksiprolin değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı [0.80(0.58-1.05) vs 1.09(0.71-1.20),p:0,038]. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında DOX+apelin-13 grubunda TAS(p:0,236) ve TOS(p:0,408) değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanmadı. Kontrol, DOX ve DOX+apelin-13 gruplarının ALT, AST, TAS, TOS ve hidroksiprolin değerleri açısından bazal değerleri Tablo VIII'de gösterilmiştir.

Tablo VIII. Kontrol, DOX ve DOX+apelin-13 gruplarının ALT, AST, TAS, TOS ve hidroksiprolin değerleri açısından bazal değerleri

Parametreler	Grup 1 Kontrol	Grup 2 Doxo	Grup 3 Doxo+Apelin	P değeri		
				G1-G2	G1-G3	G2-G3
ALT(IU/L)	48.00 (33.00- 53.00)	63.50 (53.00- 86.00)	49.00 (37.00- 64.00)	0.001*	0.442	0.013*
AST(IU/L)	108.00 (70.00- 117.00)	185.50 (118.00- 227.00)	148.00 (88.00- 188.00)	<0.001*	0.109	0.142
TAS (mmol Trolox equiv./lt)	2.07 (1.92- 2.16)	1.93 (1.67- 1.98)	1.98 (1.88- 2.16)	0.021*	0.236	0.252
TOS(μ mol H ₂ O ₂ equiv./lt)	1.18(0.48- 1.67)	2.20 (1.14- 3.29)	1.19 (0.53- 2.16)	0.002*	0.408	0.006*
Hidroksiprolin (μ g hyp/ml)	0.80 (0.58- 1.05)	1.39 (1.10- 1.66)	1.09 (0.71- 1.20)	0.001*	0.038*	0.005*

5.TARTIŞMA

İnsan vücudunda yer alan en büyük iç organ olan karaciğer; proteinlerin sentezi, kandan besinlerin alınması ve depolanması, gerek oral yolla gerekse damar yolu ile alınan ilaçların ve toksik maddelerin metabolizması ve zararsız hale getirilmesi gibi pek çok önemli işlevlere sahiptir (Crawford JM. 2015). Tüm bu işlevler nedeniyle, karaciğer hastalıkları halk sağlığına yönelik temel tehditler arasında yer almaya devam etmektedir (Adewusi EA ve ark. 2010, Asha VV ve ark. 1998, Ahsan MR ve ark. 2009).

Antrasiklin grubunda yer alan bir antibiyotik olan doksorubisin; meme kanseri, prostat kanseri, lösemi gibi pek çok malignitede tedavi edici ajan olarak kullanılmaktadır (Shabalala S ve ark. 2017, Gewitz DA. 1999, Minotti G ve ark. 2004, Mross K 1991, Sayed-Ahmed M.M. ve ark. 2010, Gorini S ve ark. 2018, Safa M ve ark. 2010). Doksorubisinin toksik etkileri; DNA üzerinde değişime sebep olması, serbest radikaller ve oksidatif stres üretimiyle gerçekleşmektedir (Granados-Principal S ve ark. 2010). Doksorubisinin bu toksik etkileri, kullanım endikasyonu geniş olmasına rağmen; doksorubisin kullanımını sınırlandırmaktadır (Ky B ve ark. 2014).

Biz çalışmamızda karaciğer hasarı oluşturmak için sıçanlara 5mg/kg dozundan 4 günde 1 defa olacak şekilde toplam verilen dozu 20mg/kg doksorubisini intraperitoneal olarak uyguladık (Bilgiç ve ark. 2019). Tedavi grubuna ise aynı dozlarda ve günlerde intraperitoneal olarak doksorubisin uygulaması sonrası, 2. doz doksorubisin uyguladıktan sonra 7 gün boyunca 15 µg/kg apelin-13'ü intraperitoneal olarak uyguladık (Kim ve ark. 2017, Principe ve ark. 2008).

Kontrol grubuyla kıyaslandığında doksorubisin verilerek hasar oluşturulan grupta toplam vücut ağırlığında ve sakrifikasyon sonrası alınan karaciğerin ağırlığında anlamlı bir azalma saptadık. Benzer şekilde DOX uygulamasına bağlı vücut ağırlığında önemli derecede azalma gösteren diğer çalışmalarla uyumluydu (Herman EH ve ark. 2000, Herman EH ve ark. 1994). Herman EH ve ark. kilo kaybının gastrointestinal sistemde DOX'a bağlı epitel hasarı gelişmesiyle besinlerin emiliminin bozulması ve ayrıca iştahın azalmasına bağlı olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda sadece DOX verilen grupta 2 adet sıçan ve DOX+apelin-13 verilen grupta ise 1 adet sıçan öldü. Bununla birlikte DOX uygulaması yapılan çeşitli çalışmalarda gelişen kardiyotoksisite, hepatotoksisite veya nefrotoksisiteye bağlı çeşitli ölümler olmuştur (Karanovic D. Ve ark. 2016, Alderton PM ve ark. 1992).

Çalışmamızda histolojik incelemelerde kontrol grubunda Hematoksilen-eozin, Masson trikrom ve Pikro sirius boyamalarında normal histolojik yapı saptanmıştır. DOX grubuna ait sıçanların karaciğeri Hematoksilen-eozin boyası ile incelendiğinde bol yağ damlacıkları, granüler dejenerasyon, bazı bölgelerde hiperpiknotik çekirdekler ve nekroz olduğunu gözlemledik. Bu bulgular da DOX ile hasar verilen benzer çalışmalarda sıçanların karaciğerinde gözlenen bulgular ile benzerlik gösterdi (Jaćević V ve ark. 2018, Rašković A ve ark. 2011, Akindele AJ ve ark. 2018). Çalışmamızda kontrol, DOX ve DOX+apelin-13 gruplarında Masson trikrom ve Pikro sirius boyamalarında belirgin bir fark gözlemedik. Bununla beraber DOX+apelin-13 grubunun Hematoksilen-eozin boyalı kesitlerinde, yağ damlacıklarının miktarının azaldığını, hepatositlerdeki dejenerasyonun ve nekrozun azaldığını gözlemledik. Sagiroglu T ve ark.(2014) sıçanlarda geliştirilen iskemi-reperfüzyon hasarında verilen apelinin lipit oksidasyonunu azalttığını ve gelişen karaciğer doku hasarını histolojik olarak hafiflettiğini ve böylece karaciğer işlevleri üzerinde olumlu etkileri olduğunu göstermişlerdir. Biz de çalışmamızda gelişen karaciğer hasarının apelin-13 verilmesiyle histolojik olarak gerilediğini gözlemledik ve bu çalışmayla uyumlu sonuçlar elde ettik. Bunlara rağmen bizim çalışmamızda bulduğumuz sonuçlara zıt olarak; parsiyel hepatektomi sonrası APJ sisteminin baskılanmasıyla Kupffer hücrelerinin aktive olduğunu ve karaciğer rejenerasyonunu artırdığı gösterilmiştir (Yoshiya S ve ark. 2015). Apelin ve APJ'nin hepatoselüler karsinomada ekspresyonunun arttığı ve tümoral anjiogeneze neden olduğu gösterilmiştir. Bu yüzden hepatoselüler karsinomada anjiogenezin bir belirteci olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Muto J ve ark. 2014). Huang Q ve ark. (2016), hepatomalarda apelin uygulamasının ERK 1/2'yi fosforile ettiğini ve Beclin-1'in ekspresyonunu artırdığını ve dolayısıyla otofajinin arttığını göstermişlerdir. Henüz altta yatan mekanizma tam olarak aydınlatılamamış olsa da non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) olan hastalarda normal sağlıklı bireylere göre serum apelin-36 yüksek bulunmuştur (Aktas B ve ark. 2011). Ercin CN ve ark.(2009) yine NAFLD olan hastalarda plazma apelin-12 seviyelerinin normal bireylere göre yüksek olduğunu bulmuştur.

NF-κB proinflamatuvar süreçlerde artan bir transkripsiyon faktörüdür (Lawrence T. 2009). NF-κB nin aktivasyonu proinflamatuvar sitokinler olan TNFα ve IL-1'in artışıyla olmaktadır, bu da bize dokuda inflamatuvar bir sürecin başladığını göstermektedir (Karin M ve ark. 2004). İmmünohistokimyasal boyama olarak kullandığımız NF-κB antikoru ile kontrol ve deney grubu arasında belirgin fark gözlemledik. DOX verilerek hasar oluşturulan grupta

inflamasyonun artışıyla beraber daha yoğun bir boyanma olması bu açıdan diğer çalışmalarla uyumludur. Apelin-13 uygulaması sonrası proinflamatuvar sitokinlerin (interlökin-1, interlökin-6) seviyesinde düşüş; antiinflamatuvar sitokin olan interlökin-10 seviyesinde ise artış görülmüştür (Emam MN ve ark. 2016). Çalışmamızda DOX grubuna göre DOX+apelin-13 grubunda NF-κB antikoruna ile daha az boyanma gözlenmiştir, bu da inflamasyonun DOX grubuna göre daha az olduğunu göstermektedir ve yapılan diğer çalışmalarla uyumludur. Han S ve ark.(2013) akut pankreatit üzerine yaptıkları deneysel çalışmada apelin uygulamasının NF-κB aktivasyonunu baskıladığını ve sonuç olarak inflamatuvar sürecin baskılandığını göstermişlerdir. Deney grubuna göre tedavi grubunda NF-κB ile daha az yoğun boyanma olması apelin uygulamasının inflamasyonu baskıladığını gösteren diğer çalışmalarla uyumludur.

Çalışmamızda DOX verilen grupta kontrol grubuna göre toplam antioksidan kapasitede azalma, toplam oksidan kapasitede ise artış gözlemledik ve bu önceki çalışmalar ile uyumluydu (Afsar T ve ark. 2019).

Yapılan deneysel çalışmalarda DOX uygulamasının serum ALT, AST değerlerini yükselttiği ve sonuç olarak karaciğer hasarına neden olduğu gösterilmiştir (Kabel AM ve ark. 2018, Djabir YY ve ark. 2017). Bizim çalışmamızda da kontrol grubuna göre hasar grubunda serum ALT ve AST değerlerinde artış gözlemledik. Bir dokudaki hidrokspirolin artışı dokudaki toplam kollajen miktarını yansıttığı için fibrozis konusunda fikir sahibi olmamızı sağlar (El-Agamy DS ve ark. 2019, Iwata K ve ark. 2018). Karaciğer hasarı olan sıçanlarda apelin-13 uygulanmasıyla alanin amino transferaz, aspartat amino transferaz ve laktat dehidrogenaz enzim seviyelerinde düşüş saptanmıştır. Ekzojen olarak verilen apelinin karaciğer doku hasarının düzelmesi üzerinde olumlu etkileri gösterilmiştir. Platelet kaynaklı büyüme faktörü ve proinflamatuvar sitokinlerin, stellat hücrelerde APJ nin ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir (Yokomori H ve ark. 2011). Çalışmamızda ELISA ile ölçülen dokudaki hidrokspirolin miktarının DOX verilen grupta kontrol grubuna göre arttığını gözlemledik. Apelin-13 verilen grupta ise hidrokspirolin miktarı açısından DOX grubuna göre azalma gözlemledik. Aynı şekilde apelin-13 verilen grupta ALT ve AST değerlerinin azalması, DOX nedeniyle oluşan karaciğer hasarı üzerine apelin-13 uygulamasının biyokimyasal olarak olumlu yönde etkisi olduğunu gözlemledik. Çeşitli deneysel çalışmalarda apelin uygulamasının reaktif oksijen radikallerini azalttığı ve toplam antioksidan kapasiteyi artırıp, toplam oksidan kapasiteyi azalttığı gösterilmiştir (Pouresmaeili-Babaki E ve ark. 2018,

Pisarenko OI ve ark. 2014). Bizim çalışmamızda da antioksidan kapasite ve oksidan kapasite üzerine apelinin etkisi bu çalışmalarla uyumluydu. APJ reseptörünün apelin ile uyarılması sonucu vasküler endotelial büyüme faktörü(VEGF) ve platelet kaynaklı büyüme faktörü(PDGF) artar ve sonuç olarak hücrenin sağkalımı üzerinde olumlu etkiler gelişir (Melgar-Lesmes P ve ark. 2011). Akut karaciğer hasarında apelinin ve reseptörü olan APJ'nin karaciğerdeki mRNA ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Yasuzaki H ve ark. 2013).

Özetle, DOX uygulanmasının yapısal, immünohistokimyasal ve biyokimyasal olarak karaciğer doku yapısına zarar verdiği gösterilmiştir. DOX+apelin-13 verilen grupta ise, hem yapısal hem de immünohistokimyasal olarak bu doku hasarının gerilediğini ve beraberinde biyokimyasal parametrelerin de uyumlu olduğunu söyleyebiliriz.



6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Sıçanlarda DOX uygulanması sonucu gelişen karaciğer hasarının, apelin-13 verilerek giderilip giderilmediğini yapısal ve immünohistokimyasal düzeyde ve biyokimyasal olarak göstermeyi amaçladık. Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz sonuçlar şunlardır:

1. Elde edilen bulgular ışığında sıçanlara intraperitoneal olarak uygulanan DOX sonrası sıçanların karaciğerinde yapısal ve immünohistokimyasal olarak hasar olduğu görüldü.
2. Yapılan ışık mikroskopik incelemede apelin-13 uygulamasının karaciğerde yapısal ve immünohistokimyasal olarak düzelmeye sağladığı ve inflamasyonu azalttığı görüldü.
3. DOX uygulaması sonrası kandan bakılan biyokimyasal testler sonucunda ALT ve AST nin arttığı ve ELISA ile bakılan TAS değerlerinde düşüş, TOS ve hidroksiprolin değerlerinde ise artış gözlemlendi. DOX uygulamasının tüm bu sonuçlar çerçevesinde biyokimyasal olarak hasar oluşturduğu görüldü.
4. DOX+apelin-13 uygulaması sonrası kandan bakılan biyokimyasal testler sonucunda ALT ve AST'nin DOX verilen gruba göre azaldığı ve yine DOX verilen gruba göre ELISA ile bakılan TAS değerlerinde artış, TOS ve hidroksiprolin değerlerinde ise azalma gözlemlendi. Apelin-13 uygulamasının tüm bu sonuçlar çerçevesinde biyokimyasal olarak gelişen hasar üzerinde geriletici etkisi olduğu görüldü.
5. DOX ile oluşturulan karaciğer hasarına apelin-13'ün etkilerinin yapısal, immünohistokimyasal ve biyokimyasal olarak araştırıldığı bu çalışmanın bundan sonra yapılacak olan deneysel ve klinik çalışmalara yol gösterici olacağı kanaatindeyiz.
6. Bu çalışmamızın klinikte uygulanabilir olması için farklı apelin-13 dozlarında, farklı hasar mekanizmalarıyla yapılacak deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.
7. Bu çalışmalar yapısal, immünokimyasal ve biyokimyasal yöntemler dışında daha ileri ve moleküler tekniklerle desteklenmelidir.

ÖZET

DOKSORUBİSİN UYGULANAN SIÇANLARDA APELİN-13 MOLEKÜLÜNÜN KARACİĞERE ETKİSİ

Bayrak E. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji Ana Bilim Dalı, 2020.

Bu çalışmanın amacı sıçanlarda doksorubisin verilerek oluşturulan karaciğer hasarının, apelin-13 verilerek histopatolojik ve biyokimyasal olarak giderilip giderilmediğini göstermektir.

Çalışmada 30 adet erkek Wistar albino cinsi sıçan kullanıldı. Sıçanlar her grupta 10 sıçan olacak şekilde 3 gruba ayrıldı; 1.Grup(kontrol grubu): 14 gün boyunca her gün 3ml/kg intraperitoneal olarak salin verildi. 2.Grup(DOX grubu): 5 mg/kg doksorubisin 4 günde 1 toplam 20 mg/kg olacak şekilde intraperitoneal olarak uygulandı. 3.Grup(DOX+apelin-13): 5 mg/kg doksorubisin 4 günde 1 toplam 20 mg/kg olacak şekilde intraperitoneal olarak uygulandı. Deneyin 2. haftasının başlangıcından itibaren 7 gün boyunca 15 µg/kg apelin-13 intraperitoneal olarak verildi. Deney sonunda sıçanlara ksilazin 5mg/kg, ketamin 100 mg/kg verilerek anestezi altında sakrifiye edildi.

Yapısal (Hematoksilen-eozin, Masson trikrom, Pikro sirius ve NF-κB antikoru) ve biyokimyasal (ALT, AST, TAS, TOS ve hidroksiprolin) değerlendirmelerin yapılması için karaciğer dokusu ve kan numuneleri alındı.

Hematoksilen-eozin ile boyanan karaciğer dokularında kontrol grubunda normal histolojik yapı görülmüştür. DOX verilen grupta hepatositlerde piknotik çekirdek, sentrilobüler nekroz, sinüzoidal dilatasyon ve yaygın dejenerasyon gözlemlendi. Apelin-13 verilen grupta tüm parametrelerde belirgin iyileşme gözlenmiştir. Masson trikrom ve Pikro sirius boyamalarında 3 grup arasında belirgin farklılık saptanmamıştır. NF-κB antikoru ile yapılan immünohistokimyasal boyamada DOX grubunun kontrol grubuna göre daha yoğun boyandığı saptanmıştır. Apelin-13 verilen grupta sadece DOX verilen gruba göre NF-κB ile boyanma yoğunluğunun azaldığı gözlenmiştir. Yapılan biyokimyasal değerlendirmelerde DOX grubunda kontrol grubuna göre ALT, AST, hidroksiprolin ve TOS düzeylerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı. DOX grubunda TAS düzeylerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı. DOX+apelin-13 verilen grupta DOX grubu ile kıyaslandığında ALT ve TOS değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı

bir azalma saptanmıştır. DOX ve DOX+apelin-13 grupları arasında AST, TAS ve hidroksiprolin değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. DOX+apelin-13 grubunda kontrol grubuna göre hidroksiprolin değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır. Kontrol grubuna göre DOX+apelin-13 grubunda ALT, AST, TAS ve TOS değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Elde ettiğimiz veriler doğrultusunda apelin-13 uygulamasının, DOX'a bağlı oluşan karaciğer hasarını; reaktif oksijen radikallerinin miktarını azaltarak belirgin bir ölçüde azalttığını gözlemledik.

Anahtar kelimeler: Karaciğer, doksorubisin, apelin-13



ABSTRACT

THE EFFECTS OF APELIN-13 MOLECULE IN RATS TREATED WITH DOXORUBICIN

Bayrak E. Aydın Adnan Menderes University Faculty of Medicine Department of Histology and Embryology,2020

The aim of this study is to show whether liver damage caused by doxorubicin in rats is resolved histopathologically and biochemically by treatment of apelin-13.

Thirty male Wistar albino rats were used in this study. Rats were divided into 3 groups with 10 rats in each group; Group 1 (control group): 3ml/kg intraperitoneal saline was given daily for 14 days. Group 2 (DOX group): Every 4 days, 5 mg/kg doxorubicin was given intraperitoneally, with a total of 20 mg/kg. Group 3 (DOX+apelin-13): Every 4 days, 5 mg/kg doxorubicin was given intraperitoneally, with a total of 20 mg/kg. 15 µg/kg apelin-13 was given intraperitoneally for 7 days from the beginning of the 2nd week of the experiment. At the end of the experiment, rats were sacrificed under anesthesia by administering xylazine 5mg/kg and ketamine 100mg/kg. Blood and liver samples were taken for biochemical (ALT, AST, TAS, TOS and hydroxyproline) and histopathological (Hematoxylin-eosin, Masson trichrome, Picro cirius and NF-κB antibody) evaluations.

Normal histological structure was observed in the control group in liver tissues stained with hematoxylin-eosin. In the DOX group, hepatocytes showed pycnotic nucleus, centrilobular necrosis, sinusoidal dilation and diffuse degeneration. DOX+apelin-13 group showed significant improvement in all histological parameters. There was no significant difference between the 3 groups in Masson trichrome and picro cirius staining. In immunohistochemical staining with NF-κB antibody, the DOX group was found to be stained more intensely than the control group. It was observed that the intensity of staining with NF-κB decreased in the group given apelin-13 compared to the group given only DOX. In biochemical evaluations, there was a statistically significant increase in ALT, AST, hydroxyproline and TOS levels in the DOX group compared to the control group. There was a statistically significant decrease in TAS levels in the DOX group compared to the control group. A statistically significant decrease in ALT and TOS levels was found in the group given DOX+apelin-13 compared to the DOX group. There was no statistically significant

difference between DOX and DOX + apelin-13 groups in AST, TAS and hydroxyproline levels. There was a statistically significant increase in hydroxyproline levels in the DOX+apelin-13 group compared to the control group. There was no statistically significant difference in ALT, AST, TAS and TOS levels in the DOX+apelin-13 group compared to the control group.

Results of the current study indicates that MSC administration may alleviate DXB-induced liver damage via reducing oxidative stress.

Keywords: Liver, doxorubicin, apelin-13



KAYNAKLAR

- Abdel-Misih SR, Bloomston M.** Liver anatomy. *Surg Clin North Am.* 2010;90(4):643–653. doi:10.1016/j.suc.2010.04.017
- Adewusi EA, Afolayan AJ.** A review of natural products with hepatoprotective activity. *J Med Plants Res.* 2010;4:1318–1334.
- Afsar T, Razak S, Almajwal A.** Effect of *Acacia hydaspica* R. Parker extract on lipid peroxidation, antioxidant status, liver function test and histopathology in doxorubicin treated rats. *Lipids Health Dis.* 2019 May 29;18(1):126. doi: 10.1186/s12944-019-1051-2.
- Agur AMR, Dalley AF.** *Grant's Atlas of Anatomy.* 13th Ed. London, UK: Lippincott Williams and Wilkins; 2013.
- Ahsan MR, Islam KM, Bulbul IJ.** Hepatoprotective activity of Methanol Extract of some medicinal plants against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Global J Pharmacol.* 2009;3:116–122.
- Akindele AJ, Oludadebo GO, Amagon KI, Singh D, Osiagwu DD.** (2018). Protective effect of carvedilol alone and coadministered with diltiazem and prednisolone on doxorubicin and 5-fluorouracil-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Pharmacology research & perspectives*, 6(1), e00381.
- Aktas B, Yilmaz Y, Eren F, Yonal O, Kurt R, Alahdab YO, Celikel CA, Ozdogan O, Imeryuz N, Kalayci C, Avsar E.** Serum levels of vaspin, obestatin, and apelin-36 in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism.* 2011; 60:544–49.
- Al-Zubaidy AA, Khattab YI.** The possible protective effect of pentoxifylline against doxorubicin-induced hepatotoxicity in rabbits. *Int J Adv Res* (2014); 2 (9): 95–101.
- Alderton PM, Gross J, Green MD.** Comparative Study of Doxorubicin, Mitoxantrone, and Epirubicin in Combination with ICRF-187 (ADR-529) in Chronic Cardiotoxicity Animal Model. *Cancer Res.* 1992;52:194–201.
- Allen SE.** *The liver: Anatomy, Physiology, Disease and Treatment.* 2002 North Eastern University Press, USA.
- Antushevich H, Kapica HM, Krawczynska A.** The role of apelin - 13 in gastrointestinal enzymes activity in young rats, *J. Anim. Feed Sci.* 25 (2016) 160–166.

- Arıncı K, Elhan A.** Kemikler, Eklemler, Kaslar, İç Organlar. 5. Baskı Ankara: Güneş Kitabevi, 2014: 265-73
- Asha VV, Pushpangadan P.** Preliminary evaluation of the anti-hepatotoxic activity of *Phyllanthus kozhikodanus*, *Phyllanthus maderaspatensis* and *Solanum indicum*. *Fitoterapia*. 1998;59:255–259.
- Ashikawa K., Shishodia S., Fokt I., Priebe W., Aggarwal B. B.** (2004). Evidence that activation of nuclear factor- κ b is essential for the cytotoxic effects of DOX and its analogues. *Biochem. Pharmacol.* 67, 353–364. 10.1016/j.bcp.2003.08.039
- Austin R., Lee S., Park S.** (2016). Rapid emergence and mechanisms of resistance by U87 glioblastoma cells to doxorubicin in an in vitro tumor microfluidic ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 14283–14288. 10.1073/pnas.1614898113
- Bagchi D, Bagchi M, Hassoun EA, Kelly J, Stohs SJ.** 1995. Adriamycin-induced hepatic and myocardial lipid-peroxidation and DNA-damage, and enhanced excretion of urinary lipid metabolites in rats. *Toxicology*. 95:1–9. doi:10.1016/0300-483X(94)02867-T.
- Ballet F., Vrignaud P., Robert J., Rey C., Poupon R.** Hepatic Extraction, Metabolism and Biliary Excretion of Doxorubicin in the Isolated Perfused Rat Liver. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1987;19:240–245. doi: 10.1007/BF00252979.
- Barret KE, Barman SE, Boitano S, Brooks HL.** Ganong'un Tıbbi Fizyolojisi, Nobel Tıp Kitabevleri. İstanbul, 2015.
- Bilgiç S ve Özgöçmen M.** The protective effect of misoprostol against doxorubicin induced liver injury. *Biotech Histochem.* 2019 Nov;94(8):583-591. doi: 10.1080/10520295.2019.1605457. Epub 2019 Sep 3.
- Blumgart LH, Belghiti J.** Surgery of the liver, biliary tract, and pancreas. 3rd edition. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007. p. 3-30
- Busti AJ.** Evidence-Based Medicine Consult . [Online] July 2015. [Cited: 04,04, 2019.] Available from: URL: <https://www.ebmconsult.com/articles/anatomyliver-gallbladder>.
- Camaggi C.M., Comparsi R., Srtocchi E., Testoni F., Angelelli B., Pannuti F.** Epirubicin and Doxorubicin Comparative Metabolism and Pharmacokinetics. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1988;21:221–228. doi: 10.1007/BF00262774.
- Carvalho C, Santos RX, Cardoso S, Correia S, Oliveira PJ, Santos MS, Moreira PI.** Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Curr Med Chem.* 2009;16(25):3267-85. Epub 2009 Sep 1.

- Casafont-Morencos F, Puente A, Pons-Romero F.** Infecciones bacterianas y parasitarias del hígado. *Medicine*. 2008;10:563–569.
- Crawford JM.** The Liver and the Biliary Tract, In —Robbins Basic Pathology. Ed. V. Kumar, R.S. Cotran and S.L. Robbins, 9th Ed., 821-873, Elsevier Saunders, Philadelphia, 2015.
- Cumhur M.** Temel Anatomi. ODTÜ Yayıncılık-METU basım, Ankara 2001.
- Çay M.** Ratlarda subkronik formaldehit zehirlenmelerinin karaciğerde neden olduğu hasara karşı chrysinin etkileri. İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi. Malatya. 2012.
- Çeçen E, Dost T, Culhaci N, Karul A, Ergur B, Birincioglu M.** Protective effects of silymarin against doxorubicin-induced toxicity. *Asian Pac J Cancer Prev.*, 2011: 12(10):2697-704.
- Damodar G , Smitha T , Gopinath S , Vijayakumar S , Rao Y .** An evaluation of hepatotoxicity in breast cancer patients receiving injection Doxorubicin. *Ann Med Health Sci Res* 2014; 4: 74–79.
- Deshwal N, Sharma AK, Sharma P.** Review on hepatoprotective plants. *Int J Pharm Sci Rev Res*. 2011;7:15–26.
- Djabir YY, Arsyad MA., Sartini S, Lallo S.** (2017). Potential roles of *Kleinhovia hospita* L. leaf extract in reducing doxorubicin acute hepatic, cardiac and renal toxicities in rats. *Pharmacognosy research*, 9(2), 168.
- Dodion P., Bernstein A.L., Fox B.M., Bachur N.R.** Loss of Fluorescence by Anthracycline Antibiotics: Effects of Xanthine Oxidase and Identification of the Nonfluorescent Metabolites. *Cancer Res*. 1987;47:1036–1039.
- Dragojević-Simić V., Dobrić S., Jaćević V., Bokonjić D., Milosavljević I., Kovačević A., Mikić D.** Efficacy of amifostine in protection against doxorubicin-induced acute cardiotoxic effects in rats. *Vojnosanit. Pregl*. 2013;70:38–45. doi: 10.2298/VSP110905041D.
- Duan XY, Pan Q, Yan SY, Ding WJ, Fan JG.** Qiao L. High-saturate-fat diet delays initiation of diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma. *BMC Gastroenterol*. 2014 Nov 20;14:195. doi: 10.1186/s12876-014-0195-9.
- El-Agamy DS, El-Harbi KM, Khoshhal S, Ahmed N, Elkablawy MA, Shaaban AA, Abo-Haded HM.** (2019). Pristimerin protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity and

fibrosis through modulation of Nrf2 and MAPK/NF- κ B signaling pathways. *Cancer management and research*, 11, 47.

Emam MN, Rehab E, El gheit Abo E. Promoting effect of adipocytokine, apelin, on hepatic injury in caerulein-induced acute pancreatitis in rats: Apelin on AP-induced hepatic injury, *AJM* 52 (2016) 309–315.

Ercin CN, Dogru T, Tapan S, Kara M, Haymana C, Karadurmus N, Karslioglu Y, Acikel C. Plasma apelin levels in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism*. 2010; 59:977–81.

Erhardt A, Biburger M, Papadopoulos T, Tiegs G. IL-10, regulatory T cells, and kupffer cells mediate tolerance in concanavalin A- induced liver injury in mice. *Hepatology* 2007, 45(2): 475 - 485.

Fogli S, Nieri P, Breschi MC. The role of nitric oxide in anthracycline toxicity and prospects for pharmacologic prevention of cardiac damage. *FASEB J*. 2004 Apr;18(6):664-75.

Ganey P.E., Kauffman F.C., Thurman R.G. Oxygen Dependent Hepatotoxicity Due to Doxorubicin: Role of Reducing Equivalent Supply in Perfused Rat Liver. *Mol. Pharmacol*. 1988;34:695–701.

Ger R. Surgical anatomy of the liver. *Surg Clin North Am*. 1989; 69(2):179–192

Gewitz D.A. A Critical Evaluation of the Mechanisms of Action Proposed for the Antitumor Effects of the Anthracycline Antibiotics Adriamycin and Daunorubicin. *Biochem. Pharmacol*. 1999;57:727–741. doi: 10.1016/S0006-2952(98)00307-4.

Gokcimen A, Cim A, Tola HT, Bayram D, Kocak A, Ozgüner F, Ayata A. Protective effect of N-acetylcysteine, caffeic acid and vitamin E on doxorubicin hepatotoxicity. *Hum Exp Toxicol.*, 2007; 26(6):519-25.

Gorini S, De Angelis A, Berrino L, Malara N, Rosano G, Ferraro E. Chemotherapeutic Drugs and Mitochondrial Dysfunction: Focus on Doxorubicin, Trastuzumab, and Sunitinib. *Oxid Med Cell Longev*. 2018 Mar 18;2018:7582730. doi: 10.1155/2018/7582730. eCollection 2018.

Granados-Principal, S., J. L. Quiles, C. L. Ramirez-Tortosa, P. Sanchez-Rovira, ve M. C. Ramirez-Tortosa. New advances in molecular mechanisms and the prevention of adriamycin toxicity by antioxidant nutrients. *Food Chem. Toxicol*, 2010; 48, 1425–1438.

Gray H, Lewis WH. Gray's Anatomy of the Human Body. 20th Ed. New York, NY: Bartleby; 2000.

- Gustafson DL, Swanson JD, Pritsos CA.** Role of xanthine oxidase in the potentiation of doxorubicin-induced cardiotoxicity by mitomycin C. *Cancer Commun.* 1991 Sep;3(9):299-304.
- Habata Y, Fujii R, Hosoya M, Fukusumi S, Kawamata Y, Hinuma S, Kitada C, Nishizawa N, Murosaki S, Kurokawa T, Onda H, Tatemoto K, Fujino M.** Apelin, the natural ligand of the orphan receptor APJ, is abundantly secreted in the colostrum. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1452:25–35.
- Hall JE.** Bir organ olarak karaciğer, In: Denli O. (ed) *Guyton ve Hall Tıbbi Fizyoloji*, Güneş Tıp Kitabevleri. İstanbul. 2017.
- Herman EH, Zhang J, Chadwick DP, Ferrans VJ.** Comparison of the Protective Effects of Amifostine and Dexrazoxane against the Toxicity of Doxorubicin in Spontaneously Hypertensive Rats. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2000;45:329–334. doi: 10.1007/s002800050048.
- Herman EH, Zhang J, Ferrans V.** Comparison of the Protective Effects of Desferrioxamine and ICRF-187 against Doxorubicin-Induced Toxicity in Spontaneously Hypertensive Rats. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1994;35:93–100. doi: 10.1007/BF00686629.
- Heymann F, Tacke F.** Immunology in the liver — from homeostasis to disease, 2016 *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 13:88–110
- Hiatt JL, Gartner LP.** *Color Atlas and Text of Histology.* Lippincott Williams & Wilkin. Philadelphia. USA. 2013.
- Hosoya M, Kawamata Y, Fukusumi S, Fujii R, Habata Y, Hinuma S, Kitada C, Honda S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M.** Molecular and functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin. *J Biol Chem.* 2000; 275:21061–67.
- Huang Q, Liu X, Cao C, Lei J, Han D, Chen G, Yu J, Chen L, Lv D, Li Z.** Apelin-13 induces autophagy in hepatoma HepG2 cells through ERK1/2 signaling pathway dependent upregulation of Beclin1. *Oncol Lett.* 2016; 11:1051–56.
- Huang J, Kang S, Park SJ.** Apelin protects against liver X receptor-mediated steatosis through AMPK and PPAR α in human and mouse hepatocytes, *Cell. Signal.* 39 (2017) 84–94.
- Ibrahim SZ, Barakat MA, Helmy HM.** Role of selenium in attenuating cardiac and hepatic damages induced by the antitumor agent, doxorubicin. *Life Sci J* 2010; 7 (4): 162–172.

- Itoh T, Okanou M, Morimoto Y, Nagao T, Mori N, Hori K, Kashima K.** Functional heterogeneity of rat liver macrophages: interleukin-1 secretion and 1A antigen expression in contrast with phagocytic activity. *Liver* 1992, 12 (1): 26 -33
- Iwata K, Matsuno K, Murata A, Zhu K, Fukui H, Ikuta K, Wen X.** (2018). Up-regulation of NOX1/NADPH oxidase following drug-induced myocardial injury promotes cardiac dysfunction and fibrosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 120, 277-288.
- Jačević V, Dragojević-Simić V, Tatomirović Ž, Dobrić S, Bokonjić D, Kovačević A, Kuča K.** (2018). The efficacy of amifostine against multiple-dose doxorubicin-induced toxicity in rats. *International journal of molecular sciences*, 19(8), 2370.
- Jung HA, Kim JI, Chung SY, Choi JS.** 2014. Protective effect of the edible brown alga *Ecklonia stolonifera* on doxorubicin-induced hepatotoxicity in primary rat hepatocytes. *J Pharm Pharmacol*. 66:1180–1188.
- Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO.** Basic histology: text & atlas: McGraw-Hill. New York. 2003.
- Juza RM, Pauli EM.** (2014). Clinical and surgical anatomy of the liver: a review for clinicians. *Clinical Anatomy*, 27(5), 764-769.
- Kabel AM, Alzahrani AA, Bawazir NM, Khawtani RO, Arab HH.** (2018). Targeting the proinflammatory cytokines, oxidative stress, apoptosis and TGF- β 1/STAT-3 signaling by irbesartan to ameliorate doxorubicin-induced hepatotoxicity. *Journal of infection and chemotherapy*, 24(8), 623-631.
- Kälin RE, Kretz MP, Meyer AM, Kispert A, Heppner FL, Brändli AW.** Paracrine and autocrine mechanisms of apelin signaling govern embryonic and tumor angiogenesis. *Dev Biol*. 2007; 305:599–614.
- Karanovic D, Grujic-Milanovic J, Miloradovic Z, Ivanov M, Jovovic DJ, Vajic UJ, Zivotic M, Markovic-Lipkovski J, Mihailovic-Stanojevic N.** Effects of Single and Combined Losartan and Tempol Treatments on Oxidative Stress, Kidney Structure and Function in Spontaneously Hypertensive Rats with Early Course of Proteinuric Nephropathy. *PLoS ONE*. 2016;11:e0161706. doi: 10.1371/journal.pone.0161706.
- Karin M, Yamamoto Y, Wang QM** 2004. The IKK NF- κ B system: A treasure trove for drug development. *Nature Reviews Drug Discovery* 3:17–26
- Kassner N, Huse K, Martin HJ, Gödtel-Armbrust U, Metzger A, Meineke I, Brockmüller J, Klein K, Zanger UM, Maser E, Wojnowski L.** Carbonyl reductase 1 is a

predominant doxorubicin reductase in the human liver. *Drug Metab Dispos.* 2008 Oct;36(10):2113-20. doi: 10.1124/dmd.108.022251. Epub 2008 Jul 17.

Kawamata Y, Habata Y, Fukusumi S, Hosoya M, Fujii R, Hinuma S, Nishizawa N, Kitada C, Onda H, Nishimura O, Fujino M. Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding. *Biochim Biophys Acta.* 2001; 1538:162–71.

Keplinger KM, Bloomston M. Anatomy and embryology of the biliary tract. *Surg Clin North Am.* 2014 Apr;94(2):203-17. doi: 10.1016/j.suc.2014.01.001. Epub 2014 Feb 20.

Kim JS, Yang JW, Han BG, Kwon HJ, Kim JH ve Choi SO. Protective Role of Apelin Against Cyclosporine-Induced Renal Tubular Injury in Rats. *Transplant Proc.* 2017 Jul - Aug;49(6):1499-1509. doi: 10.1016/j.transproceed.2017.03.080.

Kierszenbaum AL. Karaciğer, In: Demir R. (ed) *Histoloji ve Hücre Biyolojisi: Patolojiye Giriş*, Palme Yayıncılık, Ankara. 2006

Kleinz MJ, Davenport AP. Emerging roles of apelin in biology and medicine. *Pharmacol Ther.* 2005; 107:198–211.

Kockar MC, Nazıroglu M, Celik O , Tola HT, Bayram D, Koyu A. N-acetylcysteine modulates doxorubicin-induced oxidative stress and antioxidant vitamin concentrations in liver of rats. *Cell Biochem Funct.*2010; 28: 673–677.

Ky B, Putt M, Sawaya H, French B, Januzzi JL Jr, Sebag IA, Plana JC, Cohen V, Banchs J, Carver JR, Wiegers SE, Martin RP, Picard MH, Gerszten RE, Halpern EF, Passeri J, Kuter I, Scherrer-Crosbie M. Early increases in multiple biomarkers predict subsequent cardiotoxicity in patients with breast cancer treated with doxorubicin, taxanes, and trastuzumab. *J Am Coll Cardiol.* 2014 Mar 4;63(8):809-16. doi: 10.1016/j.jacc.2013.10.061. Epub 2013 Nov 27.

Lade AG, Monga SP. Beta-catenin signaling in hepatic development and progenitors: which way does the WNT blow? *Dev Dyn.* 2011 Mar;240(3):486-500. doi: 10.1002/dvdy.22522. Epub 2010 Dec 23.

Lawrence T. (2009). The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(6), a001651.

Li S, Tan HY, Wang N, Zhang ZJ, Lao L, Wong CW, Feng Y. 2015. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *Int J Mol Sci.* 16:26087–26124. doi:10.3390/ijms161125942.

Licata S, Saponiero A, Mordente A, Minotti G. Doxorubicin metabolism and toxicity in human myocardium: role of cytoplasmic deglycosidation and carbonyl reduction. *Chem Res Toxicol.* 2000 May;13(5):414-20.

Lim YL, Choi E, Jang YO, Cho YZ, Kang YS, Baik SK, Kwon SO, Kim MY. Clinical implications of the serum apelin level on portal hypertension and prognosis of liver cirrhosis. *Gut Liver.* 2016; 10:109–16.

LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012-. Doxorubicin.

Lopes JD, Gomes RA, Hial V, Lopes IC, Reis MA, Teixeira Vde P. Correlations between the collagen content of the human left ventricular myocardium, measured by biochemical and morphometric methods. *Arq Bras Cardiol.* 2002 Jul;79(1):10-9.

Lv SY, Cui B, Chen WD, Wang YD. (2017). Apelin/APJ system: a key therapeutic target for liver disease. *Oncotarget*, 8(67), 112145.

Lv SY, Yang YJ, Chen Q. Regulation of feeding behavior, gastrointestinal function and fluid homeostasis by apelin, *Peptides* 44 (2013) 87–92

Lv XR, Zheng B, Li SY, Han AL, Wang C, Shi JH, Zhang XH, Liu Y, Li YH, Wen JK. Synthetic retinoid Am80 up-regulates apelin expression by promoting interaction of RAR α with KLF5 and Sp1 in vascular smooth muscle cells. *Biochem J.* 2013; 456:35–46.

Mansouri E, Jangaran A, Ashtari A. Protective effect of pravastatin on doxorubicin-induced hepatotoxicity. *Bratisl Lek Listy.* 2017;118(5):273-277. doi: 10.4149/BLL_2017_054.

Martinel Lamas DJ, Nicoud MB, Sterle HA, Carabajal E, Tesan F, Perazzo JC, Cremaschi GA, Rivera ES, Medina VA. Selective cytoprotective effect of histamine on doxorubicin-induced hepatic and cardiac toxicity in animal models. *Cell Death Discov.* 2015 Dec 21;1:15059. doi: 10.1038/cddiscovery.2015.59. eCollection 2015.

Mechal WZ, Azzaroli F, Crispe IN. Immunology of the healthy liver. *Gastroenterology* 2001, 120: 250 – 260

Medhurst AD, Jennings CA, Robbins MJ, Davis RP, Ellis C, Winborn KY, Lawrie KW, Hervieu G, Riley G, Bolaky JE, Herrity NC, Murdock P, Darker JG. Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin. *J Neurochem.* 2003; 84:1162–72.

- Melgar-Lesmes P, Pauta M, Reichenbach V, Casals G, Ros J, Bataller R, Morales-Ruiz M, Jiménez W.** Hypoxia and proinflammatory factors upregulate apelin receptor expression in human stellate cells and hepatocytes. *Gut*. 2011; 60:1404–11.
- Menna P, Salvatorelli E, Minotti G.** Anthracycline degradation in cardiomyocytes: a journey to oxidative survival. *Chem Res Toxicol*, 2010; 23: 6–10.
- Mihailović-Stanojević N., Jovović D., Miloradović Z., Grujić-Milovanović J., Marković-Lipovski J.** Reduced Progression of Adriamycin Nephropathy in Spontaneously Hypertensive Rats Treated by Losartan. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2009;24:1142–1150. doi: 10.1093/ndt/gfn596.
- Liu ZX, Govindarajan S, Kaplowitz N.** Innate immune system plays a critical role in determining the progression and severity of acetaminophen hepatotoxicity. *Gastroenterology* 2004, 127: 1760 – 1774
- Minotti G.** Reactions of adriamycin with microsomal iron and lipids. *Free Radic Res Commun.* 1989;7(3-6):143-8.
- Minoti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., Gianni L.** Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Development in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.* 2004;56:185–229. doi: 10.1124/pr.56.2.6.
- Minotti, G., Recalcati, S., Mordente, A., Liberi, G., Calafiore, A. M., Mancuso C, Preziosi P, Cairo G.** (1998). The secondary alcohol metabolite of doxorubicin irreversibly inactivates aconitase/iron regulatory protein-1 in cytosolic fractions from human myocardium. *The FASEB Journal*, 12(7), 541-552.
- Miyamoto Y, Koh YH, Park YS, Fujiwara N, Sakiyama H, Misonou Y, Ookawara T, Suzuki K, Honke K, Taniguchi N.** Oxidative stress caused by inactivation of glutathione peroxidase and adaptive responses. *Biol Chem.* 2003 Apr;384(4):567-74.
- Monga, SPS.** (2014). Role and regulation of β -catenin signaling during physiological liver growth. *Gene Expression The Journal of Liver Research*, 16(2), 51-62.
- Moore KL, Persaud TVN.** *The Developing Human; Clinically Oriented Embryology.* 10th Ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2016. 201-205, 217-219, 243-249, 289-295
- Mordente A, Meucci E, Silvestrini A, Martorana GE, Giardina B.** New developments in anthracycline-induced cardiotoxicity. *Curr Med Chem.* 2009;16(13):1656-72.

- Mordente A, Minotti G, Martorana GE, Silvestrini A, Giardina B, Meucci E.** Anthracycline secondary alcohol metabolite formation in human or rabbit heart: biochemical aspects and pharmacologic implications. *Biochem Pharmacol.* 2003 Sep 15;66(6):989-98.
- Morsi M. I., Hussein A. E., Mostafa M., El-Abd E., Abd El-Moneim N. A.** (2006). Evaluation of tumour necrosis factor- α , soluble p-selectin, γ -glutamyl transferase, glutathione s-transferase- π and α -fetoprotein in patients with hepatocellular carcinoma before and during chemotherapy. *Br. J. Biomed. Sci.* 63, 74–78. 10.1080/09674845.2006.11732724
- Mross K.** New Anthracycline Derivates: What for? *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 1991;27:1542–1544. doi: 10.1016/0277-5379(91)90409-7.
- Mukherjee S., Banerjee S. K., Maulik M., Dinda A. K., Talwar K. K.** (2004). Protection against acute adriamycin-induced cardiotoxicity by garlic: role of endogenous antioxidants and inhibition of TNF- α expression. *BMC Pharmacol.* 3, 16–16. 10.1186/1471-2210-3-16
- Muto J, Shirabe K, Yoshizumi T, Ikegami T, Aishima S, Ishigami K, Yonemitsu Y, Ikeda T, Soejima Y, Maehara Y.** The apelin-APJ system induces tumor arteriogenesis www.impactjournals.com/oncotarget 112151 *Oncotarget* in hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res.* 2014; 34:5313–20.
- Netter FH.** (2006). *Atlas of human anatomy.* Philadelphia, PA, Saunders/Elsevier.
- Nohl H, Gille L, Staniek K.** The exogenous NADH dehydrogenase of heart mitochondria is the key enzyme responsible for selective cardiotoxicity of anthracyclines. *Z Naturforsch C J Biosci.* 1998 Mar-Apr;53(3-4):279-85.
- Northover JM., Terblanche J.** A new look at the arterial supply of the bile duct in man and its surgical implications. *The British journal of surgery,* 1979; 66 Suppl 6: 379- 84.
- O’Carroll AM, Selby TL, Palkovits M, Lolait SJ.** Distribution of mRNA encoding B78/apj, the rat homologue of the human APJ receptor, and its endogenous ligand apelin in brain and peripheral tissues. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1492:72–80.
- O’Carroll AM, Lolait SJ, Harris LE, Pope GR.** The apelin receptor APJ: journey from an orphan to a multifaceted regulator of homeostasis. *J Endocrinol.* 2013; 219:R13–35.
- O’Dowd BF, Heiber M, Chan A, Heng HH, Tsui LC, Kennedy JL, Shi X, Petronis A, George SR, Nguyen T.** A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene.* 1993; 136:355–60.
- Ortuğ G.** İnsan Anatomisi. Osmangazi Üniversitesi Basımevi Eskişehir2002.p. 77-99.

- Othman AI, El-Missiry MA, Amer MA.** Melatonin controls oxidative stress and modulates iron, ferritin, and transferrin levels in adriamycin treated rats. *Life Sci*, 2008; 83: 563–568.
- Ovalle WK, Nahirney PC.** Netter Temel Histoloji. İstanbul: Güneş Tıp Kitabevleri. İzmir. 2009.
- Ozan H.** Ozan Anatomi, Birinci Baskı. Ankara, Nobel Tıp Kitabevleri. 2004:249-314.
- Ozougwu JC.** Physiology of the liver, *International Journal of Research in Pharmacy and Biosciences* Volume 4, Issue 8, 2017, PP 13-24
- Ozougwu JC, Eyo JE.** Hepatoprotective effects of *Allium cepa* extracts on paracetamol-induced liver damage in rat. *African Journal of Biotechnology* 2014, 13(26): 2679 -2688.
- Park BK, Pirmohamed M, Kitteringham NR.** The role of cytochrome P450 enzymes in hepatic and extrahepatic human drug toxicity. *Pharmacology and Therapeutics* 1995, 68(3): 385 – 424.
- Paker Ş.** Karaciğer, In: Paker Ş. (ed) *Histoloji*, Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı Yayınları. Bursa. 1993.
- Paweorn A., Sudjit L., Surapol I.** (2015). Chemotherapy-induced cardiotoxicity: overview of the roles of oxidative stress. *Oxid. Med. Cell Longev.* 11, 1–13. 10.1155/2015/795602
- Pawłowska J, Tarasiuk J, Wolf CR, Paine MJ, Borowski E.** Differential ability of cytostatics from anthraquinone group to generate free radicals in three enzymatic systems: NADH dehydrogenase, NADPH cytochrome P450 reductase, and xanthine oxidase. *Oncol Res.* 2003;13(5):245-52.
- Pisarenko O, Shulzhenko V, Studneva I, Pelogeykina Y, Timoshin A, Anesia R, Kunduzova O.** (2015). Structural apelin analogues: mitochondrial ROS inhibition and cardiometabolic protection in myocardial ischaemia reperfusion injury. *British journal of pharmacology*, 172(12), 2933-2945.
- Pouresmaeili-Babaki E, Esmaeili-Mahani S, Abbasnejad M, Ravan H.** (2018). Protective effect of neuropeptide apelin-13 on 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y dopaminergic cells: involvement of its antioxidant and antiapoptotic properties. *Rejuvenation research*, 21(2), 162-167.
- Principe A, Melgar-Lesmes P, Fernández-Varo G, del Arbol LR, Ros J, Morales-Ruiz M, Bernardi M, Arroyo V ve Jiménez W.** The hepatic apelin system: a new therapeutic target for liver disease. *Hepatology.* 2008 Oct;48(4):1193-201. doi: 10.1002/hep.22467.

- Pugazhendhi A., Jebakumar T.N., Edison I., Velmurugan B.K., Jacob J.A., Karuppusamy I.** Toxicity of Doxorubicin (Dox) to Different Experimental Organ Systems. *Life Sci.* 2018;200:26–30. doi: 10.1016/j.lfs.2018.03.023.
- Rašković A, Stilinović N, Kolarović J, Vasović V, Vukmirović S, Mikov M.** (2011). The protective effects of silymarin against doxorubicin-induced cardiotoxicity and hepatotoxicity in rats. *Molecules*, 16(10), 8601-8613.
- Reichenbach V, Ros J, Fernández-Varo G, Casals G, Melgar-Lesmes P, Campos T, Makriyannis A, Morales-Ruiz M, Jiménez W.** Prevention of fibrosis progression in CCl4-treated rats: role of the hepatic endocannabinoid and apelin systems. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012; 340:629–37.
- Reis-Mendes A, Carvalho F, Remião F, Sousa E, Bastos ML, Costa VM.** The Main Metabolites of Fluorouracil + Adriamycin + Cyclophosphamide (FAC) Are Not Major Contributors to FAC Toxicity in H9c2 Cardiac Differentiated Cells. *Biomolecules.* 2019 Mar 11;9(3). pii: E98. doi: 10.3390/biom9030098.
- Roncati L., Manenti A., Simonini E.** Image-Guided Proper Liver Segmentectomy. *World journal of surgery*, 2017;42 Suppl 6: 1857–1859.
- Roomi M.W., Kalinovsky T., Roomi N.W., Rath M., Niedzwiecki A.** Prevention of Adriamycin-Induced Hepatic and Renal Toxicity in Male BALB/c Mice by a Nutrient Mixture. *Exp. Ther. Med.* 2014;7:1040–1044. doi: 10.3892/etm.2014.1535.
- Ross MH, Pawlina W.** *Histoloji / Konu Anlatımı ve Atlas, İlişkili Hücre Biyolojisi ve Moleküler Biyoloji ile.* 6 ed. Palme Yayıncılık. Ankara. 2014.
- Saad Y.S., Najjar A.T., Al-Rikabi A.C.** The Preventive Role of Deferoxamine against Acute Doxorubicin Induced Cardiac, Renal and Hepatic Toxicity in Rats. *Pharmacol. Res.* 2000;43:211–218. doi: 10.1006/phrs.2000.0769.
- Said M. Al-Dalaen, Aiman I. Al-Qtaitat.** Review Article: Oxidative stress versus antioxidants. *Am J Biosci Bioeng* 2014; 2 (5): 60–71.
- Sabry MM, Ramadan NM, Al Dreny BA, Rashed LA, Abo El Enein A.** Protective effect of apelin preconditioning in a rat model of hepatic ischemia reperfusion injury; possible interaction between the apelin/APJ system, Ang II/AT1R system and eNOS. *United European Gastroenterol J.* 2019 Jun;7(5):689-698. doi: 10.1177/2050640619826847. Epub 2019 Jan 23.
- Sadler TW.** *Langman's Medical Embryology.* 12th Edition. USA: Lippincott Williams & Wilkins,; 2012. 164-184, 203-206, 217-219, 231-236.

- Safa M, Kazemi A, Zand H, Azarkeivan A, Zaker F, Hayat P.** Inhibitory role of cAMP on doxorubicin-induced apoptosis in pre-B ALL cells through dephosphorylation of p53 serine residues. *Apoptosis*. 2010 Feb;15(2):196-203. doi: 10.1007/s10495-009-0417-8.
- Sagiroglu T, Aksoy MB, Sagiroglu G, Tozki H, Oguz S, Yalta T, Yagci MA, Sezer A.** Effect of leptin and apelin preconditioning on hepatic ischemia reperfusion injury in rats. *Indian J Surg*. 2014; 76:111–16. <https://doi.org/10.1007/s12262-012-0676-4>.
- Saleem MT, Chetty MC, Kavimani S.** Antioxidants and tumor necrosis factor alpha-inhibiting activity of sesame oil against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Ther Adv Cardiovasc Dis.*, 2014; 8(1):4-11
- Sayed-Ahmed M.M., Al-Shabanah O.A., Hafez M.M., Aleisa A.M., Al-Rejaie S.S.** Inhibition of Gene Expression of Heart Fatty Acid Binding Protein and Organic Cation/Carnitine Transporter in Doxorubicin Cardiomyopathic Rat Model. *Eur. J. Pharmacol.* 2010;640:143–149. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.05.002.
- Schmidt R, Lang F, Heckmann M.** *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie.* Heidelberg: Springer; 2011
- Schulick RD.** 2006. Hepatobiliary and portal venous system. In: Mulholland MW, Lillemo KD, editors. *Greenfield's Surgery: Scientific Principles and Practice.* 4th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 893–909.
- Shabalala S, Muller CJF, Louw J, Johnson R.** Polyphenols, autophagy and doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Life Sci.* 2017 Jul 1;180:160-170. doi: 10.1016/j.lfs.2017.05.003. Epub 2017 May 3.
- Schünke M, Schulte E, Schumacher U.** *Prometheus LernAtlas - Innere Organe.* 2., überarbeitete und erweiterte Auflage. 2009.
- Singla S, Kumar NR, Kaur J.** 2014. In vivo studies on the protective effect of propolis on doxorubicin-induced toxicity in liver of male rats. *Toxicol Int.* 21:191–195. doi:10.4103/0971-6580.139808.
- Skandalakis JE, Skandalakis LJ, Skandalakis PN.** Hepatic surgical anatomy. *Surg Clin North Am.* 2004; 84(2):413–435
- Song S, Chu L, Liang H, Chen J, Liang J, Huang Z, Zhang B, Chen X.** Protective Effects of Dioscin Against Doxorubicin-Induced Hepatotoxicity Via Regulation of Sirt1/FOXO1/NF- κ b Signal. *Front Pharmacol.* 2019 Sep 13;10:1030. doi: 10.3389/fphar.2019.01030. eCollection 2019.

- Taheri S, Murphy K, Cohen M, Sujkovic E, Kennedy A, Dhillon W, Dakin C, Sajedi A, Ghatei M, Bloom S.** The effects of centrally administered apelin-13 on food intake, water intake and pituitary hormone release in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Mar 15;291(5):1208-12.
- Tan C, Etcubanas E, Wollner N, Rosen G, Gilladoga A, Showel J, Murphy ML, Krakoff IH.** Adriamycin - an antitumor antibiotic in the treatment of neoplastic diseases. *Cancer* 1973; 32: 9-17.
- Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, Fujii R, Kakegawa T, Zou MX, Kawamata Y, Fukusumi S, Hinuma S, Kitada C, Kurokawa T, Onda H, Fujino M.** Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 251:471–76.
- Tatemoto K, Takayama K, Zou MX, Kumaki I, Zhang W, Kumano K, Fujimiya M.** The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism, *Regul. Pept.* 99 (2001) 87–92.
- Terblanche J, Allison HF, Northover JM.** An ischemic basis for biliary strictures. *Surgery,* 1983; 94 Suppl 1: 52-7.
- Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, Altman RB.** Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics.* 2011 Jul;21(7):440-6. doi: 10.1097/FPC.0b013e32833ffb56. PMID: 21048526; PMCID: PMC3116111.
- Thornalley PJ, Bannister WH, Bannister JV.** Reduction of oxygen by NADH/NADH dehydrogenase in the presence of adriamycin. *Free Radic Res Commun.* 1986;2(3):163-71.
- Vakili K, Pomfret EA.** Biliary anatomy and embryology. *Surg Clin North Am.* 2008 Dec;88(6):1159-74, vii. doi: 10.1016/j.suc.2008.07.001.
- Vásquez-Vivar J, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Pritchard KA Jr, Kalyanaraman B.** Endothelial nitric oxide synthase-dependent superoxide generation from adriamycin. *Biochemistry.* 1997 Sep 23;36(38):11293-7.
- Widmaier EP, Raff H, Strang KT.** *Vander's Human Physiology: The Mechanisms and Body Function*, 13. Baskı, PP 557-559
- William KO, Patrick CN.** Karaciğer, In: Müftüoğlu S., Kaymaz M., Atilla P. (eds) *Netter's Essential Histology.* Güneş Kitabevi. Ankara, 2009.

Yang Y, Lv SY, Lyu SK, Wu D, Chen Q. The protective effect of apelin on ischemia/reperfusion injury. *Peptides*. 2015; 63:43–46.

Yasuzaki H, Yoshida SI, Hashimoto T, Shibata W, Inamori M, Toya Y, Umemura S. (2013). Involvement of the apelin receptor APJ in Fas-induced liver injury. *Liver International*, 33(1), 118-126.

Yokomori H, Oda M, Yoshimura K, Machida S, Kaneko F, Hibi T. Overexpression of apelin receptor (APJ/AGTRL1) on hepatic stellate cells and sinusoidal angiogenesis in human cirrhotic liver. *J Gastroenterol*. 2011; 46:222–31.

Yoshiya S, Shirabe K, Imai D, Toshima T, Yamashita YI, Ikegami T, Okano S, Yoshizumi T, Kawanaka H, Maehara Y. Blockade of the apelin–APJ system promotes mouse liver regeneration by activating Kupffer cells after partial hepatectomy. *J Gastroenterol*. 2015; 50:573–82.

Zhang X., Xu Y., Qi Y., Yin L., Xu L., Han X., et al. (2015). Quantitative chemical proteomics for investigating the biomarkers of dioscin against liver fibrosis caused by CCl₄ in rats. *Chem. Commun.* 51, 11604–11607. 10.1039/C4CC09160D