

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**METOTREKSAT'IN KARACİĞERDEKİ HASARINA KARŞI
NAC'IN (N-ASETİLSİSTEİN) KORUYUCU ETKİSİNİN
IŞIK MİKROSKOPİK DÜZEYDE İNCELENMESİ**

Figen BALA

**HİSTOLOJİ – EMBRİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç.Dr. Murat YAĞMURCA**

Tez No : 2009-020

2009 - AFYONKARAHİSAR

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**METOTREKSAT'IN KARACİĞERDEKİ HASARINA KARŞI
NAC'IN (N-ASETİLSİSTEİN) KORUYUCU ETKİSİNİN
IŞIK MİKROSKOBİK DÜZEYDE İNCELENMESİ**

Figen BALA

**HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ (TIP) ANABİLİMDALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Murat YAĞMURCA

Tez No: 2009-020

2009-AFYONKARAHİSAR

T.C
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**METOTREKSAT'IN KARACİĞERDEKİ HASARINA KARŞI
NAC'IN (N-ASETİLSİSTEİN) KORUYUCU ETKİSİNİN
IŞIK MİKROSKOBİK DÜZEYDE İNCELENMESİ**

Figen BALA

**HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ (TIP) ANABİLİMDALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Murat YAĞMURCA**

**Bu tez Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 08.TIP.02
Proje numarası ile desteklenmiştir.**

**Tez No: 2009-020
2009-AFYONKARAHİSAR**

KABUL VE ONAY

Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Histoloji-Embriyoloji (Tıp) Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 24.06.09

Doç.Dr. Ahmet SONGUR
ÜYE

Doç.Dr. Hakan MOLLAOĞLU
ÜYE

Doç.Dr. Murat YAĞMURCA
ÜYE

Histoloji – Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Figen BALA'nın “Metotreksatın Karaciğer Hasarına Karşı NAC'ın (N-Asetisistein) Koruyucu etkisinin Işık Mikroskopik Düzeyde İncelenmesi ” başlıklı tezi 24/06/2009 günü saat 10.00'da Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Doç.Dr. Zehra BOZKURT
Enstitü Müdür

III

ÖNSÖZ

Çalışmamın başlangıcından bugüne kadar bilgi, birikim ve yardımlarını esirgemeyen, çalışmama rehberlik eden sayın hocam, ve Anabilim dalı Başkanı Doç. Dr. Murat YAĞMURCA'ya , yüksek lisans eğitimine başlamamda ve özellikle laboratuvar çalışmalarında beceri kazanmamda bana yol gösteren Murat TOSUN'a, yüksek lisans eğitimimin her aşamasında yardım ve desteklerini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Ahmet SONGUR'a ve Doç. Dr. Hakan MOLAOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Afyon Kocatepe Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Kardiyoloji Servisi'nde çalışan, bana bilgi ve deneyimleriyle destek olan Araş. Gör. Dr. Muhammet TAHTA ve Araş. Gör. Dr.Erdal BEYTER'e, eğitim dönemim boyunca bana vermiş olduğu her türlü destek ve yardımlarından dolayı Kardiyoloji Servisi sorumlu hemşiresi Ayşe IŞIK KILÇAR'a, özellikle laboratuvar çalışmaları sırasında benden yardımlarını esirgemeyen sevgili okul arkadaşım Meral YALÇIN'a bana verdiği destekten dolayı teşekkür ederim.

Bu günlere gelebilmemde çok büyük emek sahibi olan, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen anneme , babama ve kardeşime teşekkürlerimi sunarım.

Figen BALA

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
Önsöz	III
İçindekiler	IV
Simgeler ve Kısaltmalar	V
Şekiller	VI
Tablolar	VII
	Sayfa No

ÖZET**SUMMARY**

1.GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Karaciğer Anatomisi	3
2.1.2. Karaciğerin Yerleşimi	3
2.1.3. Karaciğerin Lobları	3
2.1.4. Karaciğerin Damarları ve Sinirleri	4
2.2. Karaciğer Embriyolojisi	5
2.3. Karaciğer Histolojisi	6
2.3.1. Stroma	7
2.3.1.2. Karaciğerin Kan Dolaşımı	9
2.3.2. Parankima	12
2.3.2.1. Klasik Karaciğer Lobülü	12
2.3.2.2. Portal Lobül	12

2.3.2.3. Portal Asinüs	13
2.3.3. Hepatositlerin Histolojik Özellikleri	15
2.3.3.1. Hepatositlerin Sitolojik Özellikleri	17
2.3.3.2 Sinüzoid	19
2.3.3.3 Karaciğerin Yenilenmesi (Rejenerasyon)	20
2.4. Karaciğerin Fizyolojisi	20
2.5. Metotreksat	26
2.6. N-Asetilsistein (NAC)	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1. Histolojik Yöntemler	30
3.2. Dokuları Histolojik İncelemeye Hazırlama	31
3.3. İstatistiksel Yöntemler	34
4. BULGULAR	35
5. TARTIŞMA	42
6. KAYNAKLAR	49

SİMGELER VE KISALTMALAR

MTX:	Metotreksat
NAC:	N-Asetilsistein
PAS:	Periodic Acid Shiff
H-E:	Hematoksilen Eozin
NADP:	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
FH ₂ :	Dihidrofolat
FH ₄ :	Tetrahidrofolat
dUMP:	Deoksiuridilik asit
dTMP:	Deoksitimidilik asit
LV:	Lökovorin (5-formly-tetrahydrofolic acid)
CCL ₄ :	Karbon Tetra Klorür

ŞEKİLLER VE RESİMLER

Şekil 1: Karaciğerin önden görünüşü.

Şekil 2: Karaciğerin inferiyor görünüşü ve anatomik yapıları.

Şekil 3: Karaciğer lobülünün yapılanması.

Şekil 4: Karaciğer lobülünün yapısı.

Şekil 5: Karaciğerdeki kan ve safra akış yönlerini göstermektedir.

Şekil 6: Karaciğerdeki kan ve safra akış yönlerini göstermektedir.

Şekil 7: Karaciğer lobünün histolojik sınıflandırılması.

Şekil 8: Karaciğer lobülünün fonksiyonel sınıflandırılması.

Resim 1: Kontrol grubuna ait rat karaciğerinden histolojik bir görünüm. Hepatositler, sinüzoidler ve santral ven (CV) normal olarak izlenmekte. H-E X 20.

Resim 2: Metotreksat grubuna ait rat karaciğerinden histolojik bir görünüm. Vasküler konjesyon (ok)-tromboz (T). H-E X 20.

Resim 3: Metotreksat grubuna ait rat karaciğerinden histolojik bir görünüm. Hepatosit dejenerasyonu (yıldız), vasküler tromboz (T), inflamatuvar infiltrasyon (ok) görülmekte. H-E X 40.

Resim 4: Metotreksat grubuna ait rat karaciğerinden histolojik bir görünüm. Sinüzoidal dilatasyon (ok), hepatosit dejenerasyonu (yıldız). H-E X 40.

Resim 5: MTX+NAC grubuna ait rat karaciğerinden histolojik bir görünüm. Sinüzoidal dilatasyon, hepatosit dejenerasyonu, vasküler konjesyon-trombozun kısmen azalmış olduğu izlenmektedir. H-E X 20.

Resim 6: NAC grubuna ait rat karaciğerinden alınmış histolojik bir görünüm. Kontrol grubundaki rat karaciğerleriyle benzer özellikler göstermektedir. H-E X 20.

Grafik 1: Kontrol, MTX (Grup 2) ve MTX+NAC (Grup 3) gruplarındaki doku hasarlarının karşılaştırılması.

TABLolar

Tablo 1: Deneysel Çalışma Grupları

Tablo 2: Doku Takip Metodu.

Tablo 3: Hematoksilen-Eozin Boya Prosedürü

Tablo 4: Gruplara ait histolojik değişikliklerin skorlarını gösteren tablo.

ÖZET

Metotreksat'ın Karaciğerdeki Hasarına Karşı NAC'ın (N-asetilsistein)Koruyucu Etkisinin Işık Mikroskopik Düzeyde İncelenmesi

Amaç: Metotreksat bir folik asit antagonistidir. Sitotoksik kemoterapik bir ilaç olan ve bazı kanser türlerinin ve çeşitli inflamatuvar hastalıkların tedavisinde kullanılan MTX'in karaciğer üzerinde hepatotoksik etkilerinin olduğu bilinmektedir. Asetilsistein antioksidan bir maddedir. Asetilsistein akciğer ve karaciğerde glutatyon sentezine katılır ve sistein vererek glutatyon sentezini artırır. Bu çalışmanın amacı; metoteksatın karaciğer üzerindeki hasarına karşı NAC'ın (N-Asetilsistein) etkilerinin ışık mikroskopik düzeyde incelenmesidir.

Gereç ve Yöntem: Bu amaçla erkek Wistar Albino ratlar: Kontrol, MTX, MTX+NAC, ve NAC gruplarına ayrıldı. Karaciğerler 10. günün sonunda alınarak % 10 'luk nötral tamponlu formalinle tespit edildi. Işık mikroskopunda incelendi.

Bulgular: Yapılan ışık mikroskopik incelemede MTX uygulanan ratların karaciğerlerinde sinüzoidal dilatasyon, hepatosit dejenerasyonu, vasküler konjesyon-tromboz, inflamatuvar infiltrasyon bulgularına rastlandı.

Sonuç: Bu çalışma ile Metotreksat ile meydana gelen karaciğer hasarında, N-Asetilsistein'in meydana gelen hasarı azaltabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Metotreksat, NAC, ışık mikroskop, karaciğer hasarı, rat.

SUMMARY

The Protective Effect of NAC on Methotrexate Induced Liver Damage In Rats: Light Microscopic Examination

Aim: Methotrexate (MTX), a folic acid antagonist. MTX, which is a cytotoxic chemotherapeutic agent and is used for in the threatment of several malignancies and various inflammatory diseases, is known that has hepatotoxic effects on liver. Acetylcysteine is an antioxidant material. Acetylcysteine rol of glutatyon synthesis in liver and lung and gives cysteine for abregulation glutatyon synthesis . The aim of this study is research of the NAC (N- Acetylcysteine) effects on liver damage which was occured by MTX on light microscope.

Material and Methots: For this aim male Wistar Albino rats were divided into control, MTX, MTX+NAC, NAC groups. At the end of ten days, rats livers were put into % 10 neutral tamponized formalin and inspected on light microscope.

Findings: It was found that on the liver of rats which was given MTX, sinusoidal dilatation, hepatocytes degeneration, vascular congestion-trombosis, inflammatory infiltration on light microscope.

Results: As a result of this study it was found that NAC may decrease liver damage, which was occured by MTX.

Key Words: Methotrexate, NAC, light microscope, hepatotoxicity, rat.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Karaciğer; vücudun en büyük bezi ve deriden sonra gelen en büyük organıdır (1). Toplam vücut ağırlığının %2'si kadar bir ağırlığa sahip olan karaciğer koyu kahve renginde, gevrek (travmada kolayca yırtılabilir) bir organdır (2). Karaciğer karın boşluğunun sağ üst tarafında, diyaframın altında yerleşmiştir ve kaburga kemikleri tarafından korunur (3, 4).

Sindirim kanalının hem endokrin hem ekzokrin işleve sahip bezi olan karaciğer, üç temel alanda merkezi bir rol oynar. Karbonhidratların, yağların ve proteinlerin metabolizması, ilaç ve alkol gibi dışarıdan vücuda alınan bazı maddelerin işlemde geçirilmesi ve yağ sindirimi için çok önemli olan safranin yapımı ve salgılanmasıdır (5).

Metotreksat, bir folik asit antagonistidir. Metotreksat'ın (MTX) birçok kanser türünde (osteokarsom, lenfoma) kemoterapotik ajan olarak kullanılmasının yanında ayrıca psöriyazis, sedef hastalığı, sarkoidoz, dermatomiyozit, romatoid artrit ve birçok inflamatuvar hastalığın tedavisinde de kullanılmaktadır (6, 7). Sitotoksik ilaçlar yalnız kanser hücrelerine karşı değil, sağlıklı ve maling bütün hızlı bölünen hücreleri etkilerler. Bu nedenle MTX'in yaygın toksik etkileri vardır (8). MTX'in klinikte geniş kullanım alanları olmasıyla birlikte, karaciğer üzerine toksik etkisinden dolayı daha fazla önem kazanmıştır (9). MTX'in karaciğer dışında; böbrek, ince barsak, kemik iliği, akciğer gibi organlar üzerinde de önemli hasarlara sebep olduğu bilinmektedir (10).

Asetilsistein, doğal bir aminoasit olan L-sisteinin N-asetillenmiş türevidir. Solunum yollarında mukolitik ve ekspektoran etkileri vardır (11). Asetilsistein antioksidan bir maddedir. Asetilsistein akciğer ve karaciğerde glutatyon sentezine katılır ve sistein vererek glutatyon sentezini artırır. Asetilsistein ve glutatyon karaciğerde nötrofillerin oluşturduğu serbest oksijen radikallerini bağlar ve muhtemel hücre hasarını önleyerek koruyucu etki gösterir. N-asetilsistein (NAC) hepatotoksisite üzerindeki etkisini , önemli bir faktör olan glutatyon sentezini arttırarak, direkt "serbest oksijen radikali süpürücü" olarak etki göstererek veya stabil nitrotozil türevleri oluşturarak gerçekleştirir (12).

Çalışmamız Metotreksat'ın karaciğer hasarına karşı, N-asetilsistein'in koruyucu etkisinin ışık mikroskopik düzeyde incelenmesi amacıyla yapılmıştır.

Bu çalışmada elde edilecek bulguların, NAC'ın etkinliğini ortaya koyarak, klinik çalışmalara ışık tutabileceği düşüncesindeyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KARACİĞER ANATOMİSİ

2.1.2. Karaciğerin Yerleşimi

Karaciğer, karın boşluğunun en üst kısmında yer alır. Hemen hemen tamamen sağ hipokondrium ile, epigastriyumun bir bölümünü ve sol hipokondriyumu işgal eder. Yaklaşık 1.5 kg ağırlığındadır (1). Karaciğer intraperitonel bir organ olmakla beraber , diyafragmatik yüzün arkada kalan küçük bir kısmı ile safra kesesi, porta hepatis ve vena kava inferioryun bulunduğu yerler peritonsuzdur (2).

Karaciğerin bir diyafragmatik (üst) yüzü, bir visseral (alt) yüzü, keskin bir ön kenarı ve bir de künt arka kenarı vardır (2). Karaciğerin üst kenarı, ksifosternal eklem seviyesinde olup, linea medioklavikularis'te sağda 5'nci kıkırdak kaburga, solda 5'nci interkostal boşluğu birleştiren çizgi üzerindedir. Diyafragmatik yüzü, area nuda hariç, tamamen visseral peritonla örtülüdür. Diyafragma aracılığıyla; her iki akciğer ve plevra'ları, fibröz perikardiyum ve kalbin ventriküler bölümünden ayrılır. Diyafragmatik yüz ile diyafragma arasında, recessus subphrenicus denilen potansiyel bir aralık vardır. Karaciğerin alt kenarı keskindir. Sağ 10'ncu kıkırdak kaburga ile linea medioklavikularis'in sol 5'nci kıkırdak kaburgayı kestiği nokta arasında uzanır (1).

2.1.3. Karaciğerin Lobları

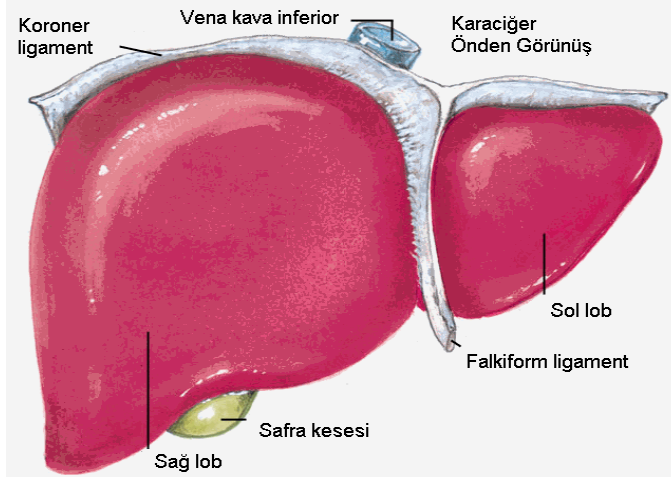
Karaciğer anatomik olarak dört lobdan oluşmaktadır. (Şekil 1, 2).

- Sağ Lob (lobus dexter) : En büyük olanıdır.
- Sol Lob (Lobus sinister) : Sağdan sola doğru incelerek uzanır.
- Quadrat Lob : Visseral yüzde sağ ve sol lob arasında önde- altta yer alır.
- Kaudat Lob : Arka üst tarafta yer alır (2).

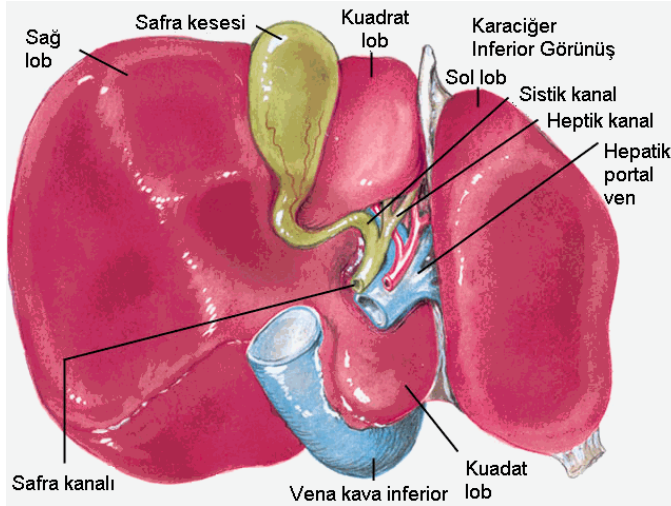
Kaudat Lobun'un sağında vena kava, solunda ise ligamentum venozus bulunur. Ligamentum venozus, fetal duktus venozusun kalıntısıdır (1, 4).

Karaciğer, sağ ve sol lob olarak falsiform ligamentle ayrılmıştır. Bu ligament paryetal peritona uzanır ve karaciğerin tutulmasına yardım eder. Falsiform ligamentin posterior serbest kenarındaki kalınlaşma, halka ligament veya ligamentum

teres adını alır ve göbeğe ulaşan fibröz bir bant şeklindedir (4). Karaciğerdeki tüm ligamentler periton tarafından oluşturulmuştur. Sadece ligamentum teres embriyonik bir kalıntıdır (1). Ayrıca diyafragma ile karaciğer arasında frontal plan boyunca uzanan koroner ligament vardır (4). Koroner ligament , karaciğeri diyafragmaya bağlayan esas ligamettir (1). Omentum minus adı verilen ligament ise karaciğeri, mide ve duodonuma bağlar.



Şekil 1: Karaciğerin önden görünüşü. (Kaynak 13'den alınmıştır.)



Şekil 2: Karaciğerin inferior görünüşü ve anatomik yapıları. (Kaynak 13'den alınmıştır.)

2.1.4. Karaciğerin Damarları Ve Sinirleri

Arter ve Venler

Quadrat ve kaudat loblar arasında bulunan porta hepatis karaciğerin kapısı olarak kabul edilir. Kan damarları, sinirler, lenfler ve keseler karaciğere buradan girer ve çıkarlar (4). Hepatik arter, aortun çölyak arterinin bir koludur ve karaciğere

oksijenlenmiş kanın yaklaşık % 20-30'unu sağlar (1). Hepatik portal ven gastrointestinal sistemden aldığı venöz kanı karaciğere boşaltır. Karaciğere gelen kanın büyük bir bölümü (%70-80) buradan kaynaklanır. Bu kan özellikle ince bağırsaklardan absorbe edilen besinleri taşır (4). Karaciğer içindeki santral venler birleşerek hepatic venleri oluşturur. Genellikle üç tane olup, inferior vena kavaya açılırlar. Hepatik venler intrahepatiktir (1, 4).

Lenf damarları

Karaciğer büyük miktarda lenf üreten bir organdır. Diyafragmatik ve visseral yüzlerin ön taraflarını drene eden yüzeysel lenf damarları hepatic noda, arka taraflarını drene eden yüzeysel lenf damarları inferior frenik noda veya derin lenf damarları ile birleşerek inferior vena kavaya gelir. Bu düğümlerin efferentleri diyafragmadan geçerek posterior mediastinal noda drene olur.

Siniri

Pleksus çöliyakustan'tan çıkan dallar porta hepaticte pleksus hepaticus'u oluşturur. Bu pleksus içindeki parasempatik dallar n.vagus'tan, sempatikler ise T7-T9'dan gelir. Karaciğeri örten peritonun duyası, n.phrenicus ile taşınır (1).

2.2. KARACİĞER EMBRİYOLOJİSİ

Karaciğer safra kesesi ve safra kanal sistemi, dördüncü haftada ön bağırsağın kaudal kısmından, ventral dışa doğru bir çıkıntı olarak gelişir. Karaciğer tomurcuğu ya da karaciğer divertikulumu, gelişen kalp ile orta bağırsak arasındaki splanknik mezoderm kitlesine, septum transversum doğru uzanır. Septum transversum, diyaframın bir kısmını ve bu yörede, ventral mezenteriy yapar. Karaciğer divertikulumu, ventral mezenter yaprakları arasında büyürken, iki kısma ayrılır (14, 15).

Divertikulum'un kranial daha büyük parçası, karaciğer taslağıdır. Çoğalan endoderm hücreleri karaciğer hücre kordonları ağını ve safra sistemini intrahepatik kısmının epitel örtüsünü meydana getirir (15). Bu hepatic hücre kordonları, endotelle dökeli boşlukların çevresinde ağ oluşturarak karaciğer sinüzoidlerinin taslaklarını meydana getirirler (14). Hematopoetik hücreler, Kupffer hücreleri ve bağ dokusu hücreleri septum transversum mezoderminden köken alır (16).

Karaciğer hızla büyür ve beşinci haftadan onuncu haftaya kadar, karın boşluğunun büyük bir kısmını doldurur. Oksijenden zengin kan miktarının,

v.umbilikalıs'ten karaciğere akması karaciğerin geliştiğini ve bölünmesini (segmentasyon) gösterir. Başlangıçta sağ ve sol loblar, aynı büyüklükte dirler, ancak, sağ lob, kısa zamanda daha büyük olur (15).

Altıncı haftada başlayan hematopoiezis, karaciğere parlak kırmızı bir renk verir; karaciğerin yedinci ve dokuzuncu haftalar arasındaki büyüklüğünden de bu hematopoetik aktivite sorumludur. Dokuzuncu haftaya kadar fetusun toplam ağırlığının % 10'unu karaciğer oluşturur (14). Hematopoetik aktivite, gebeliğin son iki ayında yavaş yavaş azalır ve doğumda geride ancak birkaç hematopoetik hücre adası kalır. Artık asıl hematopoetik aktiviteyi kemik iliği yapmaya başlar (17). Artık karaciğer ağırlığı hücre ağırlığını %5'i kadardır (16). Onikinci haftada, karaciğer hücreleri safra yapmaya başlarlar (14).

Karaciğer divertikülü küçük kaudal parçası, safra kesesini ve bunun sapı ise sistik kanalı oluşturur (15). Başlangıçta ekstra hepatik safra yolları epitel hücreleri ile tıkanmışken, bu hücrelerin dejenerasyonu ile vakuolizasyon oluşur ve kanallar açılır. Hepatik kanal ve sistik kanalı duodenuma bağlayan kordon, koledok kanalına dönüşür (14). Böylece üretilen safra bağırsağa akabilme imkânını bulmuş olur (16). Onüçüncü haftadan sonra, safra kanalı yoluyla duodenuma giren safra, bağırsak içeriklerine (mekonyum) koyu yeşil bir renk verir (15). Duodenumun pozisyonunda meydana gelen değişiklikler sonucu koledokun duodenuma giriş yeri başlangıçtaki anterior pozisyonundan posteriora doğru yer değiştirir ve sonuçta koledok duodenumun arkasından geçer duruma gelir (16).

2.3. KARACİĞER HİSTOLOJİSİ

Karın boşluğunda diyaframa altında, sağ üst kadranda yer alan karaciğer vücudun en büyük bezi olarak kabul edilir (yaklaşık 1.5 kg) (18). Karaciğer ürettiği safra safra kanalları yoluyla duodenuma boşaltması nedeniyle ekzokrin bir bez, sentezlediği bazı maddeleri doğrudan kana vermesi özelliği nedeniyle de endokrin bir bez niteliği taşımaktadır (19, 20). Karaciğer, sindirim kanalından emilen besinlerin işlendiği ve vücudun diğer kısımları tarafından kullanılmak üzere depolandığı bir organdır. Bu yüzden sindirim sistemi ile kan arasında bir geçiş bölgesi oluşturur (18). Organa kanın %70-80'i portal venden gelir; geri kalan az bir bölümü hepatik arterle sağlanır. İnce bağırsaklardan emilen maddelerin çoğu portal ven yoluyla karaciğere gelir, sadece kompleks lipitler lenf yoluyla taşınır (18).

Karaciğer üç temel alanda merkezi rol oynar: Karbonhidratların, proteinlerin ve yağların metabolizması, ilaç ve alkol gibi dışarıdan vücuda alınan bazı maddelerin işlemden geçirilmesi ve yağ sindirimi için çok önemli olan safranin yapımı ve salgılanması (5).

Karaciğer diğer pek çok organ gibi parankima ve stromadan oluşur. Bir organın kendine özgü fonksiyonlarını yerine getiren hücre ve yapıların oluşturduğu organ içindeki küçük düzenlemelerin tümüne, parankima adı verilir. Bunun yanı sıra parankimayı oluşturan hücre ve diğer yapılara desteklik sağlayan ve çoğu kez organın çatı ve iskeletini oluşturan; kapsül ve trabekül gibi bağ dokusundan oluşan yapılar ve bu yapılar içerisinde organın içerisine girip dağılan damar ve sinirlerin oluşturduğu destek yapıların tümüne de stroma denir (3).

2.3.1. Stroma

Karaciğeri en dıştan saran seröz zara, visseral periton adı verilir. Tek katlı yassı bir epitelyum türü olan mezotelyum ve altındaki ince bir bağ dokusundan oluşur. Karaciğer diyafragmatik yüzündeki 'area nuda' adı verilen bölgesi dışında tümüyle visseral peritonla örtülmüştür (3).

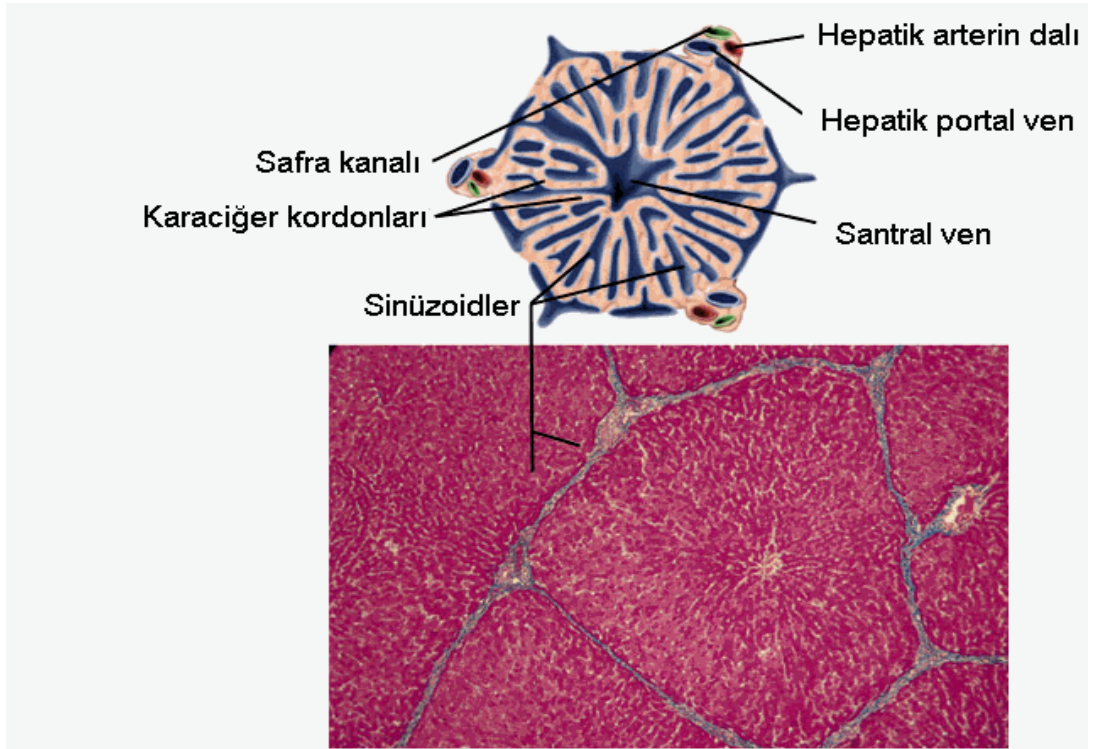
Visseral peritonun hemen altında kollajen ve elastik lif içeren özel bir kapsül vardır, bu kapsüle, Glisson kapsülü ya da kapsüle fibroza denir (3, 21).

Hilumda Glisson kapsülü içeriye doğru girer ve porta hepatisten itibaren organ içine doğru dallanan ve karaciğere giren hepatik arterle portal venin damar yoluna ve safra kanallarına eşlik eden bağ dokusu şeklinde devam eder (5, 20). Böylece karaciğer loblara ve lobüllere ayrılır (3, 20). Dört lobdan oluşan karaciğeri lobüllere ayıran bağ dokusu miktarı insanlarda az olduğu için, lobüllerin birbirinden ayrımının yapılması zordur. Oysa deve, domuz gibi hayvanlarda interlobüler bağ dokusu çok belirgindir ve lobüllerin ayrımı kolaydır (20).

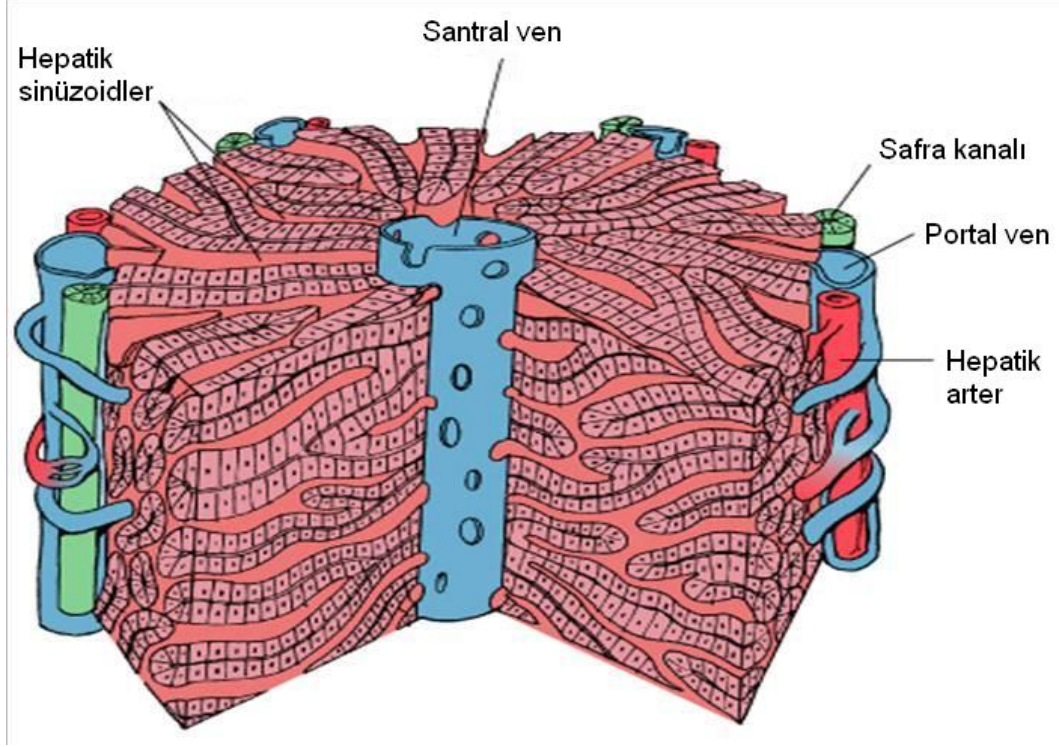
Lobüllerin birbirleriyle birleştiği bölümlerde bağ dokusu artarak enine kesitlerde üçgen biçiminde seçilen alanlar oluşturur. Bu alanlara portal alan veya portal aralık veya Kiernan aralığı denir (3, 20). İnsan karaciğer lobülünde 3-6 portal alan bulunur ve her bir portal alanda portal venin bir dalı olan venül, hepatik arterin dalı olan bir arteriyol, bir safra kanalı ve lenfatik damarlar bulunur (18). Portal alanda yerleşim gösteren bu üç önemli yapıya, 'Portal üçgen veya portal triyat' adı verilir (Şekil 3). Bu üçlü yapıdan venül, genellikle en büyük olanıdır, duvarı ince ve

lümeni düzensizdir. Arter ise, venüle göre daha küçük daha kalın duvarlı ve daha düzgün lümenlidir. Safra kanalının da tek katlı kübik epitelyumu vardır (3, 5). Safra yolları hepatositlerin arasındaki ince safra kanalikülleriyle başlar. Bunlar komşu hepatositler arasındaki oyuk benzeri girintilerden meydana gelen hücrelerarası küçük kanallar olup, en iyi elektron mikroskopuyla görülür. Kanaliküller her bir lobülün çevresine ulaştıklarında, basit kübik epitelyumla döşeli olan ve Hering kanalları olarak da bilinen küçük kanallara açılır. Bu kanallar portal alandaki büyük safra kanallarına boşalır. Kanallar genişledikçe, lümeni döşeyen prizmatik epitelyum uzamaya başlar (5).

Lobül içindeki bağ dokusunda yalnızca retiküler fibriller bulunur. Gümüşleme yöntemiyle karaciğer stromasındaki lobülleri çevreleyen ince retiküler fibriller gösterilebilir (3, 20).



Şekil 3: Karaciğer lobülünün yaplanması (Kaynak 13'den alınmıştır).



Şekil 4: Karaciğer lobülünün yapısı (Kaynak 13'den alınmıştır).

2.3.1.2. Karaciğerin Kan Dolaşımı

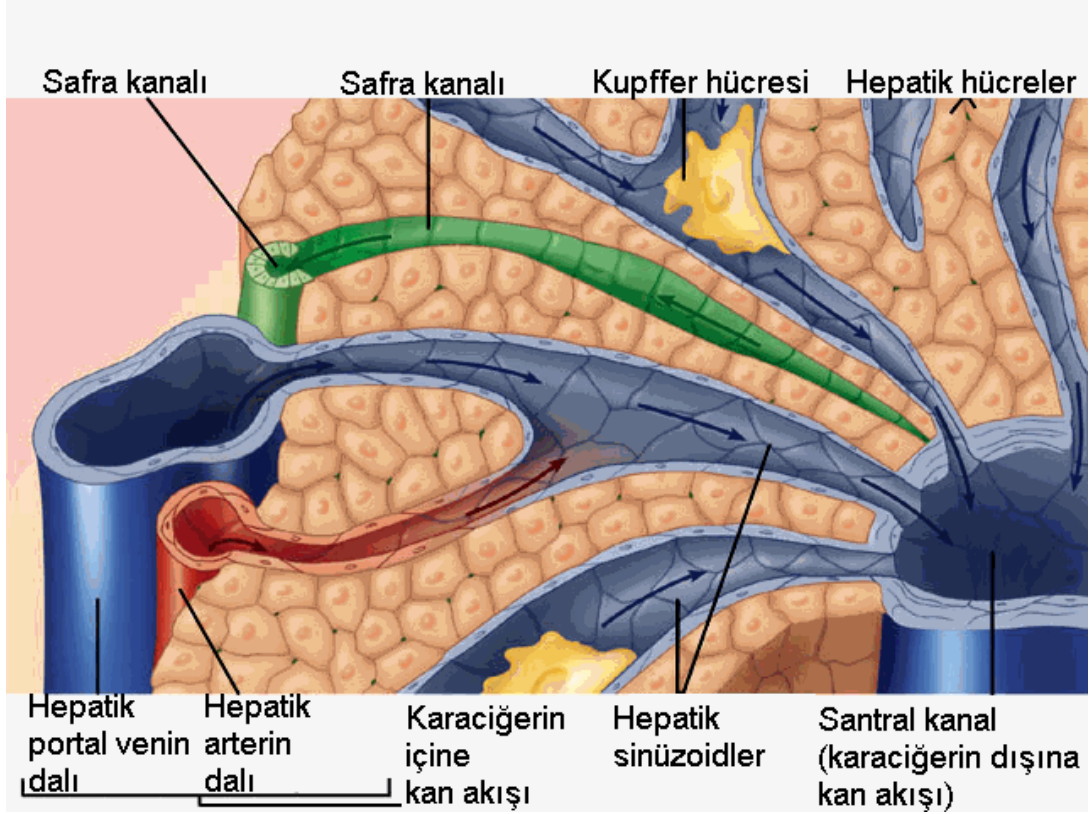
Karaciğer kanı alışılmışın dışında bir şekilde iki kaynaktan alır; %80'i sindirim yolu, dalak ve pankreastan gelen kanı taşıyan portal venden, %20'si ise oksijenden zengin kanı sağlayan çölyak hattın bir dalı olan hepatic arterden gelir (18, 21).

Portal ven ve hepatic arter organın hilumundan bir bağ dokusu kılıfıyla sarılı olarak organın içerisine birlikte girerler. Önce sağ ve sol loba giden, A.V. interlobarislere dallanırlar. Daha sonra gittikçe incelen dallar halinde lobüllerin kesiştikleri portal alanlarda, A.V. interlobularis adını alırlar. Lobüllerin sınırları boyunca dağıtıcı arteriyol ve venül adlarıyla da incelenerek lobülün sınırlarını dolaşırlar (3). Dağıtıcı damarlardan ayrılan hem arteriyel hem de venöz kan birbirine karışarak özelleşmiş bir kapiller türü olan sinüzoidlere akar (21). Sinüzoid içerisindeki kan karaciğer lobülünün ortasına yerleşen santral vene akar. Santral venler birleşerek sublobüler venleri, onlar da hepatic venleri oluştururlar. Hepatic venler bir araya gelerek vena kava inferior aracılığıyla sağ atriyuma dökülür (18, 21). Santral ven her bir karaciğer lobülünün tam ortasında bulunur. Kendisine dökülen sinüzoidler ise, santral venden lobülün periferine doğru ışınal bir biçimde düzenlenme gösterir (Şekil 4). Lobülün içinde sinüzoidlere paralel olarak ve ışınal

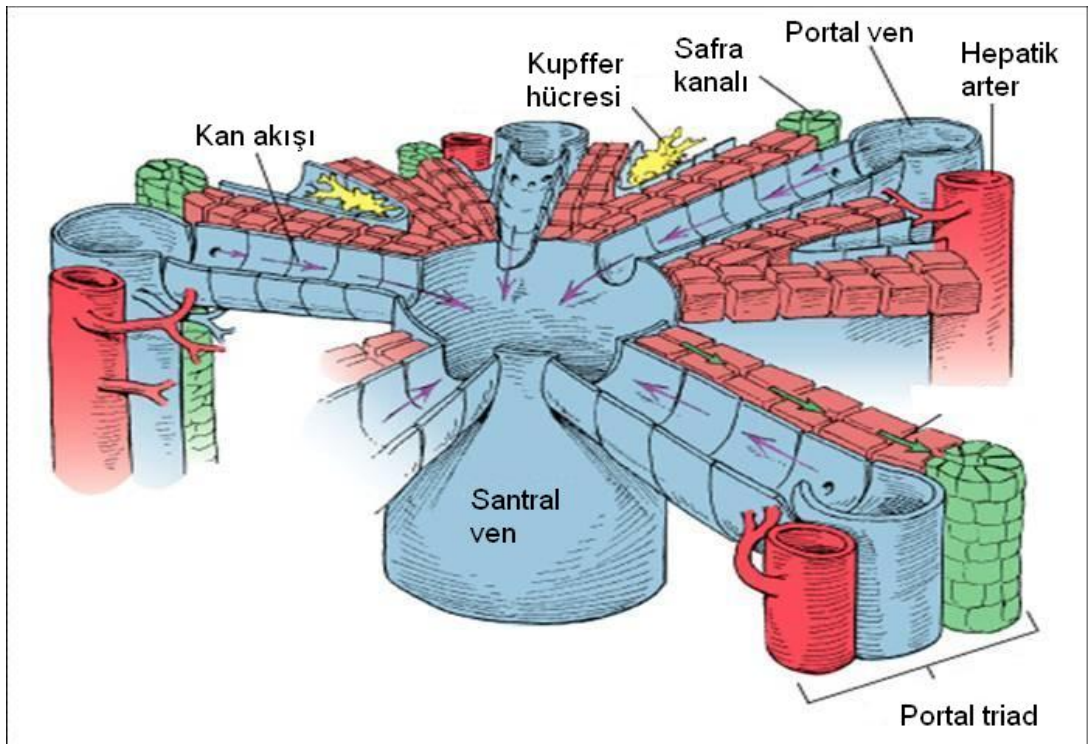
bir biçimde uzanan bir ya da iki hücre kalınlığında hepatositlerin oluşturduğu plaklara ‘karaciğer hücre kordonları’ denir (3). Kan karaciğer lobülünde çevreden merkeze doğru akar. Sonuç olarak oksijen ve metabolitler ile bağırsaklardan emilen bütün toksik olan ve olmayan maddeler önce lobülün çevresindeki hücrelere, daha sonra merkezindeki hücrelere ulaşır (18).

Lenfatik Sistem

Lobül içinde lenfatik bir damar bulunmaz. Hepatositler ile sinüzoidleri döşeyen endotel hücreleri arasındaki potansiyel boşluğa Disse aralığı denir. Burası lenfin oluşmaya başladığı alandır. Karaciğerde bulunan lenf diğer lenf sıvılarından daha fazla protein içerir ve albumin globülin oranı plazmadan biraz daha yüksektir (20). Buradan az miktarda plazma lobülün periferine doğru olan Mall aralığına akar. Buradan da portal alandaki lenfatik damarlara boşalır. Disse aralığında bulunan plazma nedeniyle kan ve hepatositler arasında aktif madde alışverişi için uygun bir ortam meydana gelmiş olur. Disse aralığı lenfatik bir kanal değildir ve intersellüler boşluktaki gibi retiküler fibriller bulunur. Sıvı bu bölgeler arasında serbestçe dolaşır. Portal alandan kör uçlar halinde başlayan karaciğer lenf damarları birleşerek en son duktus torasikusa drene olurlar. Duktus torasikusa gelen lenfin büyük bir bölümü karaciğerden, az bir bölümü de mezenterik lenfatikler aracılığı ile bağırsaklardan gelmektedir (19, 20).



Şekil 5: Karaciğerdeki kan ve safra akış yönlerini göstermektedir (22 nolu kaynaktan alınmıştır).



Şekil 6: Karaciğerdeki kan ve safra akış yönlerini göstermektedir (22 nolu kaynaktan alınmıştır).

2.3.2. Parankima

Karaciğer parankim hücreleri olan hepatositlerden meydana gelir. Parankim, birbirleriyle bağlantılı ve bir-iki hücre kalınlığında olan ve bir binanın duvarlarını andıran tabakaların ağını içerir. Her bir tabakadaki hepatositler bu duvarın tuğlalarına ve karaciğer sinüzoidleri de duvardaki boşluklara benzetilebilir. Karaciğer parankiminin organizasyonu ile ilgili üç önemli karaciğer lobül modeli vardır (5).

2.3.2.1. Klasik Karaciğer Lobülü

Bu lobül yapısında; ortada santral ven, santral venden periferine doğru uzanan karaciğer hücre kordonları ve bu kordonların arasında yer alan sinüzoidlerden oluşur. Karaciğer hücre kordonlarını, santral ven çevresinde birbirleriyle anastomozlaşan karaciğer hücreleri oluştururlar. Bu kordonlara aynı zamanda Remark kordonları da denir (20, 21). (Şekil 7).

2.3.2.2. Portal Lobül

Bu ayırımında safra salgılanışı göz önüne alınmıştır. Üç klasik karaciğer lobülünün santral venlerinin birleştirilmesiyle portal lobülün sınırları çizilir (3, 20). Burada portal triat merkezde yar alır ve etrafı saran hepatosit parankimasından safrayı toplamaktadır (21). Bu modele göre üç lobülde oluşan safra, ortada yer alan portal alandaki safra kanalına ortak olarak akmaktadır (3). (Şekil 7).

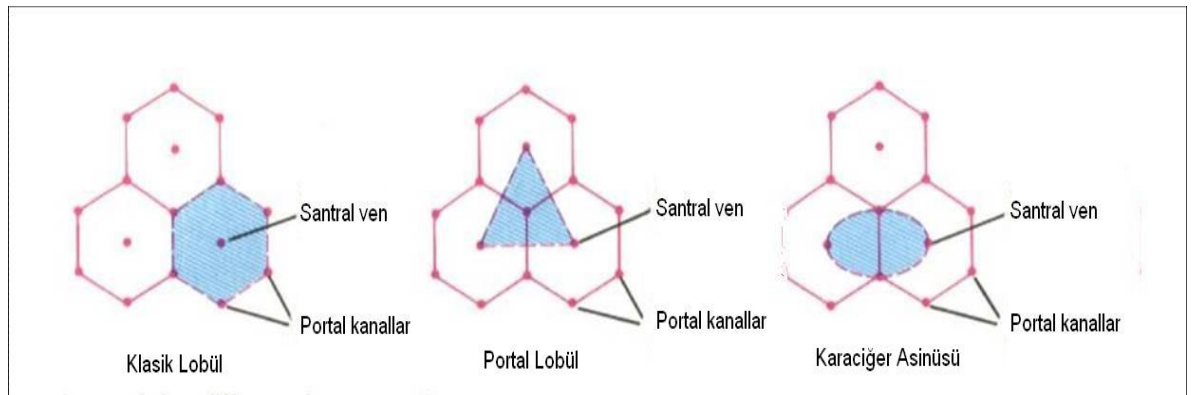
Safra karaciğer hücrelerince sentezlenir ve birbirine komşu iki karaciğer hücresi arasındaki safra kanalikülleri olarak adlandırılan dar hücrelerarası boşluklara salınmaktadır (21). Kanaliküller 1-2 µm çapında tübüler boşluklardır. Bu alanlar sadece iki karaciğer hücresinin plazma zarlarıyla sınırlıdır ve içinde az miktarda mikrovillus bulunur. Safra kanalikülleri karaciğer lobülünün plakları boyunca anastomoz yapan karmaşık bir ağ oluştururlar (18). Rutin incelemelerde seçmek çok güçtür. Gümüşleme ile ya da alkalin fosfataz reaksiyonu ile (kanalikül duvar membranı ATPase ile pozitif reaksiyon verir) seçilebilirler (20).

Lobülün periferinde, safra kanaliküllerinin duvarını oluşturan karaciğer hücreleri, sitoplazması soluk boyanan, koyu nükleuslu, organelce fakir kübik hücrelere dönüşür. Bu hücreler belirgin bir bazal membrana oturmaktadırlar. Bu bölgeye Hering kanalları adı verilir. Hering kanalı da sonuçta portal alandaki interlobüler safra kanalına akar. Görüldüğü gibi safranın akışı kan akımının tersine merkezden çevreye doğrudur (3, 18, 20, 21). (Şekil 5, 6). Safra kanalları kübik

epitelden prizmatik epitele değişiklik gösterebilir ve belirgin bir bağ dokusu kılıfına sahiptir (18). Bu yapı elastik lifler ve bazen düz kas hücreleri içerir (3). Ana interlobüler safra kanalı (portal alanlardaki interlobüler safra kanallarının birleşmesiyle oluşur) karaciğer hilusunda lobar safra kanalına açılır. Sağ ve sol lobar safra kanalları hilusta birleşirler ve duktus hepaticus komminisi (ortak safra kanalı) oluştururlar. Karaciğerden çıkan duktus hepaticus komminisi safra kesesinden gelen sistik kanalla birleşerek duktus koledokus adıyla, duodenuma boşalır (3, 18). Bu kanalın epiteli tek katlı kübik epitelden prizmatik epitele değişiklik gösterebilir. Epitel hücreleri oval bir çekirdek, iyi gelişmiş golgi kompleksi ve mitokondriye sahiptir. Sitoplazma mikropinositik veziküller, bazen de kolesterol kristalleri içerir. Epitelyum hücreleri belirgin bir bazal lamina üzerine oturmuşlardır ve apikal yüzlerinde bol miktarda mikrovillus bulunur (3).

2.3.2.3. Portal Asinüs (Hepatik Asinüs)

İki komşu klasik lobül içerisindeki aynı interlobüler venden kanlanan hücre grupları hepatic asinüs olarak adlandırılırlar. Karaciğer asinüsünde sınırlar karaciğer parankiminin portal venin uç dallarından ve hepatic arterden beslenmesiyle bağlantılı olarak belirlenmiştir (5, 21). İki komşu klasik lobül içerisindeki dağıtıcı arteriyol ve venülden kanlanan hücre gruplarından oluşur. Komşu iki lobülün portal alanları ile santral venlerinin birleştirilmesiyle oluşan baklava dilimi şeklindeki bir modeldir (3). Karaciğer asinüsünde sınırlar, bir hepatic arterin son dalı ile belirlenmektedir. Hepatositler; arterden gelen kanın, venöz sinüzoidler boyunca akışı, oksijenlenmede ve beslenmede farklı içerik ve kanlanmaya göre periferik zon, santral zon ve ara zon olarak üç bölgeye ayrılırlar (20, 21).



Şekil 7: Karaciğer lobünün histolojik sınıflandırılması (23 nolu kaynaktan alınmıştır).

Periferik Bölge (Zon I)

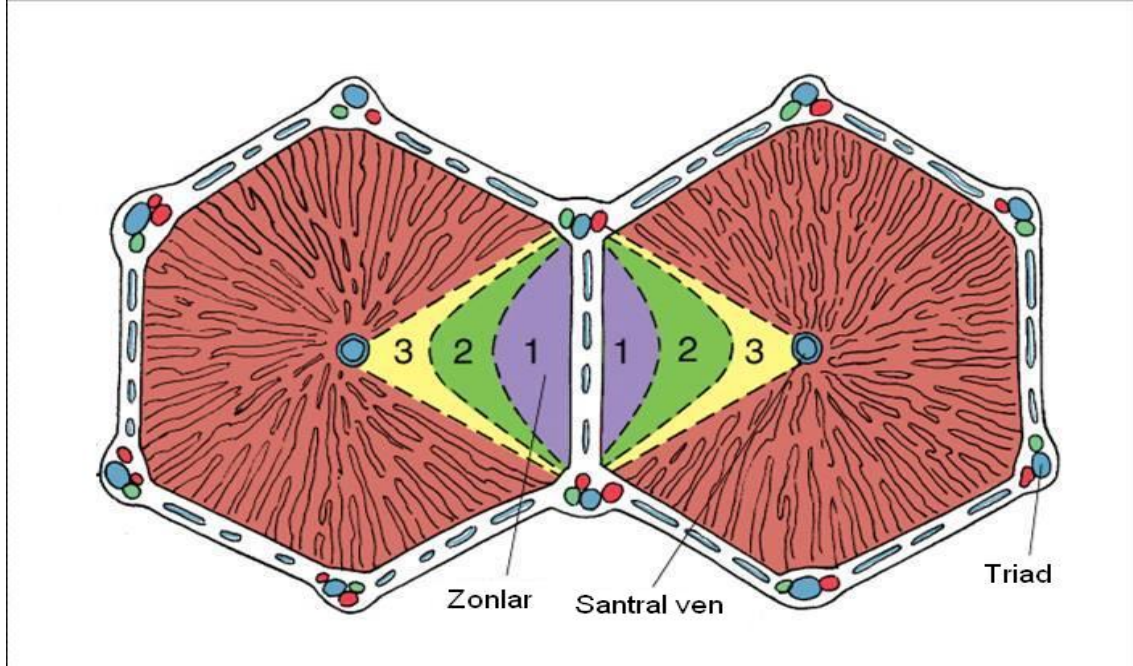
Portal venül ve hepatik arteriyol, lobülün periferinden merkezine doğru ilerlediğinden, bu bölge kandaki oksijenin ve besin maddelerinin ilk alındığı yer olup, hepatositler sürekli aktivite gösterirler. Glikojenin depolanması ve plazma proteini üretiminin en fazla olduğu hücreler bu zondaki hücrelerdir (5). Kandaki zararlı maddelerden de ilk etkilenen bu hücrelerdir. Glikojen en çok bu hücrelerde depolanır, daha az olarak da iç zonlarda birikir. Açlık durumunda ilk önce periferik hücreler glikojeni boşaltmaktadırlar. Bu zonda glikojen tükenene kadar diğer zonlardaki hücrelerden glikojen verilmez (20). Bu zondaki hücrelerde granüllü endoplazmik retikulum ve bol kristal mitokondriler dikkati çekecek şekilde iyi gelişmişlerdir. Bu zondaki hücreler dolaşım bozulduğu sırada en geç ölen ve rejenerasyonun ilk izlendiği hücrelerdir (19). (Şekil 8).

Ara Bölge (Zon II)

Orta bölgedeki hücrelerdir. Oksijen ve besin maddeleri açısından ara bir durumdadır. Bu zonun sınırlarını kesin olarak ayırdetmek mümkün değildir (21). (Şekil 8).

Santral Bölge (Zon III)

Santral veni çevreleyen en içte kalan hücre gruplarından oluşur. Periferik zondaki hücelere göre daha az aktiftirler. Organelleri daha az gelişmiştir. Özellikle düz endoplazmik retikulundan zengindir (3, 20). Bu zondaki hücreler perfüzyon azaldığı zaman iskemik nekroza uğrayan ve patolojik ve fizyolojik yağ birikiminin ilk görülmeye başlandığı yerdir (19). Santral bölge ilaç metabolize eden enzimleri en yüksek yoğunlukta içerir, viral, toksik ve anoksik karaciğer hasarına en çok maruz kalan bölgedir (3). (Şekil 8).



Şekil 8: Karaciğer lobülünün fonksiyonel sınıflandırılması (22 nolu kaynaktan alınmıştır).

2.3.3. Hepatositlerin Histolojik Özellikleri

Hepatositler, karaciğer sinüzoidlerinin arasında düzensiz tabakalar şeklinde sıralanmış olan ve yaklaşık 20-30 μm çapında polihedral (çok yüzeyli) parankim hücreleridir. Karaciğer hücre popülasyonunun %80'ini meydana getirirler (19). Santral vende lobülün periferine doğru ışınal şekilde uzanan tek ya da iki hücre kalınlığında hücre kordonları oluştururlar (3, 5). Hepatositlerden oluşan hücre kordonları arasında kalan boşluklarda da sinüzoidal kapillerler bulunmaktadır (19). Genellikle merkezde yerleşik tek çekirdeğe sahiptirler fakat, iki ve çok çekirdekli hücrelere de sıklıkla rastlanmaktadır ve hücrelerin yaklaşık %20 kadarı iki çekirdeklidir. Çoğunlukla ribozomal RNA yapımında görev alan bir veya daha fazla yapıda çekirdekçikleri vardır (5). Hematoksilen eozinle (H-E) boyanmış kesitlerde, çok sayıda mitokondri ve bir miktar düz endoplazma retikulumunun bulunması nedeniyle hepatositin sitoplazması eozinofiliktir (18). Bir karaciğer epitel hücresinin üç işlevsel yüzeyi vardır.

1. Sinüzoidlere bakan yüzü,
2. Safra kanalikülüne bakan yüzü,
3. Komşu hepatosite sıkıca temas eden yüzü (3, 20).

Hepatositlerin sinüzoidlere bakan yüzünde, çok sayıda düzensiz şekil ve büyüklükte mikrovilluslar bulunur. Bu yapılar hücrenin salgılama ve emilim alanını yaklaşık altı kez artırır (3, 20).

Hepatosit ile sinüzoidleri döşeyen endotel hücreleri arasındaki boşluğa Disse aralığı denir. Bu aralığa subendotelyal boşluk da denir (3). Bu aralıkta hepatositlerin mikrovillusları bulunur (18). Sinüzoidlerdeki kan endotel duvarından kolayca geçer ve hepatosit yüzeyi ile temas eder. Aynı zamanda hepatositte sentezlenen moleküller (örn: lipoproteinler, albumin, fibrinojen, protrombin ve koagülasyon faktörleri V, VII, IX gibi) disse aracılığıyla sinüzoidlerdeki kana geçer (Karaciğerin endokrin özelliği) (18, 21).

Disse aralığında yerleşik olan İto hücreleri olarak da adlandırılan karaciğer yıldız hücreleri bulunur. Bu hücreler mezenşimal kaynaklı olup, yağ içerirler ve A vitaminini lipid damlacıkları içinde retinil esterler halinde depolama kapasitesine sahiptirler (19). Patolojik durumlarda, İto hücreleri kollajen üreten hücrelere dönüşürler. Tip I kollajenin sentezine ve salınımına ek olarak, laminini, proteoglikanları ve büyüme faktörlerini salgılamaktadırlar (21). Organel yönünden zayıftırlar. Uzantıları komşu hepatositlerle ilişki kurar. Ancak bağlantı birimleri içermezler (3).

Safra kanalikülünü oluşturan yüz, safranın ilk salgılandığı bölümün duvarlarını yapar (3). Karşılıklı olarak komşu karaciğer hücre membranlarının kıvrılmasıyla safra kanalikülü oluşur. Bu yüzde de kısa mikrovilluslar bulunur. Safra salgılanıp salgılanmamasına göre mikrovillusların boyu değişiklik gösterir. Salgı olmadığı zaman mikrovillusların boyu artar ve lümeni kapatır (20).

Komşu hücre ile sıkı ilişkide olan yüzde, özellikle safra kanalikülünün hemen altında ve üstünde kalan bölgelerde hücreler arasında zonula okludens tipi sıkı bağlantı birimleri bulunur. Böylece safranın bu kanalikül dışına sızması önlenmiş olur. Ayrıca hücrelerin fizyolojik aktivitelerinin koordinasyonunda önemli olan, hücrelerarası iletişim bölgelerinden gap junctionlara da hepatositlerde sıkça rastlanır (3, 19, 20).

2.3.3.1. Hepatositlerin Sitolojik Özellikleri

Nükleus

Hepatositler bir ya da iki tipik çekirdekçik içeren bir ya da iki yuvarlak çekirdeğe sahiptirler. Çekirdeklerin bazıları poliploiddir; yani haploid kromozom sayısının çift katlarında kromozom içerirler (18). Erişkin karaciğerinde mitoz nadirdir. (her 15.000 hücrede bir mitoz) fakat hasar sonrası tamir döneminde bol mitozla rastlanır (20).

Mitokondri

Her hücrede yaklaşık 2000 mitokondri bulunmaktadır. Sferik ya da oval biçimli mitokondrilerin kristalleri çok sayıdadır. Mitokondriden zengin oluşu hücrenin yüksek metabolik aktivitesine işaret eder (20).

Endoplazmik Retikulum

Hepatosit, plazma proteinlerinin sentezinde yer alan kaba endoplazmik retikulumun (GER) yanı sıra , glikojen, lipit sentezi, detoksifikasyon mekanizmaları ile ilişkili olan düzgün yüzeyli endoplazmik retikulumu (AGER) içerir (21). İlaçlar, toksinler ya da metabolik uyarıların etkimesi sonucunda hepatosit sitoplazmasında en baskın organel AGER olur. Fenobarbital, etanol, anabolik steroidler ve progesteron, bazı kanser ilaçları uygulandıktan sonra AGER hipertrofisi gelişir ve bu ilaçların bağlanmasıyla ilgili enzim aktiviteleri fazlalaşır. Diğer yandan (CCL₄), 3,4-benzyrene gibi hepatotoksik ajanların metabolizması AGER'de yapılır (3, 20). AGER, karaciğer hücresi tarafından alınan moleküllere hemen reaksiyon oluşturan kararsız bir sistemdir (18). Hepatositte kaba endoplazmik retikulum (GER) sitoplazma içinde saçılmış kümeler oluştururlar, bunlar bazofilik cisimler olarak adlandırılır. Bu yapılardaki poliribozomlarda birkaç tip protein (örn: albümin, fibrinojen, protrombin) sentezi yapılır. Bu proteinlerin sentezi GER'de bulunan poliribozomlarda gerçekleşir. Genellikle hepatositler proteinleri salgı granülleri halinde sitoplazmalarında depolamaz, sürekli kan dolaşımına verirler (18). Hepatositler kandan glikoz fazlasını alarak glikojen şeklinde sitoplazmasında depolarlar. Glikojen adı verilen bu polisakkarit, elektron mikroskopik düzeyde yapılacak olan incelemelerde GER kümeleri içinde toplanmış, kaba ve elektron yoğun granüller biçiminde görülür. Glikojeni görebilmek için Best Karmin ve PAS (Periodic Acid Schiff) uygun boyalardır (19). AGER'de aynı zamanda hidrofobik

bilirubin, glukuronik asitle konjuge edilir ve suda eriyebilen bilirubin glukuronid oluşur. Bilurubin glukuronid oluştuktan sonra sitoplazmadan difüzyon yolu ile safra kanalikülüne geçer ve oradan da safra içerisine salınır (18, 21).

Golgi Kompleksi

Çok sayıdadır ve safra kanaliküllerine yakın yerleşimlidir (20). Sayıları hücrede 50'ye varır. Bu organelin işlevi arasında lizozomların oluşturulması ve plazma proteinlerinin (albumin), glikoproteinlerin (transferin) ve lipoproteinlerin (çok düşük dansiteli lipoproteinler-VLDL) salgılanması vardır (18).

Lizozom

Lizozomlar pigment granülleri (lipofusin), kısmi olarak sindirilmiş sitoplazmik organeller ve myelin şekillerin çeşitli miktarlarını içerir (3). Hepatosit lizozomları ayrıca ferritinin yıkım ürünü olan ve eriyebilir ferritin ile eriyemeyen hemosiderin şeklinde bulunan demiri depolamaktadırlar (21).

Peroksizomlar

Hepatositler hücre başına yaklaşık olarak 200-300 peroksizom içerir (3). Bir peroksizom, değişik metabolik yollarda kullanılacak olan yaklaşık olarak 50 adet enzimi içermektedir (21). Bunlardan bazıları alkol dehidrogenaz, katalaz ve D-amino asit oksidazdır. Peroksizomlar, genel sitoplazmik metabolik aktivitenin bir ürünü olan H_2O_2 'nin (su) yıkım yerleridir (3). Hidrojen peroksitin toksik bir maddesi olması nedeniyle, katalaz enzimi bu ürünü oksijen ve su açığa çıkartacak şekilde yıkıma uğratar. Bu katalitik olay, hepatositlerde ve böbrek hücrelerinde meydana gelmektedir (21). Bundan başka peroksizomlar, pürinlerin (AMP, GMP) fazlasının ürik aside yıkılması, kolesterol, safra asitleri ve miyelin yapımında kullanılan bazı lipidlerin sentezine katılmaktadır (18).

Lipid Damlacıkları

Hücresel yapı ya da sayıları farklılıklar gösterir. Karaciğer hücresinde lipid, glikojen, AGER miktarının değişik oranlarda bulunuşu hepatositin fonksiyonunun çok yönlü olduğunu gösterir. Lipid damlacıklarını Sudan boyama metodu ile göstermek mümkündür (19, 20).

2.3.3.2. Sinüzoid

Portal aralık çevresinde karaciğer hücreleri bir hücre kalınlığında periportal bağ dokusuna dayanmış bir tabaka şeklinde (sınırlayıcı plak) bulunur. Portal aralıkta bulunan portal venin ve hepatik arterin dalları, kanlarını karaciğer hücre kordonları arasında bulunan düzensiz şekilli, özel, her yerde rastlanan kapillerlerden daha büyük damar sistemine (sinüzoidlere) boşaltırlar (20). Hem arteryel hem de venöz kan içerirler (3). Bir lobül içerisindeki sinüzoidler lobülün ortasındaki santral vene akarlar (3, 20). Sinüzoid ince bir retiküler lif ağıyla sarılmıştır (18).

Ortalama çapları 9-15 µm arasında olan karaciğer sinüzoidleri duvarını yassılaştırmış endotel hücreleri bulunur. Hücreler arasında, yaklaşık 2µm boşluklar vardır. Endotel hücrelerinde, 100 nm çapında, diyaframsız ve geçirgen fenestralar (pencereler) bulunur (5). Endotel hücrelerinin sitoplazma ve organelleri azdır. Sitoplazmalarında küçük pinositik veziküller bulunur. Endotel hücrelerinin çekirdekleri küçük, yassı ve koyu boyanmış çekirdekleri vardır (19).

Endotel hücrelerine ek olarak sinüzoidler Kupffer hücreleri adı verilen makrofajları da içerir. Bu hücreler endotel hücrelerinin lümenine bakan yüzeyinde bulunur. Bu hücrelerin düzensiz sitoplazmik uzantıları yıldız biçimini kazandırır (21). Endotel hücrelerinden daha büyüktür. Çekirdeği endotel hücre çekirdeğine göre daha yuvarlak ve büyüktür. Çekirdekleri soluk boyanmasıyla endotel hücresinden ayırtedilebilir (5, 20). Kupffer hücrelerinin birbirleriyle ve endotelle sitoplazmik bağlantısı bulunmaz. Dolayısıyla göç edebilme (migrasyon) yetenekleri vardır. Sitoplazmik uzantıları ile madde alışverişi yaparlar (19). Elektron mikroskopunda, kupffer hücrelerinin lizozomlar yönünden zengin oldukları ve bu hücrelerin çok sayıda filopoda (yalancı hücre ayakcıkları) ve endositik veziküle sahip oldukları görülür (5). Kupffer hücreleri organizmada yaygın dağılım gösteren mononükleer fagositik sistemin üyesidirler (3). Başlıca fonsiyonları; yaşlı eritrositleri metabolize etmek, hemoglobini sindirmek, bakterileri, virüsleri, tümör hücrelerini ve parazitleri etkisizleştirmektir (5, 18). Ayrıca immünomodülatör fonksiyonları olan çeşitli sitokinleri salgırlar. Az sayıda da olsa plazma proteinlerini sentezleyip salgırlar (3). Genellikle diğer kupffer hücrelerinin mitotik bölünmesi sonucu oluşurlar. Ancak, kemik iliği kökenli de olabilirler. Fagositoz özelliği intravital boya (tripan mavisi) veya özel madde (çini mürekkebi) enjeksiyonları ile gösterilebilir (19).

Eskiden Pit hücreleri olarak bilinen NK hücresi ya da büyük granüllü lenfosit (LGL) oldukları gösterilen bir grup hücre de bu bölgede bulunmaktadırlar. Çeşitli viral ajanlara karşı karaciğeri korurlar.

2.3.3.3. Karaciğerin Yenilenmesi (Rejenerasyon)

Karaciğer olağanüstü bir yenilenme yeteneğine sahiptir. Karaciğer dokusunun cerrahi yolla çıkarılmasından ya da hepatotoksik maddelerin (karbontetraklorür, kloroform) verilmesinden kısa bir zaman sonra organ normal ağırlığını yeniden kazanır (18). Sıçanlarda karaciğerin %75'i çıkarılırsa bir ay içinde kaybedilen dokunun yerine konduğu görülür. İnsanlarda bu özellik biraz daha sınırlıdır (3). Rejenerasyon geride kalan hepatositlerin mitozu ve büyümeleri ile sağlanır. Rejenere olan karaciğerde parankimal hücrelerin normalden büyük olduğu ve binükleer hücrelerin çoğaldığı görülür. Hepatositlerde meydana gelen mitoz kanda dolaşan şalon (Chalon) denen mitoz inhibitörü maddelerle kontrol edilir. Doku hasarında ya da karaciğerin bir parçasının çıkarılmasıyla kandaki şalon miktarı düşer, mitoz baskısı kalktığından hızlı bir mitoz görülür. Rejenerasyon ilerledikçe, yapılan şalon miktarı artar, mitoz giderek azalır (20).

Sürekli ve tekrarlanan karaciğer hasarlarında karaciğer hücre rejenerasyonu ile birlikte bağ dokusu artımı da hızlandığından , giderek karaciğer bağ dokusu artar ve ve siroz denen patolojik bir durum ortaya çıkar (19).

2.4. KARACİĞER FİZYOLOJİSİ

2.4.1. Karaciğerin Fonksiyonları

Karaciğerin organizmada üstlendiği fonksiyonları ve bunların organizma için ne kadar vazgeçilmez işlevler olduğunun anlaşılabilmesi için, kanlanmasına ve genel dolaşım içerisinde yerleştiği stratejik konuma bakmak yeterlidir. Özofagusun abdominal parçasından itibaren, mide duodenum-jejenum-ileum, kalın bağırsakların tümü ve hatta dalak ve pankreasın tüm venöz kanı, içindekilerle beraber kalbe dönmeden önce işlenmek üzere karaciğerden geçmek zorundadır. Bu durum karaciğeri, organizmada aralıksız olarak sürdürülen metabolik faaliyetlerin merkezi ve can damarı konumuna getirmektedir (3).

Karaciğerin temel görevleri:

- Kanın depolanması ve filtrasyonu ile ilgili vasküler işlevi,
- Metabolik sistemin büyük bölümü ile ilgili olarak metabolik işlevleri,

-Safra kanalları ile gastrointestinal kanala akan safranın oluşumu ile ilgili salgılama fonksiyonudur (24).

2.4.1.1. Karaciğerin Depo Fonksiyonu

Karaciğer genişleyebilen bir organ olduğu için, kendi kan damarlarında büyük miktarlarda kan depolayabilir. Hepatik venlerdeki ve hepatik sinüslerdeki kan ile birlikte karaciğer normal volümü 450 ml yani yaklaşık olarak vücudun toplam kan hacminin %10'u kadardır. Sağ atriyumda basınç yükseldiği zaman karaciğerde de basınç artar ve karaciğer genişleyerek 0,5 ile 1 lt ekstra kan hepatik venler ve sinüslerde depo edilir. Bu özellikle periferik konjesyonlu kalp yetersizliğinde meydana gelir.

Böylece, aslında, karaciğer, kan hacmi azaldığında ekstra kan sağlama yeteneği olan ve kan hacmi aşırı şekilde arttığında ise kan deposu olarak görev yapabilen venöz bir organdır (24).

2.4.1.2. Karaciğerin Metabolik Fonksiyonu

2.4.1.2.1. Karbonhidrat Metabolizması

Karaciğer özellikle kanda normal glikoz konsantrasyonunun devamı bakımından önemlidir. Glikoz, fruktoz, galaktozu glikojene çevirerek depo eder (glikojenezis). Gıda alınmadığı hallerde (ya da kan şekeri düştüğünde, hipoglisemide) , karaciğer glikojeni parçalayarak enerji gereksinimini karşılamak üzere kan glikozunun normal kalmasını sağlar (glikojenolizis). Hepatosit , lipidlerin gliserol parçalarından ve aminoasitleri glikoneogenezis denilen karmaşık bir enzimatik yolla glikoz haline dönüştürür (Şiddetli egzersizlerde kaslar için glikoza gereksinim olur) (3).

2.4.1.2.2. Protein Metabolizması

Karaciğer karbonhidrat ve yağ metabolizmasındaki fonksiyonlarının çoğunu yapmasa bile vücut canlı kalmaya devam edebilir. Öte yandan vücut karaciğerin protein metabolizmasındaki işlevlerinden vazgeçemez (24). Karaciğerin protein metabolizmasındaki fonksiyonları şöyle sıralanabilir.

- Yeni amino asitlerin yapımı,
- Üre oluşumu ile amonyağın vücut sıvılarından uzaklaştırılması,
- Plazma proteinlerinin oluşumu,

Gama globulinlerin bir bölümü dışında hemen bütün plazma proteinleri , karaciğer hücrelerinde yapılırlar. Bu plazma proteinlerin % 90'ıdır. Geri kalan gama globulinler antikorlardır ve başlıca lenfatik dokudaki plazma hücrelerinde yapılırlar (24).

- Vücuttaki metabolik olaylar için önemli amino asitlerin ve öteki maddelerin birbirine dönüşümleri,
- Albumin ve globülin gibi plazma proteinlerinin sentezi,
- Esansiyel olmayan aminoasitlerin sentezi (3).

2.4.1.2.3. Yağ Metabolizması

Karaciğerin lipit metabolizması ile ilgili fonksiyonları şöyle özetlenebilir.

- Diğer vücut fonksiyonları için enerji sağlayacak yağ asitlerinin büyük bir hızla oksidasyonu,
- Lipoproteinlerin sentezi,
- Kolesterol ve fosfolipit sentezi,
- Karbonhidrat ve proteinlerin lipitlere dönüştürülmesi,
- İnce bağırsaklarda yağların emilmesinde rolü olan safra tuzları karaciğerde yapılırlar (3, 24).

2.4.1.3. Karaciğerin Diğer Metabolik Fonksiyonları

2.4.1.3.1. Vitaminlerin Depo Edilmesi

Karaciğerin iyi bir vitamin kaynağı olduğu uzun süreden beri bilinmektedir. Özellikle A vitamini başta olmak üzere, D ve B₁₂ vitaminleri de depolanır. A vitamini eksikliğini on ay, D vitamini eksikliğini üç-dört ay , B₁₂ vitamini ise en az bir yıl ya da daha uzun süre eksikliklerini önleyecek kadar depo edilebilir (24).

2.4.1.3.2. İlaçların, Hormonların ve Diğer Zararlı Maddelerin Karaciğer Tarafından Detoksifiye Edilip Atılması

Karaciğerdeki aktif kimyasal ortamın çeşitli ilaçları zehirsizleştirerek safra ile vücuttan uzaklaştırdığı iyi bilinmektedir. Aynı şekilde iç salgı bezlerinden salgılanan östrojen, kortizol, aldosteron gibi tüm steroid hormonlar ve tiroksin de karaciğer tarafından ya kimyasal olarak değiştirilir ya da dışarı atılır. Böylece karaciğer harabiyetinde, çok defa bu hormonlardan birinin ya da bir çoğunun vücut sıvılarında birikmesi, hormonal sistemin aşırı faaliyetine yol açar (24).

2.4.1.3.3 Kan Pıhtılaşması ile Karaciğerin İlişkisi

Kanda koagülasyon işleminde kullanılan maddelerin çoğu karaciğerde yapılır. Bu maddeler fibrinojen, protrombin, globulin, faktör V, faktör VII, faktör IX ve faktör X'dur. K vitamini yokluğunda bu maddelerin konsantrasyonu çok düştüğünden pıhtılaşma hemen hemen tamamen ortadan kalkar (3, 27).

2.4.1.3.4 Demir Depo Edilmesi

Vücutta kandaki hemoglobinde bulunan demir dışında, demirin en büyük bölümü normalde karaciğerde ferritin şeklinde depolanır. Karaciğer hücrelerinde, demirle az ya da çok miktarlarda birleşebilen bir protein olan apoferritin bol miktarda bulunur. Böylece vücut sıvılarında demir miktarı arttığı zaman, apoferritinle birleşerek ferritini oluşturur ve gerektiğinde başka bir yerde kullanılmak üzere saklanır. Dolaşımdaki vücut sıvılarında demir düşük bir düzeye indiğinde ferritin demiri serbestlenir. Böylece, karaciğerdeki apoferritin-ferritin sistemi bir demir deposu görevi yapar (24).

2.4.1.3.5 Safranın Sentezlenip Salgılanması

Karaciğerin önemli fonksiyonlarından biri, normal düzeyi 500 – 1000 ml/gün olan safra salgısı salgılamaktır. Safranın iki önemli işlevi vardır. Bunlardan birincisi, yağların sindiriminde ve emiliminde önemli bir rol oynar. İkinci işlevi ise kandan önemli yıkım ürünlerinin atılmasında rol oynamaktadır. Bunlar arasında özellikle, hemoglobin parçalama ürünü olan bilirübin ve karaciğer hücrelerinde sentezlenen kolesterol yer alır (25).

Safra su ve elektrolitlere ek olarak safra tuzları, safra pigmentleri kolesterol, inorganik tuzlar, yağ asitleri, bilirübin, lesitin birkaç esansiyel komponente sahiptir. Safranın bileşiminde en fazla miktarda bulunan madde safra tuzlarıdır (24, 25).

2.4.1.3.5.1. Safra Asitleri ve Tuzları

Safra asitinin insanda bulunan dört yapısı vardır. Bunlar kolit asit, kenodeoksikolik asit, deoksikolik asit, litokolik asittir. Kolit asit ve kenodeoksikolik asit karaciğerde kolesterolden sentezlenen primer safra asitleridir. Bunlar glisin ya da taurin aminoasitleri ile konjuge olmuş sodyum tuzları formunda safraya salgılanırlar. Primer safra asitleri bağırsak lümeninde bakteriler tarafından dehidroksile edilerek

deoksikolik asit ve litokolik asit denilen sekonder safra asitlerine dönüştürülürler (3, 25). Deoksikolik asit geri emilip enterohepatik dolaşıma girer, karaciğere gelir ve tekrar salgılanır. Litokolik asitin çoğu dışkıyla atılır.

Safra tuzları bağırsak kanalında iki önemli etkiye yol açarlar. İlki besindeki yağ partikülleri üzerinde deterjan etkileri vardır. Bu etki ile partiküllerin yüzey gerilimini azaltarak yağ partiküllerinin küçük parçalara ayrılmasına imkan sağlayan karıştırmayı sağlar. Buna safra tuzlarının emülsifiye edici veya deterjan fonksiyonu denir. İkinci olarak, safra tuzları yağ asitlerinin, monogliseridlerin, kolesterol ve diğer lipidlerin barsak kanalından emilimine yardım ederler. Bunu lipidlerle kompleks oluşturarak yaparlar. Oluşan komplekslere miçel adı verilir. Miçeller safra tuzlarının elektriksel yükleri nedeniyle ileri derecede çözünür maddelerdir. Lipidler bu yapı içinde mukozadan geçebilir özellik kazanırlar ve daha sonra absorbe olurlar. Bağırsakta safra tuzları olmadığında, lipidlerin % 40'ı feçesle kaybedilir ve kişide buna bağlı olarak metabolik yetmezlik gelişir (24). Bu durumda yağda eriyen vitaminlerin ciddi malabsorpsiyonu da gelişir. Terminal ileum rezeksiyonu veya ince bağırsağın bu bölümdeki bir hastalık nedeniyle safra tuzlarının geri emilimi engellendiğinde, dışkıda yağ yine artar, çünkü enterohepatik dolaşımın engellendiği bu koşullarda karaciğer, safra tuzu yapım hızını, karşılamaya yetecek derecede arttıramamaktadır (25).

2.4.1.3.5.2. Bilirubin Oluşumu

Bilirubin hem (demir) metabolizmasının son ürünü olup , karaciğer ve dalakta yıkılan yaşlı kırmızı kan hücrelerinden kaynaklanmaktadır (21). Hemoglobini oluşturan hem ve globulin yapısı ayrılır. Globulin genel protein havuzuna dahil olurken hem'den demirin ayrılmasıyla bilirubin oluşur. Daha sonra ayrılan bu demir tekrar kullanılır. Bilirubinün yaklaşık % 80'i mononükleer fagositik sistem de hem'in yıkılmasıyla oluşurken, geri kalan kısmı da olgunlaşmamış kırmızı kan hücrelerinden miyoglobulin ve sitokromlar gibi kimyasal olarak hemoglobinle ilişkili bileşiklerden kaynaklanır (3).

İndirek Bilirubin: Bilirubin lipofiliktir ve salınmadan önce hepatik enzimlerle konjuge hale gelmelidir. Serbest bilirubin plazmada proteine, başlıca albumine bağlı olarak taşınır. Bilirubinün plazmada proteine bağlanması onun dokularca tutulmasına engel olur. İndirekt bilirubin olasılıkla karaciğer hücrelerinin membranlarındaki

reseptöre bağlandıktan sonra hücre içine alınır. Hücre içi proteinlere, özellikle ligantine bağlanır. Ligantin bilirubini glukuronil transferaz ile konjuge edilerek bilirubin diglukuronit'e çevrildiği ER'a taşır. Daha ileri aşamada enerji gerektiren bir işlemle bilirubin glukuronit (konjuge=direkt=suda çözünebilen bilirubin) safra kanaliküllerine salınır. Direkt bilirubin polardır bu nedenle ince bağırsaktan emilemez. Kolonda bakterilerce indirgenerek ürobilinojen denen renksiz bileşiğe dönüşür. Ürobilinojenin çoğu bağırsak bakterileri tarafından okside edilerek sterkobilin'e dönüştürülür. Dışkının rengini veren madde sterkobilindir. Ürobilinojenin çok az bir kısmı kolon mukozasından emilerek portal dolaşıma aktarılır ve böbreğe gelir. Burada sarı renkli ürobiline çevrilerek atılır ve idrarın rengini bu madde verir. Bilirubin, serumdaki düzeyi 35-40 µmol/l'den fazla olduğu zaman deri ve skleranın rengini bozan sarı bir pigmenttir. Bu halde idrar çay gibi koyu renklidir, bilirubinüri (indirekt bilirubin suda erimediğinden idrara da geçemez.)(3, 21, 24, 25).

2.4.1.3.5.3 Safra Taşları

Kolelitiazis, yani safra taşlarının oluşması, sık rastlanan bir durumdur (25). Safra taşı, böbrek taşlarının aksine kalsiyum içermez (sadece % 10'u radyopak olan kalsiyum içerir). Safra taşlarının ana bileşeni kolesteroldür (3). Safra taşlarının oluşumunda üç etmen sorumlu tutulabilir. Bunlardan biri safra stazıdır; bu durumda, safra taşları, safra yollarında akan safradan çok, kesede biriken safrada oluşur. İkincisi, safranın kolesterolle aşırı doymasıdır. Kolesterol safra içinde çözünmeyerek, safra tuzları ve lesitinin sadece belirli derişimlerinde, çözeltide miçeller içinde bulunur (25). Safra taşları safra akımını bloke edebilir ve safra kanalikülleri çevresindeki sıkı bağlantıların parçalanmasıyla sarılığa (kanda artmış safra pigmentleri) neden olabilir (3, 25).

2.5. METOTREKSAT

Metotreksat (MTX), bir folat asit antagonistidir. İlk olarak 1948 yılında çocuklarda akut lösemi tedavisinde kullanılmıştır (26). Metotreksat, lösemi, karsinoma, osteosarkoma tedavisinde sıklıkla kullanılan antineoplastik ilaçlardan biridir. Metotreksat; kanser tedavisinin dışında; romatoid artrit, psoriasis, lösemi, sarkoidoz, vaskulit diğer otoimmün rahatsızlıklarda da kullanılan etkili bir ilaçtır (27, 28). Sitotoksik ilaçlar yalnız kanser hücrelerine karşı değil, sağlıklı ve malign bütün hızlı bölünen hücreleri etkilerler. Bu nedenle yaygın toksik etkileri vardır (8). Klinikte geniş kullanım alanları olmasıyla birlikte, karaciğer üzerine toksik etkisinden dolayı daha fazla önem kazanmıştır (9). MTX'in karaciğer dışında; böbrek, ince barsak, kemik iliği, akciğer gibi organlar üzerinde de önemli hasarlara sebep olduğu bilinmektedir (10).

Metotreksat antimetabolit grubu neoplastik bir ilaçtır. Kimyaca folik asidin 4-amino, N₁₀-metil analogudur. Vitamin şeklinde besinler içinde alınan veya bağırsak florasinca oluşturulan folik asidin (folat'ın) vücuttaki yararlı şekli, folinik asid ve diğer tetrahidrofolat türevi koenzimlerdir (11, 29). Folik asit bağırsaklardan emildikten sonra hücrede NADPH bağımlı dihidrofolat redüktaz tarafından tetrahidrofolat formuna indirgenir. Metotreksat hücreye normalde N₅-metil FH₄'ün taşınmasını sağlayan aktif transport mekanizması ile taşınır. Yüksek konsantrasyonlarda difüzyon yoluyla hücreye girebilir (29). Metotreksat dihidrofolata yüksek afinite gösterir. Metotreksat yapısal olarak folik asite benzer ve dihidrofolatı (FH₂) tetrahidrofolata (FH₄) indirgeyen dihidrofolat redüktazı inhibe eder. Böylece tetrahidrofolat sentezi inhibe olur. Tetrahidrofolat sentezinin inhibisyonu timidilat ve purin nukleotidlerinin (adenin ve guanin) biyosentezinin durmasına yol açar (30). DNA molekülü, RNA'daki urasil yerine timin içerir. Tetrahidrofolat, deoksiuridilik asitin (dUMP) deoksitimidilik asite (dTMP) dönüşümü için gereklidir. Bu dönüşüm olmayınca timidilat sentezi durur. Bu yapı taşlarının üretilmemesi hücre çoğalması için gerekli olan DNA ve RNA'nın sentezini ve enerji üretimi için gerekli ATP üretimini inhibe eder (31). Bu da hücre ölümüyle gerçekleşir (26, 29). Tetrahidrofolatın kendisi gibi MTX de hücre içerisinde poliglutamatla birleşir. Bu bileşik büyük molekülü olduğundan ve negatif

elektrik yükü yüksek olduğundan hücre dışına çıkamaz (32). Engüçlü neoplastik etkilerini S fazında gösterirler (8).

Folik asidin, dihidrofolat (FH₂) üzerinden tetrahidrofolat'a (FH₄'e) dönüşümü şu şekilde olur.



Kanda bulunan folatların sonuna bağlı tek bir glutamat bulunmasına rağmen hücre içerisine giren folat poliglutamat formuna çevrilir. Bu formları genellikle hücre içerisinde tutulur ve monoglutamatlara oranla daha etkili kofaktörlerdir. Metotreksat da poliglutamat formuna metabolize edilir. Bu özelliği önemlidir çünkü dihidrofolat redüktazı da inhibe eden poliglutamatlar hücre dışında ilaç bulunmasa da hücre içindeki varlıklarını sürdürürler. Oysa metotreksat hücre dışındaki ilaç konsantrasyonu azalmaya başlar başlamaz hücreden çıkmaya başlamaktadır. Bu nedenle idrar pH'ının yüksek tutulması ve hastanın iyi hidrate edilmesi, böbrek fonksiyonlarının korunması açısından çok önemlidir (29).

MTX; psoriasis ve romatoid artrit gibi bazı inflamatuvar hastalıkların tedavisinde tek ilaç olarak etkilidir (27, 33). Osteosarkoma, intrakranial lenfoma ve çocuklarda lösemi gibi hastalıkların tedavisinde tek ilaç şeklinde veya kombine tedavi olarak kullanılır. Standart dozlara direnç gelişimi nedeniyle 1970 yılından sonra intermedia (0.5-1 gr/m²) ve yüksek dozlarda (> 1 gr/m²) kullanılmaya başlanmıştır (28, 34). Yüksek doz tedavi sonucunda; kemik iliği baskılanması, mukozit, kusma, diyare, gastrointestinal ülserler, deri ülserleri gibi yan etkilerinin olmasının yanında en önemli etkisi karaciğer toksisitesidir (27, 35). Yüksek doz MTX tedavisinden sonra 24-48 saatlik periyotlarda plazmadaki MTX konsantrasyonuna bakılmalıdır ve hastalara azalan folat seviyesini yükseltmek için lökovorin (5-formly-tetrahydrofolic acid; LV) verilmelidir. Yüksek dozda uygulanan MTX tedavisinde rutin kullanılan LV etkisizdir. MTX plazmada yükselmeye başladığı anda LV'ye ihtiyaç duyulabilir (34).

2.6. NAC (N-ASETİLSİSTEİN)

Asetilsistein, doğal bir aminoasit olan L-sisteinin N-asetillenmiş türevidir. Solunum yollarında mukolitik ve ekspektoran etkileri vardır. Asetilsistein, sahip olduğu sülfhidril grubu ile mukus glikoproteini içerisindeki disülfid bağlarını parçalayarak mukusun DNA fibrillerini depolimerize edici etki gösterir. Mukusun viskozitesini bu mekanizmayla azaltır. Solunum yollarında toplanan balgamın yoğunluğunu ve yapışkanlığını azaltır, akıcı hale getirir. Ayrıca yapısındaki reaktif SH grubu kimyasal radikallere bağlanarak detoksifiye edici etki gösterebilmektedir (11).

Asetilsistein antioksidan bir maddedir (36). Asetilsistein akciğer ve karaciğerde glutatyon sentezine katılır ve sistein vererek glutatyon sentezini artırır. Asetilsistein ve glutatyon karaciğerde nötrofillerin oluşturduğu serbest oksijen radikallerini bağlar ve muhtemel hücre hasarını önleyerek koruyucu etki gösterir. NAC hepatotoksisite üzerindeki etkisini, önemli bir faktör olan glutatyon sentezini artırarak, direkt "serbest oksijen radikali süpürücü" olarak etki göstererek veya stabil nitroozil türevleri oluşturarak gerçekleştirir (37). Örneğin metotreksat normal şartlarda karaciğerde metabolize edilirken az bir bölümü sitokrom P 450 enzim sistemi üzerinden reaktif bir ara metabolite dönüşür (38, 39). Bu ara metabolit de glutatyon ile konjuge edilir ve idrar ile atılır. Yüksek doz metotreksat verilmesiyle, bu reaktif ara metabolitin oluşumu artar; glutatyonun azalmasıyla ara metabolitin inaktivasyonu da azalır (40). Bu durumda uygulanan asetilsistein, karaciğer hücrelerinde glutatyonun normal düzeylerine çıkmasını sağlar ve glutatyon reaktif metabolite bağlanarak olası hücre hasarını önler. NAC oral olarak uygulandıktan sonra hızlı bir şekilde absorbe edilir. İlk olarak akciğer, böbrek ve karaciğere geçer. Mide ve barsak sıvılarında stabildir. Akciğer ve plazmada asetilsistein hem serbest hem de disülfid köprüleri yardımıyla proteinlere geri dönüşümlü olarak bağlanmış halde bulunur (41). Karaciğerde metabolize edilir ve böbrek, karaciğer ve akciğerler yolu ile vücuttan atılır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Afyon Kocatepe Üniversitesi (AKÜ) Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenen ve AKÜ Veteriner Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanan bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nde yapıldı. Bu merkezden temin edilen Wistar Albino cinsi, 40 adet (250-300 gr) erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar rastgele seçilerek 4 gruba ayrıldı. Sıçanlar 10 gün süresince 12 saat aydınlık/karanlık ışık döngüsünde, normal oda sıcaklığı ve neminde tutuldu, standart pellet yem ve musluk suyu ile beslendi. Gün aşırı içme suları değiştirildi ve kafes temizliği yapıldı. Çalışmanın 10. gününün sonunda karaciğer dokuları alındı. % 10'luk nötral tamponlu formaline konularak fikse edildi.

Toplam 4 deney grubu şu şekilde oluşturuldu.

Kontrol Grubu (Grup 1) (n:10) : Herhangi bir ilaç uygulamadan sadece % 0.9 sodyum klorür 0.5 ml intraperitoneal (i.p) olarak uygulandı.

Metotreksat Grubu (Grup 2) (n:10) : İlk iki gün bu gruptaki sıçanlara da % 0.9'luk sodyum klorür 0.5 ml (i.p) olarak uygulandı. Deneyin 3. günü Metotreksat (Sigma; St Louis MO, USA) 100/mg/kg (i.p) tek doz uygulandı.

Metotreksat + NAC (N-Asetilsistein) Grubu (Grup 3) (n:10): Metotreksat uygulamasından iki gün önce NAC (Hüsnü Arsan Ltd Şti.) 180 mg/kg/i.p olacak şekilde uygulandı, ardından 3. gün tek doz Metotreksat 100 mg/kg/i.p uygulandı ve NAC verilmesi işlemine 7 gün daha devam edildi.

NAC (N-Asetilsistein) Grubu (Grup 4) (n:10): Deney süresince sıçanlara 180 mg/kg/i.p NAC verildi.

3.2. Dokuları Histolojik İncelemeye Hazırlama

Çıkartılan dokular 24 saat % 10'luk nötral tamponlu formaldehit solüsyonu içinde tespit edildi. İlk aşama olarak doku fiksasyonu (tespiti) metoduna göre sağlandı (Tablo 2).

Tablo 2. Doku Takibi Metodu

Formaldehit	24-48 saat
Çeşme suyu	6-8 saat veya bir gece
% 70 Alkol (I)	1 saat
% 70 Alkol (II)	1 saat
% 80 Alkol	1 saat
% 96 Alkol (I)	1 saat
% 96 Alkol (II)	1 saat
% 100 (Absolü) Alkol (I)	1 saat
% 100 Alkol (II)	1 saat
Ksilen (I)	1 saat
Ksilen (II)	1 saat
Ksilen (III)	1 saat
Parafin (I)	1 saat
Parafin (II)	1 saat

Parafine gömülen dokulardan mikrotom ile 4µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler preparat haline getirilerek ışık mikroskopik inceleme için rutin hematoxilen-eozin boyasıyla boyandı.

Tablo 3: Hematoksilen-Eozin Boya Prosedürü

Etüvde deparafinizasyon	45-60 dakika
Ksilen I	15 dakika
Ksilen II	15 dakika
Ksilen III	15 dakika
% 100 (Absolü) Alkol	2 dakika
% 96 Alkol	2 dakika
% 80 Alkol	2 dakika
% 70 Alkol	2 dakika
Çeşme Suyu	2 dakika
Distile Suda Çalkala	15-30 saniye
Hematoksilen	4-12 dakika (*)
Çeşme Suyu	2 dakika
Eozin	15 saniye-2 dakika
% 80 Alkol	Daldır çıkar
% 96 Alkol	2 dakika
% 100 Alkol	2 dakika
% 100 Alkol	2 dakika
Ksilen I	5 dakika
Ksilen II	5 dakika
Ksilen III	5 dakika
Entellan ile kapat	

Sonuç: Hücrelerin nükleusları hematoksilen ile mavi-mor boyanırken, sitoplazma eozin ile pembe renkte boyanır.

Her gruba ait karaciğer kesitleri histolojik olarak sinüzoidal dilatasyon, hepatosit dejenerasyonu, vasküler konjesyon ve inflamatuvar infiltrasyon bulguları dikkate alınarak incelendi. Her bir kesit 0-3 arasında (sırası ile hasar yok, az hasar, orta derecede hasar ve şiddetli hasar) skorlandı (42, 43, 44).

Normal karaciğer	0 (0)
Az hasar	+ (1)
Orta derecede hasar	++ (2)
Şiddetli hasar	+++ (3)

3.3. İstatistiksel Yöntemler

İstatistiksel analiz SPSS 9.05 ile yapıldı. Elde edilen veriler ortalama \pm standart hata (SEM) olarak alındı. Grupların homojenitesi Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Grupların karşılaştırması Kruskal Wallis H Testi ile yapıldı. Gruplar arası analiz (ikili karşılaştırma) ise Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. Elde edilen “p” değerinin <0.05 olması istatistiksel olarak anlamlılık ifadesi oldu.

4. BULGULAR

MTX'a bağılı oluşturulan hepatotoksik doku hasarları Tablo 4'de gösterilmiştir. Karaciğer dokusunda meydana gelen sinüzoidal dilatasyon, hepatosit dejenerasyonu, vasküler konjesyon-tromboz, inflamatuvar infiltrasyon; MTX grubu ve MTX+NAC grubunda kontrol grubuna göre artmış bulundu.

Tablo 4:Gruplara ait histolojik değişikliklerin skorlarını gösteren tablo. Değerler ortalama \pm standart hata (SEM) olarak verilmiştir. Grup 1: Kontrol, Grup 2: Metotreksat, Grup 3: Metotreksat+N-Asetilsistein, Grup 4: N-Asetilsistein. A.D.: İstatistiksel olarak anlamlı değil ($p>0.05$)

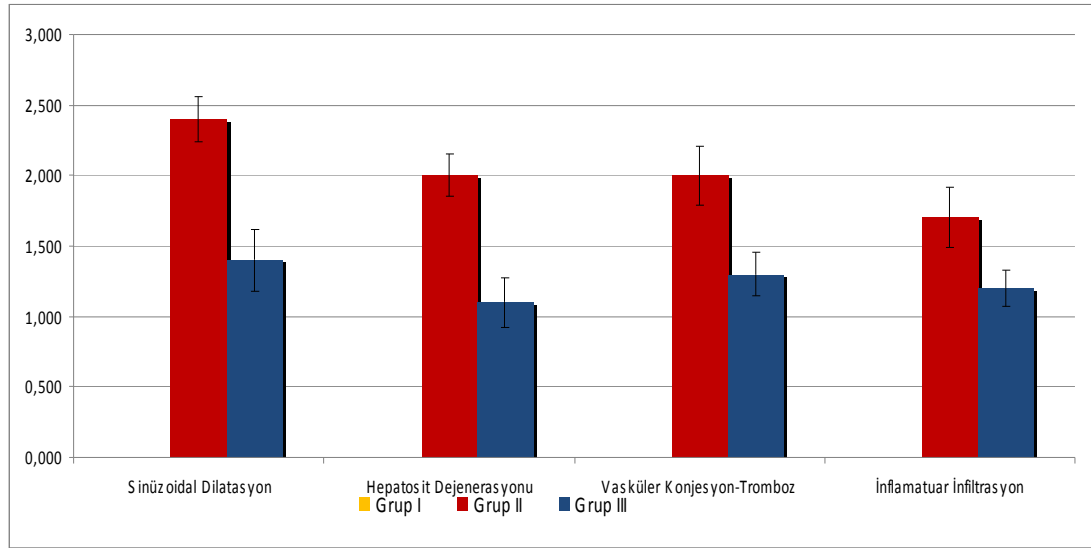
Grup	Sinüzoidal Dilatasyon	Hepatosit Dejenerasyonu	Vasküler Konjesyon-Tromboz	İnflamatuvar İnfiltrasyon
I (n:10)	0.000 \pm 0.000	0.000 \pm 0.000	0.000 \pm 0.000	0.000 \pm 0.000
II (n:10)	2.400 \pm 0.163	2.000 \pm 0.149	2.000 \pm 0.211	1.700 \pm 0.213
III (n:10)	1.400 \pm 0.221	1.100 \pm 0.180	1.300 \pm 0.153	1.200 \pm 0.133
IV (n:10)	0.300 \pm 0.153	0.200 \pm 0.133	0.300 \pm 0.153	0.200 \pm 0.133
P değeri				
I-II	0.000	0.000	0.000	0.000
I-III	0.000	0.000	0.000	0.000
II-III	0.004	0.002	0.019	A.D.
I-IV	A.D.	A.D.	A.D.	A.D.

Kontrol grubu ve MTX grubunda meydana gelen değişiklikler değerlendirildiğinde MTX grubunda sinüzoidal dilatasyon, hepatosit dejenerasyonu, vasküler konjesyon-trombozis ve inflamatuvar infiltrasyon gibi hepatotoksik hasarların meydana geldiği tespit edildi. MTX grubunda oluşan bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$) (**Tablo 4**).

Kontrol grubu ve MTX+NAC grubunda meydana gelen değişiklikler değerlendirildiğinde gruplar arasında oluşan bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$) (**Tablo 4**).

MTX grubu ve MTX+NAC grubunda meydana gelen değişiklikler açısından istatistiksel analiz yapıldığında sinüzoidal dilatasyon, hepatosit dejenerasyonu, vasküler konjesyon-tromboz parametreleri için gruplar arasında anlamlı bir farklılık olduğu gözlenmiştir ($p<0.05$). Fakat inflamatuvar infiltrasyon açısından gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamsız olduğu bulunmuştur. ($p>0.05$) (**Tablo 4**).

Kontrol grubu ve NAC grubu sinüzoidal dilatasyon, hepatosit dejenerasyonu, vasküler konjesyon-tromboz, inflamatuvar infiltrasyon hasarları açısından karşılaştırıldığında bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. ($p>0.05$) (**Tablo 4**).



Grafik1: Kontrol, MTX (Grup 2) ve MTX+NAC (Grup 3) gruplarındaki doku hasarlarının karşılaştırılması.

Grafik 1’de, sinüzoidal dilatasyon, hepatosit dejenerasyonu, vasküler konjesyon-tromboz ve inflamatuvar infiltrasyon gibi doku hasarlarının karşılaştırılmasında MTX+ NAC grubunda MTX grubuna göre doku hasarlarında azalma görülmüştür.

Kontrol Grubu:

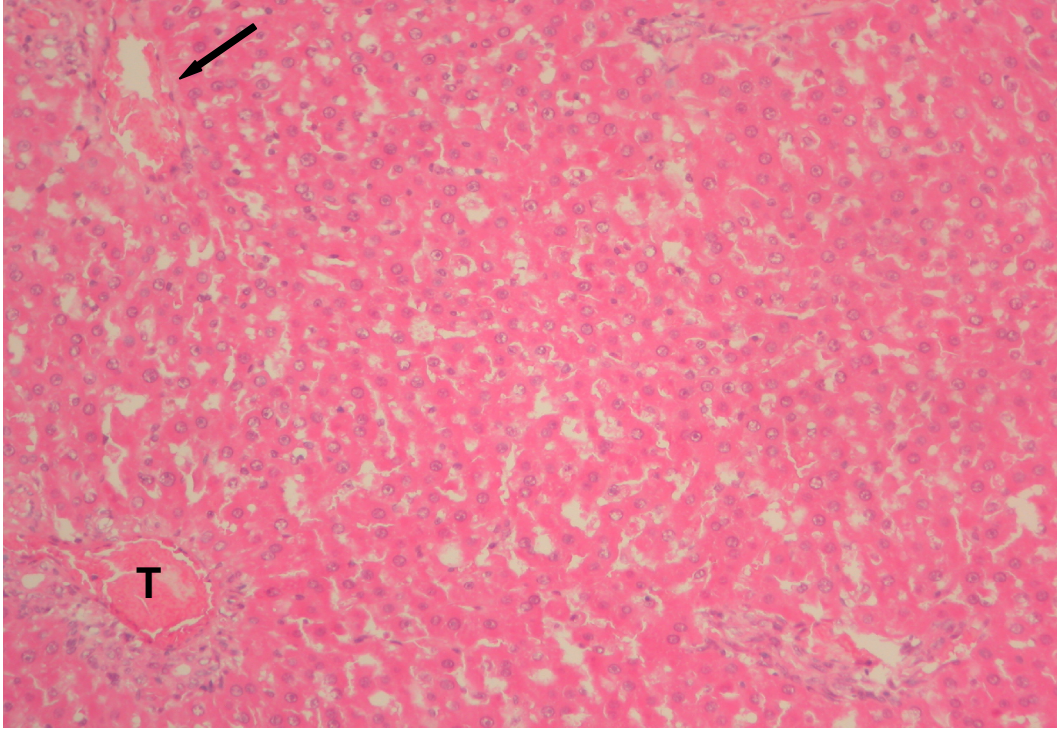
Kontrol grubundan alınan ratların karaciğer kesitlerinde normal histolojik görünümde oldukları izlendi. Karaciğer parankim hücreleri olan hepatositlerin santral venler etrafında düzenli şekilde yerleşerek hepatosit kordonlarını oluşturduğu görüldü. Hepatosit kordonları arasında sinüzoidlerin yer aldığı izlendi. Hepatositler veziküler nükleusa ve asidofilik stoplazmaya sahipti. Hepatik lobüllerin etrafında yer alan portal alanlarda portal vene ait dal, arteriyol ve safra duktusunun olduğu gözlemlendi (**Resim 1**). Bu alanda sinüzoidal dilatasyon, hepatosit dejenerasyonu, vasküler konjesyon-tromboz, inflamatuvar infiltrasyon bulgularına rastlanmadı.



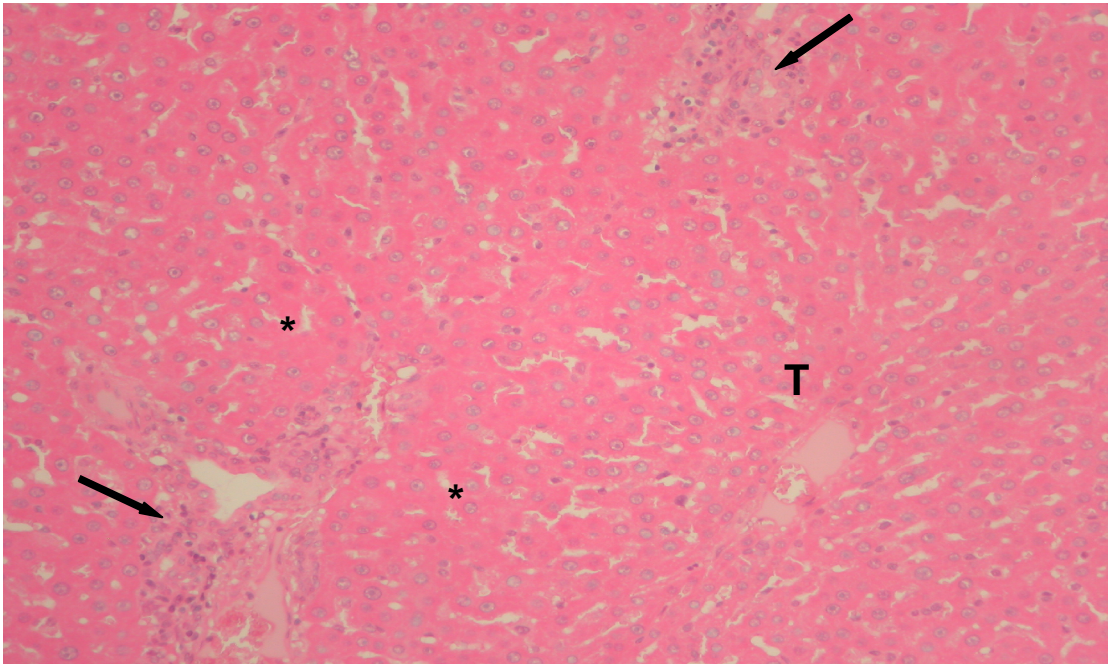
Resim 1: Kontrol grubuna ait rat karaciğerinden histolojik bir görünüm. Hepatositler, sinüzoidler ve santral ven (CV) normal olarak izlenmekte. H-E X 20.

MTX Grubu:

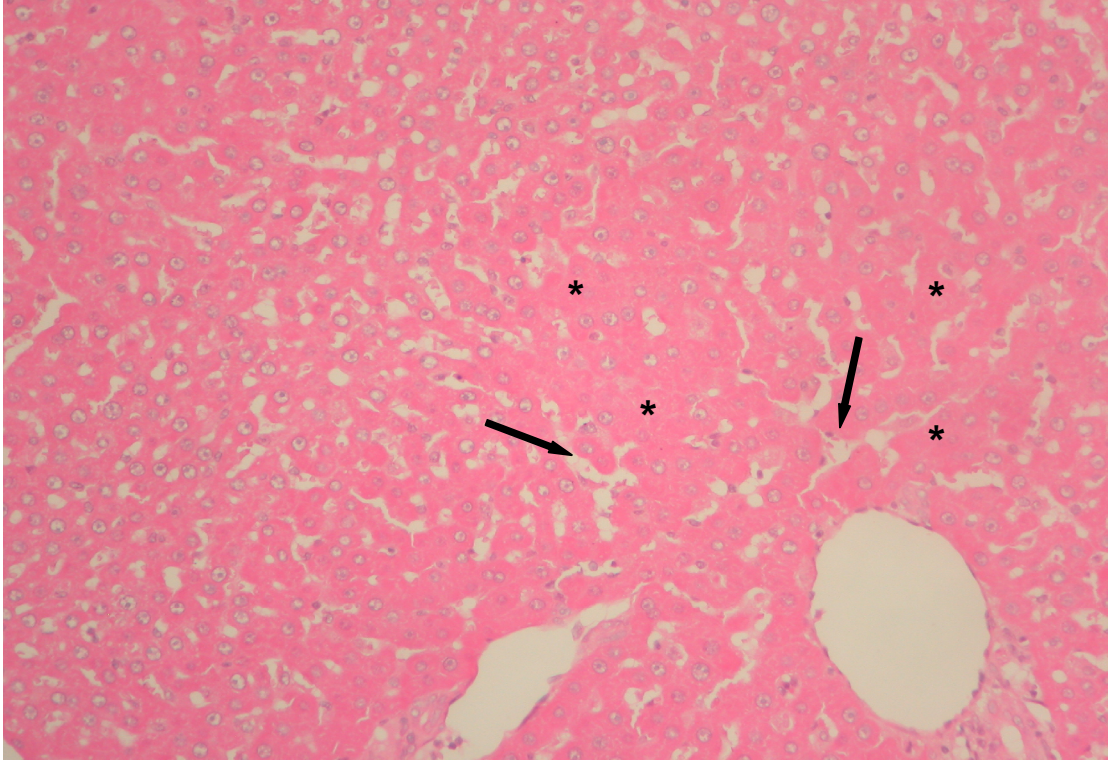
MTX verilen ratlara ait karaciğer dokularının ışık mikroskopik incelemesinde sinüzoidal dilatasyon, hepatosit dejenerasyonu, vasküler konjesyon-tromboz ve inflamatuvar infiltrasyon izlendi (**Resim 2,3-4**). Buna bağlı olarak MTX uygulanan gruptaki ratlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tüm parametreler açısından hasarın artmış olduğu izlendi ($P < 0.001$).



Resim 2: Metotreksat grubuna ait rat karaciğerinden histolojik bir görünüm. Vasküler konjesyon (ok)-tromboz (T). H-E X 20.



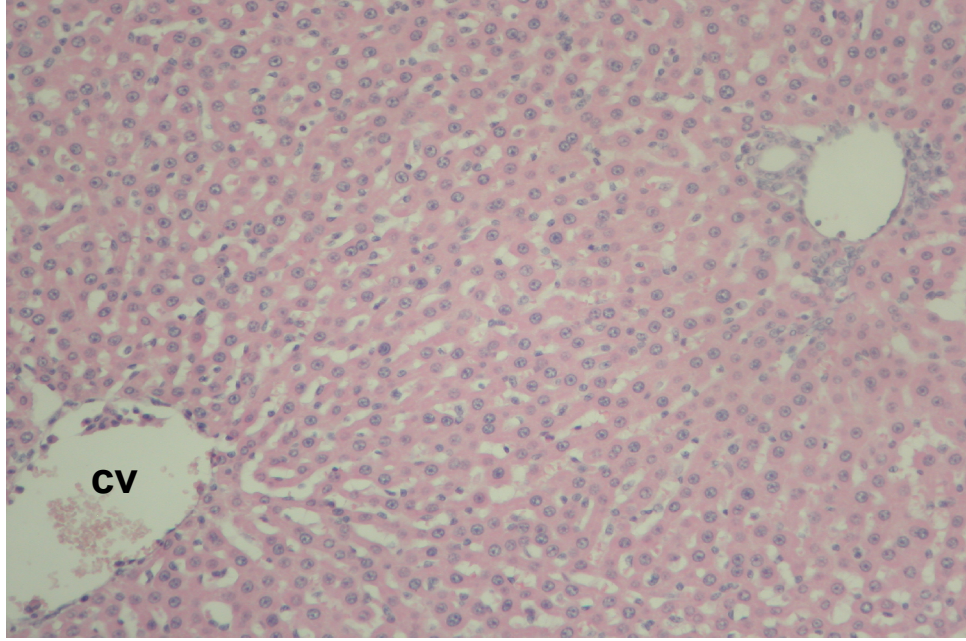
Resim 3: Metotreksat grubuna ait rat karaciğerinden histolojik bir görünüm. Hepatosit dejenerasyonu (yıldız), vasküler tromboz (T), inflamatuvar infiltrasyon (ok) görülmekte. H-E X 40.



Resim 4: Metotreksat grubuna ait rat karaciğerinden histolojik bir görünüm. Sinüzoidal dilatasyon (ok), hepatosit dejenerasyonu (yıldız). H-E X 40.

MTX+ NAC Grubu :

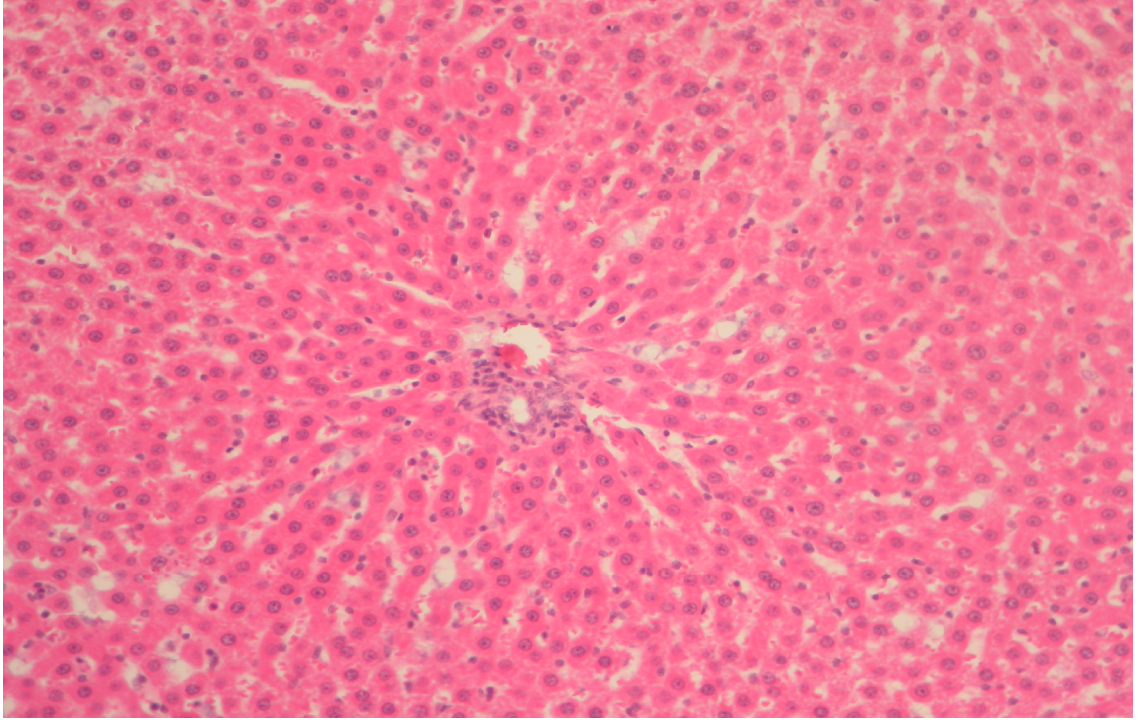
MTX + NAC grubuna ait rat karaciğerlerinin histolojik incelenmesinde sinüzoidal dilatasyon, hepatosit dejenerasyonu, vasküler konjesyon-tromboz, açısından gözlenen değişikliklerin tek başına MTX uygulanan gruba göre belirgin ve istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) bir şekilde azalma gösterdiği izlendi (**Resim 5**). İnflamatuvar infiltrasyon açısından aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamsız olduğu gözlemlendi.



Resim 5: MTX+NAC grubuna ait rat karaciğerinden histolojik bir görünüm. Sinüzoidal dilatasyon, hepatosit dejenerasyonu, vasküler konjesyon-trombozun kısmen azalmış olduğu izlenmektedir. H-E X 20.

NAC Grubu :

NAC uygulanan ratların karaciğerlerinin histolojik özellikleri kontrol grubundaki ratların karaciğerlerinin özelliklerinden farklı değildi. Stroma ve parankima normal görünüm sergilemekteydi (**Resim 6**). Çalışmada incelenen parametrelere göre iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi .



Resim 6: NAC grubuna ait rat karaciğerinden alınmış histolojik bir görünüm. Kontrol grubundaki rat karaciğerleriyle benzer özellikler göstermektedir. H-E X 20.

5. TARTIŞMA

Yüzyılın en önemli problemlerinden biri olan kanser, yan etkileriyle insan yaşamını olumsuz yönde etkileyebilen hastalıklardan biridir. Kanser tedavisinde etkin olarak kullanılan ilaçlardan birisi de metotreksatdır (MTX). MTX kanser tedavisi dışında romatoid artrit (33, 45), psoriasis (27), ektopik gebelik (46), Crohn hastalığı ve ülseratif kolit (46) gibi hastalıkların tedavisinde de kullanılan bir ilaçtır. Fakat MTX'in etkinliği; toksik skalası ve yan etkilerinden dolayı sınırlanmıştır. Örneğin MTX kullanımıyla oluşan ince barsak hasarı malabsorbsiyon ve diyare ile sonuçlanır. Böylece kilo kaybı meydana gelir. Çalışmalarda yüksek doz uygulanan MTX ile akut böbrek yetmezliklerinin oluştuğu rapor edilmiştir (47). Yüksek doz MTX'in hepatotoksisiteye yol açması sık olarak gözlenir ve bu durum kanser hastasının sağlık durumunu kötü yönde bozabilmektedir (48).

MTX, kemoterapotik ve immunosupresif madde olarak pek çok romatizmal, dermatolojik ve hematolojik hastalıkların tedavisinde kullanılan antimetabolit bir ilaçtır. Buna rağmen, steatozis (vücutta aşırı yağ toplanması), kolestazis (safra akımının kesilmesi), fibrozis (bağ dokusu artımı) ve sonuç olarak siroz gibi ciddi yan etkilere sebep olabilir (7). Bu yan etkileri nedeniyle kullanımı sınırlıdır. Bununla birlikte yüksek dozlarda uygulanan MTX'in hepatotoksisiteye yol açması sıklıkla görülür ve kanser hastasının durumunu bozabilir. MTX hücre içinde poliglutamat formda saklanır. İlaç sadece malign hücrelere karşı değil tüm hücrelere karşı etki göstererek hepatotoksisiteye sebep olur. Özellikle yüksek oranda kendini yenileyebilen kemik iliği hücreleri, mukozal hücrelere de toksik etki gösterirler. Epitel hücrelerindeki proliferasyon diferansiyasyon arasındaki dengesizlik; epitel hücrelerinin erken ölümüne neden olur. Bu da mukozal bariyerdeki yaralanmalara ve enterekolite sebep olur. Yüksek doz uygulanan MTX renal tübüllerde çökmeye neden olup akut renal yetmezlik ile sonuçlanabilir (49, 50). MTX eliminasyonundaki gecikme sonucunda nefrotoksisite oluşur. MTX'in toksik etkilerinin görülebilmesi, doz skalası ve tedavinin uzunluğu, hastanın risk faktörleri ve hastalığın tipi ve genetik faktörler gibi bazı faktörlere bağlıdır. Renal yetersizlik, alkol tüketimi, diyabet, yaşlılık da toksisiteye eşlik eden diğer faktörlerdir. MTX'in yan etkilerinden kaçınmak için folik asit tedavisi önerilmektedir. Eklenen folik asit takviyesi ile

gastrointestinal yan etkilerden, kemik iliği depresyonu ve mukozitiden kaçınılabılır fakat hepatotoksik gelişim etkileri sınırlıdır.

Son zamanlarda MTX ile indüklenmiş hepatotoksitenin serbest oksijen radikallerinin artmasına bağlı olarak meydana gelen oksidatif stresin artmasından kaynaklandığı rapor edilmiştir.

Karaciğer, toksik kimyasal maddelerin atılımı ve detoksifikasyonunda önemli rolü olan bir organdır. MTX ve metabolitlerinin vücuttan atılımında hepatobiliyer sistem, böbrekler ile birlikte çalışır. MTX böbreklerden sonra en fazla karaciğerde biriktiğinden dolayı, yüksek doz uygulanması hepatotoksositeye neden olabilir (38, 51). Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların yan etkilerinin ortadan kaldırılabilmesi veya en aza indirgenebilmesi için alternatif yollar denenmektedir. Bunlardan biri de istenmeyen yan etkileri önleyecek veya azaltacak diğer bir ajanın antineoplastik ajan ile birlikte kullanılmasıdır. Literatürde kanser tedavisinde kullanılan MTX'in hepatotoksik etkilerini azaltmak amacıyla L-Karnitin (42), nikotinamid (52), metionin (52), melatonin (53, 54), ursedoksikolik asit (UDCA) (9), folik asit (55) gibi antioksidan maddelerin koruyucu etkilerinin olduğunu gösteren birçok deneysel çalışmalar yapılmıştır.

Serbest radikallerin zararlı etkileri, bazı maddeler tarafından azaltılır veya tamamen ortadan kaldırılır. Bunlardan biri de NAC'dır. NAC *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda geniş kullanım alanı bulunan antioksidan bir maddedir. Güçlü antioksidan özelliği ile kanser tedavisinde, kalp hastalıkları, kolit ve pankreatitte parasetamol toksisitesinde ve bütün serbest oksidatif hasar ile karakterize bütün durumlarda kullanılmaktadır (56, 57). NAC'ın serbest radikaller tarafından oluşturulan doku hasarına karşı koruyucu etkisi olduğu ve bu etkisini GSH düzeyini artırarak, direkt olarak serbest oksijen radikali süpürücü olarak etki göstererek veya stabil nitrozotil türevleri oluşturarak gerçekleştirdiği bildirilmektedir (12).

MTX'in hepatotoksik etkilerinin üzerine NAC'ın koruyucu etkisinin oksidan ve antioksidan parametrelere bakılmaksızın sadece histopatolojik skorlarla değerlendirilmesi çalışmamızın sınırlayıcı faktörüdür.

Bu çalışmada tek doz olarak uygulanan MTX'in karaciğer üzerindeki hasarına karşı NAC'ın koruyucu etkisi ışık mikroskopik düzeyde incelenmiştir.

Histolojik incelemede sinüzoidal dilatasyon, hepatosit dejenerasyonu, vasküler konjesyon ve trombozis, inflamatuvar infiltrasyon bulgularının şiddet ve yaygınlığı dikkate alınarak incelendi.

Kontrol grubu ve MTX grubunda meydana gelen değişiklikler değerlendirildiğinde MTX grubunda sinüzoidal dilatasyon, hepatosit dejenerasyonu, vasküler konjesyon-trombozis ve inflamatuvar infiltrasyon gibi hepatotoksik hasarların meydana geldiği tespit edildi. MTX grubunda oluşan bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$). (Tablo 4).

Kontrol grubu ve MTX+NAC grubunda meydana gelen değişiklikler değerlendirildiğinde gruplar arasında oluşan bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$). (Tablo 4).

MTX grubu ve MTX+NAC grubunda meydana gelen değişiklikler açısından istatistiksel analiz yapıldığında sinüzoidal dilatasyon, hepatosit dejenerasyonu, vasküler konjesyon-tromboz parametreleri için gruplar arasında anlamlı bir farklılık olduğu gözlenmiştir ($p<0.05$). (Tablo 4). Fakat; inflamatuvar infiltrasyon açısından gruplar arasındaki farkın anlamsız olduğu bulunmuştur. ($p>0.05$) (Tablo 4).

Kontrol grubu ve NAC grubu sinüzoidal dilatasyon, hepatosit dejenerasyonu, vasküler konjesyon-tromboz, inflamatuvar infiltrasyon hasarları açısından karşılaştırıldığında bu iki grup arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. ($p>0.05$) (Tablo 4).

Şener ve ark. yaptığı çalışmada (42), tek doz metotreksat 20 mg/kg/i.p olarak uygulanmış ve sonrasında beş gün süre ile L-Karnitin 500 mg/kg uygulanmış ve çalışma sonunda karaciğer dokuları alınarak histolojik açıdan incelenmiştir. Çalışmada MTX grubunda dejenere hepatositler, sinüzoidlerde dilatasyon, vasküler konjesyon, bulgularının olduğu gözlenmiştir. Bu parametreler dikkate alındığında bizim çalışmamızda da benzer bulguların meydana geldiğini söyleyebiliriz.

Uraz ve ark. yapmış olduğu (9) MTX'in karaciğer üzerindeki hasarına karşı UDCA (Urseloksikolik asit)'nin koruyucu etkisini araştırdığı çalışmasında; MTX tek doz olarak 20 mg/kg/i.p olarak uygulanmıştır. MTX uygulanan grupta yalnızca hepatosit nekrozu meydana geldiği görülmüştür. Bizim yaptığımız çalışmada ise sinüzoidal dilatasyon, hepatosit dejenerasyonu, vasküler konjesyon-trombozis,

inflatuar infiltrasyon bulguları gözlenmiştir. Çalışmamızda uygulanan MTX dozunun daha fazla olması hepatotoksik etkilerini arttırdığını düşündürmektedir.

Al-Motabagani'nin yaptığı çalışmada (46), iki haftalık çalışma süresi boyunca 3, 6 ve 9. haftalarda MTX 0.5 mg/kg/i.p (düşük doz) olarak uygulanmış ve çalışma sonunda karaciğer dokuları histolojik açıdan değerlendirilmiştir. MTX grubunda portal alanlarda ağır hücre infiltrasyonuna, hepatosit stoplazmasında vakualizasyona rastlanmıştır. Bizim çalışmamızda ise; MTX'in yüksek dozdan uygulanmasıyla (100 mg/kg/i.p) bu sonuçlara ek olarak sinüzoidal dilatasyon, vasküler konjesyon ve trombozis bulgularının meydana geldiği izlenmiş. Dozun artırılmasının bu sonuçta etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Reaktif oksijen metabolitleri organ yetmezliklerinin patogeneğinde ve bazı ksenobiyotiklerin renal ve hepatik toksisitesinde rol oynar ve bu da MTX'in hepatik toksisitede rol oynadığını düşündürür (58). MTX, dihidrofolatın tetrahidrofolata redüksiyonunu katalizleyen dihidrofolat redüktaz enzimini bağlar. Bu enzim, DNA sentezi ve hücre bölünmesinde önemli olan pürin, pirimidin ve timidilat sentezi için gereklidir. Yüksek doz uygulanan MTX ile hepatositlerdeki DNA sentezi inhibe edilir ve böylece hücre nekrozu gerçekleşir.

Jahovic ve ark yaptığı bir çalışmada (53) tek doz 20 mg/kg MTX uygulanmış ve beş gün boyunca 10 mg/kg melatonin verilmiştir. Karaciğer ve böbrek dokularına ait oksidan ve antioksidan parametreler incelenmiştir. MTX uygulanmasıyla Malondialdehit (MDA) seviyesinde artış ve GSH seviyesinde azalma saptanmıştır. MDA seviyesindeki artış nötrofil infiltrasyonunun bir göstergesi olarak kabul edilir.

Serbest radikaller paylaşılmamış elektron içeren reaktif ve kısa ömürlü moleküllerdir. Bu moleküller hem normal metabolizmanın yan ürünü olarak, hem de ilaçların ve diğer zararlı kimyasal maddelerin etkisiyle oluşabilmektedir. Serbest radikaller nükleik asitler, serbest aminoasitler, proteinler, lipitler, lipoproteinler, karbonhidratlar ve bağ dokusu makromolekülleri de dahil olmak üzere, canlı organizmanın yapısındaki hemen hemen tüm biyomoleküllerle reaksiyona girerek bunlar üzerinde geri dönüşlü ya da geri dönüşsüz etkiler meydana getirebilmektedirler (12). Serbest radikallerin oluşum hızı, bunları etkisiz hale getiren savunma sistemlerinin hızı ile dengede olduğu sürece, organizma etkilenmez. Ancak bu denge bozulursa, serbest radikaller zararlı olmaya baslar ve oksidatif stres olarak

etkilerini gösterirler (59). Hücreler, reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerine karşı antioksidan savunma sistemleri ile korunurlar. Savunma sistemleri enzimatik (Methemoglobin redüktaz, Süperoksit dismutaz, Katalaz, Glutasyon peroksidaz, Glutasyon redüktaz, Glutasyon S-transferaz) ve nonenzimatik (Glutasyon, vitamin E, vitamin C, redükte nikotinamid adenin dinükleotit-NADH⁺, redükte nikotinamid adenin dinükleotit fosfat-NADPH) olmak üzere iki grupta toplanabilirler. Non-enzimatik endojen antioksidanların en önemlilerinden biri glutasyon (GSH)'dur (60).

Glutasyonun (GSH) hücre, doku ve organ sistemlerinin bütünlüğünün yapısal ve fonksiyonel olarak korunmasında antioksidan bir molekül olarak önemi büyüktür. Glutasyon, biyolojik olarak iki önemli yapıyı (tiyol grubu ve γ -glutamin bağı) yapısında bulundurur. Yapısındaki sistein tiyol grubundan ve yüksek konsantrasyonundan dolayı (0.1- 10 mM) hücre içinde önemli bir antioksidan olan glutasyonun % 99'undan fazlası indirgenmiş formda bulunur (60, 61). Bu formda tutulabilmesi pentoz fosfat metabolik yoluna bağlıdır. Bu yolda üretilen NADPH, glutasyon disülfid redüktaz (GR)'ın katalize ettiği reaksiyonda koenzim olarak görev alır. GSH, DNA'nın deoksiribonükleozid öncüllerinin oluşması için ribonükleotidlerin indirgenmesinde kullanılır. Eritrosit hariç tüm hücrelerde gözlenen GSH salınımı, homeostatik mekanizmalar için önemli bir faktördür. GSH, akciğer, bağırsak, böbrek ve kısmen karaciğer gibi eksojen kaynaklara direkt olarak maruz kalabilen organlar için önemlidir. Karaciğer ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu devreye giren ve aynı zamanda GSH için ana depo olan bir organdır. Glutasyon en yüksek hücre içi derişime (10 mM) hepatositlerde ulaşır. Hepatositler bir yandan potansiyel toksinlere karşı GSH'ı kullanırlarken, bir yandan da GSH'ı sentezleyebilen hayli özelleşmiş hücrelerdir. Ksenobiyotiklere maruz kalan hayvanların hepatositlerinde GSH tükenmekte, ardından karaciğer hasarı meydana gelmektedir (12, 62, 63).

AL-Ali ve ark yaptığı çalışmada da (64) yüksek doz alınan parasetamole bağlı oluşan hepatotoksisitede NAC'ın karaciğeri koruyucu etkinliğinden bahsedilmiş ve NAC'ın parasetamol toksisitesine karşı koruyucu etkinliğini gösteren GSH seviyelerini artırdığı görülmüştür.

Rodrigues ve ark koroner arter hasarında (KAH) oksijen radikallerine karşı NAC'ın koruyucu etkinliğini araştırdığı çalışmasında (65); KAH'da vasküler kas

kontraksiyonlarının ve endotel kaslarındaki gevşeme döneminin azaldığı görülmüş ve bundan da oksidatif stresin sebep olduğu sonucu çıkarılmıştır. NAC'ın da endotel fonksiyonları geliştirici etkisinden bahsedilmiştir.

Kaya ve ark. (66) Siklosporin'in (CsA) oluşturduğu hepatotoksisiteye karşı NAC'ın koruyucu rolünü histolojik olarak incelediği çalışmasında; portal alan çevresinde hücre infiltrasyonu, sinüzoidal dilatasyon, orta düzeyde konjesyona, santral ven çevresinde multifokal nekroz alanlarına rastlanmıştır. CsA (15 mg/kg/s.c) uygulamasından sonraki onbir gün boyunca NAC 150 mg/kg/i.m dozda uygulanmıştır. Sonuçta; CsA+NAC uygulanan grupta yalnız CsA uygulanan gruba göre hepatositlerdeki sitoplazmik değişikliklerde ve diğer bulgularda azalma meydana geldiği görülmüştür. Bizim çalışmamızın; özellikle çocukluk çağı kanserlerinin tedavisinde kullanılan MTX'in ve bu çalışmada da etkinliği gösterilmiş olan NAC'ın bir arada kullanılmasıyla bundan sonra yapılacak olan çalışmalara ışık tutabileceği düşüncesindeyiz.

Çıralık ve ark. (56) MTX'in ince barsakta meydana getirdiği hasara karşı NAC'ın koruyucu etkinliğini incelediği çalışmasında; tek doz 20 mg/kg/i.p dozda MTX uygulamasından sonra 150 mg/kg/i.p dozda 5 gün süre ile NAC uygulanmıştır. Çalışmanın sonunda incelenen ince barsak kesitlerinde NAC uygulanmasıyla birlikte, epiteliyal atrofi, kript kaybı, lamina propria inflamatuvar infiltrasyon ve goblet hücre kaybı bulgularının azaldığı görülmüştür. Aynı zamanda NAC uygulanmasıyla antioksidan enzim seviyelerinde de artış görülmüştür. Çetinkaya ve ark. yapmış olduğu çalışmada (67), MTX'in oluşturduğu böbrek hasarına karşı NAC'ın koruyucu etkisi incelenmiştir. MTX 20 mg/kg/i.p tek doz uygulanmış ve sonrasında 150 mg/kg/i.p NAC 5 gün süre ile uygulanmıştır. Çalışmanın sonrasında oksidan antioksidan parametreler incelenmiştir. NAC uygulanmasıyla birlikte GSH seviyesinde artış olduğu tespit edilmiştir.

Gökçimen ve ark. doksorubisin (20 mg/kg/i.p) uygulanmasıyla oluşan hepatotoksisiteye karşı NAC, CAPE (caffeic acid phenethyl ester) ve E vitaminini antioksidan maddeler olarak kullanmış ve etkilerini karşılaştırmışlardır (68). Doksorubisin uygulanmasından sonra 8 gün süre ile antioksidan maddelerin verilmesine devam edilmiştir. Bizim çalışmamızdaki sonuçlara benzer olarak karaciğerde sinüzoidal dilatasyon, hepatosit dejenerasyonu gibi bulgulara

rastlanmıştır. Doksurubisin ve Doksurubisin+NAC verilen gruplar karşılaştırıldığında NAC'ın diğer antioksidan maddelere göre koruyucu etkisinin daha az olduğu görülmüştür.

NAC'ın farklı organlarda yapılan çalışmalarda da antioksidan bir madde olarak etkinliğinin olması nedeniyle biz de çalışmamızda farklı dozlarda NAC ve MTX uygulayarak karaciğer dokusundaki hasarda NAC'ın etkinliğini görmek istedik.

MTX ile ilgili farklı organlarda ve farklı antioksidan maddelerle yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır. Yüncü ve ark yaptığı çalışmada (6), MTX'in ince barsak mukozasında hasar neden olduğu ve E vitamini verilen grupta bu hasarın azaldığı sonucuna varmışlardır.

Sonuç olarak;

* MTX'in yüksek tek doz kullanımı karaciğerde sinüzoidal dilatasyon, hepatosit dejenerasyonu, inflamatuvar infiltrasyon ve vasküler konjesyon-tromboz gibi morfolojik hasarlar oluşturmaktadır.

* NAC'ın güçlü bir antioksidan olması özelliği ile uygulanması sonucunda MTX'in karaciğerde yapmış olduğu hasarı azaltıcı yönde etki göstermiştir.

* MTX uygulamasıyla meydana gelen toksik etkilerin azaltılmasında NAC'ın alternatif bir tedavi olarak kullanılabilceği düşüncesindeyiz.

* NAC'ın antioksidan etkinliğinin tedavi edici dozlarının ve uygulama sürelerinin daha iyi tespit edilebilmesi için; antioksidan sistemde yer alan enzim aktivitelerinin ve bu enzimlere bağlı son ürünlerin de yer aldığı parametrelerin, ileri araştırmalar ile çalışılması faydalı olacaktır.

6) KAYNAKLAR

- 1) Ozan H. (2004) Karaciğer, In: Ozan H.(ed) Ozan Anatomi, Ankara, Nobel Tıp Kitabevi.
- 2) Sarsılmaz M. (2000) Karaciğer, In: Sarsılmaz M. (ed) Anatomi, Ankara, Nobel Yayın Dağıtım.
- 3) Karaöz E. (2002) Sindirim Sistemi Histolojisi, In: Karaöz E. (ed) Özel Histoloji, SDÜ Basımevi.
- 4) Aktümsek A. (2001) Anatomi ve Fizyoloji (İnsan Biyolojisi) (1. Baskı). Nobel Yayın Dağıtım, Ankara.
- 5) William K.O., Patrick C.N. (2009) Karaciğer, In: Müftüoğlu S., Kaymaz M., Atilla P. (eds) Netter's Essential Histology, Ankara, Güneş Kitabevi.
- 6) Yüncü M., Kanter M., (2006) Farelerde Metotreksatın İnce Barsak Mukozasında Yaptığı Hasara Karşı E vitamininin Koruyucu Etkisi: Elektron Mikroskopik Çalışma. Tıp Araştırmaları Dergisi **4 (2)** : 1-6.
- 7) Çetinkaya A., Bulbuloglu E., Kurutaş Ergul B., ve ark. (2006) N- Acetylcysteine Ameliorates Methotrexate- Induced Oxidative Liver Damage in Rats. Med Sci Monit **12 (8)**,274-278.
- 8) Reide P., Taylor M. (2000) Antimetabolitler, In: Ozer H . (ed) Mosby's Crash Course Farmakoloji, 1. Baskı, Ankara, Güneş Tıp Kitabevi.
- 9) Uraz S., Tahan V., Aygun C., ve ark. (2007) Role of ursedeoxycholic acid in prevention of methotrexate-induced liver Toxicity. *Dig Dis Sci* DOI 10.1007/s10620-007-9949-3.
- 10) Olson J. (2000) Klinik Farmakoloji, 1.Baskı, Ankara, Hacettepe Taş Yayıncılık.
- 11) Kayaalp O. (2002) Kayaalp Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 10. Baskı, Ankara, Hacettepe Taş Yayıncılık.
- 12) Aydoğdu N., Kaymak K., Yalçın Ö. (2005) Sıçanlarda Böbrek İskemi/Reperfüzyon Hasarında N-Asetilsisteinin Etkileri. *Fırat Tıp Dergisi* **10(4)**, 151-155.
- 13) <http://www.octc.kctcs.edu/gcaplan/anat2/notes/Notes8%20Digestive%20Anatomy%20II.htm>.

- 14) Moore K. M. (2002) Karaciğer Safra Kesesi ve Safra Yollarının Gelişmesi, In: Yıldırım M., Okar İ., Dalçık H. (eds) *Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi*, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri.
- 15) Şeftalioğlu A. Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi. 3. baskı. Tıp teknik yayıncılık Ltd. Şti. Ankara 1998:301-302.
- 16) Sadler T.W. (2005) Karaciğer ve Safra Kesesi, In: Başaklar C. *Langman's Medikal Embriyoloji*, Ankara, Palme Yayıncılık.
- 17) Lauren J.S. (1998) Formation of Liver, In: Hiram T.G. (ed) *Basic Concepts in Embryology: A Students Survival Guide*, United States, McGraw- Hill Companies.
- 18) Junqueira L.C., Carneiro J. (2003) Karaciğer, In: Aytekin Y., Solakoğlu S. (eds) *Temel Histoloji : Text & Atlas*, Nobel Matbaacılık.
- 19) Yağmurca M. (2003) Karaciğer Histolojisi (*Ind ed*).In: Dilek O.N. (ed) *Karaciğer*. AKÜ Yayınları, Afyon.
- 20) Paker Ş. (1993) Karaciğer, In: Paker Ş. (ed) *Histoloji*, Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı Yayınları.
- 21) Abraham L.K. (2006) Karaciğer , In: Demir R. (ed) *Histoloji ve Hücre Biyolojisi: Patolojiye Giriş*, Ankara, Palme Yayıncılık.
- 22)<http://www.octc.kctcs.edu/gcaplan/anat2/notes/Notes8%20Digestive%20Anatomy%20II.htm>.
- 23) http://www.meddean.luc.edu/lumen/MedEd/Histo/frames/h_fram19.html.
- 24) Guyton AC., Hall J.E. (1999) Bir organ olarak karaciğer, In: Çavuşoğlu H. (ed) *Tıbbi Fizyoloji*, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri.
- 25) Ganong WF. (2002) Karaciğer ve safra sistemi, In: Türk Fizyolojik Bilimler Derneği. (eds) *Ganong Tıbbi Fizyoloji*, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri.
- 26) Page CP., Curtis MJ., Sutter MJ., Walker MJ., Hoffman BB. (eds), (1997) *Pharmacology, (Second Edition)*, Barcelona, Mosby.
- 27) Şendur N., Karaman G., Şavk H., ve ark. (2002) Akut Metotreksat Toksisitesinin Erken Belirtisi ; Deri Ülserleri. *T Klin Tıp Bilimleri* **22**, 593-596.
- 28) Totan M., Ak AH. R., Albayrak D., (1999) Yüksek Doz Metotreksat Tedavisine Bağlı Karaciğer ve Böbrek Toksisitesi. *T Klin J Pediatr* **8**, 185- 188.

- 29) Mycek MJ ., Harvey R.A., Champe P.C. (1997) Anti Metabolitler, In: Berkman K., Oktay Ş., Onat F., Gören Z. (eds) Lippincott's Illustrated Review Serisinden: Farmakoloji, 2. *Baskı* , İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri.
- 30) Rosenfeld G.C., Loose D.S. (1999) Antimetabolitler, In: Selçukbiricik S. (ed) Farmakoloji, (*Second Edition*), , İstanbul, Nobel Tıp kitabevleri.
- 31) Gözükara E.M. (1997) Biyokimya 2 (3. *Baskı*). Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
- 32) Allison A.C. (2000) Immunosuppressive Drugs: The first 50 Years and a glance forward. *Immunopharmacology* **47**, 63-83.
- 33) Tuncay R., Ekşioğlu E., Gürçay E. (2006) Romatoid Artritli hastalarda ikinci basamak ilaç kullanım sürelerinin toplam hastalık sürelerine oranları ve ilaçların kesilme nedenleri. *Türk Fiz Tıp Rhab Derg* **52**, 158-62.
- 34) Treon SP., Chabner BA. (2001) Concepts in use of high-dose methotrexate therapy. *Clin Chem* **42**, 1322-1329.
- 35) Goto E., Tomojiri S., Okamoto I. (2001) Methotrexate poisoning with acute hepatorenal dysfunction. *Clinical Toxicology* **39**, 101-104.
- 36) Cuzzocrea S., Mazzon E., Costantino G., et al. (2000) Effects of n-acetylcysteine in a rat model of ischemia and reperfusion injury. *Cardiovascular Research* **47**, 537-548.
- 37) Thong – Ngam D., Samuhasaneeto S., Kulaputana O., (2007) N- Acetylcysteine Attenuates Oxidative Stres and Liver Pathology in Rats With Non- Alcoholic Steatohepatitis. *World J Gastroenterol* **28; 13(36)** , 0000-0000.
- 38) Süzer Ö., (2002) Karaciğer Hastalıklarında İlaç Kullanımı ve Hepatotoksik Etkileri. Hepato- Bilier Sistem ve Pankreas Hastalıkları Sempozyum Dizisi **28**, 37-42.
- 39) Vural N. (1996) Karaciğer Zehirleri, In: Vural N. (ed) Toksikoloji, Ankara, Ankara Üniversitesi Basımevi.
- 40) Zhang Shui- Jun., Ma Ting- Wu., Ma Xiu- Xian., et al. (2006) Protective Effects of N- Acetylcysteine on Brain- Dead Rat Liver. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* **5**, 428-431.
- 41) Awi W., Valery R., Ron B.A., et al. (2000) N-Acetyl-L-Cysteine for preventing lung reperfusion injury after liver ischemia-reperfusion. *Transplantation* **69(5)**, 853-859.

- 42) Şener G., Ekşioğlu- Demiralp E., Çetiner M., ve ark. (2006) L-Carnitine Ameliorates Methotrexate-Induced Oxidative Organ Injury and Inhibits Leukocyte Death. *Cell Biology and Toxicology* **22**, 47-60.
- 43) Songur, A., N. Akpolat, I. Kus, O. A. Ozen, I. Zararsiz ve M. Sarsilmaz. (2003) The Effects of The Inhaled Formaldehyde During The Early Postnatal Period in The Hippocampus of Rats: A Morphological and Immunohistochemical Study. *Neurosci Res Commun*, **33**, 168-178.
- 44) Sahin, O., O. Sulak, Y. Yavuz, E. Uz, I. Eren, H. R. Yilmaz, M. A. Malas, I. Altuntas, A. Songur. (2006) Lithium-Induced Lung Toxicity in Rats: The Effect Of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE). *Pathology* **38**, 58-62.
- 45) Tilling L., Townsend S., David J. (2006) Methotrexate and hepatic toxicity in rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis. *Clin Drug Invest* **26**, 55-62.
- 46) Al- Motagabani M.A., (2006) Histological and Histochemical Studies on the Effects of Methotrexate on the Liver of Adult Male Albino Rat. *Int. J. Morphol* **24(3)**, 417-422.
- 47) Behnam S.E., Eliason M. (2004) A Comparison of the hepatotoxicity caused by different schedules of methotrexate administration. *J Am Acad Dermatol* **22**, 552
- 48) SY Al-Ali., IM Hassan., S Sadek. (2005) Ultrastructural changes in rat livers perfused in vitro and in vivo with a high dose of methotrexate. *Histol Histopathol* **20**, 1131-1145.
- 49) Öktem F., Yilmaz H. R., Ozguner F., ve ark. (2006) Methotrexate – Induced Renal Oxidative Stres in Rats . The Role of a Novel Antioxidant Caffeic Acid Phenethyl Ester. *Toxicol Ind Health* , **22**, 241-247.
- 50) Devrim E., Çetin R., Kılıçolu B., ve ark. (2005) Methotrexate Causes Oxidative Stress in Rat Kidney Tissues. *Renal Failure* **27**, 771- 773.
- 51) Uz E., Öktem F., Yılmaz H.R., et al. (2005) The activities of purine-catabolizing enzymes and the level of nitric oxide in rat kidneys subjected to methotrexate: Protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Molecular and Cellular Biochemistry* **277**, 165-170.
- 52) Kröger H., Hauschild A., Ohde M., et al. (1999) Nicotinamide and Methionine Reduce the Liver Toxic Effect of Methotrexate. *General Pharmacology* **33**, 203-206.

- 53) Jahovic N., Çevik H., Şehirli A.Ö., ve ark (2003) Melatonin Prevents Methotrexate- Induced Hepatorenal Oxidative Injury in Rats. *J Pineal Res* **34**, 282-287.
- 54) Sener G., Tosun O., Şehirli A.Ö., ve ark. (2003) Melatonin and N-Acetylcysteine Have Beneficial Effects During Hepatic Ischemia and Reperfusion. *Life Sciences* **72**, 2707-2718.
- 55) Sultana F., Mehboobali N., et al. (2001) Folinic acid protects against suppression of growth by methotrexate in mice. *Biopharm. Drug Dispos* **22**, 169-178.
- 56) Çıralık H., Bulbuloğlu E., Çetinkaya A., ve ark. (2006) Effects of N-Acetylcysteine on Methotrexate-Induced Small Intestinal Damage in Rats. *The Mount Sinai J Med* **73**, 1086-92.
- 57) Bruck R., Frenkel D., Shırn N., et al. (1999) Hypothyroidism protects rat liver from acetaminophen hepatotoxicity. *Digestive Diseases and Sciences* **44**, 1228-35.
- 58) Kumar O., Sugendran R., Vijayaraghavan R., (2003) Oxidative Stress Associated Hepatic and Renal Toxicity Induced by Ricin in Mice. *Toxicon* **41**, 333-338.
- 59) Phillips Darren C., Woollard Kevin C., Griffiths Helen R., (2003) The Antiinflammatory Actions of Methotrexate are Critically Dependent Upon the Production of Reactive Oxygen Species. *Br J Pharmacol* **138(3)**, 501-511.
- 60) Aksoy Y. (2002) Antioksidan mekanizmada glutasyonun rolü. *T Klin J Med Sci* **22**, 442-448.
- 61) Burçak G., Andıcan G. (2004) Oksidatif DNA hasarı ve yaşlanma. *Cerrahpaşa J Med* **35**, 159-169.
- 62) Çavdar C., Sifil A., Çamsarı T. (1997) Hastalıkların patogenezi ve tedavisinde reaktif oksijen partikülleri ve antioksidanlar. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* **3-4**, 96-101.
- 63) Ellenhorn M.J. (ed), (1997), *Ellerhorn's Medical Toxicology Diagnosis and Treatment of Human Poisoning*, (Second Edition), USA, Williams & Wilkins Company.
- 64) Al-Ali A.K., Al-Mustafa Z.H., Qaw F.S. et al. (1998) Paracetamol-induced hepatotoxicity : Lack of enhancement of the hepatoprotective effect of n-acetylcysteine by sodium sulphate. *Inflammopharmacology* **6**, 235-241.

- 65) Rodrigues A.J., Evora P.R.F., Schaff H.V., (2004) Protective Effect of N-Acetylcysteine Against Oxygen Radical-Mediated Coronary Artery Injury. *Braz J Med Biol Res* **37**, 1215-1224.
- 66) Kaya H., Koç A., Sogut S., ve ark. (2008) The Protective Effect of N-Acetylcysteine Against Cyclosporine A- Induced Hepatotoxicity in Rats. *J. Appl. Toxicol* **28**, 15-20.
- 67) Çetinkaya A., Kurutaş E.B., Bulbuloğlu E., ve ark. (2006) The Effects of N-Acetylcysteine on Methotrexate- Induced Oxidative Renal Damage in Rats. *Nephrol Dial Transplant* **22**, 284-285.
- 68) Gokçimen A., Cim A., Tola HT., ve ark. (2007) Protective Effect of N-Acetylcysteine , Caffeic Acid and Vitamin E on Doxorubicin Hepatotoxicity. *Human & Experimental Toxicology* **26**, 519-525.