



**ASETAMİNOFEN İLE OLUŞTURULAN KARACİĞER HASARINDA
BORİK ASİTİN VASKÜLARİZASYON VE REJENERASYON ÜZERİNE
ETKİSİNİN HİSTOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ VE ÜÇ BOYUTLU
MODELLENMESİ**

Müşerref Şeyma CEYHAN

**DOKTORA TEZİ
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

HAZİRAN 2024

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Müşerref Şeyma CEYHAN

24/06/2024

ASETAMİNOFEN İLE OLUŞTURULAN KARACİĞER HASARINDA BORİK ASİTİN
VASKÜLARİZASYON VE REJENERASYON ÜZERİNE ETKİSİNİN HİSTOLOJİK
OLARAK İNCELENMESİ VE ÜÇ BOYUTLU MODELLENMESİ

(Doktora Tezi)

Müşerref Şeyma CEYHAN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran 2024

ÖZET

Asetaminofen, analjezik ve antipiretik etkinliği nedeniyle yaygın olarak kullanılan bir ilaçtır. Yüksek dozda alındığında organ yetmezliğine kadar ilerleyen karaciğer hasarına yol açabilmektedir. Türkiye dünyanın en önemli bor rezervlerinin bulunduğu coğrafyalardan biridir. Esansiyel bir element olduğu düşünülen borun bir bileşiği olan borik asit ile ilgili son zamanlarda yapılan çalışmalar borik asitin anti-inflamatuar ve antioksidan etkisinin olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada, asetaminofen kaynaklı karaciğer hasarında borik asitin vaskülarizasyon ve rejenerasyon üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla 35 adet Sprague Dawley cins erişkin, erkek sıçan her grupta 7 hayvan olacak şekilde rastgele 5 gruba ayrıldı. Gruplar, kontrol grubu, asetaminofen grubu, asetaminofen verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan grup, asetaminofen verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan grup ve borik asit uygulanan grup olacak şekilde düzenlendi. Asetaminofen verildikten 24 saat sonra denekler sakrifiye edildi. Elde edilen kan örneklerinde biyokimyasal olarak ALT, AST, GGT, total bilirubin, ALP ve glukoz değerlendirildi. Karaciğer örneklerinde hepatik hasar ve glikojen kaybı ile VEGF-A, AFP ve PCNA ifadeleri histokimyasal ve immünohistokimyasal yöntemler ile değerlendirildi. Karaciğer hasarındaki histopatolojik değişikliklerin daha iyi anlaşılması için üç boyutlu modelleme yapıldı. Asetaminofen ile oluşturulan karaciğer hasarında borik asit uygulaması sonucu sentrilobüler nekroz, vasküler konjesyon, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve hemorajiyi içeren hepatik hasarın, glikojen kaybının, ALT, GGT ve total bilirubin seviyesinin azaldığı görülürken VEGF-A ifadesinin ve PCNA pozitif hücre yüzdesinin arttığı görüldü. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde asetaminofen uygulamasının karaciğerde hasara yol açtığı ve hasar sonrası farklı zamanlarda uygulanan borik asitin bu hasarı azalttığı gözlemlenmiştir.

Bilim Kodu : 1033
Anahtar Kelimeler : Asetaminofen, Borik asit, Karaciğer hasarı, Rejenerasyon
Sayfa Adedi : 131
Danışman : Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU
İkinci Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Zeynep YIĞMAN

HISTOLOGICAL INVESTIGATION AND THREE DIMENSIONAL MODELING OF
THE BORIC ACID EFFECTS ON VASCULARIZATION AND REGENERATION IN
ACETAMINOPHEN-INDUCED LIVER INJURY

(Ph. D. Thesis)

Müşerref Şeyma CEYHAN

GAZİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

June 2024

ABSTRACT

Acetaminophen is a commonly-used drug due to its analgesic and antipyretic effects. Overdosing of acetaminophen may lead to liver damage, which may result in organ failure. Türkiye is one of the geographical regions that has the most important boron reserves in the world. The latest studies about boric acid, a compound of boron considered as essential element, revealed antiinflammatory and antioxidant effects. In this study, we aimed to investigate the effects of boric acid on vascularization and regeneration in acetaminophen-induced liver injury. 35 adult, male Sprague Dawley rats were randomly divided into 5 groups, each containing 7 rats. Groups were designed as control, acetaminophen, boric acid treatment 1 hour after acetaminophen administration, boric acid treatment 8 hours after acetaminophen administration and boric acid groups. After 24 hours of acetaminophen application, animals were sacrificed. ALT, AST, GGT, total bilirubin, ALP and glucose levels were evaluated biochemically and hepatic injury, glycogen depletion, VEGF-A, AFP and PCNA expressions were evaluated histochemically and immunohistochemically using the liver and blood samples collected at the end of experiments. Three-dimensional modeling was constituted to better demonstrate the histopathology of liver injury. Boric acid treatment in acetaminophen-induced liver injury resulted in a decrease in hepatic injury including centrilobular necrosis, vascular congestion, inflammatory cell infiltration and hemorrhage, glycogen depletion, ALT, GGT and total bilirubin levels on the other hand an increase VEGF-A expression and PCNA positive cell percentage occurred. Results showed that boric acid treatment at different time points of acetaminophen induced liver injury reduced the severity of damage.

Science Code : 1033
Key Words : Acetaminophen, Boric acid, Liver injury, Regeneration
Page Number : 131
Supervisor : Prof. Dr Suna ÖMEROĞLU
Co Supervisor : Assit. Prof. Dr. Zeynep YIGMAN

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmam boyunca engin bilgisiyle bana yol gösteren, önderlik eden ve desteğini esirgemeyen, bu uzun ve zorlu yolda beni cesaretlendirip her zaman yanımda olan değerli hocalarım, danışmanım Sayın Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU ve eş danışmanım Sayın Dr. Öğretim Üyesi Zeynep YIĞMAN'a en derin şükranlarımı sunarım.

Doktora eğitimim süresince değerli bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan ve desteklerini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Çiğdem ELMAS hocam başta olmak üzere anabilim dalı öğretim üyelerimiz Sayın Prof. Dr. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU, Sayın Doç Dr. Cemile Merve SEYMEN, Dr. Öğretim Üyesi Süheyla Esra ÖZKOÇER ve Dr. Öğretim Üyesi Duygu DAYANIR hocalarıma teşekkür ederim.

Doktora tezime verdikleri önemli katkılardan dolayı Sayın Prof. Dr. Tuncay Veysel PEKER, Sayın Prof. Dr. Deniz KARÇAALTINCABA, tezimin planlanması ve hayvan deneylerini yapmamda bana destek olan Sayın Prof. Dr. Mürşide Ayşe DEMİREL'e teşekkür ederim.

Asistanlığım ve doktora eğitimim boyunca beraber iyi ve kötü zamanlar geçirdiğimiz ve her daim birbirimize destek olduğumuz sevgili Araş. Gör. Asiye Aslı EMNİYET, Araş. Gör. Deniz İrem BULUT, Araş. Gör. Pınar KAÇAMAK'a, deney sürecimde yardımlarını esirgemeyen sevgili Aslı DAĞLI ve Dr. İrem KESLER'e ve bölümümüzdeki tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Doktora eğitimim süresince her zaman yanımda olan, bana destek veren, güzel anılar biriktirdiğim değerli arkadaşlarım Uzm. Dr. Elif Seda ÖZDEMİR, Dr. Çisem YEŞİL KAYABAŞI ve Dr. Tuğba KAPUCU'ya teşekkür ederim.

İyi dilekleri ile beni her zaman destekleyip sabrı ve ilgisi ile hep yanımda olan varlığına şükrettiğim sevgili kız kardeşim Dr. Betül CEYHAN'a, ilk arkadaşım sevgili abim Kadir Tankut CEYHAN'a ve varlığı ile huzur veren kedimiz Tomtom'a en derin teşekkürlerimi sunarım.

Tüm yaşamım boyunca beni sevgi ile büyüten, akademik hayatımın iniş ve çıkışlarını benimle birlikte sabırla yaşayan, bana olan inançları ve hiç bitmeyen sevgileriyle tüm kararlarımı destekleyen sevgili annem Tayyibe CEYHAN'a ve varlığını yanımda hissettiğim sevgili babam Harun CEYHAN'a sonsuz teşekkür ve minnetlerimi sunarım. Geçmişte ve gelecekte insanlığa bırakacağım tüm eserleri size ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Karaciğer	5
2.1.1. Anatomisi	5
2.1.2. Gelişimi (embriyolojisi).....	8
2.1.3. Histolojisi	9
2.1.4. Fizyolojisi.....	14
2.2. Akut Karaciğer Hasarı ve Yetmezliği	16
2.3. Asetaminofen.....	17
2.3.1. Moleküler özellikleri ve farmakokinetiği.....	17
2.3.2. APAP'ın etki mekanizması	18
2.3.3. APAP'ın toksisitesi	19
2.4. Karaciğerin Rejenerasyonu.....	20
2.4.1. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)	22
2.4.2. Alfa fetoprotein (AFP)	23
2.4.3. Proliferatif hücre nükleer antijeni (PCNA)	24

	Sayfa
2.5. Borik Asit	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1. Kullanılan Kimyasallar	27
3.2. APAP ile Karaciğer Toksisitesinin Oluşturulması ve Tedavi Gruplarına Borik Asit Uygulaması	28
3.3. Histokimyasal ve İmmunohistokimyasal Değerlendirme.....	29
3.3.1. Dokuların toplanması ve takip edilmesi.....	29
3.3.2. Hematoksilen-Eozin (HE) boyama protokolü ve karaciğer hasarının değerlendirilmesi.....	30
3.3.3. Periyodik Asit Schiff (PAS) boyama protokolü ve boyalı kesitlerin histolojik değerlendirilmesi.....	31
3.3.4. İmmunohistokimyasal boyamalar ve boyalı kesitlerde immünoreaktivitenin değerlendirilmesi	32
3.4. Biyokimyasal Analizler	34
3.5. Üç Boyutlu Modelleme	34
3.6. İstatistiksel Analiz	35
4. BULGULAR	37
4.1. Makroskobik Bulgular	37
4.2. Işık Mikroskobik Bulgular.....	39
4.2.1. Hematoksilen-Eozin bulguları.....	39
4.2.2. Periyodik Asit Schiff (=PAS) bulguları	56
4.2.3. İmmunohistokimyasal boyama bulguları	68
4.3. Üç Boyutlu Modelleme Bulguları	84
4.4. Biyokimyasal Analiz Bulguları	87
5. TARTIŞMA	91
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	107
KAYNAKÇA	109

	Sayfa
EKLER.....	125
EK-1. Deney Hayvanları Etik Kurul Onay Belgesi	126
EK-2. Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu Sertifikası.....	128
ÖZGEÇMİŞ	129

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal malzemeler.....	27
Çizelge 3.2. Fiksatif solüsyonları.....	30
Çizelge 4.1. Vücut ağırlıkları, ağırlık değişimi, karaciğer ağırlığı/vücut ağırlığı oranı (ortalama±standart hata) (APAP; Asetaminofen grubu, APAP+ BA 1 sa; Asetaminofen verildikten 1 saat sonra Borik Asit uygulanan grup, APAP+ BA 8 sa; Asetaminofen verildikten 8 saat sonra Borik Asit uygulanan grup, BA; Borik Asit grubu).....	37

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Karaciğerdeki mikrosirkülasyon.....	6
Şekil 2.2. Karaciğerde kanlanma ve safra dolaşımı	7
Şekil 2.3. Karaciğer lobüllerinin şematik gösterimi.....	12
Şekil 2.4. APAP ve NAC etki mekanizması	18
Şekil 2.5. Asetaminofenin (A) ve NAPQI'nın (B) kimyasal formülünün 2 boyutlu görüntüsü.....	19
Şekil 2.6. Borik asitin kimyasal formülünün 2 boyutlu görüntüsü	25
Şekil 4.1. Vücut ağırlıkları karşılaştırması (APAP; Asetaminofen grubu, APAP+ BA 1 sa; Asetaminofen verildikten 1 saat sonra Borik Asit uygulanan grup, APAP+ BA 8 sa; Asetaminofen verildikten 8 saat sonra Borik Asit uygulanan grup, BA; Borik Asit grubu).....	38
Şekil 4.2. Histopatolojik hasar değerlendirme sonuçları (A) Hepatik Hasar, (B) Nekroz, (C) Vasküler Konjesyon, (D) İnflamatuar Hücre İnfiltrasyonu, (E) Hemoraji, (F) Sinüzoidal Dilatasyon (APAP; Asetaminofen, BA; Borik Asit) Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001, ****p <0,0001.	55
Şekil 4.3. Karaciğer dokularında glikojen yoğunluğu değerlendirme sonuçları (APAP; Asetaminofen, BA; Borik Asit, PAS; Periyodik Asit Schiff) Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; *p <0,05, **p <0,01, ****p <0,0001. APAP grubu ile karşılaştırıldığında; #####p <0,0001	67
Şekil 4.4. VEGF-A immünoreaktivite değerlendirmesi (A) Periportal Alan, (B) Sentrilobüler Alan, (C) Total Alan, (APAP; Asetaminofen, BA; Borik Asit) Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001, ****p <0,0001. BA grubu ile karşılaştırıldığında; +p <0,05, ++p <0,01	72
Şekil 4.5. VEGF-A immünoreaktivitelerinin periportal ve sentrilobüler alanlarının değerlendirmesi (APAP; Asetaminofen, BA; Borik Asit) (*p <0,05)	73
Şekil 4.6. AFP immünoreaktivite değerlendirmesi (A) Periportal Alan, (B) Sentrilobüler Alan, (C) Tüm Alanlar (APAP; Asetaminofen, BA; Borik Asit) (*p <0,05).....	78
Şekil 4.7. AFP immünoreaktivitelerinin periportal ve sentrilobüler alanlarının değerlendirmesi (APAP; Asetaminofen, BA; Borik Asit) (*p <0,05, **p <0,01).....	79

Şekil	Sayfa
Şekil 4.8. PCNA pozitif hücre yüzdeleri (APAP; Asetaminofen, BA; Borik Asit) Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; **p <0,01; ****p <0,0001. APAP grubu ile karşılaştırıldığında; #p <0,05. BA grubu ile karşılaştırıldığında; ++++p <0,0001	83
Şekil 4.9. Karaciğer fonksiyonlarının biyokimyasal değerlendirmesi (APAP; Asetaminofen, BA; Borik Asit) Kontrol grubuna göre; *p <0,05; ****p <0,0001. APAP grubuna göre; #p <0,05; ##p <0,01; ###p <0,001	89

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. Gruplara ait karaciğer dokularının makroskopik görüntüleri. APAP grubu karaciğer örneklerinde belirgin renk değişimi (★) görülmekte	38
Resim 4.2. (A): Kontrol grubu. Ortalarında v. centralis (vc) içeren, aralarında portal alanların (pa) bulunduğu karaciğer lobülleri görülmekte (HE, ×100)	42
Resim 4.3. (A): APAP grubu. V. centralis'lerde (vc) konjesyon (★) ve sentrilobüler nekroz görülmekte (HE, ×100)	44
Resim 4.4. (A): APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan grup. V. centralis (vc), karaciğer lobülleri arasındaki portal alanlar (pa) görülmekte. (HE, ×100)	49
Resim 4.5. (A): APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan grup. APAP uygulanan gruba göre azalmış sentrilobüler nekroz görülmekte. V. centralis (vc) (HE, ×100)	51
Resim 4.6. (A): Borik Asit uygulanan grup. Minimal düzeyde v. centralis'te (vc) konjesyon görülmekte. (HE, ×100)	53
Resim 4.7. (A): Kontrol grubu. Karaciğer dokusunda yoğun glikojen içeriğine sahip hepatositler diffüz bir dağılım göstermekte. V. centralis (vc) (PAS, ×100)	58
Resim 4.8. (A): APAP grubu. Karaciğer dokusunda sentrilobüler alandaki (- - -) ile çevrili hepatositlerde yoğun glikojen kaybının olduğu görülmekte. V. centralis (vc) (PAS, ×100)	60
Resim 4.9. (A): APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan grup. Karaciğer dokusunda, sınırlı setrilobüler alanda glikojen kaybı görülen hepatositler ile periferde doğru glikojen içeriği artan hepatositler görülmekte. (PAS, ×100)	62
Resim 4.10. (A): APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan grup. Sentrilobüler alanda sınırlı bölgede glikojen kaybı görülen hepatositler ile periferde doğru glikojen içeriği giderek artan hepatositler izlenmekte. (PAS, ×100)	64
Resim 4.11. (A): Borik asit uygulanan grup. Karaciğer dokusunda farklı yoğunlukta glikojen içeriğine sahip hepatositlerin diffüz bir dağılım gösterdiği izlenmekte. (PAS, ×100)	66
Resim 4.12. Periportal alanda VEGF-A immünoreaktivitesi gösteren hepatositler görülmekte. A) Kontrol; B) APAP; C) APAP verildikten 1 saat sonra borik asit; D) APAP verildikten 8 saat sonra borik asit; E) Borik Asit; F) Negatif Kontrol (DAB & Hematoksilin, ×200)	70

Resim	Sayfa
Resim 4.13. Sentrilobüler alanda VEGF-A immünoaktivitesi gösteren hepatositler görülmekte. A) Kontrol; B) APAP; C) APAP verildikten 1 saat sonra borik asit; D) APAP verildikten 8 saat sonra borik asit; E) Borik Asit; F) Negatif Kontrol (DAB & Hematoksilin, ×200).....	71
Resim 4.14. AFP immünoaktivitesi gösteren periportal alan hepatositleri görülmekte. A) Kontrol; B) APAP; C) APAP verildikten 1 saat sonra borik asit; D) APAP verildikten 8 saat sonra borik asit; E) Borik Asit; F) Negatif Kontrol (DAB & Hematoksilin, ×200).....	76
Resim 4.15. AFP immünoaktivitesi gösteren sentrilobüler alan hepatositleri görülmekte. A) Kontrol; B) APAP; C) APAP verildikten 1 saat sonra borik asit; D) APAP verildikten 8 saat sonra borik asit; E) Borik Asit; F) Negatif Kontrol (DAB & Hematoksilin, ×200).....	77
Resim 4.16. Periportal alandaki hepatosit çekirdeklerinde PCNA immünoaktivite (↑) görülmekte. A) Kontrol; B) APAP; C) APAP verildikten 1 saat sonra borik asit; D) APAP verildikten 8 saat sonra borik asit; E) Borik Asit; F) Negatif Kontrol (DAB & Hematoksilin, ×200).....	81
Resim 4.17. Sentrilobüler alandaki hepatosit çekirdeklerinde PCNA immünoaktivite (↑) görülmekte. A) Kontrol; B) APAP; C) APAP verildikten 1 saat sonra borik asit; D) APAP verildikten 8 saat sonra borik asit; E) Borik Asit; F) Negatif Kontrol (DAB & Hematoksilin, ×200).....	82
Resim 4.18. Sağlıklı sıçan karaciğerine ait klasik lobülün 3 boyutlu modellemesi; v. centralis (vc), sinüzoidler (s), a. hepatica (ah), v. porta (vp), safra kanalı (sk), normal hepatositler (h), hepatositlerde glikojen (☛) ve asetaminofenin sinüzoidlere geçişi (→) görülmekte. (3 boyutlu modelleme Prof. Dr. Tuncay Veysel PEKER tarafından hazırlanmıştır) ...	85
Resim 4.19. Asetaminofen kaynaklı karaciğer hasarı görülen klasik lobülün 3 boyutlu modellemesi ve animasyonu; eozinofilik boyanan dejeneratif hepatositler (dh), dilate sinüzoidler (ds), hepatositlerde vakuolizasyon (☛), hemoraji (★) görülmekte. (QR kodu okutarak animasyona ulaşabilirsiniz) (3 boyutlu modelleme ve animasyon Prof. Dr. Tuncay Veysel PEKER tarafından hazırlanmıştır)	85
Resim 4.20. Proteine (Makrofaj Migrasyon İnhibitör Faktör) bağlı NAPQI'dan elde edilmiş Asetaminofen dimeri (kesikli çizgi içerisinde) görülmekte. (QR kodu okutarak animasyona ulaşabilirsiniz) (3 boyutlu modelleme ve animasyon Prof. Dr. Tuncay Veysel PEKER tarafından hazırlanmıştır) (120, 121)	86

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklama

μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
dL	Desilitre
g	Gram
kg	Kilogram
mg	Miligram
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece

Kısaltmalar

Açıklama

AFP	Alfa fetoprotein
ALB	Albümin
ALF	Akut karaciğer yetmezliği
ALP	Alkalin fosfataz
ALT	Alanin aminotransferaz
APAP	Asetaminofen
AST	Aspartat aminotransferaz
ATP	Adenozin trifosfat
BA	Borik asit
CCl_4	Karbon tetraklorür
CDK	Siklin bağımlı kinaz
COX	Siklooksijenaz
DAMP	Hasar ile ilişkili moleküler modeller
EGF	Epidermal büyüme faktörü
FDA	Amerika Gıda ve İlaç Dairesi
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
GER	Granüllü endoplazma retikulumu

Kısaltmalar	Açıklama
GGT	Gama glutamil transferaz
GLU	Glukoz
GSH	Glutasyon
HE	Hematoksilen-eozin
HGF	Hepatosit büyüme faktörü
HNF-4	Hepatosit nükleer faktör-4
ICAM1	Hücrelerarası adezyon molekülü 1
IL	İnterlökin
İ.P.	İntraperitoneal
JNK	c-Jun N terminal kinaz
MAPK	Mitojenle aktive edilmiş protein kinaz
MDA	Malondialdehit
NAC	N-asetilsistein
NADP	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NAPQI	N-asetil-p-benzokinonimine
NFκB	Nükleer faktör kappa B
NSAID	Nonsteroidal anti-inflamatuar ilaçlar
PAS	Periyodik asit Schiff
PBS	Fosfat tamponlu salin
PCNA	Proliferatif hücre nükleer antijeni
PI3K/AKT	Fosfatidilinositol-3-kinaz/protein kinaz B
PTEN	Fosfataz ve tensin homologu
QPCR	Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
ROS	Reaktif oksijen türleri
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SOD	Süperoksit dismutaz
TA	Tiyoasetamit
TGF-β	Dönüştürücü büyüme faktörü beta
TLR	Toll benzeri reseptör
TNF-α	Tümör nekrozis faktör alfa
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü
VLDL	Çok düşük yoğunluklu lipoprotein

1. GİRİŞ

Karaciğer hem endokrin hem ekzokrin işlevi olan vücuttaki en büyük organdır. Bağırsaklardan emilimi gerçekleşen tüm maddelerin portal ven aracılığı ile geldiği, depolama, detoksifikasyon ve makromoleküler metabolizmanın gerçekleştiği önemli bir organdır [1]. Detoksifikasyon işlevinden ötürü karaciğerde birçok enzimatik reaksiyon gerçekleşir. Bunun sonucunda stabil metabolitler oluşurken bazı ilaçlar ise hepatosit hasarı oluşturabilen ve toksisite potansiyeli olan aktif metabolitlere dönüşebilir. Bu metabolitlerin yarı ömrü genellikle bir dakikadan daha az iken yüksek miktarda ilaç varlığı veya metabolik aktivasyon sebebi ile karaciğerden uzaklaştırılmaz ve birikerek nükleik asitlere, sinyal proteinlerine veya enzimlere bağlanarak toksisiteye sebep olabilir. Bu yüzden karaciğer yoğun detoksifikasyon işlevi sebebi ile hasarlanmaya yatkın bir organdır [2,3].

Asetaminofen (N-asetil-para-aminofenol; APAP), analjezik ve antipiretik bir ilaç olarak ateş ve ağrının giderilmesinde yaygın bir şekilde kullanılır. Güvenli doz aralığında yan etkisinin az olması, birçok farklı formda (tablet, kapsül, süspansiyon gibi) bulunması, reçetesiz satıldığı ve ucuz olduğu için elde edilebilirliğinin kolay olması kullanım yaygınlığını arttırmaktadır [4]. Tek seferde yüksek doz APAP kullanımı veya içerisinde APAP bulunan ilaçların eş zamanlı kullanılması nedeni ile karaciğerde hasara sebep olduğu bilinmektedir. Doz aşımının sonucunda organ kaybına kadar gidebilen durumlar ortaya çıkabilir [5]. APAP, karaciğerde sitokrom p450 ailesine dahil enzimler ile N-asetil-p-benzokinonimine (NAPQI) metabolize olur ve glutatyon (GSH) varlığında toksik olmayan son metabolite çevrilerek idrar ile atılır. Ancak yüksek doz APAP varlığında glutatyonun bu reaksiyonun gerçekleşmesi için yetersiz kalması sonucu, ortamda yüksek düzeyde reaktif bir ara metabolit olan NAPQI birikir ve hücredeki proteinlere bağlanarak hasar oluşumuna neden olur [6]. NAPQI, özellikle mitokondriyal proteinlere bağlanarak hasar oluşturup oksidatif stresin de artması ile hepatositlerde nekroza sebep olur [7].

Yüksek doz APAP hepatositlerden önce sinüzoid endotel hücrelerinde hasara sebep olur ve böylece konjesyon oluşur. Endotel hücrelerinin hasarlanması sonucunda mikrovasküler dolaşım bozulurak karaciğer hasarının özellikle hepatosit nekrozunun gelişmesine sebep olur [8]. Karaciğerde oluşan hasarın giderilmesi ve rejenerasyon süreci için hasarlı alanda yeniden vaskülarizasyonun oluşması gerekir. Bu sebeple rejenerasyonun gerçekleşmesi için proanjyogenik faktörler üretilir [9]. Sinüzoid endotel hücreleri, vaskülarizasyonun yanı sıra

hepatosit büyüme faktörü (HGF) salgılayarak parankim hücresi hepatositlerin proliferasyonuna da destek olur. Hepatositler de vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) salgılayarak sinüzoid endotel proliferasyonunu sağlar [1,10]. Rejenerasyon süreci hem hepatosit proliferasyonu hem de progenitör hücre farklılaşması ile meydana gelir. Nekrozun çok şiddetli olduğu ve hepatosit proliferasyonunun yetersiz kaldığı durumlarda rejenerasyonda progenitör hücrelerin farklılaşması yer alır [11,12].

N-asetilsistein (NAC), APAP toksisitesinde kullanılan bir antidottur. Ancak NAC'in yan etkileri arasında kızarıklık, ürtiker, kusma ve anafilaksi bulunduğu ve bu yan etkiler sebebi ile tedavi uygulamalarındaki kısıtlılıklardan ötürü kullanılabilecek yeni alternatifler araştırılmaktadır [13,14]. Antioksidan ve anti-inflamatuar özellikleri olan resveratrol [15], kurkumin [16], silmarin [17], tannin [18] ve prosiyanidin [19] gibi maddelerin APAP kaynaklı karaciğer hasarında hepatoprotektif etkiler sergilediği gösterilmiştir.

Ülkemiz dünyadaki en önemli bor rezervlerine sahip coğrafyalardan biridir [20]. Bor, günümüzde antiseptiklerde, pestisitlerde, temizlik ürünlerinde ve farmasötik formülasyonlarda kullanılmaktadır [21]. Doğada element değil bileşikler halinde bulunan bor, pH değerinin 7'nin altında olduğu koşullarda ve ayrıca bitki ve hayvanlarda borik asit şeklinde bulunur. Toprakta bulunan borik asit yeşil yapraklı bitkiler tarafından emilir ve eksikliğinde bitkilerin büyümesinde azalma ve renk kaybı görüldüğü için esansiyel bir mikrobesein olarak kabul edilir [22-24]. Günümüzde borik asit üzerinde yapılan çalışmalar antioksidan [25] ve anti-inflamatuar [26] etkinliği ile hepatoprotektif bir ajan olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Farklı deneysel modellere uygulandığında ise apoptozisi baskıladığı ve anjiyogenezi arttırdığı gösterilmiştir [27-29].

Yüksek doz APAP kaynaklı karaciğer hasarının moleküler mekanizmaları bilinmesine rağmen klinikte tedavi olarak sadece NAC antidot olarak uygulanmaktadır. NAC, APAP doz aşımından sonra en kısa sürede verilmelidir. Sağlık merkezine geç başvuran kişilerde ise etkisinin sınırlı olduğu ve uzun süreli uygulamalarda yan etkilere sebep olabileceği bildirilmiştir [65]. İlk 8 saatlik süreçteki NAC uygulamaları hepatik hasarı en aza indirirken bu süre zarfından sonra yapılan uygulamalarda hepatotoksisitenin riskinin yüksek olduğu bildirilmiştir [30]. Tüm bu sebeplerden ötürü asetaminofen doz aşımının karaciğere verdiği hasarın azaltılması ve onarımı ile ilgili alternatif terapötiklerin araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada literatürdeki bilgilere dayanarak yüksek doz asetaminofen nedeniyle oluşan karaciğer hasarında, borik asitin 1 saat ve 8 saat sonra uygulanmasının vaskülarizasyon ve rejenerasyon sürecinde etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğer

Karaciğer, yetişkin bir insanda yaklaşık 1,5 kg ağırlığında olan en büyük glandular organdır [31]. Hem endokrin hem ekzokrin salgı yapan karaciğerin birçok farklı işlevi vardır [43].

2.1.1. Anatomisi

Karaciğer, kahverengi-kırmızı renkte ve yarım elipsoid şeklindeki organ, karın boşluğunun sağ üst kısmında diafragmanın altında bulunur. Organın diafragmaya değen üst bölümüne facies diaphragmatica ve alt bölümdeki diğer organlar ile komşuluk yapan yüzüne facies visceralis denir [32]. Facies visceralis, midenin ön yüz sağ tarafı, omentum minus, pars superior duodeni, vesica biliaris, flexura coli dextra, colon transversum'un sağ tarafı, ren dexter ve glandula suprarenalis dexter ile komşuluk halindedir [33].

Facies diaphragmatica tarafında periton ile çevrelenmeyen ve diafragmayla direkt teması olan bölgeye area nuda denir. Bu bölge dışında periton ile çevrelenen karaciğer intraperitoneal organlardan biridir. Peritonun altında bağ dokudan oluşan ve organı çepeçevre saran capsula fibrosa (Glisson kapsülü) bulunur [34].

Karaciğerin visseral yüzünde komşuluğundaki organların izleri, yarıklar ve oluklar bulunur. Ayrıca bu yüzde karaciğer kapısı veya portal fissür olarak da adlandırılan porta hepatis vardır. Bu alanda organa giren ve çıkan yapılardan a. hepatica propria, v. portae hepatis, duc. hepaticus dexter ve sinister bulunmaktadır [32].

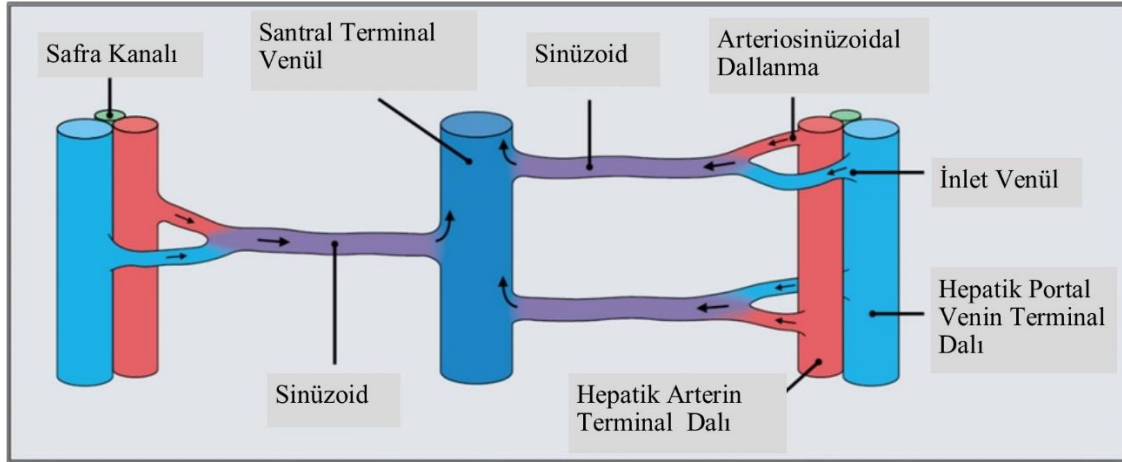
Karaciğer anatomik olarak dört loba ayrılır. Bu loblar ön yüzde ligamentum falciforme hepatis tarafından büyük olan lobus hepatis dexter ve küçük olan lobus hepatis sinister'e ayrılır. Organın visseral yüzünde ise "H" harfine benzeyen oluklar bu yüzü lobus caudatus ve lobus quadratus olarak loblara ayırır [32].

Karaciğerin damar ve sinirleri

Karaciğerin kanlanması %20-25 oranında arteria hepatica ve %75-80 oranında vena porta hepatis olmak üzere iki farklı kaynaktan sağlanır. Vena porta hepatis oksijen içeriği düşük,

besin içeriği yüksek kanı sindirim kanalından karaciğere getirir. Bu ven, v. mesenterica superior ve v. splenica'nın birleşimi ile oluşur. Vena porta, a. hepatica ve ductus choledochus'un arka tarafından porta hepatis'e girer. Bu noktada r. dexter ile r. sinister'i oluşturmak üzere ikiye ayrılır [32]. a. hepatica'nın dalları ile beraber dallanır ve birlikte ilerlediği arterlerle vena centralis'e açılır. Vena centralis'ler vena hepatica'ları oluşturur ve porta hepatis'ten gelen kanları vena cava inferior'a iletirler. Vena porta hepatisin yanı sıra karaciğeri besleyen diğer damar arteria hepatica propria, truncus coeliacustan dallanan arteria hepatica communis'in bir dalıdır. Bu arter, porta hepatis'de r. dexter ile r. sinister şeklinde ikiye ayrılır [35].

Vena porta ve arteria hepatica'dan gelen kan hepatik hücre kordonları arasında yer alan sinüzoidlerde birleşir ve vena centralis'e akar. Her lobülde bulunan vena centralis'ler birleşerek vena sublobularis'i oluşturur. Bu venler de birleşerek vena hepatica ile vena cava inferior'a kan akışını iletir [36,37].(Şekil 2.1) .



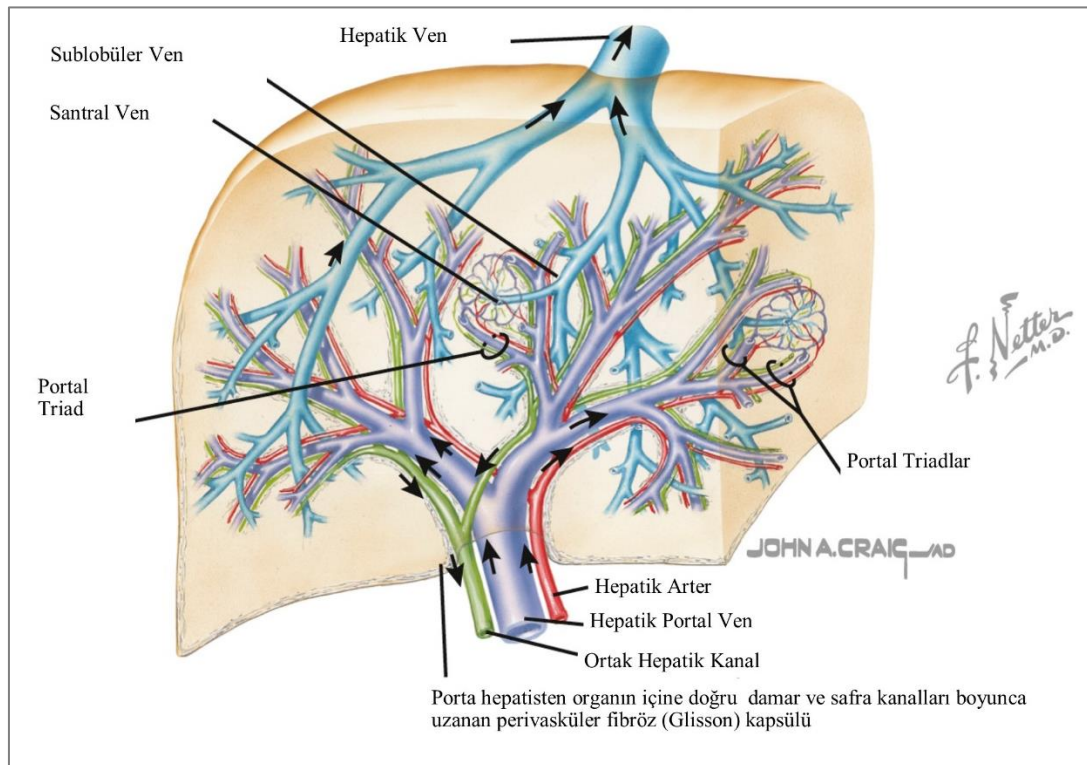
Şekil 2.1. Karaciğerdeki mikrosirkülasyon [37] (Türkçe'ye çevrilmiştir)

Karaciğer yüksek miktarda lenf sıvısı üreten bir organdır. Lenf sıvısı, perisinüzoidal aralıkta oluşur ve Mall aralığında (periportal alan) toplanarak diğer portal triad yapılarında bulunan lenfatik kapillerlere boşalır. Lenf sıvısı portal alandan vena centralis'e doğru akar [38]. Lenfatik kapillerlerden gelen lenf porta hepatis'te bulunan nodi hepatici'ye boşalır. Buradan çıkan lenf nodi coeliac'i'den geçer ve ductus thoracicus'a drene olur. Yüzeysel lenfatik damarlar nodi hepatici'ye oradan da nodi coeliac'i'ye boşalır. Bazı lenf damarları for. venae cavae'den geçip nodi phrenici superiores ve sonra nodi parasternales ile devam eder [35].

Organın sempatik sinir innervasyonu nn. splanchnici'den gelirken parasempatik sinir innervasyonu n. vagus'tan gelir. Gelen sinir lifleri plexus coeliacus'u oluşturduktan sonra vena porta hepatis ve arteria hepatica propria çevresinde plexus hepaticus'u oluşturarak karaciğere girer [35].

Safra kanalları

Ekzokrin bir organ olarak karaciğer, kolesterol, fosfolipit ve safra tuzlarından oluşan safrayı üretir. Safra hepatositler tarafından üretilip canaliculus bilifer'e geçer. Bu yapılar birleşerek ductus biliferi ve onlar da ductus interlobularis biliferi'yi oluşturur [35]. Bu kanallar daha sonra ductus hepaticus dexter ve ductus hepaticus sinister ile devam eder. Porta hepatis'te birleşip karaciğerden ayrılan kanallar ductus hepaticus communis'i meydana getirir. Bu kanal safra kesesinden gelen ductus cysticus ile beraber ductus choledochus'u oluşturur. Safra bu kanal aracılığı ile duodenuma akar. Böylece ductus choledochus'un son kısmı duodenumun posteromedial duvarında bulunan papilla duodeni major'ün bulunduğu bölgeye açılır. Kanalın son bölümündeki ampulla hepatopancreatica (ampulla Vateri) olarak isimlendirilen genişleme ve bu genişleme çevresindeki sphincter hepatopancreatica (Oddi sifinkteri) safranın akışını kontrol eder [34] (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Karaciğerde kanlanma ve safra dolaşımı [46] (Türkçe'ye çevrilmiştir)

2.1.2. Gelişimi (embriyolojisi)

Gelişimin 4. haftasında ön bağırsağın distalinde karaciğer tomurcuğu veya hepatik divertikül olarak bilinen bir çıkıntı ortaya çıkar. Karaciğer tomurcuğunu oluşturan hücreler hızlı bölünme yeteneğine sahip olup perikard boşluğu ile vitellin kanalı arasında bulunan ve mezodermal bir yapı olan septum transversuma doğru penetre olur. Endodermal hücreler çoğalarak hücre kordonlarını ve safra kanalını meydana getiren epiteli oluşturur ve bu süreçte divertikül ile duodenum arasında kalan bölge daralarak safra kanalını meydana getirir. Safra kanalından gelişen ventral bir çıkıntı ise safra kesesi ve sistik kanalı oluşturur [39]. Hepatik hücre kordonları organın parankimine farklanır ve sinüzoidleri oluşturacak olan endotel hücrelerinin çevresinde ağsı bir şekilde yerleşim gösterir. Organın stroması, hematopoetik bileşenleri ve Kupffer hücreleri splanknik mezenşimden köken alırlar [40].

Gelişimin ilerlemesi ile karın boşluğunda bulunan organ kaudale doğru genişler. Karın ön duvarı ve karaciğer arasında bulunan septum transversuma ait mezoderm gerilip incelerek ligamentum falsiforme'yi oluşturur. Karaciğer ile ön bağırsak arasındaki septum mezodermi ise membranöz bir yapıya farklanarak omentum minus'u oluşturur. Organın yüzeyindeki mezoderm gelecekte diyafram ile temas eden alan dışında visseral peritona farklanır. Diyafram ile ilişkili olan bu bölge ise karaciğerin çıplak bölgesi şeklinde isimlendirilir ve periton ile örtülü değildir [39].

Gelişimin 5. haftasından 10. haftasına kadar organ hızla büyür ve organın ağırlığı hematopoetik işlevleri ve sinüzoidlerin de gelişmesiyle beraber vücut ağırlığının yaklaşık %10'unu oluşturur. Hepatositler ve sinüzoidler arasında eritrosit ve granülositlerin öncülleri görülür. Organın hematopoetik işlevi son iki ayda giderek azalır ve doğumda çok az hematopoietik hücre grupları bulunur. Karaciğer ağırlığı da doğuma kadar azalır ve doğumda toplam vücut ağırlığının %5'i kadarını oluşturur. 12. haftada hepatositlerde safra üretimi başlar. Oluşan sistik kanal ve hepatik kanal birleşir ve duodenuma bağlanan kısım koledok kanalına dönüşür. Duodenumun gelişimiyle birlikte meydana gelen rotasyon sonucunda koledok kanalının duodenuma giriş yeri ön yüzden arka yüze doğru yer değiştirir. Gelişimin erken dönemlerinde safra kanalları epitel ile kapalıyken vakuolizasyon sonrasında bu hücreler dejenere olur ve kanal yapıları meydana gelir. Böylece hepatositler tarafından üretilen safra 12. haftadan itibaren safra kanalından geçerek bağırsağa akar [39,40].

Vitellin venleri karaciğer gelişim sürecinde ağsı bir şekilde sinüzoid yapılarını oluşturur. İntraembriyonik vitellin venleri hepatik portal sistemin büyük bölümünü oluşturur. Sağ umbilikal ven ve solun proksimal kısmı körelirken geriye kalan kısmı sinüzoidler ile anastomozlaşarak duktus venosus ve vena cava inferior ile bir şant oluştururlar [41].

Karaciğer gelişiminin moleküler temeli

Ön bağırsak endodermi karaciğere farklılaşmak için gerekli genleri ifade edebilecek bir doku iken ektoderm, notokord ve kardiyak olmayan mezoderm gibi dokulardan salınan inhibe edici faktörler sebebi ile bu endodermin karaciğere gelişimi engellenir. Gelecekteki karaciğerin oluşacağı bölgede kardiyak mezoderm fibroblast büyüme faktörü (FGF) salgılayarak karaciğerin gelişimini baskılayan inhibe edici faktörleri etkisiz hale getirir. Böylece kardiyak mezodermin etkisi ile karaciğer gelişimi meydana gelmiş olur [39].

Hepatik kordonları oluşturan hücreler olan hepatoblastlar bipotent özellikte hücrelerdir. Bu hücreler hepatik parankim hücreleri olan hepatositlere ve intrahepatik safra kanalını oluşturan kolanjiyositlere farklılaşabilirler. Hepatoblastlar, hepatosit nükleer faktör-4 (HNF-4) ve FoxA transkripsiyon faktörlerinin varlığında albümin (ALB) ve alfa fetoprotein (AFP) salgılayan parankim hücrelerine yani hepatositlere farklılaşırlar. Diğer hepatoblastlar, dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- β) ve Notch etkisi ile portal venin yakınında bir duktal plak oluşacak şekilde toplanırlar. Gelişimin ilerleyen döneminde kolanjiyositlere farklılaşan bu hücreler intrahepatik safra kanallarını oluştururlar [42].

2.1.3. Histolojisi

Karaciğer, endokrin ve ekzokrin salgı yapan vücuttaki en büyük bezdir. Organ Glisson kapsülü olarak isimlendirilen düzensiz sıkı bağ dokudan oluşan bir kapsül yapısı ile dıştan çepeçevre sarılıdır. Kapsül yapısı organın iç kısımlarına doğru ilerleyerek organı lob ve lobüllere ayırır. Kan ve lenf damarları, sinirler ve safra kanalları stromayı oluşturan bağ dokusu içerisinde yer alırlar. Karaciğer parankiminin büyük bölümü kordonlar şeklinde anastomozlaşan ve tek tip hücreler olan hepatositlerden oluşur. Hepatosit kordonları v. centralis'ten periferine doğru birbirine paralel bir düzenlenimde yerleşim gösterirler [43].

Hepatositler, birçok farklı metabolik, endokrin ve ekzokrin işlevini karaciğerin eşsiz histolojik organizasyonu sayesinde gerçekleştirir. Organın parankimi, v. centralis etrafında radyal düzenlenimde olan yüzlerce hepatosit kordonu ve aralarında sinüzoidlerin bulunduğu birçok küçük lobülden ($\sim 0.7 \times 2$ mm) meydana gelmiştir. Lobülün merkezinde v. centralis bulunurken, periferinde sayıları 3-6 arasında değişen portal alan veya portal triad olarak isimlendirilen interlobüler yapılar bulunur. Portal alanda genel olarak portal venin dalı olan bir venül, hepatik arterin dalı olan bir arteriyol ve bir veya iki küçük safra kanalı bulunur. Ayrıca lenfatik damarlar ve sinir lifleri de portal alanda yer alır. Hepatosit kordonları retiküler lifler (=Tip-III kollajen lifler) ile desteklenir ve bu lifler organın çatısını oluşturur. Portal alandaki yapılar ve v. centralis endoteli fibröz bağ dokusu ile desteklenir. Her lobüldeki v. centralis'ler birleşerek v. cava inferior'a drene olacak daha büyük venleri oluşturur [31].

Karaciğer işlevsel olarak ele alındığında endokrin, ekzokrin ve detoksifikasyon işlevlerine göre farklı lobül yapıları ile incelenmektedir (Şekil 2.3):

Klasik lobül

Farklı lobül tanımlamaları arasında en yaygın kullanılan ve kan akışını temel alan bu tanımlama klasik karaciğer lobülüdür. Klasik karaciğer lobülü, ortasında terminal hepatik venül (v. centralis) ve periferinde portal alanların bulunduğu hegzagonal şekilli bir yapı olarak tanımlanır. Portal alanlar arasında ince bir bağ dokusu bulunur. Bu bağ dokusu insanda yoğun olarak bulunmadığından lobül sınırları belirgin değildir ancak domuz gibi farklı türlerde daha yoğun bağ dokusu liflerinin varlığı nedeni ile lobüllerin ayrımı daha kolaydır. Bu bağ dokusu organı saran kapsül yapısı ile devamlılık gösterir. Lobülün çevresindeki bağ dokusu ile hepatositler arasında kalan alana Mall aralığı (=periportal alan) denir [38]. Kanın akışı portal alandan v. centralis'e doğrudur ve bu düzenlenim organın endokrin işlevini vurgulamaktadır [31].

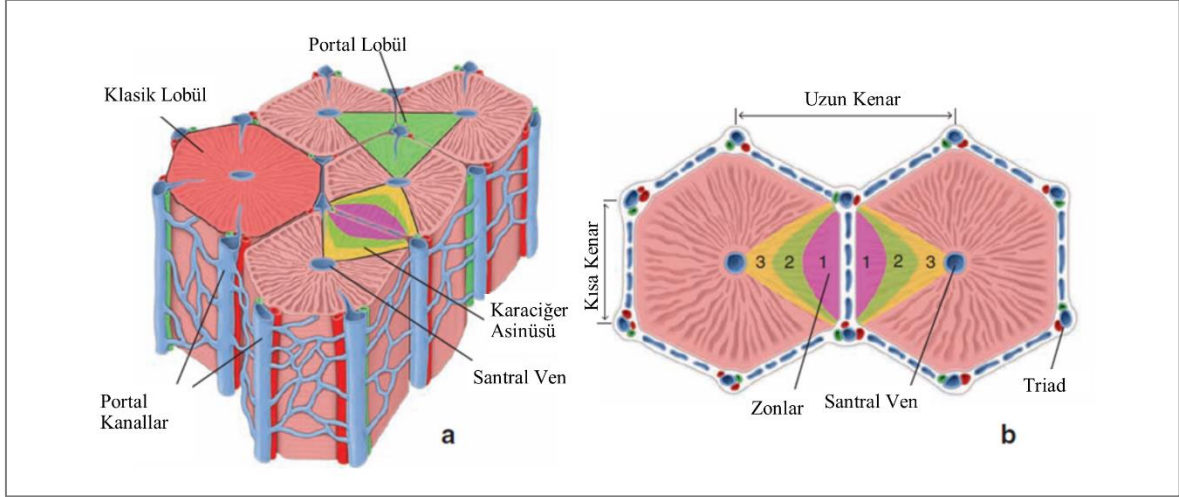
Portal lobül

Karaciğerin ekzokrin salgı işlevinin temeli olarak tanımlanan bu lobülün merkezinde safra kanalı bulunmaktadır. Birbirine komşu üç klasik portal lobülün v. centralis'lerinden oluşan, üçgen şeklindeki bu lobülün merkezinde portal alan bulunur. Hepatositlerin ekzokrin salgısı

olan safra, kanın akış yönüne göre ters şekilde kanaliküllerden safra kanallarına ve portal triada doğru akar [44].

Karaciğer asinüsü

Komşu klasik iki lobülün v. centralis'leri ve iki portal alanlarından oluşan oval şekilli bir yapıdır. Bu tanımlama, hepatositlerdeki kan akışına bağlı olarak oksijenlenmesi, beslenmesi ve metabolik aktiviteleri temel alınarak yapılmıştır. Asinüs ve zonları karaciğerdeki patolojik durumların incelenmesi ve değerlendirilmesi açısından önemlidir. Hepatositler v. centralis ve portal alana olan uzaklıklarına göre zonlara ayrılmışlardır. Zon 1 portal alana en yakın olan bölgedir. Burada bulunan hepatositler a. hepatica ve v. porta'dan gelen kan ile ilk karşılaşan hücreler olduklarından diğerlerine göre daha oksijenli ve besin yönünden zengin bir ortamda bulunurken kandaki toksinlerle ilk karşılaşan hücrelerdir. Ayrıca bu zondaki hepatositler iskemi durumunda son etkilenen ve ilk rejenerasyon gösteren hücreler olmakla birlikte safra kanalı tıkanıklığından da ilk etkilenen hücrelerdir. Zon 2, zon 1 ve 3 arasındaki bölgedir ve bu zonda bulunan hepatositler diğerlerine göre daha orta seviye etkinliğe sahiptir. Zon 3 v. centralis'e yakın olan bölgede bulunan hücrelerdir. Bu hücreler sinüzoidal kanın daha az oksijenli ortamında buldukları için iskemiden en hızlı etkilenen hücrelerdir. Ayrıca yağ birikimi zon 3'de bulunan hepatositlerde diğer zonlara göre daha erken görülür. Farklı zonlarda bulunan hepatositlerde görülen metabolik aktivite ve detoksifikasyon farklılıklarının sebebi enzim aktivitelerinin, içerdikleri organellerin dağılımları ve glikojen depolama kapasitelerinin farklılığından kaynaklanmaktadır [38]. Zon 3'deki hücreler diğerlerine göre daha fazla glikoliz, lipid sentezi ve ilaç metabolizmasında yer alır [31].



Şekil 2.3. Karaciğer lobüllerinin şematik gösterimi [38] (Türkçe'ye çevrilmiştir)

Hepatositler, poligonal şekile sahip hücreler olup belirgin bir apikal ve bazal yüzeye sahip değildirler. Ancak bazı kaynaklara göre hücrenin safra salgısı salınan ve kanaliküllerin bulunduğu yüzeyi apikal yüzey, Disse aralığına bakan yüzeyi ise bazal yüzey olarak tanımlanabilir. Hepatositlerin Disse aralığına bakan yüzeylerinde çok sayıda uzun mikrovillus yapıları bulunur. Bu yapılar, yüzey alanını büyük miktarda arttırarak hepatositlere sinüzoidal kandan gelen metabolit geçişini kolaylaştırır. Hepatositler, ekzokrin salgı olan safrayı salgılayarak sindirime katkı sağlarlar. Bu salgıyı kanalikül adı verilen ve sinüzoidlerden sıkı bağlantı birimleri ile ayrılan, ince hücrelerarası kanal yapıları ile safra kanallarına aktarırlar. Safra kanalikülleri başlangıçta epitel yapısından yoksunken daha sonra genişleyerek safra kanallarını oluşturur ve kanal boyunca tek katlı yassı epitelden tek katlı kübik epitele doğru değişiklik gösterirler. Safranın akış yönü kanın akış yönüne göre ters bir şekilde lobülün merkezinden periferine doğrudur. Hepatositler, genellikle mononükleer hücrelerken %25'e yakın bir kısmı ise binükleerdir. Hepatosit sitoplazması hücrenin emilim, detoksifikasyon veya moleküllerin modifikasyonu gibi işlevleri ile uyumlu olarak organelden zengin bir yapıya sahiptir. Plazma proteinlerinin sentezi ve salınması karaciğerin önemli işlevlerinden biridir. Bu sebeple hepatositler çok sayıda serbest ribozom ve granüllü endoplazma retikulumu (GER) içerirler. Ayrıca lipid metabolizması ve detoksifikasyon reaksiyonları sebebi ile hepatositlerde yoğun miktarda düz endoplazma retikulumu görülür. Düz endoplazma retikulumlarında ilaç detoksifikasyonu, kolesterol sentezi ve glukoneogenez sürecinde yer alan enzimler bulunur. Sitoplazmada depolanan glikojenler düz endoplazma retikulumlarının çevresinde görülür. Golgi bileşiği genel olarak nükleus ve safra kanalikülü yakınında bulunur. Ayrıca farklı boyutlarda lipid damlacıkları,

çok sayıda lizozom ve Golgi bileşiği yakınında peroksizomlar sitoplazmada yer alır. Çok sayıda mitokondriyon içeren hepatositler çoğunlukla asidofiliktir [45,46].

Lobül içinde kordonlar oluşturan hepatositler arasında sinüzoid olarak isimlendirilen vasküler yapılar bulunur. v. porta ve a. hepatica dallarından gelen venöz ve arteriyel kan bu yapılarda birbirine karışarak v. centralis'e doğru akar. Hepatositler arasında düzensiz bir şekilde yer alan sinüzoidler, diyaframsız, geniş fenestralı endotel hücrelerinden ve bu hücreleri destekleyen aralıklı basal lamina ve retiküler liflerden oluşur. Hepatositler ve sinüzoidler arasında Disse aralığı olarak da adlandırılan bir perisinüzoidal aralık bulunur. Hepatositlerin Disse aralığına bakan yüzlerinde mikrovilluslar bulunur ve endotel porlarından geçen plazma içerikleri, besinler ve atık maddeler bu yolla hepatositlere ulaşır. Hepatosit ve endotel hücrelerinin ilişkisini sağlayan bu histolojik düzenlenim hepatositlerin birçok işlevi için gerekli olan madde geçişine olanak sağlar [31,45].

Monosit kökenli, mononükleer fagositik sistemin bir üyesi olan Kupffer hücreleri veya diğer ismi ile stellat sinüzoidal makrofajlar sinüzoid duvarında yer alan hücrelerdir. Kupffer hücreleri düzensiz şekilli hücreler olup oval bir çekirdeğe sahiptir [44]. Bu hücrelerin elektron mikroskopik görüntülerinde mitokondriyon, küçük bir Golgi bileşiği, bol miktarda lizozom ve geç endozomlar görülmektedir. Çok sayıda filopodia benzeri uzantıları olan Kupffer hücreleri ile komşuluğundaki sinüzoid endotel hücreleri arasında hücreler arası bağlantı birimleri yoktur [43]. Kupffer hücreleri portal kan ile gelen bakterileri fagosite eden ve antijen sunan hücrelerdir. Bunun yanı sıra kan ile gelen yaşlanmış veya hasarlı eritrositleri de fagositoz yolu ile parçalar ve hemosiderin granülleri oluşturarak demirin yeniden kullanılabilmesini sağlar [38].

Disse aralığında, hepatosit mikrovillusları ile birlikte organın hücre popülasyonunun yaklaşık %5'ini oluşturan hepatik stellat hücreleri diğer adıyla İto hücreleri bulunmaktadır. İğ şeklindeki bu hücreler kimyasal algılayıcı işlevi olan birçok sitoplazmik uzantıya sahiptir [37]. Hücre uzantılarının bir kısmı sinüzoid endotel hücreleri ile temas halindeyken bir kısmı da hepatositlerin mikrovilluslu yüzeyleri ile ilişkidir. Küçük ve oval bir nükleusa sahip olan İto hücreleri sitoplazmasında az miktarda mitokondriyon ve dağınık bir şekilde GER bulunur. Bu hücrelerin sitoplazmalarında A vitamini ve diğer yağda çözünen vitaminleri depoladıkları çok miktarda lipit damlacıkları ve vakuoller görülür. Sitoplazmik uzantılarında ise çok sayıda mikrotübüller, aktin ve vimentin filamentleri bulunur. Alfa düz kas aktini (α -

SMA) ifade eden bu hücreler vazoaktif maddelerin varlığında kasılarak sinüzoidal dolaşımın düzenlenmesine katkı sağlayabilir. Ayrıca İto hücreleri akut ve kronik patolojik süreçlerde miyofibroblastlara farklılaşarak ekstraselüler matriks elemanlarından laminin, fibronektin, tip I, III ve IV kollajen liflerini üretir. Böylece hasarlı hepatositlerin yerini alarak organın parankiminde gelişen fibrozis ile hasarın onarılmasını sağlarlar [46].

2.1.4. Fizyolojisi

Karaciğer ürettiği salgılar sebebi ile hem endokrin hem de ekzokrin bir organdır. Pek çoğu hepatositlerce gerçekleştirilen birçok işlevi vardır. Safra üretimi, detoksifikasyon, lipid, karbonhidrat ve protein metabolizması, vitaminlerin ve demirin depolanması, immünolojik işlevler karaciğerin yer aldığı önemli metabolik süreçlerdir.

Safra üretim işlevi; safra hepatositlerde de novo olarak kolesterolden üretildiği gibi ince bağırsağa geçen kısmı da geri emilerek v. porta aracılığıyla karaciğere geri döner ve hepatositler tarafından endositoz ile geri alınır. Safra tekrar kanaliküllerden safra kanallarına salınarak duodenuma boşalır. Buna safra tuzlarının intrahepatik yeniden dolaşımı denir [47].

Detoksifikasyon işlevi; ilaç, ksenobiyotik ve toksinlerin uzaklaştırılması karaciğerin önemli işlevlerinden biridir. Bu maddeler suda tam çözünebilir maddeler olmadığından böbrekten atılmaları tam olarak gerçekleşemez. Bu sebeple karaciğer faz I (oksidasyon) ve faz II (konjugasyon) reaksiyonları ile bu maddeleri daha fazla suda çözünebilir hale getirir. Faz I reaksiyonları hidroksil grubu veya karboksil grubu eklenmesi şeklinde gerçekleşir. Düz endoplazma retikulumu ve mitokondriyonda meydana gelen bu reaksiyonlarda sitokrom P450 ailesine ait proteinler görev alır. Faz II reaksiyonlarında ise glisin veya glukronik asit eklenmesi ile maddelerin suda çözünürlüğü artar ve böbrekten atılmaları kolaylaşır [38].

Karbonhidrat metabolizmasındaki işlevi; kandaki glukoz seviyesini glukozu glikojene çevirerek veya glikojenoliz ile glikojeni glukozu çevirerek glukoz metabolizmasını düzenler. Ayrıca glukoneogenesis ile amino asitlerden ve yağlardan glukoz üretimi de hepatositlerde gerçekleşir [43].

Protein metabolizmasındaki işlevi; karaciğerin önemli işlevlerinden biri albümin, fibrinojen, protrombin, transferrin gibi plazma proteinlerinin sentezi ve salınmasıdır. Ayrıca amino

asitler enerji ihtiyacı olduğunda karaciğerde deaminasyona uğrayarak kullanılabilir. Bu reaksiyon sonucunda ortaya çıkan amonyağın vücuttan uzaklaştırılmasında da karaciğer rol alır. Bir diğer önemli işlevi de amino asit sentezi gerçekleştirmektir [48].

Yağ metabolizmasındaki işlevi; lenfatik sistem ve ince bağırsaklardan gelen şilomikron yapıları hepatositlerde yağ asiti ve gliserole dönüştürür. Yağ asitleri, fosfolipit ve kolesterol yapımında kullanılır ve bu moleküller hepatositlerde depolanır [43]. Üretilen kolesterolün büyük miktarı safra tuzları şeklinde safraya katılır. Karaciğerde üretilen ve plazmadan alınan yağ asitleri çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL)'e çevrilir. Ayrıca karaciğerde protein ve karbohidrat moleküllerinden yağ sentezi yapılır ve bu ürünler dokulara lipoproteinler şeklinde iletilir [48].

Vitamin metabolizmasındaki işlevi; yağda çözünen A, D, K vitaminleri ile B₁₂ vitamini karaciğerde depolanan veya metabolize olan vitaminlerdir. En yüksek miktarda depolanan vitamin A vitamini (retinol). Karaciğer A vitaminini depolamanın yanı sıra alımı ve kandaki seviyesinin düzenlenmesinde de rol oynar. A vitamininin depolanmasında ve tekrar salınmasında İto hücreleri görev alır. Karaciğerde depolanan A vitamininin miktarı yaklaşık olarak 10 ay eksikliğin görülmeyeceği düzeydedir. Karaciğerde D vitamini depolanması genellikle görülmez ancak bu vitaminin diyet ile alınan D₃ formundan 25-hidroksikolekalsiferol formuna dönüştürülmesi gerçekleşir. İskelet sistemi ve kemik mineralizasyonu için önemli olan D vitamini 3-4 ay eksikliği görülmeyecek düzeyde karaciğerde bulunur. K vitamini, protrombin gibi pıhtılaşma faktörlerinin karaciğerde sentezlenmesinde yer alır. Bu vitamin, diyet ve bağırsak florasındaki bakterilerin sentezlemesi ile şilomikronlarla birlikte karaciğere gelir. Burada emilip bir kısmı kullanılırken bir kısmı da VLDL ile salınır. Karaciğerde depolanan vitaminlerden biri olan B₁₂ büyük miktarlarda depolanabildiği için bir yıl veya daha fazla eksikliği görülmeyebilir [38,48]

Billirubin metabolizmasındaki işlevi; hemoglobinin toksik yıkım metaboliti olan billirubin suda çözünmeyen ve kanda albümine bağlı olarak bulunan bir maddedir. Karaciğerde hepatositler tarafından alınan billirubin bu hücrelerde toksik olmayan ve suda çözünen billirubin glukuronide çevrilir. Bir kısmı dolaşıma geçerken bir kısmı da safra yolu ile bağırsağa geçer ve feçes ile atılır [43].

Kanın filtrasyonu işlevi; v. porta ile bağırsaklardan gelen kanda bakteri varlığı görülür. Venöz sinüzoidlerde bulunan Kupffer hücreleri bu bakterileri fagosite ederek kanın temizlenmesini sağlar. Böylece bakterilerin sistemik dolaşıma katılması engellenir [48].

2.2. Akut Karaciğer Hasarı ve Yetmezliği

Akut karaciğer yetmezliği (AKY) hepatositlerin hızla hasarlandığı ve organın rejenerasyon sürecinin hepatosit kaybını telafi edemediği süreçlerde ortaya çıkar. Fulminan karaciğer yetmezliği olarak da isimlendirilen AKY, ilk 1950'lerde özel bir hastalık olarak tanımlanmıştır. Günümüz gelişmiş tedavi uygulamalarına rağmen hala AKY varlığı çok kısa sürede hepatic koma veya ölüm ile sonuçlanabilir. AKY'nın birçok sebebi olabilir, bunlardan başlıcaları viral enfeksiyonlar ve yüksek doz ilaç toksisitesidir. Tedavide ortotopik karaciğer nakli uygulamaları 5 yıllık sağkalım oranlarını önemli ölçüde arttırmıştır. Ancak nakil uygulaması; organ rejeksiyonu, immunsupresyon nedeniyle yaşanan yan etkiler [49] ve donör sayısı kısıtlılığı [50] gibi sebeplerden ötürü zorluklar ile karşılaşılan bir tedavi yaklaşımıdır.

Yüksek doz APAP alımı akut karaciğer hasarına ve sonrasında da AKY'ye sebep olur. Asetaminofen'nin vücuda alınımından birkaç saat içerisindeki tedavide aktif kömür kullanılır. Bu uygulama intestinal sistemdeki asetaminofen miktarını azaltmaya yarar. Bunun yanı sıra asetaminofenin klinikte kullanılan antidotu NAC, yüksek doz APAP tedavisinde en kısa sürede uygulanmaktadır [30, 51].

Karaciğer rejenerasyonunu inceleyen çalışmalarda genellikle deneysel parsiyel hepatektomi ve kimyasal hasar modelleri kullanılmaktadır. Parsiyel hepatektomi modeli yaygın olarak kullanılırken son zamanlarda araştırmacılar kimyasal madde ile hasar oluşturulan karaciğerdeki rejenerasyon çalışmalarına odaklanmaya başlamıştır. Bu çalışmalarda karbon tetraklorür (CCl₄), tiyoasetamit (TA), asetaminofen (APAP), kloroform en yaygın kullanılan ve hepatosit ölümüne sebep olarak karaciğer hasarı meydana getiren kimyasallardır. Bu yöntemler dışında iskemi/reperfüzyon veya kronik diyet modelleri gibi rejenerasyon araştırmalarının alışık olunmadığı modellerin de kullanıldığı literatürde görülmektedir. Ancak bu konudaki en güvenilir sonuçlar parsiyel hepatektomi veya APAP gibi kimyasalların sebep olduğu akut karaciğer hasarı modellerinden elde edilmektedir [52].

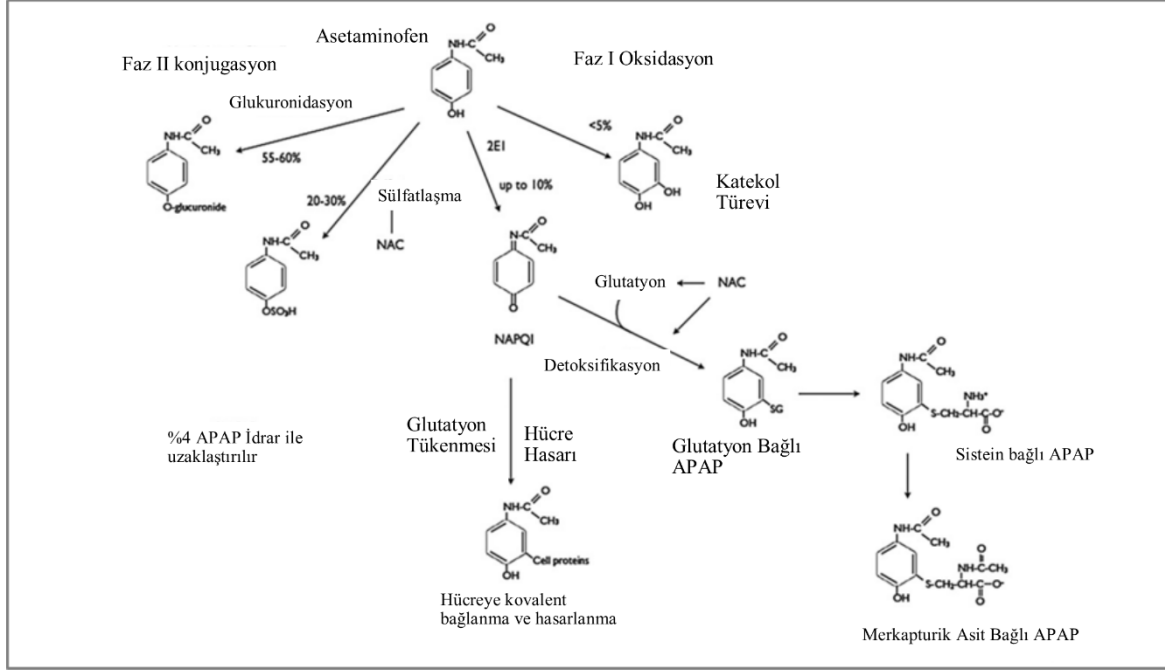
2.3. Asetaminofen

Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) adlandırması N-(4-hidroksifenil) asetamid olan asetaminofen, 1951 yılında Amerika Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından kullanımını onaylanan bir ilaçtır [53].

2.3.1. Moleküler özellikleri ve farmakokinetiği

Asetaminofenin moleküler formülü $C_8H_9NO_2$ ve moleküler ağırlığı 151,16 g/mol'dür. Beyaz renkli, kokusuz ve toz formunda bulunan bir maddedir [53].

Amerika'da asetaminofen (APAP; N-asetil-para-aminofenol), Avrupa'da ise parasetamol olarak isimlendirilen bu ilaç, tüm dünyada yaygın olarak kullanılan analjezik ve antipiretik etkisi olan bir maddedir. Asetaminofen oral yolla vücuda alındığında ilk emilim bağırsak epitelinden parasellüler ve transsellüler olarak gerçekleşir. Oral biyoyararlanımı %88 oranında olmakla beraber en yüksek emilimin konsantrasyonuna vücuda alındıktan 90 dakika sonra ulaşır [54]. Asetaminofenin plasmadaki yarılanma ömrü 2 saat iken hepatik hasarın olduğu durumlarda yarılanma ömrü 4 saatten daha uzun olabilir [55,56]. APAP, karaciğerde metabolize olarak farklı inaktif eşlenik maddelere çevrilir. Toplam APAP yaklaşık olarak %52-57 oranında APAP-glukuronid, %30-44 oranında APAP-sülfat ve %5-10 oranında N-asetil-p-benzokinonimine (NAPQI) çevrilirken %5 oranındaki APAP ise metabolize olmadan vücuttan atılır. Toksik bir metabolit olan NAPQI'nin üretimi APAP dozuna bağlı olarak artar ve hücrelerde hasar oluşmasına sebep olur [54] (Şekil 2.4).

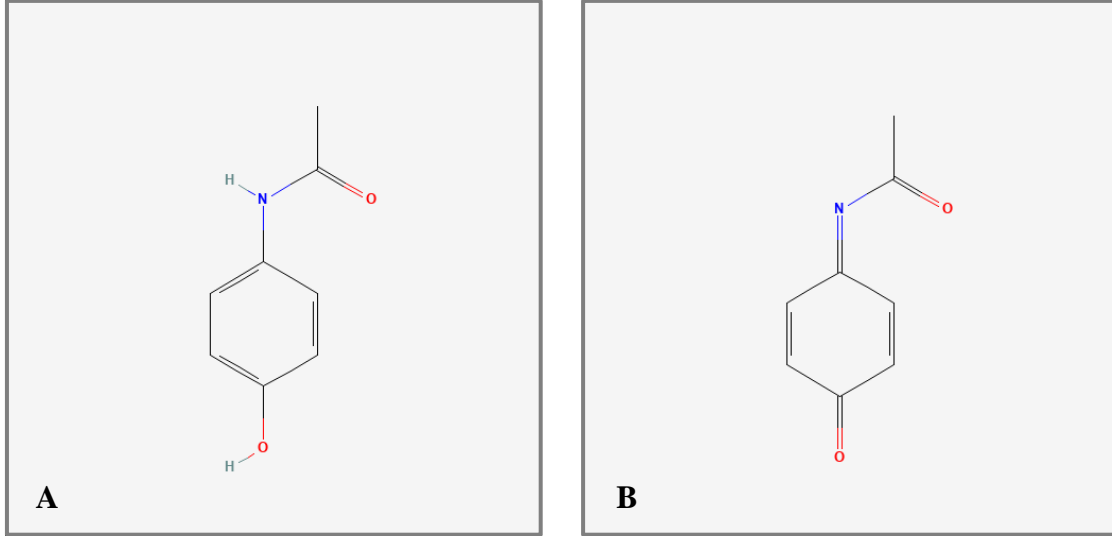


Şekil 2.4. APAP ve NAC etki mekanizması [55] (Türkçe'ye çevrilmiştir)

2.3.2. APAP'ın etki mekanizması

APAP'ın etki mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte siklooksigenaz (COX) sinyal yollarını inhibe ettiğinden ötürü nonsteroidal antiinflatuar ilaçlar (NSAID) sınıfında kabul edilmektedir. NSAID'lerden farklı olarak periferel anti-inflatuar etkinliği bulunmamaktadır. APAP'ın COX inhibitörü olduğu bilinmektedir, ancak COX-1 veya COX-2 enzimlerinin aktif bölgelerine bağlanmadan farklı bir mekanizma üzerinden enzimatik aktivitelerini azalttığı düşünülmektedir. Ayrıca COX-3 üzerinde de inhibe edici etkisi olduğunu iddia eden çalışmalar bulunmaktadır [57].

APAP, karaciğerde sitokrom P450 enzimi tarafından N-asetil-p-benzokinonimine (NAPQI) çevrilmekte ve GSH ile metabolize edilerek karaciğerden uzaklaştırılmaktadır [58] (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Asetaminofenin (A) ve NAPQI'nın (B) kimyasal formülünün 2 boyutlu görüntüsü [53]

2.3.3. APAP'ın toksisitesi

FDA, güvenli kullanım dozunun günlük en yüksek 4000 mg miktarında olduğunu belirtmiştir [59,60]. Kan beyin bariyerini ve plasentayı geçebilen asetaminofenin terapötik doz aralığındaki kullanımının güvenli olduğu bildirilmiştir [61,62]. Fakat asetaminofenin ulaşılabilirliğinin kolay olması ve tüm dünyada yaygın bir şekilde kullanılması sebebi ile istemli veya istemsiz doz aşımaları olabilmektedir. Yüksek doz alımlarının akut karaciğer hasarından organ nakline kadar ilerleyen durumlara yol açabildiği bildirilmiştir [5]. Yüksek doz APAP, GSH tükenmesine sebep olmakta ve bunun sonucunda oksidatif stres gelişimiyle karaciğer hasarı meydana gelmektedir [63]. Reaktif bir metabolit olan NAPQI'nın yüksek doz APAP varlığında birikerek karaciğerde oksidatif stresle birlikte mitokondriyal disfonksiyon ve hücre ölümüne sebep olduğu bilinmektedir [64]. Yüksek miktardaki NAPQI, GSH sentez reaksiyonunda yer alan glutatyon sentetaza bağlanır ve bu enzimi inhibe eder. Bunun sonucunda GSH sentezlenemediği ve mevcut GSH APAP detoksifikasyon süreci için yeterli olmadığı için hepatik hasar meydana gelir. Yüksek doz APAP'a etkin kalmak hepatositlerde yaygın nekroza sebep olduğundan bu toksisitede steril inflamatuvar yanıt görülür. APAP kaynaklı hepatosit nekrozu; mitokondrial-DNA, nükleer DNA fragmentleri ve ATP de dahil olmak üzere hasar ile ilişkili moleküler modellerin (DAMPs) ortaya çıkmasına sebep olur. DAMPs salınması sonrası toll benzeri reseptörlere (TLRs) bağlanarak kemokin ve sitokin transkripsiyonlarının ve ifadelerinin artmasına yol

açar. Bu süreçte aktive olan inflamazom inflamatuvar hücrelerin bölgeye toplanmasını sağlar [65].

Artan reaktif oksijen türlerinin (ROS) c-Jun N-terminal kinaz (JNK) aktivasyonunu indüklediği ve bu yolağın da mitokondriyal membran geçirgenliğini arttırarak hücre solunumuna etki ettiği gösterilmiştir [66]. Yapılan çalışmalar yüksek doz asetaminofen kaynaklı karaciğer hasarında IL-1 β ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin arttığını göstermiştir [7,67].

Yapılan bir çalışmada APAP hepatotoksitesini araştırmak amacı ile yüksek doz APAP verilen grupta artan malondialdehit (MDA) ve süperoksit dismutaz (SOD) seviyelerinin APAP ile beraber C ve E vitamini uygulanan gruplarda azaldığı gösterilmiştir [68]. APAP ile beraber antioksidan ve anti-inflamatuvar bir madde olan kurkumin uygulamasının IL-1 β , IL-8 ve TNF α seviyelerini APAP verilen gruba göre azalttığı belirlenmiştir. Ayrıca kurkumin uygulamasının yüksek doz APAP kaynaklı ortaya çıkan yaygın nekroz ve inflamasyonu azalttığı gösterilmiştir [69]. Günümüzde APAP kaynaklı karaciğer hasarına yönelik tedavide uygulanabilecek maddeler halen önemli bir araştırma konusudur.

2.4. Karaciğerin Rejenerasyonu

Yunan mitolojisinde geçen Prometheus miti o dönemde bile karaciğer rejenerasyonunun bilindiğini göstermektedir. Mitolojiye göre Prometheus, Olimpos tanrılarında ateşi çalar ve insanlara verir. Bunu öğrenen tanrılar ise Prometheus'u sürgüne gönderir ve cezalandırır. Cezası ise bir kayaya zincirlenerek her gün tanrılar tarafından gönderilen bir kartalın gelip karaciğerinden bir parça yemesidir. Gece boyunca yenilenecek iyileşen Prometheus'un karaciğeri gündüz gelen kartal tarafından yine bir parça yenir. Karaciğerin rejenerasyon kapasitesinin yüksek olması sebebi ile kartal sonsuza kadar beslenirken Prometheus ise sonsuza kadar acı çeker [70].

Postnatal süreçte gelişimin tamamlanması ile organların rejenerasyon kapasiteleri azalır. Bu nedenle organ hasarından sonraki iyileşme rejenerasyondan çok hasarın fibrozis ile onarımı şeklindedir [71]. Yetişkin bir bireyde rejenerasyon kapasitesi en etkin olan organ karaciğerdir. Karaciğer, herhangi bir hasarlanma veya cerrahi işlem sonrası kütleli olarak azalmasından sonra %100 eski haline dönebilen tek solid organdır. Diğer organlar

hasarlanmadan sonra iyileşme gösterirken tam anlamı ile işlevsel olarak eski haline dönemez [72]. Karaciğer rejenerasyonu, hücrelerin çoğalması veya farklılaşması yolu ile gerçekleşir. Hepatektomi veya akut karaciğer hasarı sonrası görülen yaygın rejenerasyonda hepatositler olmak üzere karaciğerde yer alan kolanjiyosit, sinüzoid endotel hücresi ve Kupffer hücre proliferasyonu görülür.

Hepatositlerin hücre çoğalması ile meydana gelen rejenerasyon; başlangıç fazı, proliferasyon fazı ve terminal fazdan oluşan bir süreci içerir. Rejenerasyonu başlatan süreçler hasara yanıt olarak salınan sitokinler tarafından düzenlenir. Başlangıç fazında, hepatositler hücre döngüsünün G1 fazına girerler. Bu süreçte karaciğere gelen venöz kandaki ve portal basınçtaki artış sebebi ile sinüzoidlerdeki basınç da artar. Sinüzoid endotel hücreleri artan basıncın mekanik etkisi ile urokinaz plazminojen aktivatör salınımını artırarak matriks metalloproteinaz aktivasyonunun ve bunun sonucu olarak da ekstrasellüler matriksin yeniden düzenlenmesine sebep olur. Ayrıca proinflamatuvar sitokinlerden olan interlökin 6 (IL-6) ve tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) bu evrede mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (MAPK), fosfatidilinositol-3-kinaz/protein kinaz B (PI3K/AKT) ve nükleer faktör kappa B (NF κ B) gibi sinyal yollarını aktive ederek rejenerasyon sürecinde hepatositlerin proliferasyonunu artırır [73]. Rejenerasyon sürecinin ikinci fazı olan proliferasyon fazında hepatositler G1/M fazına geçerek mitoz sürecine girerler. Bu süreçte tam mitojenler ve ikincil mitojenler yer alır. HGF, TGF- α ve epidermal büyüme faktör (EGF) gibi mitojenlerin hepatotrofik etkinliği vardır. Bu büyüme faktörleri DNA sentezini destekleyerek hücre çoğalmasını sağlarlar. İkincil mitojenler ise tek başlarına mitoz sürecini başlatamazken yokluklarında rejenerasyon sürecinde gecikmelere sebep olurlar. VEGF, östrojen, norepinefrin ve safra asiti rejenerasyonu destekleyen ikincil mitojenlerdir [74]. Karaciğer yenilenmesi sürecinde karaciğer ağırlığının vücut ağırlığına oranı %2.5 olduktan sonra yenilenme süreci yavaşlamaya başlar. Böylece rejenerasyonun son fazı olan terminal faza geçilmiş olur. TGF- β proliferasyon inhibitörüdür ve siklin D, E ve siklin bağımlı kinaz (CDK) 2, 4 gibi hücre siklusu düzenleyicilerini inhibe eder. Böylece hücre çoğalmasını baskılayarak karaciğer yenilenmesinin sonlanmasında rol alır. Ayrıca aktivin ve C/EBP α , DNA sentezini baskılayarak ve hücre siklusunu durdurarak hepatosit proliferasyonunun azalmasını sağlar böylece karaciğerin kontrolsüz büyümesini engellemiş olur [74,75].

Karaciğer rejenerasyonu, hepatositlerde artan proliferasyonun yanı sıra kök hücre farklılaşması yolu ile de gerçekleşir [76]. Hepatosit çoğalması yetersiz kaldığında biliyer

epitel hücreleri fakültatif öncül hücrelere dönüşürler. Bu hücreler “oval hücre” olarak bilinen ve Hering kanalında bulunan hücrelerdir. Oval hücreler hem hepatositlere hem de kolanjiyositlere farklılaşabilme yeteneği olan progenitör hücrelerdir [77]. Karaciğer rejenerasyonu uzun yıllardır araştırılan fakat henüz tam olarak mekanizması çözülememiş bir araştırma konusudur. Bununla birlikte farklı patolojilerde ve hasar durumlarında farklı sinyal yolları üzerinden rejenerasyonun gerçekleştiği bilinmektedir.

2.4.1. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF)

Fizyolojik süreçlerde gerçekleşen anjiyogenez, embriyonik ve fetal gelişimde yer alan önemli bir süreçtir. Yetişkin dönemde ise iskelet gelişiminde, üreme organlarında ve hamilelikte fizyolojik anjiyogenez görülür. Ayrıca doku rejenerasyon sürecinde de anjiyogenez önemli bir fizyolojik mekanizmadır. Bunun dışında tümör gelişimi ve diyabetik retinopati gibi patolojik süreçlerde anjiyogenez görülür. VEGF hem fizyolojik hem de patolojik anjiyogenez sürecinde rol alır [78].

VEGF protein ailesi trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF)/VEGF süpergen ailesi içerisinde yer alır. Bu protein ailesinin, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve VEGF-E gibi birçok üyesi bulunur. VEGF-A hem progenitor hücrelerden damar oluşumunun gerçekleştiği vaskülogenez hem de mevcut damarlardan endotel hücre proliferasyonu ile gerçekleşen anjiyogenez sürecinde görev alan önemli bir proteindir.

VEGF ekspresyonu transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel olarak düzenlenir. VEGF geninin promotörü birçok transkripsiyon faktör (HIF-1, Sp1, Stat3, AP-1 gibi) için bağlanma bölgeleri içerir. VEGF mRNA transkripsiyonu, büyüme faktörleri EGF, TGF- β ve sitokinler TNF- α ve interlökin-1 beta (IL-1b), NF κ B yolları ve östrojen ile düzenlenir [79,80].

VEGF ailesi, VEGFR1, VEGFR2 ve VEGFR3 reseptörlerine bağlanırlar. VEGF-A ise VEGFR1 ve VEGFR2 reseptörlerine bağlanarak anjiyogenezi, vasküler geçirgenliğin düzenlenmesini, ve migrasyonu destekler [78,81].

VEGF, vasküler ve lenfatik sistemde yer alan endotel hücre proliferasyonu için gerekli bir büyüme faktörüdür [80]. APAP kaynaklı hepatotoksiste varlığında VEGF ve VEGF reseptör ifadelerinin ve ayrıca PCNA ile hücre proliferasyonunun da arttığı gösterilmiştir.

APAP kaynaklı hasar ortaya çıktığında hepatositler VEGF salgılayarak sinüzoid endotel hücrelerindeki VEGFR2'ye bağlanır ve sinüzoid endotel hücrelerinin proliferasyonunu sağlar. Sinüzoid endotel hücreleri de HGF salgılayarak hepatosit proliferasyonunu destekler. Ayrıca makrofajlardaki VEGFR1'e bağlanarak hasarlı bölgeye makrofaj toplanmasını ve fagositoz ile nekrotik hücrelerin bölgeden uzaklaştırılmasını sağlayarak rejenerasyonu destekler [72,82,83].

2.4.2. Alfa fetoprotein (AFP)

Alfa fetoprotein (AFP), albümin benzeri protein ailesinde yer alan bir glikoproteindir. Bu proteinin ilk serumda görülmesi gelişimin 5. ayından önce olduğu için erken dönem gelişiminde önemli olduğu düşünülmektedir. Karaciğer, özellikle 12. hafta civarında vitellus kesesinin gerilemesi ile AFP'nin üretildiği primer organdır. Gebelik boyunca maternal ve fetal dolaşımdaki AFP seviyesi değişir. Maternal kandaki AFP'nin fetal gelişim ile ilişkisi bilinmektedir. Bu nedenle AFP, prenatal tarama testlerinde konjenital anomalilerin tespiti için kullanılan belirteçlerden biridir [84].

AFP fetal dönemde ifadesinin yüksek olduğu sonrasında ise baskılandığı ve hepatoselüler karsinoma durumunda AFP miktarında artış olduğu bilinmektedir. Ancak sitoplazmik AFP'in sinyal yollarında aldığı rol tam olarak anlaşılmamıştır. Yapılan bir çalışmada AFP'nin bir tümör baskılayıcı protein olan fosfataz ve tensin homologuna (PTEN) bağlanarak PTEN fonksiyonunu baskıladığı ve bu sinyal yolağının devamında bulunan diğer proteinlerle birlikte AKT proteininin de birikimini ve aktivasyonunu sağlayarak hücre büyümesi ve proliferasyonunun artmasına sebep olduğunu göstermişlerdir [85]

AFP, yetişkin dönemde ifadesi baskılanan bir proteinken karaciğer rejenerasyonunda ve karaciğerde tümör oluşumunda ifadesi artar. Normal karaciğerde bazal seviyedeki AFP ifadesinin düzenlenmesi *Afr1* ile olurken rejenerasyon durumunda AFP ifadesinin artmasında *Afr2* geni rol alır [86]. AFP, hepatoselüler karsinomada tümör belirteci olmasının yanı sıra progenitör hücre aracılı karaciğer rejenerasyonu çalışmalarında rejenerasyon belirteci olarak incelenmiştir [87-89].

2.4.3. Proliferatif hücre nükleer antijeni (PCNA)

Proliferatif hücre nükleer antijeni (PCNA), DNA kayar kısaç gen ailesinde bulunan bir gendir. PCNA, DNA sentezlenmesi sırasında DNA polimeraz III'e bağlanarak DNA ipliğinden ayrılmasını engeller böylece ipliğe yeni nükleotit bağlanmasını ve DNA sentezinin hızlanmasını sağlar. Ayrıca DNA polimeraz ile diğer replikasyon proteinlerinin bağlanmasında bir platform işlevi görür [90]. Hücre siklusunda DNA sentezi için gerekli histon olmayan nükleer bir protein olan PCNA, DNA replikasyonunun yanı sıra DNA tamirinde de rol alır. Ayrıca senesens hücrelerde çok az miktarda PCNA mRNA'sı bulunduğu bildirilmiştir [91].

DNA'nın duplikasyonu hücre siklusunun S fazında gerçekleştiğinden bu süreçte PCNA ifadesi de artar [90]. Yapılan çalışmalar immünohistokimyasal boyamalarda PCNA ifadesinin hücre siklusunu sürecinde en yüksek seviyede S fazında olduğunu, G1, G2 ve M fazında daha düşük tutulum görülürken G0 fazında boyanma görülmediğini bildirmiştir [92,93].

Karaciğer rejenerasyonunda hücre proliferasyonu belirteci olarak kullanılan PCNA'nın, değerlendirilmesi tutulum gösteren koyu kahverengi boyanmış çekirdeklerin sayılması ile yapılır [94-97].

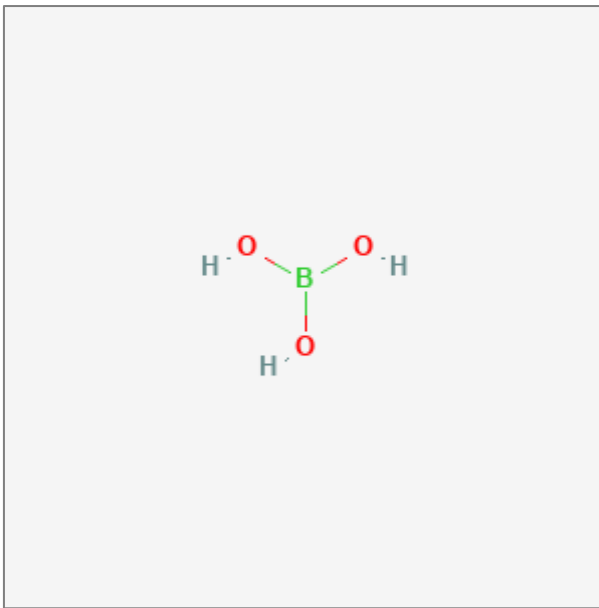
2.5. Borik Asit

Bor, periyodik tabloda beşinci sırada yer alan ve "B" harfi ile gösterilen bir elementtir. Toprak, kaya, su ve atmosferde bulunan bu element doğada serbest bir halde bulunmaz ve oksijen ile birleşerek inorganik borat bileşiklerini oluşturur [23]. Boraks, kolemanit, üleksit ve kernit dünya genelinde bor kaynağı olarak kullanılan önemli bor mineralleridir [98]. Dünyada Türkiye, Amerika ve Rusya önemli bor rezervlerine sahip ülkelerdir. Toplam rezervin %73'ü Türkiye'deki bor yataklarında bulunur [99]. Bu sebeple bor ülkemiz için stratejik öneme sahip doğal bir kaynaktır.

Bitkilerin büyümesi ve gelişimi için esansiyel bir mikrobeyin olan borun hayvan ve insanlar için de beyin, böbrek ve iskelet sistemi için gerekli olduğu belirtilmiştir [23]. Bor, meyve ve yeşil yapraklı sebzelerin yanı sıra baklagiller, buğday, pirinç, mısır ve balda bulunur. Borun

en yüksek oranda alındığı ana kaynak ise su ve tarımda kullanılan gübrelerdir [100]. Henüz biyokimyasal olarak etki mekanizması tam olarak bilinmemesine rağmen yapılan çalışmalarda borun hücre membran fonksiyonu ve yapısını etkileyerek mineral olması sebebiyle hücre metabolizması ile ilgili sinyal yollarında regülasyona sebep olabileceği belirtilmiştir [101]. Borun, beş karbonlu riboz şekerine bağlanarak nükleik asitler ve adenin trifosfat (ATP), nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP) gibi koenzimler üzerinde etki gösterebileceği düşünülmüştür. Ayrıca borun kalsiyum, magnezyum, fosfor ve alüminyum gibi mikrobelerin metabolizmasında ve kemik gelişimi ve devamlılığı üzerinde düzenleyici bir rol oynadığı literatürde belirtilmiştir [100].

Bor atomu proton vermeyen hidroksil iyonu alan Lewis asit gibi davranır ve hidroksil grubu olan karboksilik asitler, amino asitler, nükleotidler ve karbonhidrat gibi makromoleküllerle esterleşme reaksiyonuna girerek bileşikler oluşturur [100,102]. Doğal aköz sistemlerde borun en yaygın bulunan formu borik asit ve borat iyonudur [103]. Bor, pH 7'den düşük olduğu durumlarda borik asit ($B(OH)_3$) formunda bulunurken pH 10.5'den yüksek olduğu durumlarda ayrıışmış borat ($B(OH)_4^-$) formunda bulunur [104]. Moleküler ağırlığı 61,84 g/mol olan borik asit suda çözünen, kokusuz, beyaz toz halinde bulunan bir maddedir [105]. Borik asit; antiseptikler, hijyen ürünleri, seramik ve cam ürünler, pestisitler ve gübre gibi çeşitli endüstriyel ürünlerin içeriğinde bulunmaktadır. Ayrıca adjuvan veya tampon madde olarak farmasötik formülasyonlarda da kullanılmaktadır [20,21]



Şekil 2.6. Borik asitin kimyasal formülünün 2 boyutlu görüntüsü [105]

Borik asit insan ve hayvanlarda oral yol ile alındığında gastrointestinal sistem epiteli üzerinden tamamen emilir. Bor ve oksijen arasındaki bağların kırılması için yüksek enerji gerektiğinden vücutta metabolize olmaz. Borik asitin insanda yarılanma ömrü yaklaşık 21 saat, sıçanlarda ise yaklaşık 14-19 saattir. Yetişkinlerde alınan miktarın %94'ü idrar ile atılırken %2'si feçes ve az miktarlar da ter, safra ve solunum ile atılır [23,100].

Borik asitin alkol ile oluşturulan karaciğer ve böbrek hasarı üzerindeki etkileri yapılan çalışmalar ile araştırılmıştır. Bu çalışmalarda borik asit uygulanan grupta apoptozisin azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca alkol uygulanan grubun karaciğer dokularında artan TNF α ifadesinin borik asit uygulaması sonucu azaldığı belirtilmiştir [27,106]. Borik asitin karaciğerde iskemi/reperfüzyon hasarı üzerine etkisi incelendiğinde borik asit uygulamasının morfolojik hasarı ve alanin aminotransferaz (ALT) seviyesini azalttığı gösterilmiştir [107]. Günümüzde borik asitin antioksidan, anti-inflamatuar ve antienotoksik etkisi olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu çalışmalar ışığında kanser, yara iyileşmesi, oksidatif stres hasarı ve toksisite üzerinde borik asit etkileri araştırılmaya devam etmektedir [27,108-110]

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan G.Ü.ET-21.025 kod numarası ile etik kurul onayı alınarak yapıldı. Çalışmada, asetaminofen ile karaciğer hasarı oluşturulmak üzere ağırlıkları 185-225 g aralığında olan 35 adet Sprague Dawley cinsi erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanların barınma koşulları 20-25°C sıcaklık, %55 nem olan ortamda, 12 saat karanlık ve 12 saat aydınlık siklus olacak şekilde ayarlandı. Hayvanlar kısıtlama olmaksızın ad-libitum beslendi ve suya serbest olarak erişimleri sağlandı. Sıçanlarda planlanan çalışma modelinin oluşturulması, hayvanların izlenmesi ve sakrifikasyonu Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Deney Hayvanları Bakım ve Araştırma Ünitesinde gerçekleştirildi.

3.1. Kullanılan Kimyasallar

Kullanılan kimyasal maddeler ayrıntılı olarak çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal malzemeler

<i>Kimyasal Malzeme</i>	<i>Marka, Katalog Numarası</i>
Asetaminofen	Sigma, A7085-100G
Borik Asit	Tekkim, TK.020100.01002
VEGF-A	Bioss, bs-1957R
AFP	Abcam, ab46799
PCNA	Elabscience, E-AB-40056-60ul
Sitrat Tamponu	Thermoscientific, AP-9003-999
PBS Tablet	BioShop, PBS404.100
Diaminobenzedin (DAB) Kiti	Thermoscientific, TA-125-HD
Ultravision Detection System Kit (Anti-polyvalent, HRP)	Thermoscientific, TP-125-HL
Sodyum Dihidrojen Fosfat Dihidrat	Isolab, 969.053.1000
Disodyum Hidrojen Fosfat Dihidrat	Isolab, 969.086.1000
Formaldehit	Tekkim, TK.911012.02501
Hematoksilen	BesLab, BS-001
Eozin	BesLab, BS-0013
Absolut Ethanol	Isolab, 920.026.2500
Teksoll (%96 Ethanol)	Tekkim, TK.200650.05001
Glasiyal Asetik Asit	Isolab, 901.013.2500
Hidrojen Peroksit	Merck, M108597.2500
Ksilen	Tekkim, TK,090270.05003

3.2. APAP ile Karaciğer Toksisitesinin Oluşturulması ve Tedavi Gruplarına Borik Asit Uygulaması

Sıçanlar aşağıda belirtildiği gibi her grupta 7 hayvan olacak şekilde rastgele 5 gruba ayrılmıştır;

Grup 1 (n=7): Kontrol grubu

Bu gruptaki hayvanlara APAP çözücüsü olarak kullanılan %2'lik Arap Zamkı gavaj ile verilirken [111] borik asit çözücüsü olan salin intraperitoneal olarak [107] uygulandı.

Grup 2 (n=7): APAP grubu

Bu gruptaki hayvanlara APAP, 3 g/kg olacak şekilde tek doz [112] gavaj ile verildi.

Grup 3 (n=7): APAP, 1 saat sonra Borik Asit grubu

Bu gruptaki hayvanlara 3 g/kg APAP gavaj ile verildikten 1 saat [113] sonra 200 mg/kg borik asit intraperitoneal olarak uygulandı.

Grup 4 (n=7): APAP, 8 saat sonra Borik Asit grubu

Bu gruptaki hayvanlara 3 g/kg APAP gavaj ile verildikten 8 saat [114] sonra 200 mg/kg borik asit intraperitoneal olarak uygulandı.

Grup 5 (n=7): Borik Asit grubu

Bu gruptaki hayvanlara 200 mg/kg borik asit [25] 3. grup ile eş zamanlı intraperitoneal olarak uygulandı.

Karaciğer toksisite modeli oluşturmak için 3 g/kg dozunda uygulanan asetaminofen, distile su ile hazırlanan %2'lik Arap zamkı içinde çözüldü. 200 mg/kg dozunda uygulanan borik asit için hazırlanan solüsyon salin içinde çözüldü. Çalışmaya başlamadan önce sıçan ağırlıkları ölçüldü. Çalışmada 1. ve 5. grup dışındaki tüm gruplara APAP, 3 g/kg olacak şekilde gavaj ile tek doz uygulandı [112]. APAP uygulamasından 24 saat sonra tüm sıçanlar ksilazin (5-8 mg/kg/i.p.) ve ketamin (75-90 mg/kg/i.p.) anestezisi altında kalpten kan

alınarak sakrifiye edildi. Alınan karaciğer dokuları tartıldıktan ve makroskopik olarak değerlendirildikten sonra disseksiyonları yapılarak sağ median lobu %10'luk nötral formaline alınırken sol lobu alkol-formol solüsyonu içerisine alındı. Solüsyon içerikleri Çizelge 3.2'de detaylı olarak belirtilmiştir. Biyokimyasal analizler için toplanan kanlar jelli tüpe alınarak serumları analizler için ayrıldı.

3.3. Histokimyasal ve İmmunohistokimyasal Değerlendirme

Değerlendirme için fiksatif solüsyonlarına alınan dokular uygun fiksasyon süreleri tamamlandıktan sonra aşağıda detaylıca belirtilen şekilde takip edildi.

3.3.1. Dokuların toplanması ve takip edilmesi

- Nötral formalindeki dokular 48 saat oda sıcaklığında tespit edildikten sonra 1 saat akar suda yıkandı.
- Formol-alkol solüsyonundaki dokular 24 saat oda sıcaklığında tespit edildikten sonra 1 saat %75'lik alkol solüsyonunda yıkandı.
- Dokular yıkama işlemi bittiğinde 1 saat %75'lik alkol solüsyonunda tutuldu.
- Ardından tekrar 1 saat %75'lik alkol solüsyonuna konuldu.
- Sonrasında 1 saat %96'luk alkol içerisinde tutuldu.
- %96'luk alkol yenilendikten sonra bir gece oda sıcaklığında tutuldu.
- Dokular 1 saat %100 alkole kondu.
- %100 alkol yenilerek 1 saat daha tutuldu.
- Ardından 2 saat ksilolde şeffaflandırma işlemi yapıldı.
- 2 saatte bir parafin yenilenecek 4 saat parafinde tutuldu.
- Daha sonra dokular parafine gömülerek bloklar haline getirildi.
- Boyama işlemleri için bu bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alındı.

Çizelge 3.2. Fiksatif solüsyonları

<i>%10'luk Nötral Formalin (1L)</i>	<i>Formol-Alkol (1L)</i>
8,149 g Disodyum Hidrojen Fosfat Dihidrat	850 ml Etanol
5,2 g Sodyum Dihidrojen Fosfat Dihidrat	100 ml Formaldehit
100 ml Formaldehit	50 ml Glasiyal Asetik Asit
900 ml dH ₂ O	
Ph 7,4	

3.3.2. Hematoksilen-Eozin (HE) boyama protokolü ve karaciğer hasarının değerlendirilmesi

Karaciğerde oluşan histopatolojik değişiklikleri incelemek amacı ile hematoksilen-eozin boyaması yapıldı.

- Alınan kesitler, deparafinizasyon işlemi için 59°C'lik etüvde bir gece bekletildi.
- Deparafinizasyon işlemi tamamlamak için kesitler 1 saat 59°C'lik etüvde ve 1 saat oda sıcaklığında ksilolde bekletildi.
- Rehidratasyon işlemi için azalan etil alkol serilerinde (%100, %96, %75) 10'ar dakika tutuldu.
- 10 dakika akar su altında yıkanıp alkolden uzaklaştırıldı.
- Yıkama işleminin ardından 14 dakika Harris hematoksilen (BesLab, katalog no; BS-001) boya solüsyonunda tutuldu.
- Daha sonra akar su altında 10 dakika yıkandı.
- Kesitler asit alkol karışımı olan solüsyona 2-3 kez batırılıp çıkarılarak akar su altında 10 dakika yıkandı.
- Kesitler yıkamadan sonra 14 dakika eozin (BesLab, katalog no; BS-013) boya solüsyonunda bekletildi.
- 10 dakika akar su altında yıkandı
- Ardından sırasıyla %75, %96 ve %100'lük artan etil alkol serilerinden geçirildi.
- 45 dakika ksilolde bekletilip kesitler entellan ile kapatıldı.
- Hazırlanan örnekler DM 4000B (Leica, Germany) bilgisayar destekli ışık mikroskopunda $\times 100$, $\times 200$ ve $\times 400$ büyültmelerde gözlemlendi ve Leica Las V4.9 programı kullanılarak boyalı örneklerin görüntüleri alındı.

HE boyalı karaciğer doku örneklerinde karaciğer hasarı, nekroz, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, konjesyon, hemoraji ve sinüzoidal dilatasyon bulgularının 0-3 arasında skorlandığı yarı kantitatif bir yöntemle değerlendirildi. Bu yöntemle göre her bir bulgu için normal görünümdeki örnekler “0”, hafif bulguların olduğu örnekler “1”, orta şiddette bulguların olduğu örnekler “2” ve şiddetli bulguların gözlendiği örnekler “3” puan verilerek skorlandı. Değerlendirme sonucunda her bir değişkene ait ortalama bir skor ve tüm bu değişkenlerin skorları toplamı ile elde edilen bir karaciğer hasar skoru belirlendi [115].

3.3.3. Periyodik Asit Schiff (PAS) boyama protokolü ve boyalı kesitlerin histolojik değerlendirilmesi

Karaciğerin glikojen içeriğindeki değişimleri incelemek amacı ile karaciğerden alınan örneklerin bir kısmından formol-alkol içerisinde fiksasyonu takiben parafin bloklar hazırlandı. Bu bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alındı ve PAS yöntemi ile boyandı.

- Deparafinizasyon işlemi için alınan kesitler, 59°C’lik etüvde bir gece bekletildi.
- Deparafinizasyon işlemi tamamlamak için kesitler 1 saat 59°C’lik etüvdeki ve 1 saat oda sıcaklığındaki ksilolde bekletildi.
- Rehidratasyon işlemi için azalan etil alkol serilerinde (%100, %96, %75) 10’ar dakika tutuldu.
- Kesitler 5 dakika distile su ile yıkandı.
- Daha sonra % 0,5’lik periyodik asit solüsyonunda 35 dakika bekletildi.
- Kesitler 5 dakika distile su ile yıkılarak periyodik asit solüsyonu uzaklaştırıldı.
- Ardından Schiff reaktifi içeren solüsyonda 40 dakika karanlıkta bekletildi.
- Sodyum metabisülfid ile 2 kez 2 dakika yıkandı.
- Sonrasında 5 dakika akar su altında yıkanan kesitler Harris hematoksilen ile 1 dakika boyandı.
- Daha sonra 10 dakika çeşme suyu ile yıkandı.
- Kesitler % 0,5’lik asit alkole 2 kez batırılıp çıkarıldı.
- 5 dakika akar suda yıkandı.
- Ardından sırasıyla %75, %96 ve %100’lük artan etil akol serilerinden geçirildi.
- 45 dakika ksilolde bekletilip kesitler entellan ile kapatıldı.

- Hazırlanan kesitlerden DM 4000B (Leica, Germany) bilgisayar destekli ışık mikroskopunda değerlendirildi ve Leica Las V4.9 programı kullanılarak kesitlere ait $\times 100$, $\times 200$ ve $\times 400$ büyültmesinde görüntüler alındı.

Karaciğerin PAS değerlendirmesinde PAS pozitif hücre yüzdesi dikkate alınarak 4 ölçekli bir skorlama yapıldı. Skorlamada % 0-15 pozitiflik 0, % 16-25 pozitiflik 1, % 26-50 pozitiflik 2, % 51-75 pozitiflik 3 ve % 76-100 pozitiflik 4 olarak değerlendirildi [116].

3.3.4. İmmunohistokimyasal boyamalar ve boyalı kesitlerde immünoreaktivitenin değerlendirilmesi

Vaskülarizasyonun ve rejenerasyonun değerlendirilmesi amacı ile VEGF-A, AFP ve PCNA antikorları ile immünohistokimyasal boyamalar yapıldı.

- Pozitif yüklü lamlara alınan 5 μm kalınlığındaki kesitler 59°C'lik etüvde bir gece bekletildi.
- Etüvden çıkarılan örnekler oda sıcaklığında 45 dakika ksilolde bekletildi.
- Daha sonra 5'er dakika azalan etil alkol serilerinde (% 100, %96, %75) tutuldu.
- Kesitler 2 kez 5'er dakika distile su ile yıkayıp alkolden uzaklaştırıldı
- Dokudaki epitoplarn açığa çıkarılması için, kesitler sitrat tamponu (pH 6.0) içerisine alınarak ısı ile indüklenen antijen dönüştürme işlemi uygulandı. Herbir antikor için ön çalışmalar yapılarak en uygun boyanma elde edilen antijen dönüştürme yöntemi belirlendi.
 - VEGF-A ve AFP için mikrodalga fırında 15 dakika sürede,
 - PCNA için ise 85 °C derecede 2 saat boyunca su banyosunda ısı ile indüklenmiş antijen dönüştürme işlemi yapıldı.
- Kesitler PBS (fosfat tamponlu salin, Phosphate Buffer Saline pH:7.4) ile 3 kez 5'er dakika yıkandı
- Daha sonra metanol ile hazırlanan %3'lük hidrojen peroksit (Merck, katalog no; M108597.2500) içerisine konularak 30 dakika süresince etkin bırakılan dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesi bloklandı.
- Kesitler PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandı.
- Ardından spesifik olmayan bağlanmaları engellemek amacı ile kesitler 30 dakika süreyle UltraV block (Thermo Scientific, katalog no; TP-125-HL) ile etkin bırakıldı.

- UltraV block solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra kesitler belirlenen uygun dilüsyon oranlarında PBS ile hazırlanan antikor solüsyonlarına etkin bırakıldı.
 - 1:100 dilüsyon oranında VEGF-A (Bioss, katalog no; bs-1957R),
 - 1:200 dilüsyon oranında PCNA (Elabscience, katalog no; E-AB-40056),
 - 1:200 dilüsyon oranında AFP (Abcam, katalog no; ab46799) antikor solüsyonu ile gece boyunca +4 °C derecede etkin bırakıldı
- Primer antikor inkübasyonundan sonra kesitler oda sıcaklığına getirildi
- Kesitler PBS ile 4 kez 5'er dakika yıkandı.
- Daha sonra biotin bağlı sekonder antikor (Thermo Scientific, katalog no; TP-125-HL) ile 2 saat oda sıcaklığında etkin bırakıldı.
- Kesitler PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandı
- Sonrasında 30 dakika oda sıcaklığında streptavidin peroksidaz kompleksine etkin bırakıldı.
- Kesitler PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandı
- Diaminobenzedin (DAB) (Thermo Scientific katalog no; TA-125-HD,) solüsyonu 1 ml substrat içerisine 1 damla kromojen olacak şekilde hazırlandı ve her bir antikor için uygun sürelerde etkin bırakıldı.
 - VEGF-A için 4 dakika,
 - PCNA için 2 dakika,
 - AFP için 15 dakika DAB solüsyonuna etkin bırakıldı.
- Reaksiyon PBS ile durdurulduktan sonra 3 kez 5 dakika yıkama yapıldı.
- Sonra hematoksilin ile zemin boyaması yapıldı.
- Kesitler 5 dakika akar suda yıkandı.
- Sırası ile %75, %96 ve %100 şeklinde artan alkol serilerinden geçirildi.
- 45 dakika ksilolde beklendi ve entellan ile kapama yapıldı.
- Hazırlanan kesitlerden DM 4000B (Leica, Germany) bilgisayar destekli ışık mikroskopunda değerlendirildi ve Leica Las V4.9 programı kullanılarak kesitlere ait $\times 200$ büyültmede görüntüler alındı.

Dokuların VEGF-A ve AFP boyamalarından elde edilen sonuçların değerlendirilmesi için her hayvandan v. centralis merkezli 6 alan ve portal alan merkezli 6 alan olacak şekilde

mikrografların analizleri İmage j programı kullanılarak histoloji skor (H-skor) ile yapıldı [117].

Dokularda PCNA boyamalarının değerlendirilmesinde her hayvandan v. centralis merkezli 3 alan ve portal alan merkezli 3 alan olacak şekilde mikrograflar çekildi ve pozitif hücre yüzdesi hesaplandı [118].

H-skor hesaplamaları 0 (boyanma yok), 1+ (zayıf), 2+ (orta) ve 3+ (yoğun) skorları verilip, her doku için her yoğunlukta boyanan hücrelerin yüzdelerinin toplanması ve ağırlıklı boyanma yoğunluğu ile çarpılmasıyla hesaplandı (Eş. 3.1).

$$H \text{ skor} = \sum Pi(i + 1) \quad (3.1)$$

i değeri 1, 2 ve 3 arasında değişirken *Pi* değeri 0-100 arası değerlerle belirlendi [119].

3.4. Biyokimyasal Analizler

Deney sonunda hayvanlardan toplanan kanlar uygun serum tüplerine aktarıldıktan sonra 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serumlar ayrıldı. Elde edilen serumlar analizlerin yapılacağı deney gününe kadar -80°C'de muhafaza edildi. Tüm serumlardan, Otto Scientific markalı kitlerin yönergelerine uyularak alanin aminotransferaz (ALT) (Otto Scientific, katalog no; OttoBC128), aspartat aminotransferaz (AST) (Otto Scientific, katalog no; OttoBC127), total bilirubin (TBİL) (Otto Scientific, katalog no; OttoBC132), gama glutamil transferaz (GGT) (Otto Scientific, katalog no; OttoBC141), alkalın fosfataz (ALP) (Otto Scientific, katalog no; OttoBC124) ve glukoz (Otto Scientific, katalog no; OttoBC142) analizleri yapıldı. Deney sonunda kolorimetrik ölçümler için MINDRAY-BS400 markalı cihaz kullanıldı.

3.5. Üç Boyutlu Modelleme

HE ve PAS boyalı doku örneklerinin histolojik değerlendirmesinde elde edilen bulgular, Cinema 4D (2024) (Maxon computer, Friedrichsdorf, GERMANY) adlı program kullanılarak modellendi. Daha sonra bu modellerdeki patolojilerin oluşumunu göstermek için 3B Animasyonlar yapıldı. Sağlıklı karaciğer lobülü ve APAP'a etkin kalmaya bağlı oluşan patolojilerin olduğu karaciğer lobülüne ait fotoğraflar 1280×720 piksel çözünürlükte

TIFF olarak kaydedildi. 3B animasyon filmi ise MP4 olarak kaydedildi. Daha sonra animasyon sırasında oluşan patolojileri isimlendirmek ve işaretlemek için Capcut adlı video işleme programı kullanıldı. Hareketli görüntüleri cep telefonundan izlemek amacıyla video görüntülerine ait QR kodlar oluşturuldu.

3.6. İstatistiksel Analiz

Çalışma sonucunda elde edilen tüm verilerin normal dağılıma uygunlukları Shapiro-Wilk normallik testi ve histogramları sonucuna göre değerlendirildi. Normal dağılım gösteren veriler tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA) ve ardından Tukey'in çoklu karşılaştırma testi ile analiz edildi. Normal dağılım göstermeyen veriler ise Kruskal-Wallis ve ardından Dunn'un çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirildi. $p < 0,05$ değerler istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi. İstatistiksel analizler GraphPad Prism (Versiyon 10.2.3) programı ile yapıldı. Veriler ortalama±standart hata veya ortanca ve çeyreklikler arası uzaklık şeklinde ifade edildi.

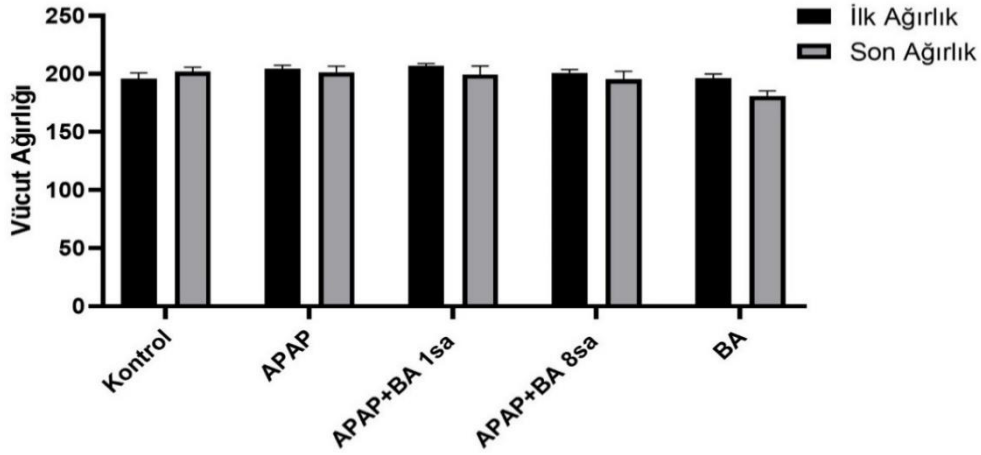
4. BULGULAR

4.1. Makroskobik Bulgular

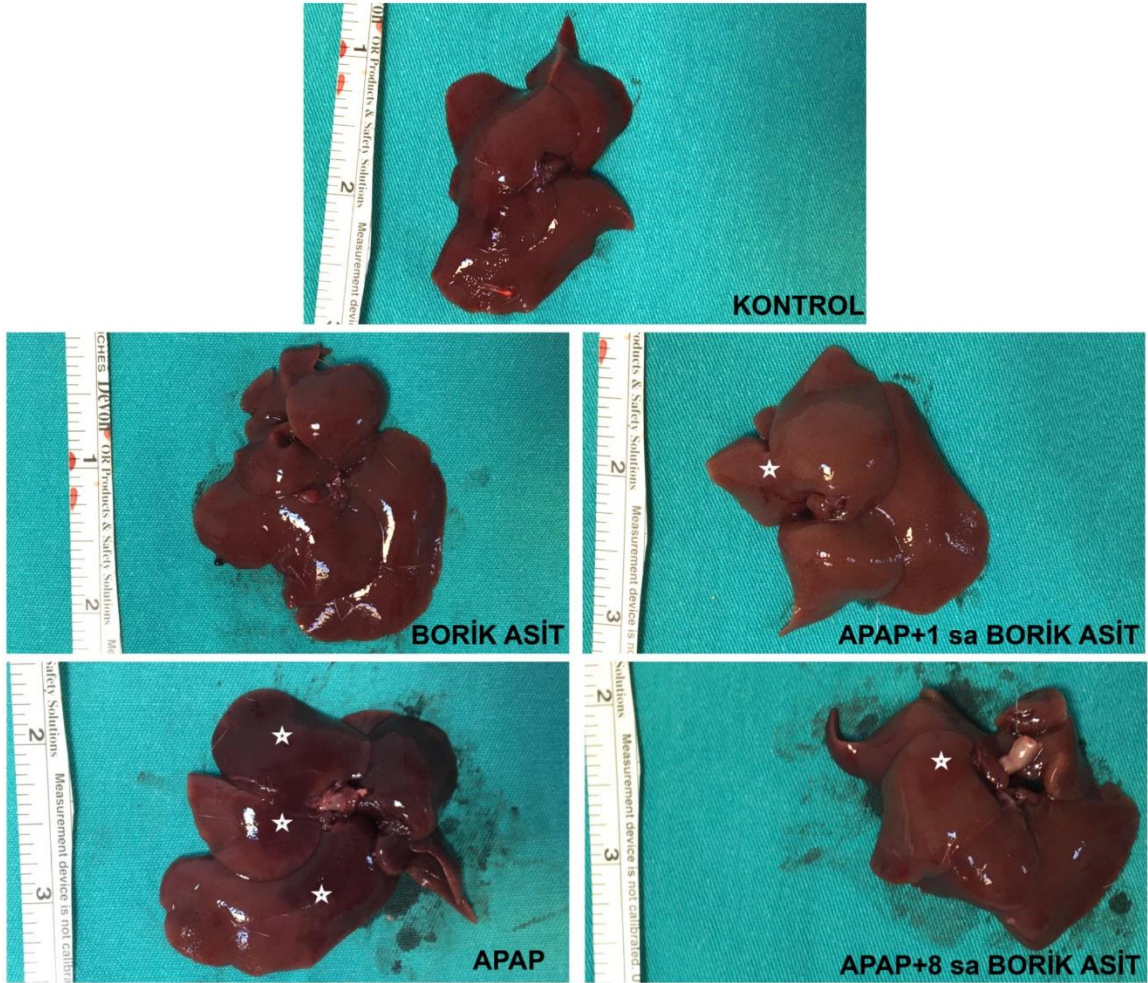
APAP grubunda bir hayvan kaybı oldu. Gruplar ilk ve son hayvan ağırlıkları ve karaciğer ağırlığı/vücut ağırlığı oranı açısından değerlendirildiğinde gruplar arası bir fark görülmedi (Çizelge 4.1) (Şekil 4.1). Makroskobik incelemelerde kontrol grubunda kahverengi ve homojen bir görünüm varken APAP verilen grupta karaciğer loblarında daha koyu kahverengi görünümde renk değişikliği olan alanlar dikkati çekti. APAP verildikten 1 saat ve 8 saat sonra borik asit verilen gruplarda ise APAP verilen gruba göre daha az renk değişimi olduğu görüldü (Resim 4.1).

Çizelge 4.1. Vücut ağırlıkları, ağırlık değişimi, karaciğer ağırlığı/vücut ağırlığı oranı (ortalama±standart hata) (APAP; Asetaminofen grubu, APAP+ BA 1 sa; Asetaminofen verildikten 1 saat sonra Borik Asit uygulanan grup, APAP+ BA 8 sa; Asetaminofen verildikten 8 saat sonra Borik Asit uygulanan grup, BA; Borik Asit grubu)

Gruplar	İlk vücut ağırlığı (g)	Son vücut ağırlığı (g)	Ağırlık değişimi (%)	Karaciğer ağırlığı/ Vücut ağırlığı
Kontrol	195,7± 5,0	202,0± 3,8	3,3	23,14±0,64
APAP	204,2± 3,1	201,3± 5,3	-1,3	23,33± 0,60
APAP+BA 1sa	206,9± 1,9	199,6± 7,3	-3,6	23,44± 0,79
APAP+BA 8sa	200,9± 2,8	195,3± 6,9	-2,9	24,25± 0,85
BA	196,4± 3,5	181,0± 4,3	-7,8	24,98± 0,80



Şekil 4.1. Vücut ağırlıkları karşılaştırması (APAP; Asetaminofen grubu, APAP+ BA 1 sa; Asetaminofen verildikten 1 saat sonra Borik Asit uygulanan grup, APAP+ BA 8 sa; Asetaminofen verildikten 8 saat sonra Borik Asit uygulanan grup, BA; Borik Asit grubu)



Resim 4.1. Gruplara ait karaciğer dokularının makroskobik görüntüleri. APAP grubu karaciğer örneklerinde belirgin renk değişimi (☆) görülmekte

4.2. Işık Mikroskopik Bulgular

Histopatolojik değerlendirme için hematoksilin-eozin ve PAS boyama yöntemleri sonucu elde edilen görüntüler yarı kantatif skorlamalar ile değerlendirildi. İmmunohistokimyasal boyamalar sonucunda elde edilen görüntülerde H-skor ve pozitif hücre yüzdesi belirlenerek analizler yapıldı.

4.2.1. Hematoksilin-Eozin bulguları

APAP, APAP verildikten 1 saat sonra borik asit, APAP verildikten 8 saat sonra borik asit ve sadece borik asit uygulanan gruplara ait karaciğer dokularındaki mikroskopik değişiklikleri kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak incelemek üzere HE boyama yöntemi uygulandı.

Kontrol grubuna ait karaciğer dokularının hematoksilin eozin yöntemi ile boyanmış kesitlerinin küçük ve büyük büyültmelerindeki incelemesinde; ortalarında v. centralis'in bulunduğu, ancak sınırları net olarak ayırt edilemeyen, aralarında portal alanları içeren klasik karaciğer lobüllerinin normal yapıda olduğu gözlemlendi (Resim 4.2. A). V. centralis'lerden periferik doğru ışınal şekilde uzanan, ökromatik özellikte çekirdekleri olan, poligonel şekilli normal karaciğer parankim hücreleri hepatositler ile aralarındaki karaciğer sinüzoidlerinin normal genişlikte olduğu gözlemlendi (Resim 4.2. B ve C).

Tek doz (3 g/kg) APAP uygulanan gruba ait sıçan karaciğer dokularının HE ile boyanmış kesitlerinin küçük ve büyük büyültmelerindeki incelemesinde; karaciğer lobüllerinin ortasında bulunan v. centralis'lerde konjesyon (Resim 4.3. A-B-C-D-E), endotel tabakası bütünlüğünde bozulma (Resim 4.3. E), sentrilobüler nekroz (Resim 4.3. B-C-E), sinüzoidlerde dilatasyon, konjesyon (Resim 4.3. E), parankimde inflamatuvar hücre infiltrasyonu (Resim 4.3. B-C-E), bazı hepatositlerde mikro ya da makro düzeyde sitoplazmik vakuoller oluşumları (Resim 4.3. F), daha koyu eozinofilik boyanan piknotik çekirdekli, poligonel şekillerini kaybetmiş dejeneratif özellikte hepatositler, hemoraji (Resim 4.3. D) nedeniyle karaciğer parankim yapısının ileri derecede bozulduğu dikkati çekti (Resim 4.3. E) (Şekil 4.2).

APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan gruba ait karaciğer dokularının HE ile boyanmış kesitlerinin küçük ve büyük büyültmelerindeki incelemesinde; karaciğerdeki

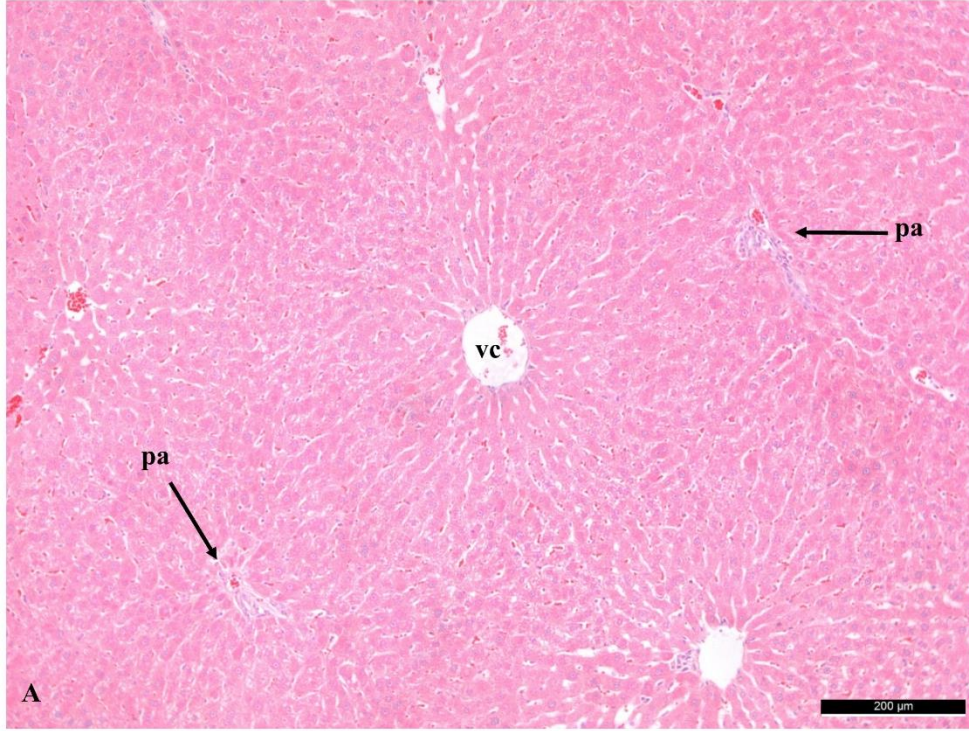
sentrilobüler nekroz alanlarının, hepatositlerdeki dejeneratif değişikliklerin, inflamatuvar değişikliklerin, sinüzoidlerdeki dilatasyon ve konjesyonun APAP uygulanan gruba göre azaldığı, karaciğer parankim yapısının daha iyi korunduğu (Resim 4.4. A-B), ancak yer yer inflamasyonun, konjesyonun, piknotik çekirdekli daha eozinofilik boyanan hepatositlerin varlığı dikkati çekti (Resim 4.4. C) (Şekil 4.2).

APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan gruba ait karaciğer dokularının HE ile boyanmış kesitlerinin küçük ve büyük büyültmelerdeki incelemesinde; sadece APAP uygulanan gruba göre karaciğer parankim yapısının daha iyi korunduğu, hepatositlerdeki dejeneratif değişikliklerin 1. saate göre daha fazla olduğu ancak inflamasyonun azaldığı görüldü, genel olarak 1. saatteki borik asit uygulaması ile benzer özellikte karaciğer dokusu izlendi (Resim 4.5.A-B-C) (Şekil 4.2).

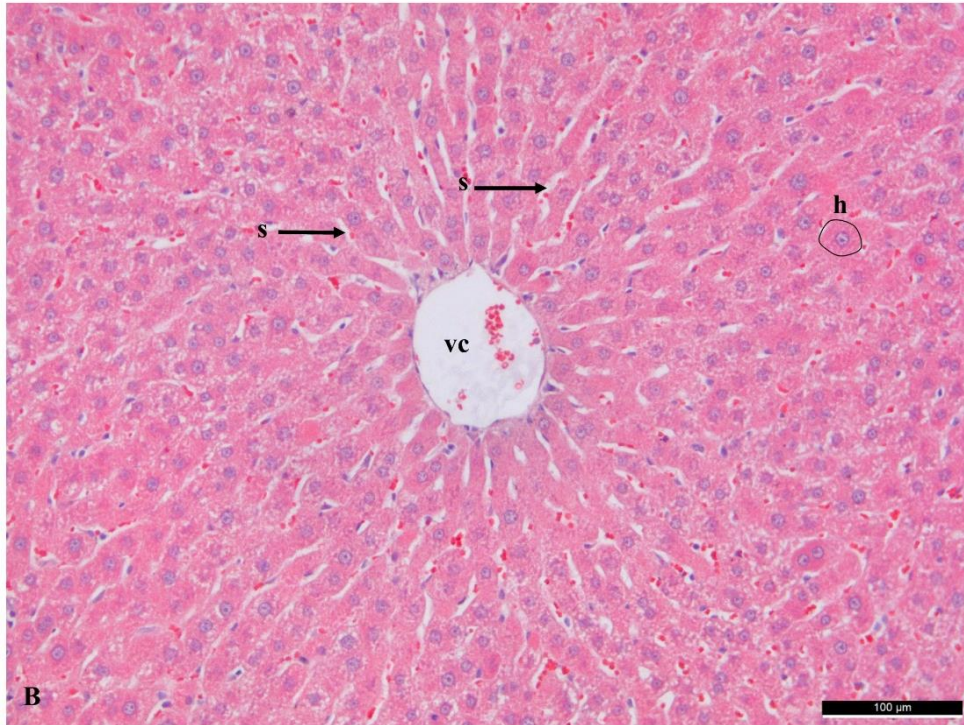
Borik asit uygulanan grupta APAP, APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan grup ve APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan gruplara göre konjesyon, hepatik hasar ve nekrozun, inflamasyonun, sinüzoidal dilatasyonun minimal düzeyde olduğu görüldü (Resim 4.6 A-B-C) (Şekil 4.2).

Gruplar arası histopatolojik farklılıkları değerlendirmek amacı ile yapılan istatistiksel analiz sonucunda hepatik hasar, nekroz, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve sinüzoidal dilatasyon bakımından gruplar arasında anlamlı farklılık olduğu belirlendi (Şekil 4.2 A-B-D-F). Vasküler konjesyon ve hemoraji değerlendirildiğinde gruplar arasında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (Şekil 4.2 C ve E). Hepatik hasar nekroz, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, sinüzoidal dilatasyon, vasküler konjesyon ve hemoraji açısından yapılan değerlendirmeler sonucunda elde edilen skorların toplamı olarak belirlendi. Hepatik hasar skorları kontrol grubunda $0,57 \pm 0,14$; APAP grubunda $7 \pm 1,75$; APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan grupta $4,07 \pm 0,82$; APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan grupta $3,8 \pm 0,43$ ve borik asit grubunda $1,80 \pm 0,23$ olarak belirlendi (Şekil 4.2 A). Kontrol grubuna göre en yüksek hepatik hasar skoru APAP grubunda görüldü ($p < 0,0001$) (Şekil 4.2 A). APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan grupta hepatik hasar azalmış olmakla birlikte yine de kontrol grubuna göre hepatik hasarın devam ettiği görüldü ($p < 0,05$). Hepatik hasar bakımından kontrol grubuna göre diğer gruplarda ise anlamlı farklılık olmadığı belirlendi ($p > 0,05$). APAP verildikten 1 saat ve 8 saat sonra borik asit uygulanan gruplar hepatik hasar bakımından

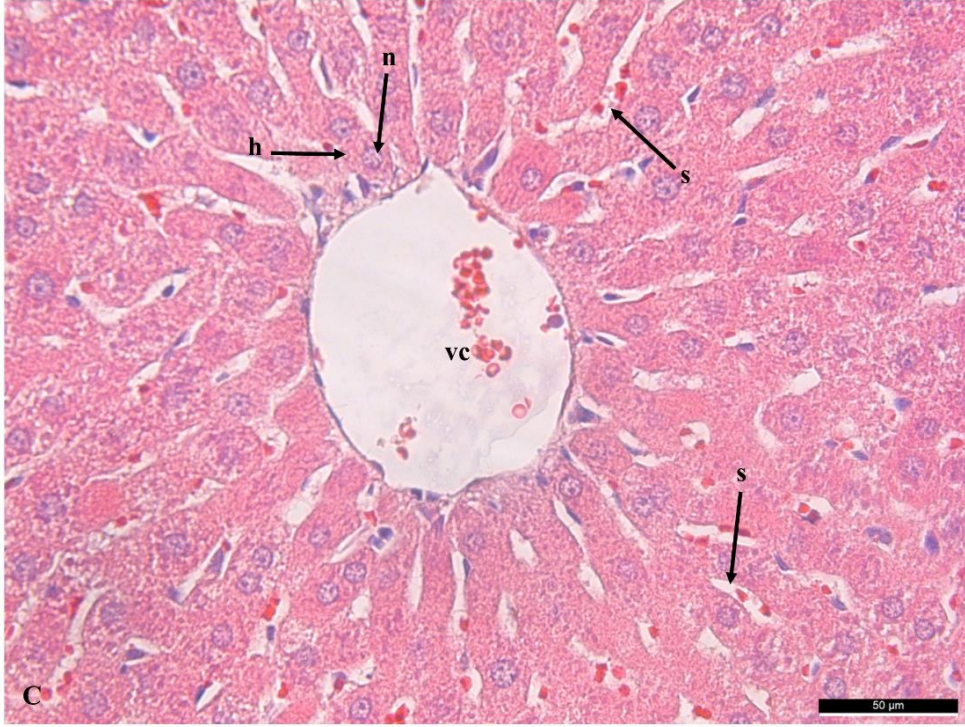
karşılaştırıldığında aralarında anlamlı farklılık olmadığı görüldü ($p > 0,05$) (Şekil 4.2 A). Nekroz skorları kontrol grubunda $0,0 \pm 0,0$; APAP grubunda $2,08 \pm 0,41$; APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan grupta $1,33 \pm 0,25$; APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan grupta $1,5 \pm 0,21$ ve borik asit grubunda $0,24 \pm 0,12$ olarak belirlendi (Şekil 4.2 B). Gruplar nekroz varlığı açısından değerlendirildiğinde kontrol grubuna göre en şiddetli nekroz APAP grubunda görülürken APAP verildikten 1 saat ve 8 saat sonra borik asit uygulanan gruplarda da nekrozun azalarak devam ettiği görüldü (Sırası ile $p < 0,001$; $p < 0,05$; $p < 0,01$). APAP verildikten 1 saat ve 8 saat sonra borik asit uygulanan gruplar karşılaştırıldığında nekrozun 8 saat sonra borik asit uygulanan grupta daha fazla olduğu ancak iki grup arasında anlamlı farklılık olmadığı belirlendi (Şekil 4.2 B). Vasküler konjesyon skorları kontrol grubunda $0,37 \pm 0,13$; APAP grubunda $1,2 \pm 0,4$; APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan grupta $0,40 \pm 0,22$; APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan grupta $0,33 \pm 0,13$ ve borik asit grubunda $0,30 \pm 0,09$ olarak belirlendi (Şekil 4.2 C). Dokular konjesyon açısından karşılaştırıldığında tüm gruplarda minimal düzeyde konjesyon varlığı görülürken, APAP grubunda konjesyonun arttığı fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamlılık göstermediği belirlendi ($p > 0,05$) (Şekil 4.2 C). İnflamatuar hücre infiltrasyonu skorları kontrol grubunda $0,07 \pm 0,05$; APAP grubunda $1,5 \pm 0,33$; APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan grupta $1,02 \pm 0,32$; APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan grupta $0,69 \pm 0,24$ ve borik asit grubunda $0,26 \pm 0,14$ olarak belirlendi (Şekil 4.2 D). İnflamatuar hücre infiltrasyonu değerlendirildiğinde kontrol grubuna göre APAP grubunda en fazla infiltrasyonun olduğu izlendi ($p < 0,01$) ve borik asit verilen gruplarda azalma olduğu görülürken, APAP verildikten 1 saat sonra borik asit verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlılık olduğu belirlendi ($p < 0,05$) (Şekil 4.2 D). Hemoraji skorları kontrol grubunda $0,0 \pm 0,0$; APAP grubunda $0,67 \pm 0,49$; APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan grupta $0,14 \pm 0,09$; APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan grupta $0,0 \pm 0,0$ ve borik asit grubunda $0,02 \pm 0,02$ olarak belirlendi (Şekil 4.2 E). Dokulardaki hemoraji değerlendirildiğinde APAP grubunda en fazla düzeyde olduğu gözlemlenirken gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık olmadığı belirlendi ($p > 0,05$) (Şekil 4.2 E). Sinüzoidal dilatasyon skorları kontrol grubunda $0,12 \pm 0,05$; APAP grubunda $1,5 \pm 0,37$; APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan grupta $1,17 \pm 0,26$; APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan grupta $1,29 \pm 0,25$ ve borik asit grubunda $1,1 \pm 0,14$ olarak belirlendi (Şekil 4.2 F). Gruplar sinüzoidal dilatasyon bakımından karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre diğer tüm gruplarda anlamlı düzeyde sinüzoidal dilatasyon olduğu görüldü ($p < 0,05$) (Şekil 4.2 F).



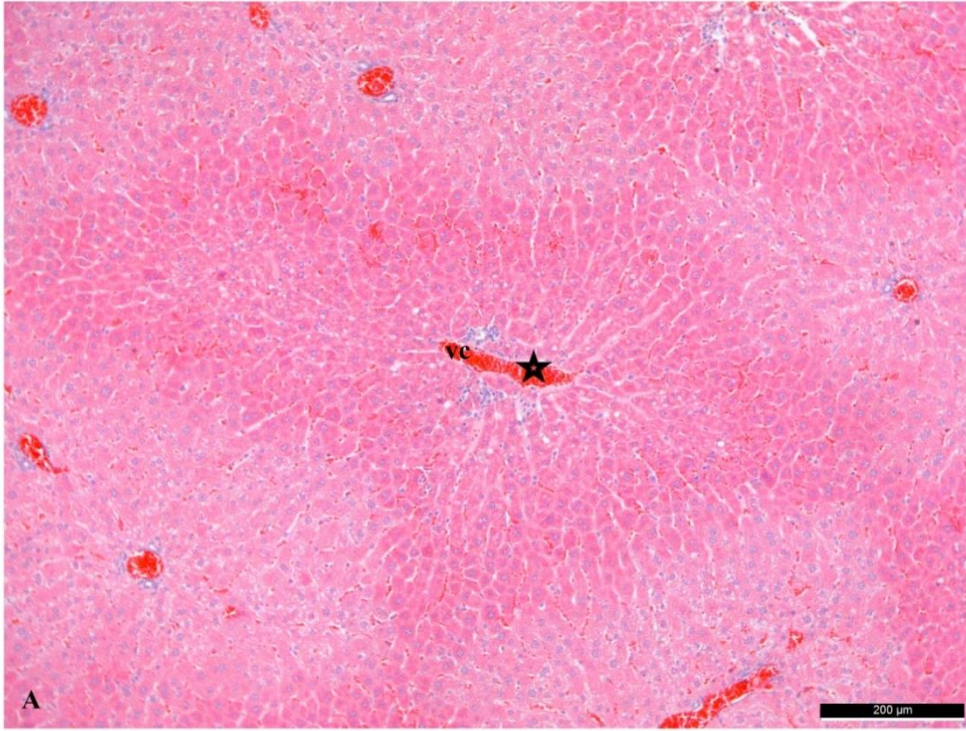
Resim 4.2. (A): Kontrol grubu. Ortalarında v. centralis (vc) içeren, aralarında portal alanların (pa) bulunduğu karaciğer lobülleri görülmekte (HE, ×100)



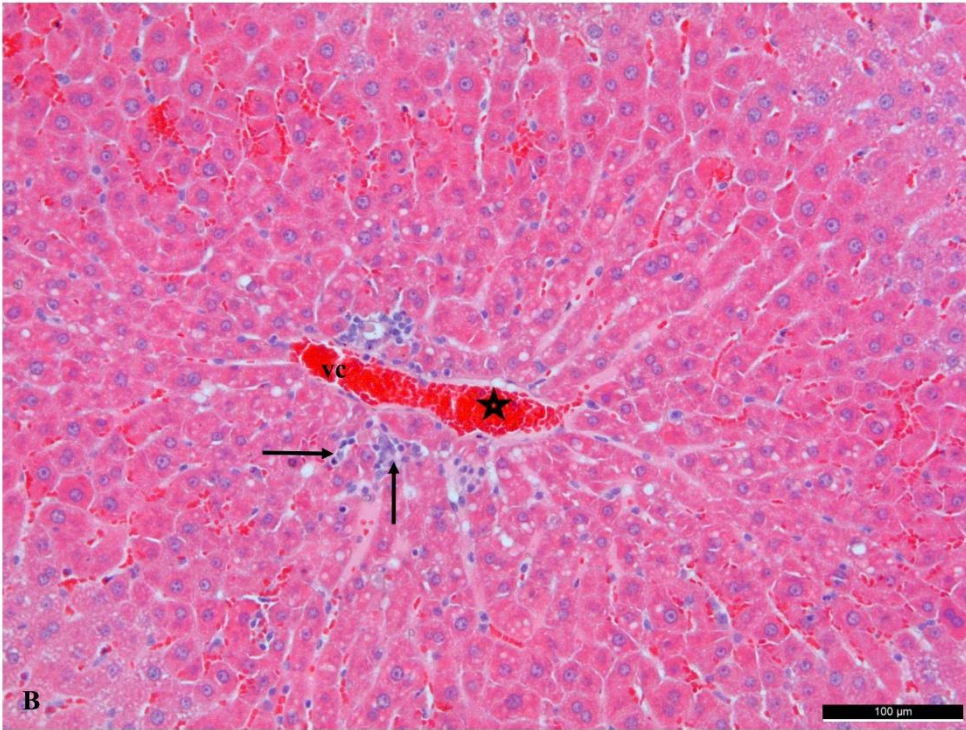
Resim 4.2. (devam) (B): Kontrol grubu. Merkezi yerleşimli v. centralis'ten (vc) perifere doğru ışınal olarak uzanan hepatositler (h) ile aralarında yer alan karaciğer sinüzoidleri (s) görülmekte (HE, ×200)



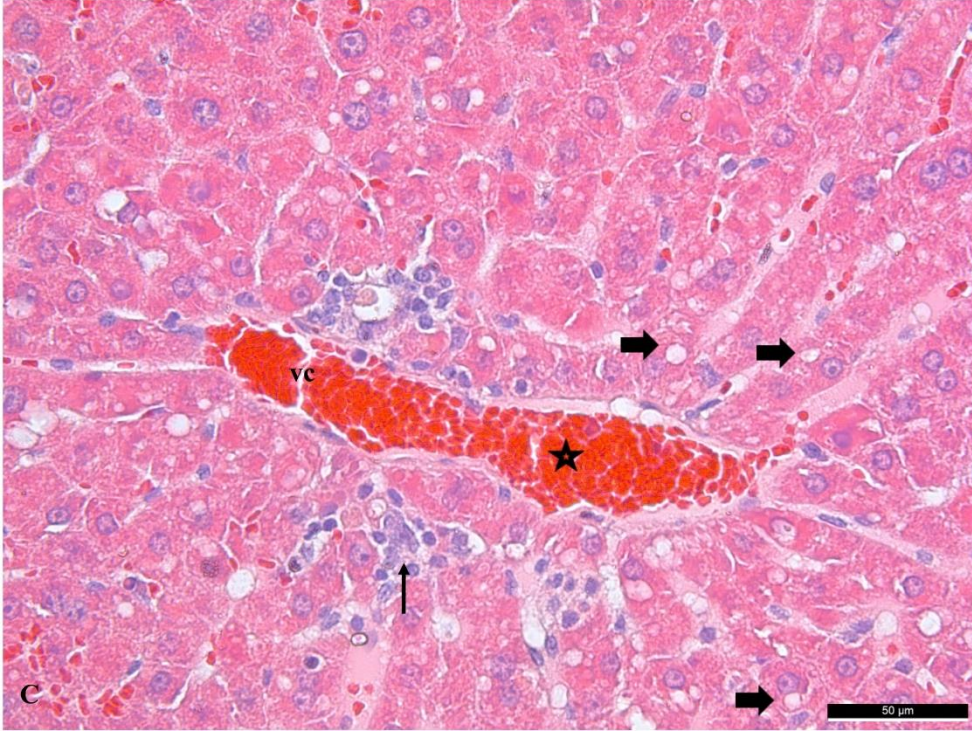
Resim 4.2. (devam) (C): Kontrol grubu. V. centralis'ten (vc) perifere uzanan hücre kordonları yapan, ökrömatik çekirdekli (n) hepatositler (h) ile aralarında yer alan karaciğer sinüzoidleri (s) görülmekte (HE, ×400)



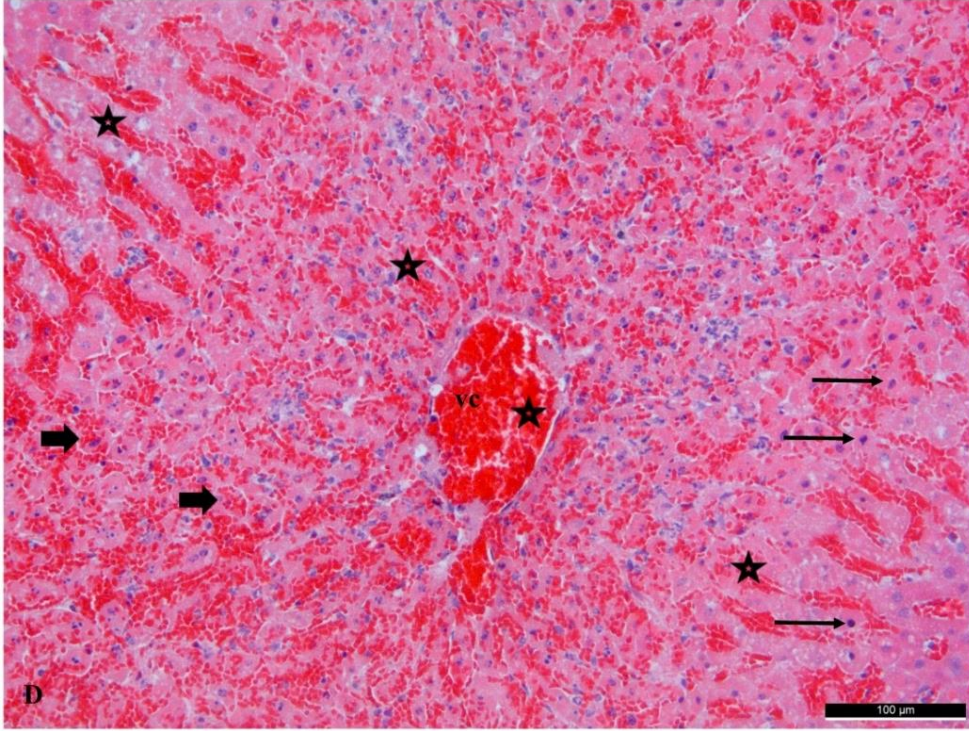
Resim 4.3. (A): APAP grubu. V. centralis'lerde (vc) konjesyon (★) ve sentrilobüler nekroz görülmekte (HE, ×100)



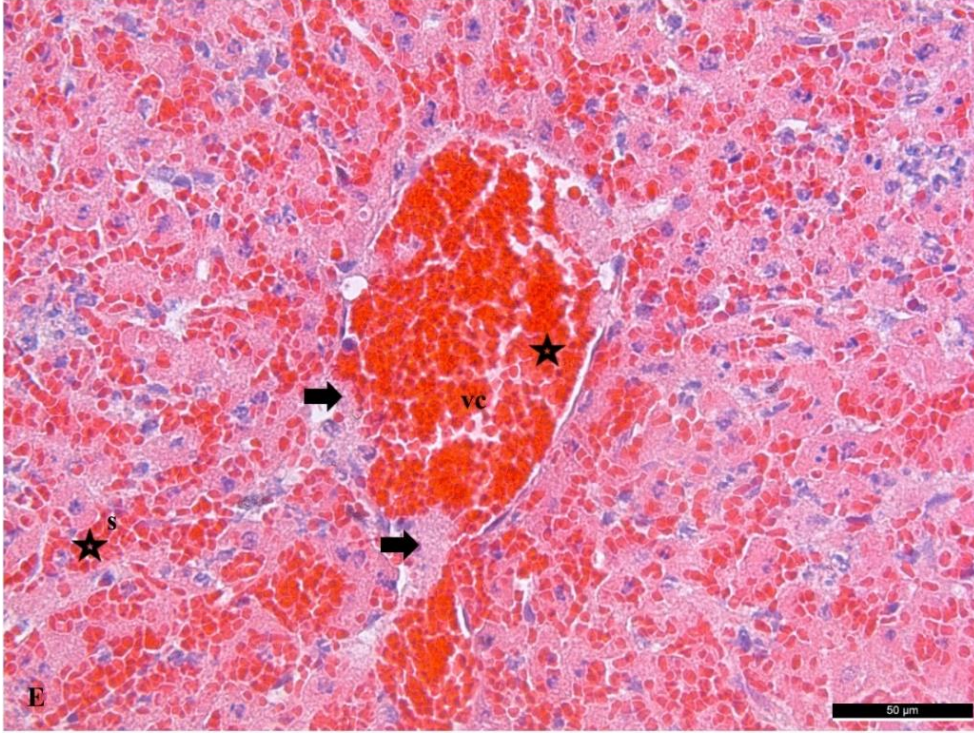
Resim 4.3. (devam) (B): APAP grubu. V. centralis'te (vc) konjesyon (★), ve çevresinde hücre infiltrasyonu (↑) görülmekte (HE, ×200)



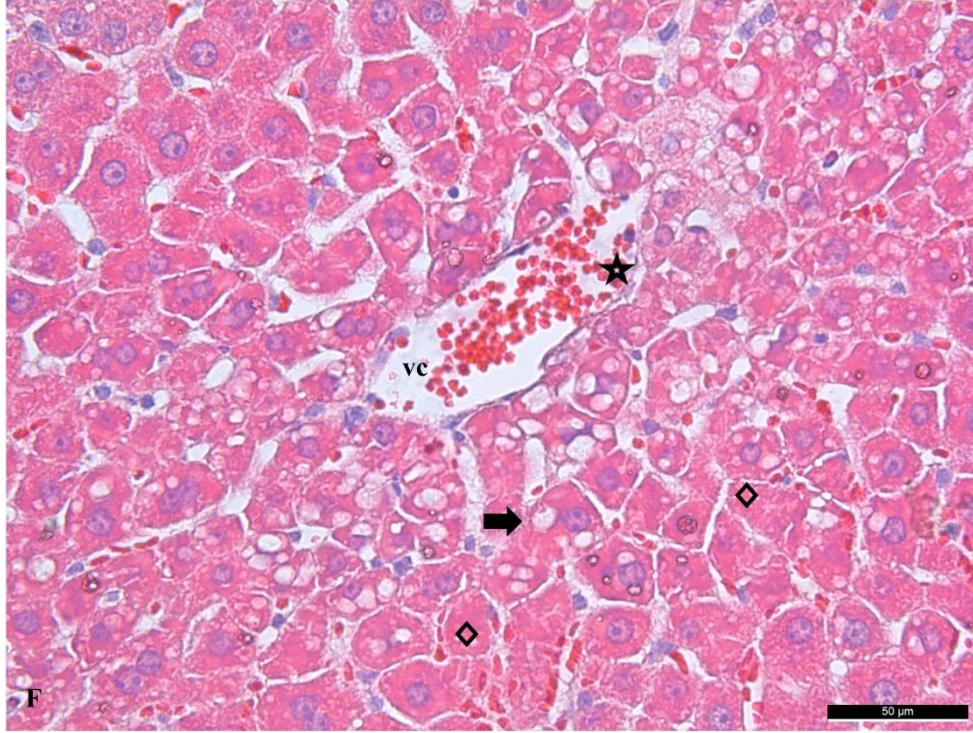
Resim 4.3. (devam) (C): APAP grubu. V. centralis'te (vc) konjesyon (★), inflamatuvar hücre infiltrasyonu (↑), hepatositlerde sitoplazmik vakuoler oluşumlar (➡) görülmekte (HE, ×400)



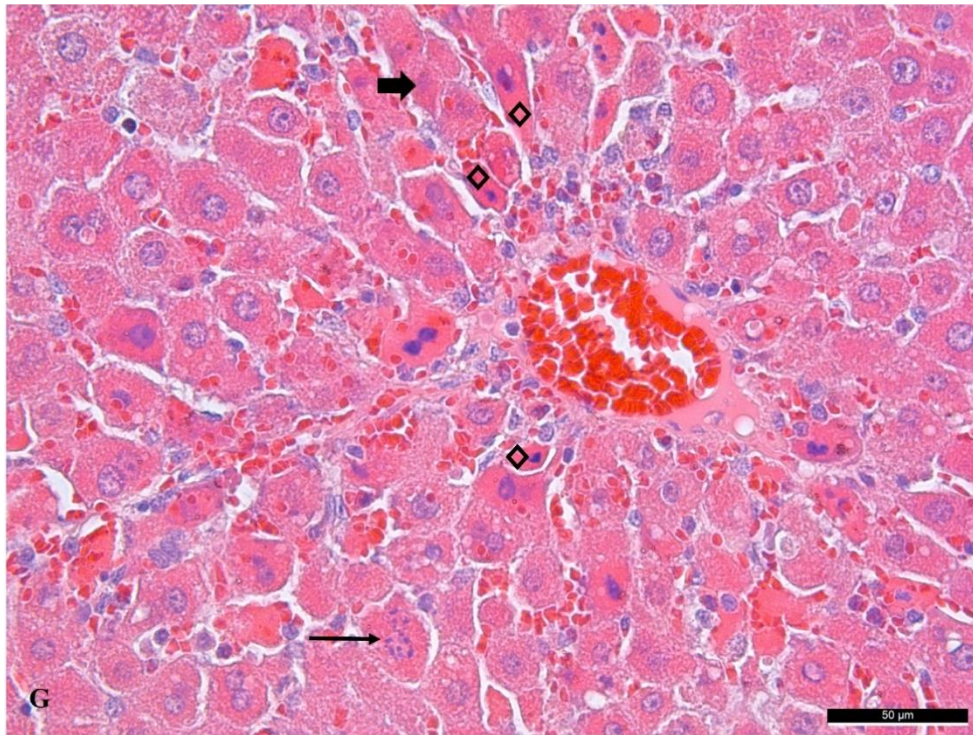
Resim 4.3. (devam) (D): APAP grubu. V. centralis (vc) ve sinüzoidlerde konjesyon (★), hemoraji (➡), piknotik çekirdekli hepatositler (↑) ile bozulmuş karaciğer parankim yapısı görülmekte (HE, ×200)



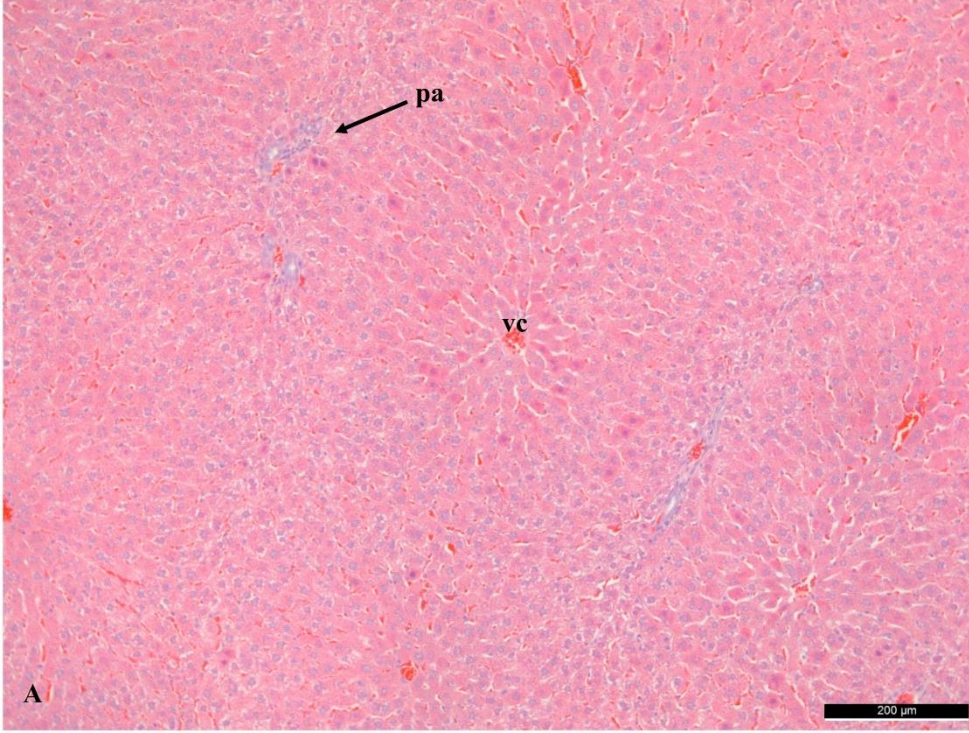
Resim 4.3. (devam) (E): APAP grubu. V. centralis'te (vc) ve konjesyon (★), endotel tabakasında bütünlüğün bozulması (➡), sinüzoidal dilatasyon (s) ve konjesyon (★), nedeniyle parankim yapısı ayırt edilemeyen karaciğer dokusu görülmekte (HE, ×400)



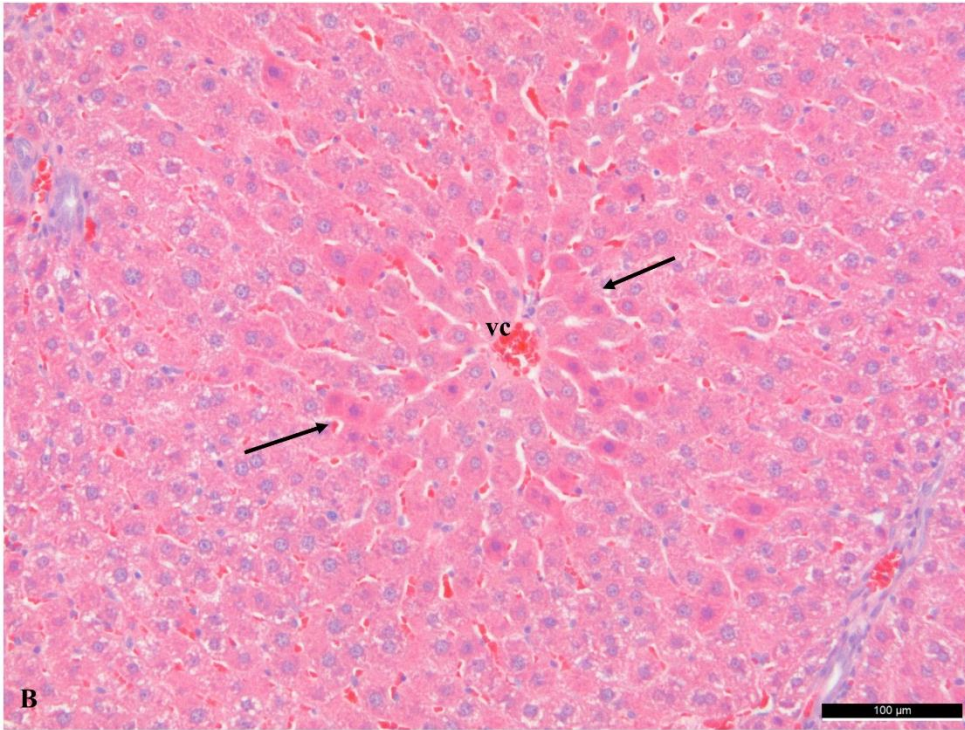
Resim 4.3. (devam) (F): APAP grubu. V. centralis (vc) endotel bütünlüğünde bozulma (★), çekirdeğini kaybetmiş daha eozinofilik boyanan hepatositler (◇), hepatositlerde vakuoler oluşumlar (➡) görülmekte (HE, ×400)



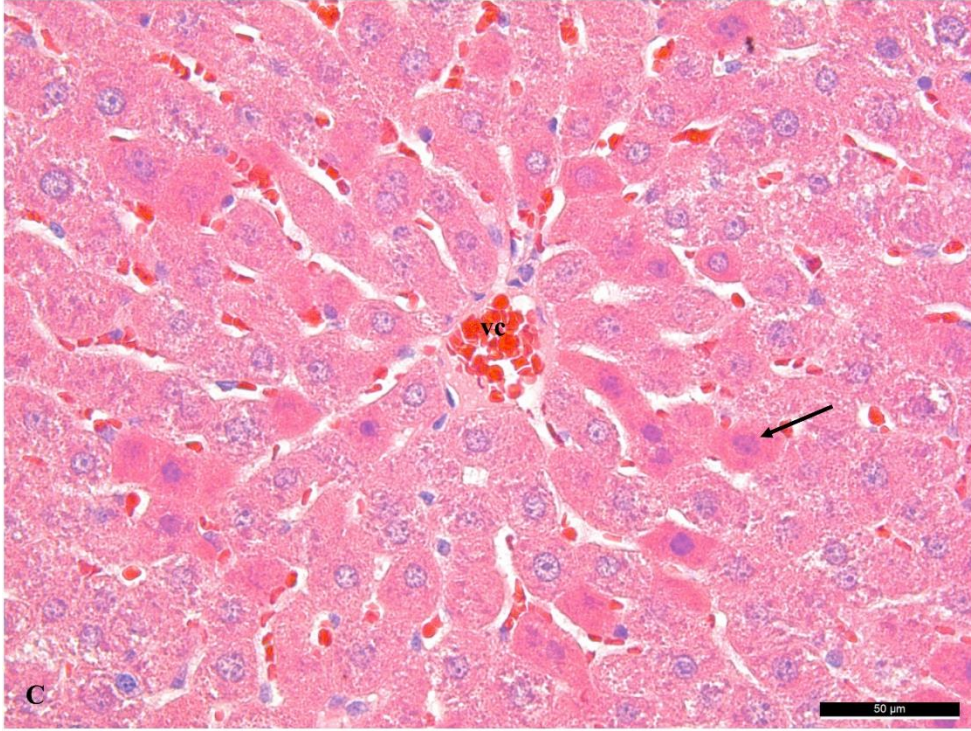
Resim 4.3. (devam) (G): APAP grubu. Hiper eozinofilik boyanan, poligonal şekillerini kaybetmiş, piknotik çekirdekli hepatositler (◇), karyoreksiz (↑), karyolizis (➡) görülmekte (HE, ×400)



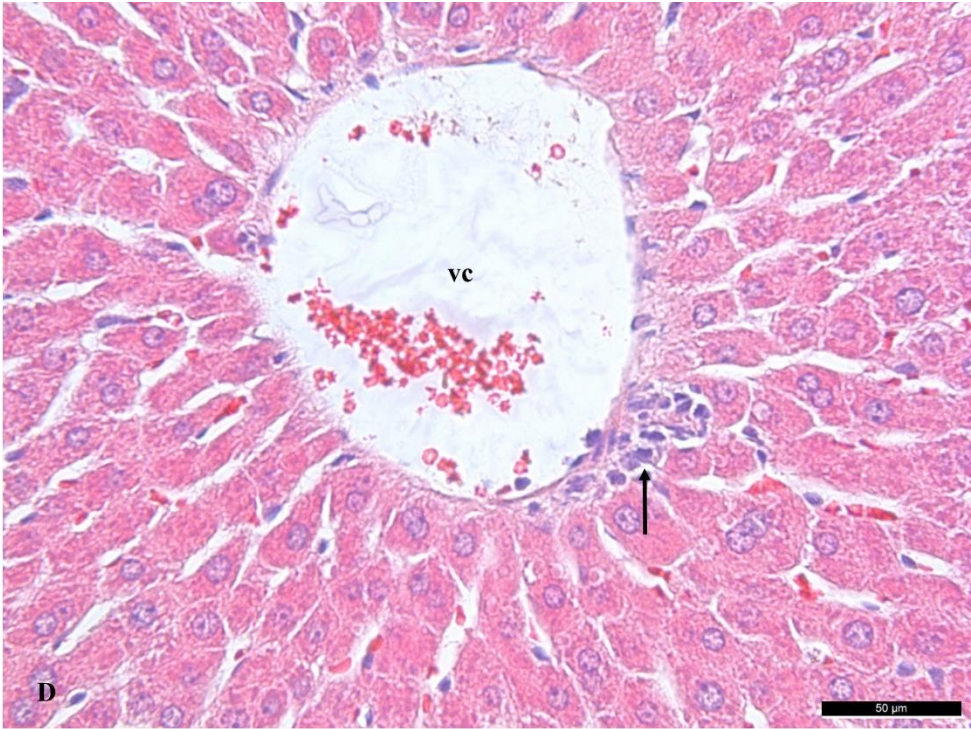
Resim 4.4. (A): APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan grup. V. centralis (vc), karaciğer lobülleri arasındaki portal alanlar (pa) görülmekte (HE, ×100)



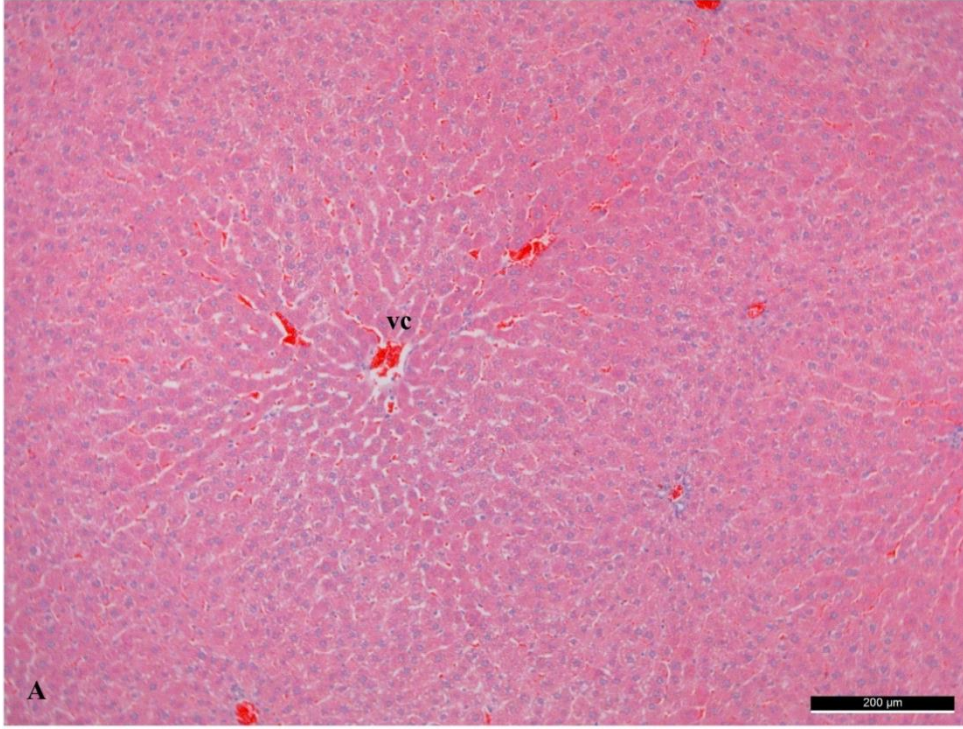
Resim 4.4. (devam) (B): APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan grup. Sınırlı alanlarda sentrilobüler nekroz (↑) görülmekte, v. centralis (vc) (HE, ×200)



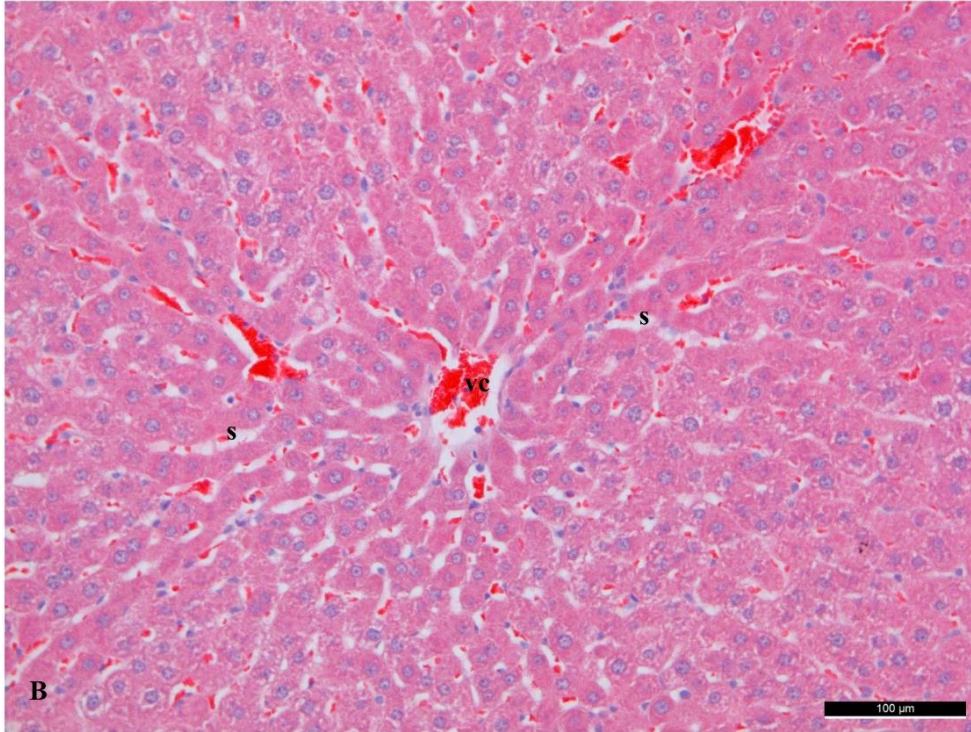
Resim 4.4. (devam) (C): APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan grup. Eozinofilisi artmış (↑), piknotik çekirdekli hücre sayısında azalma görülmekte, v. centralis (vc) (HE, ×400)



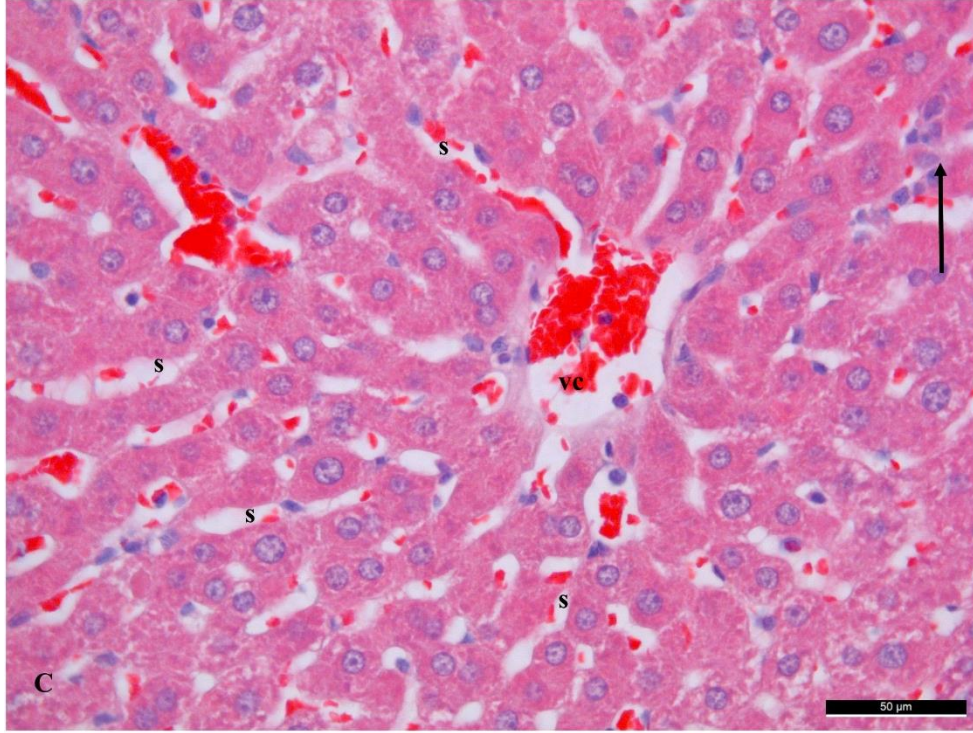
Resim 4.4. (devam) (D): APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan grup. APAP grubuna göre azalmış konjesyon, azalmış inflamatuvar hücre infiltrasyonu (↑) görülmekte, v. centralis (vc) (HE, ×400)



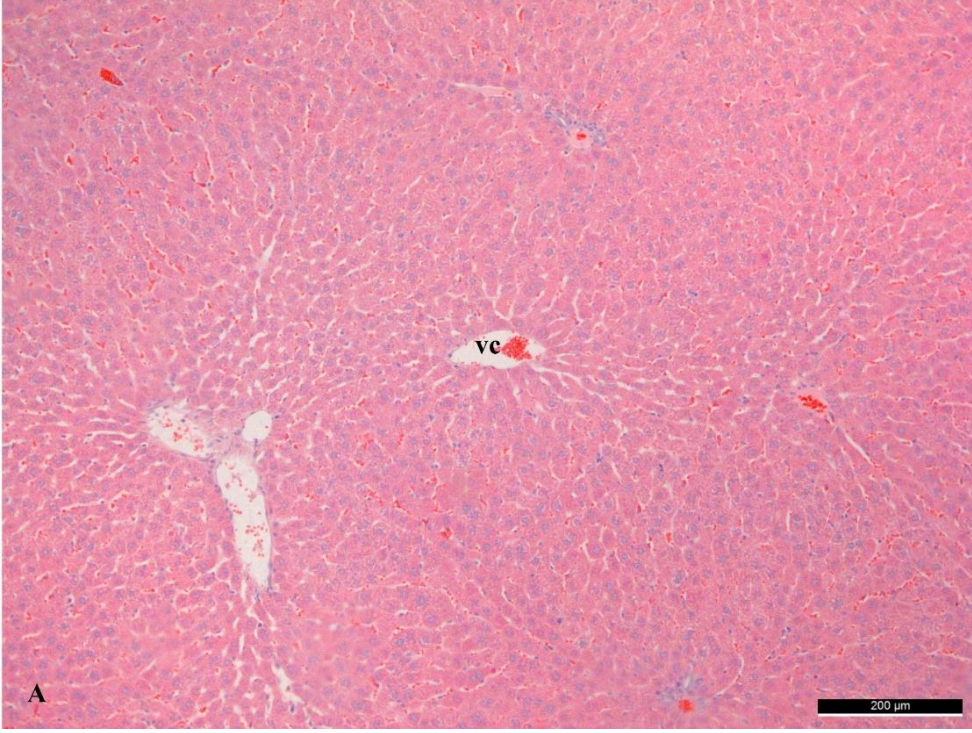
Resim 4.5. (A): APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan grup. APAP uygulanan gruba göre azalmış sentrilobüler nekroz görülmekte, v. centralis (vc) (HE, $\times 100$)



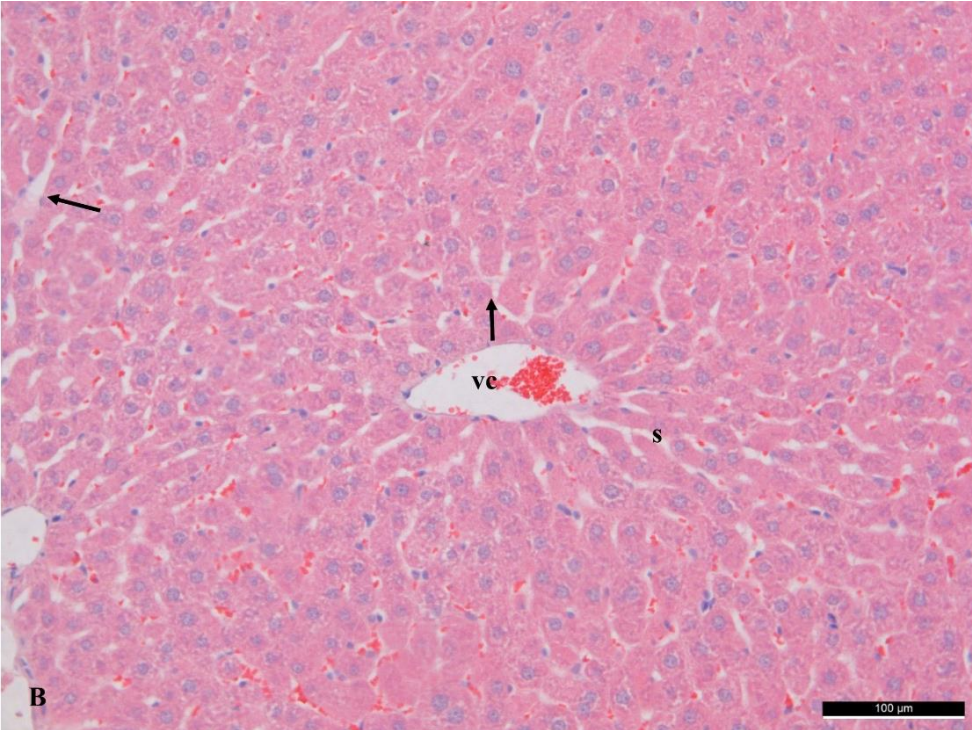
Resim 4.5. (devam) (B): APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan grup. APAP grubuna göre azalmış sentrilobüler nekroz ve konjesyon görülmekte, v. centralis (vc), sinüzoidler (s) (HE, $\times 200$)



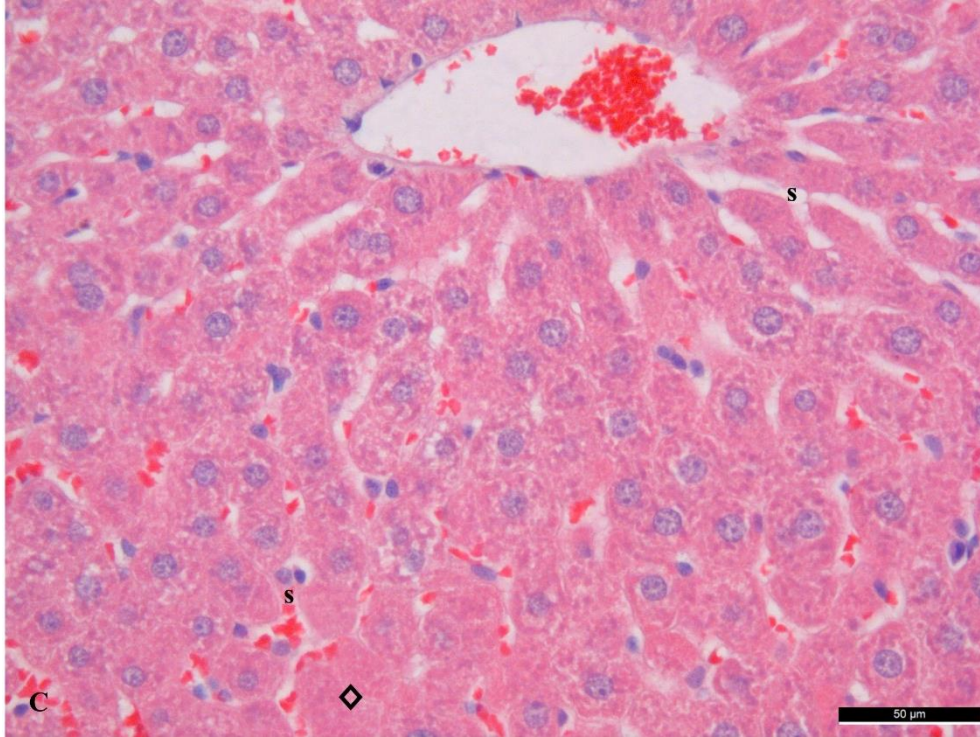
Resim 4.5. (devam) (C): APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan grup. APAP grubuna göre azalan inflamatuvar hücre infiltrasyonu (↑) görülmekte, v. centralis (vc), sinüzoidler (s) (HE, ×400)



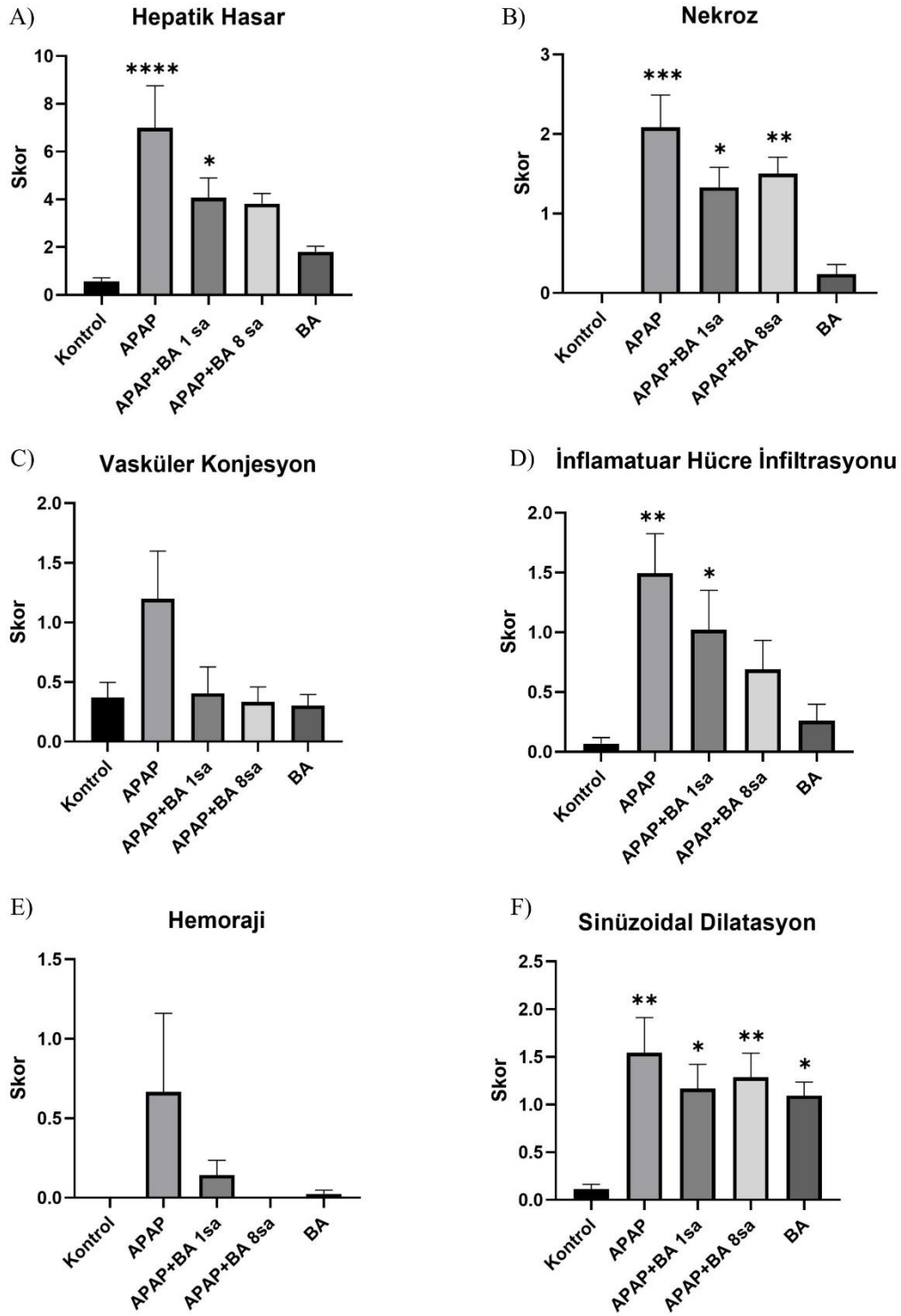
Resim 4.6. (A): Borik Asit uygulanan grup. Minimal düzeyde v. centralis'te (vc) konjesyon görülmekte (HE, $\times 100$)



Resim 4.6. (devam) (B): Borik asit uygulanan grup. Bazı alanlarda sinüzoidal dilatasyon (\uparrow) görülmekte, v. centralis (vc), sinüzoidler (s) (HE, $\times 200$)



Resim 4.6. (devam) (C): Borik asit uygulanan grup. Bazı alanlarda sinüzoidal dilatasyon ve minimal dejeneratif değişiklikler (◇) görölmekte, sinüzoid (s) (HE, ×400)



Şekil 4.2. Histopatolojik hasar değerlendirme sonuçları (A) Hepatik Hasar, (B) Nekroz, (C) Vasküler Konjesyon, (D) İnflamatuar Hücre İnfiltrasyonu, (E) Hemoraji, (F) Sinüzoidal Dilatasyon (APAP; Asetaminofen, BA; Borik Asit) Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001, ****p <0,0001

4.2.2. Periyodik Asit Schiff (=PAS) bulguları

APAP, APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan, APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan ve borik asit uygulanan gruplara ait karaciğer dokularındaki glikojen içeriğini incelemek amacıyla, PAS boyama yöntemi uygulandı. PAS boyama yöntemi ile glikojen içeren hepatositlerin daha koyu morumsu kırmızı renkte boyanırken, glikojen içeriğini kaybeden hepatositlerin daha açık renkte boyandıkları görüldü.

Kontrol grubuna ait karaciğer dokularının PAS boyama yöntemi ile boyanmış kesitlerinin küçük ve büyük büyütmelerdeki incelemesinde; yoğun glikojen içeren PAS pozitif hepatositlerin diffüz bir dağılım gösterdiği dikkati çekti (Resim 4.7. A, B ve C).

APAP uygulanan gruba ait karaciğer dokularının PAS boyama yöntemi ile boyanmış kesitlerinin küçük ve büyük büyütmelerdeki incelemesinde; sentrilobüler alanlardaki hepatositlerde yoğun glikojen kaybının olduğu gözlemlendi (Resim 4.8. A, B ve C). Bu alanlar bu gruba ait HE boyamalarındaki sentrilobüler nekrozun yoğun olduğu alanlara karşılık geldiği görüldü.

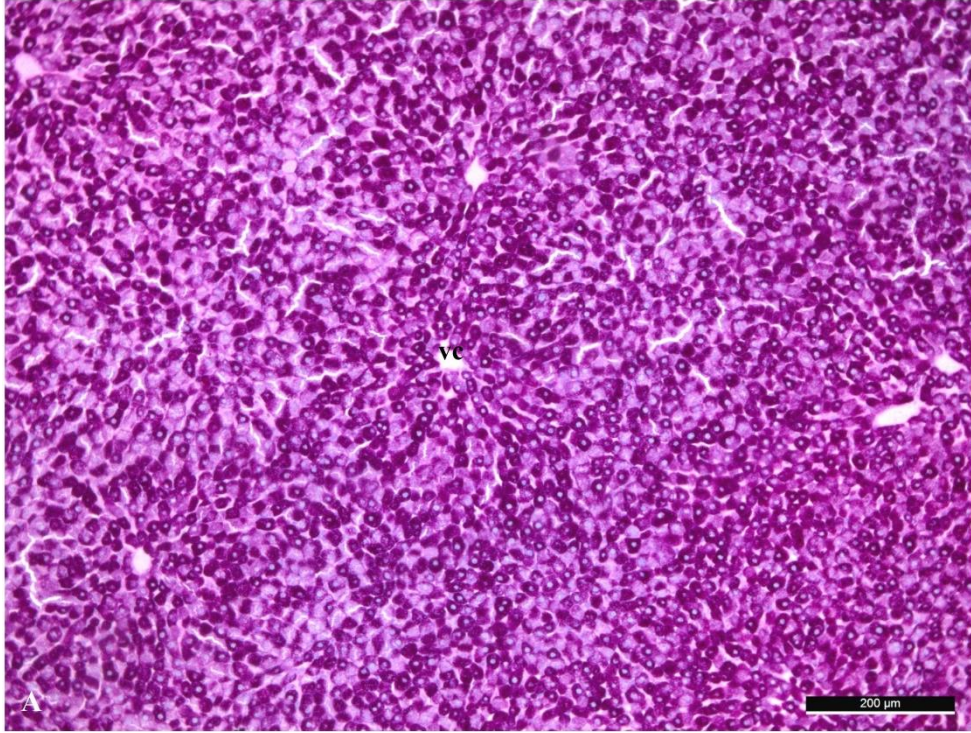
APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan gruba ait karaciğer dokularının PAS yöntemi ile boyanmış kesitlerinin küçük ve büyük büyütmelerdeki incelemesinde; APAP uygulanan gruba göre sentrilobüler bölgede daha sınırlı, dar bir alanda glikojen kaybı gösteren hepatositler mevcutken, perifere doğru farklı yoğunlukta glikojen içeriğine sahip PAS pozitif hepatositlerin bulunduğu gözlemlendi. Bu grupta da HE boyamalarda sentrilobüler nekrozun devam ettiği alanlara karşılık gelen yerlerde glikojen kaybının olduğu görüldü (Resim 4.9. A, B ve C).

APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan gruba ait karaciğer dokularının PAS yöntemi ile boyanmış kesitlerinin küçük ve büyük büyütmelerindeki incelemesinde; APAP uygulanan gruba göre daha sınırlı alandaki hepatositlerde glikojen kaybı mevcutken, perifere doğru glikojen içeriği artarak devam eden hepatositlerin varlığı izlendi (Resim 4.10. A, B ve C).

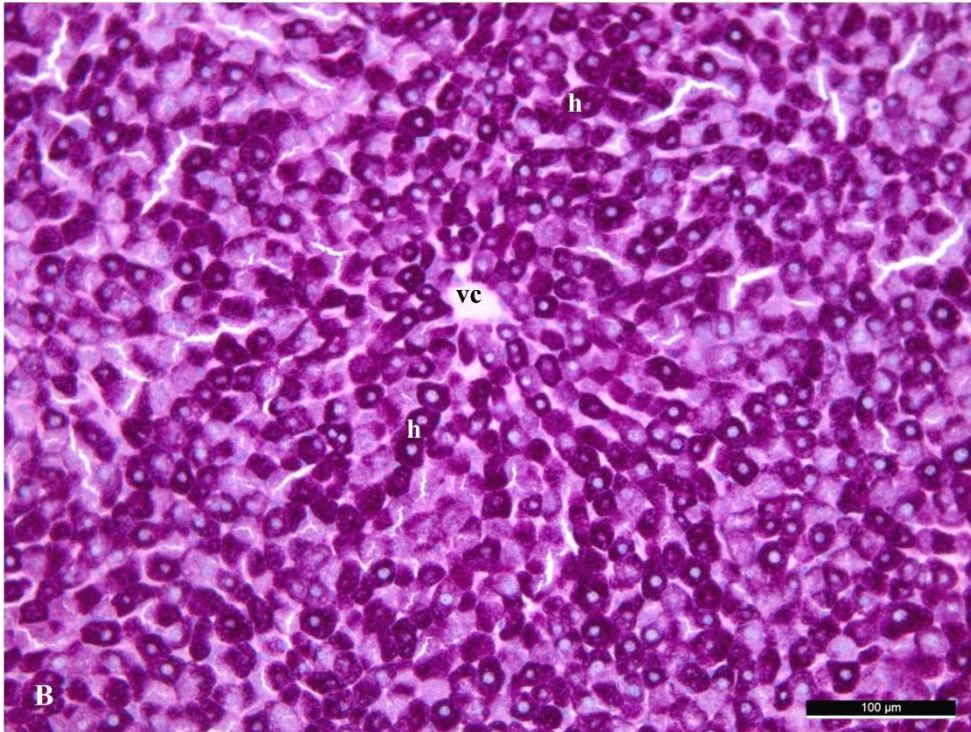
Borik asit uygulanan gruba ait karaciğer dokularının PAS yöntemi ile boyanmış kesitlerinin küçük ve büyük büyütmelerindeki incelemesinde; farklı yoğunlukta glikojen içeriğine sahip

PAS pozitif ya da negatif hepatositlerin karaciğer dokusu içinde belli bir yerde lokalize olmayıp, diffüz bir dağılım gösterdiği izlendi (Resim 4.11. A, B ve C).

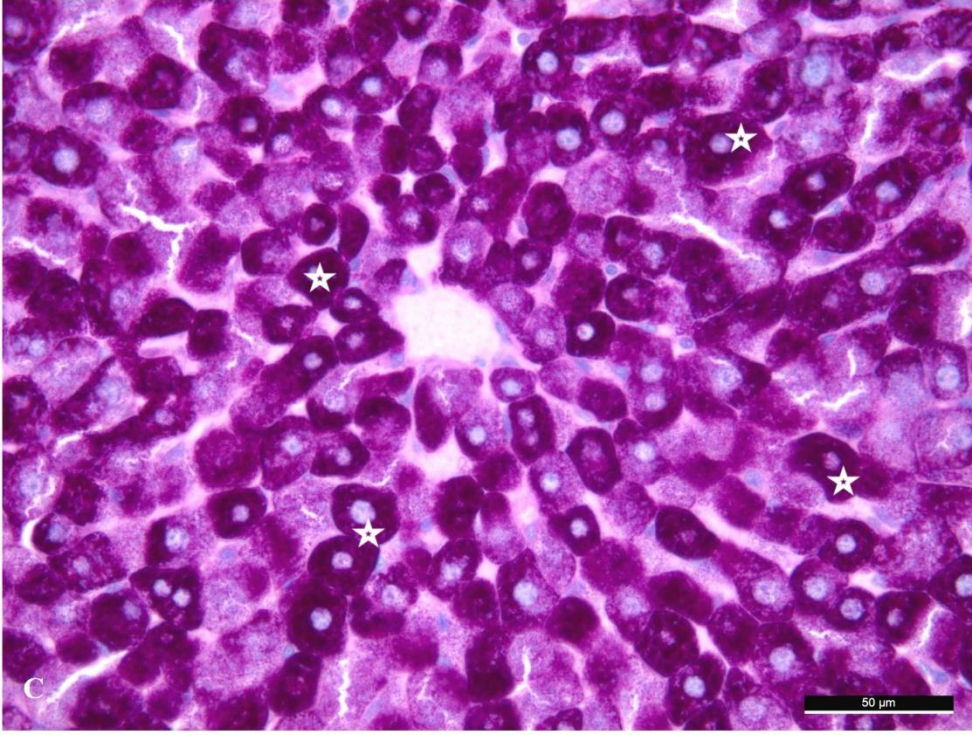
Dokulardaki glikojen içeriğinin değerlendirilmesi PAS pozitif alanların yaygınlığı üzerinden yapılan skorlama ile belirlendi. PAS pozitif boyanma skoru ortalamaları kontrol grubunda $3,38 \pm 0,17$; APAP grubunda $0,22 \pm 0,1$; APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan grupta $2,44 \pm 0,23$; APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan grupta $2,55 \pm 0,18$ ve borik asit grubunda $2,62 \pm 0,22$ olarak belirlendi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasında PAS pozitif alanların en az olduğu grubun APAP grubu olduğu belirlendi ($p < 0,0001$). APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan grubun kontrol grubuna göre daha az, APAP uygulanan gruba göre ise daha fazla glikojene sahip olduğu belirlendi (sırası ile $p < 0,01$, $p < 0,0001$) (Şekil 4.3). APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan grubun kontrol grubuna göre daha az, APAP uygulanan gruba göre ise daha fazla glikojene sahip olduğu belirlendi (sırası ile $p < 0,05$, $p < 0,0001$). Borik asit uygulanan gruptaki glikojen içeriğinde kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık görülmezken ($p > 0,05$), APAP uygulanan grup ile karşılaştırıldığında PAS pozitif alanların anlamlı olarak bu grupta daha fazla olduğu görüldü ($p < 0,0001$) (Şekil 4.3).



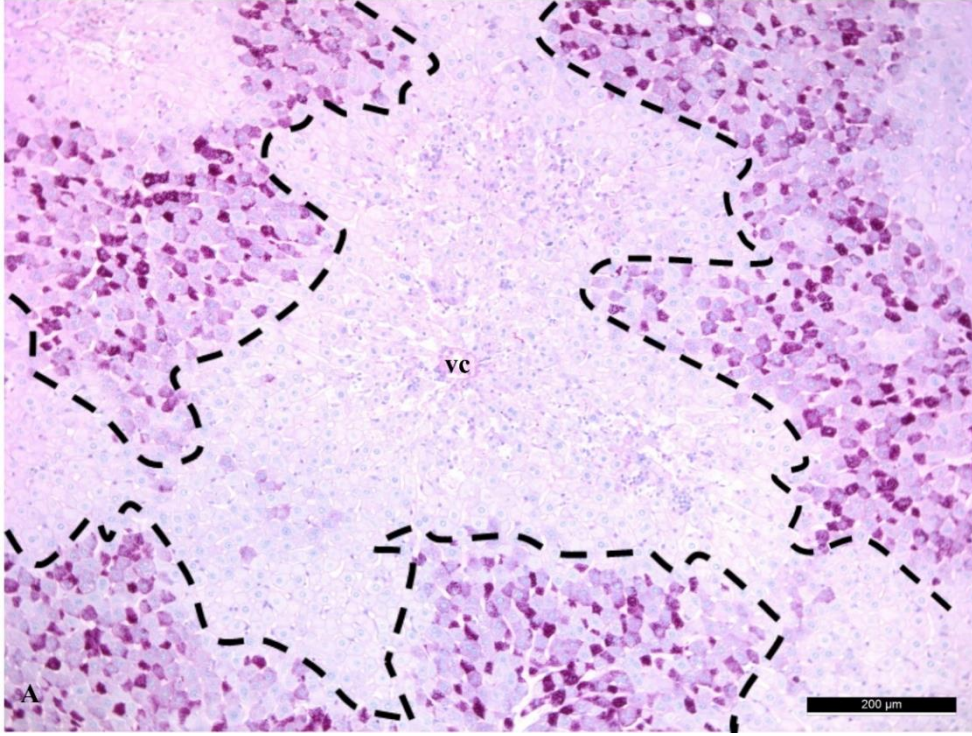
Resim 4.7. (A): Kontrol grubu. Karaciğer dokusunda yoğun glikojen içeriğine sahip hepatositler diffüz bir dağılım göstermekte, v. centralis (vc) (PAS, $\times 100$)



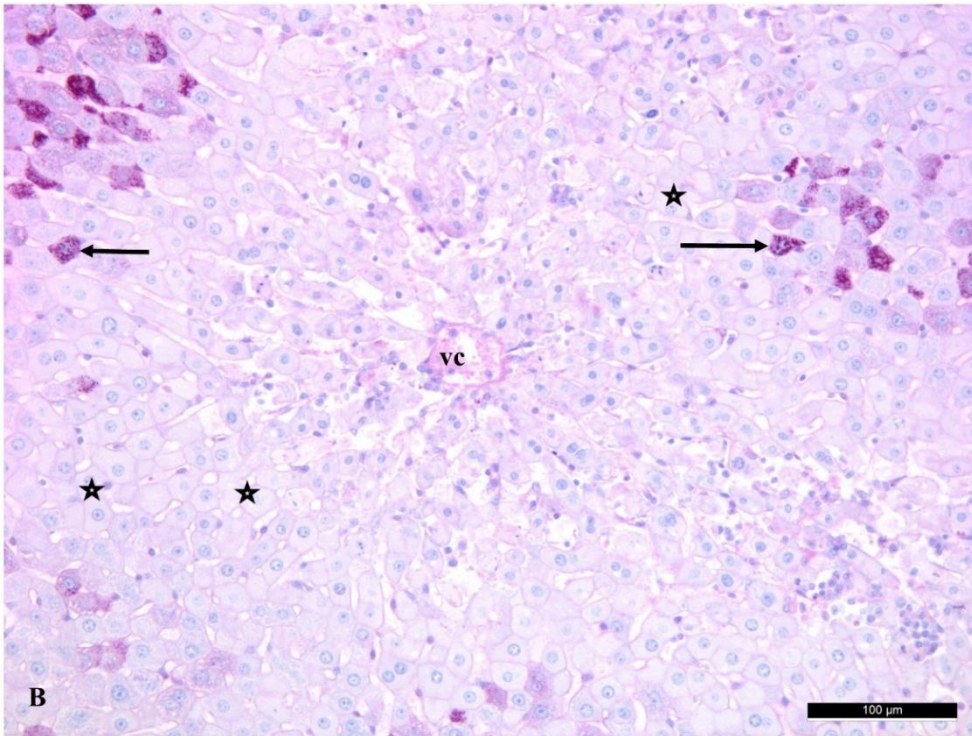
Resim 4.7. (devam) (B): Kontrol grubu. Karaciğer dokusunda yoğun glikojen içeriğine sahip hepatositler (h) diffüz bir dağılım göstermekte, v. centralis (vc) (PAS, $\times 200$)



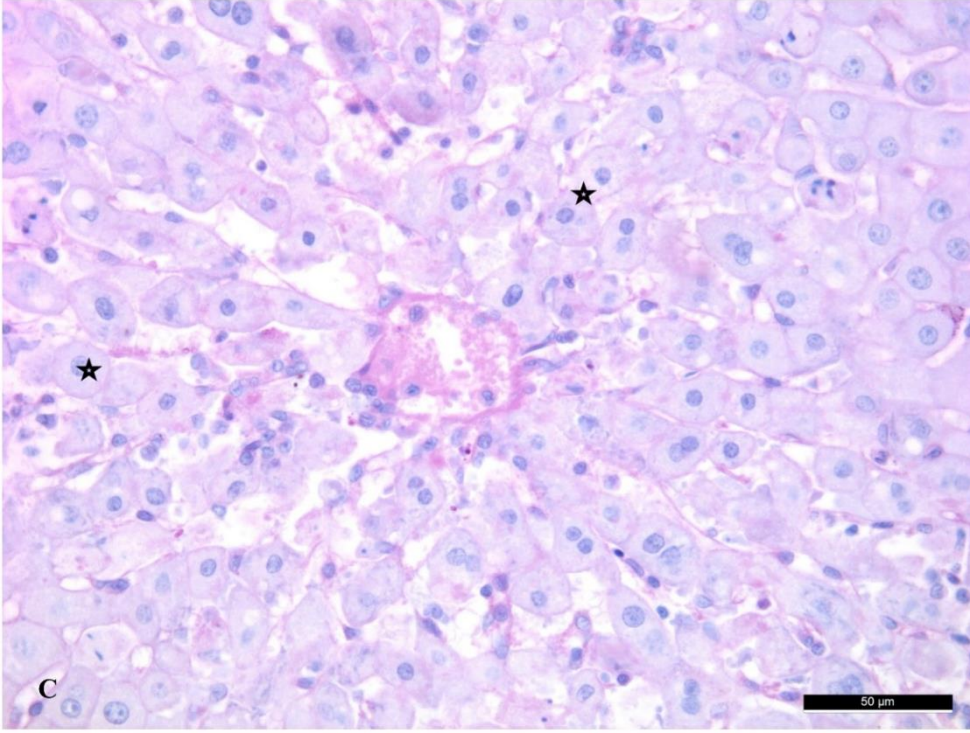
Resim 4.7. (devam) (C): Kontrol grubu. Karaciğer dokusunda yoğun glikojen içeriğine sahip PAS (+) hepatositler (★) görülmekte (PAS, ×400)



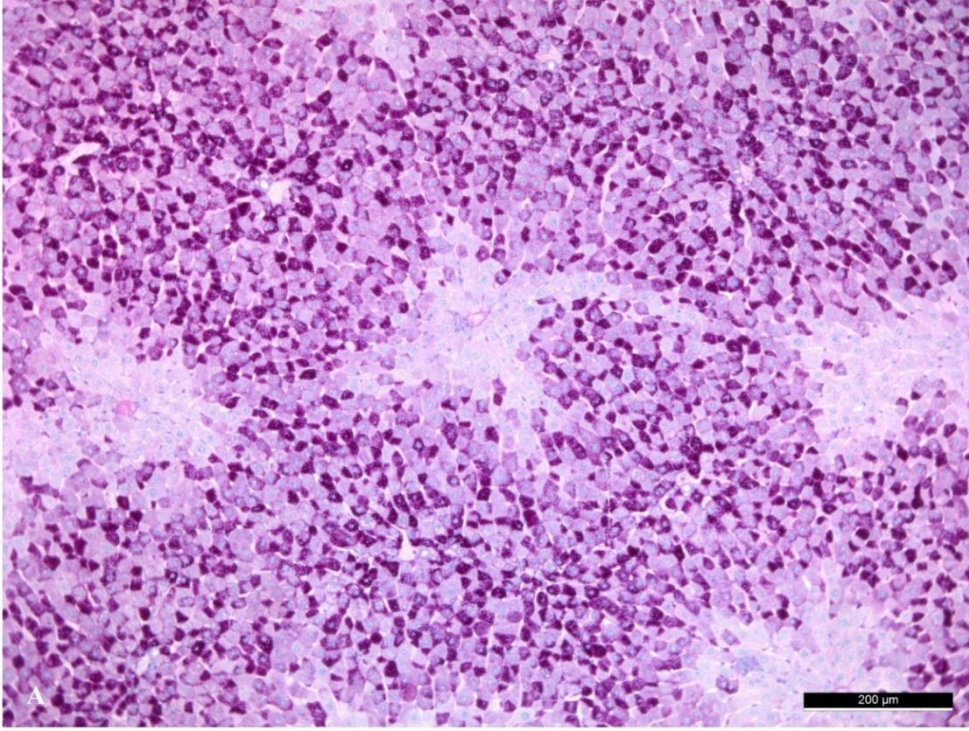
Resim 4.8. (A): APAP grubu. Karaciğer dokusunda sentrilobüler alandaki (- - -) ile çevrili hepatositlerde yoğun glikojen kaybının olduğu görülmekte, v. centralis (vc) (PAS, $\times 100$)



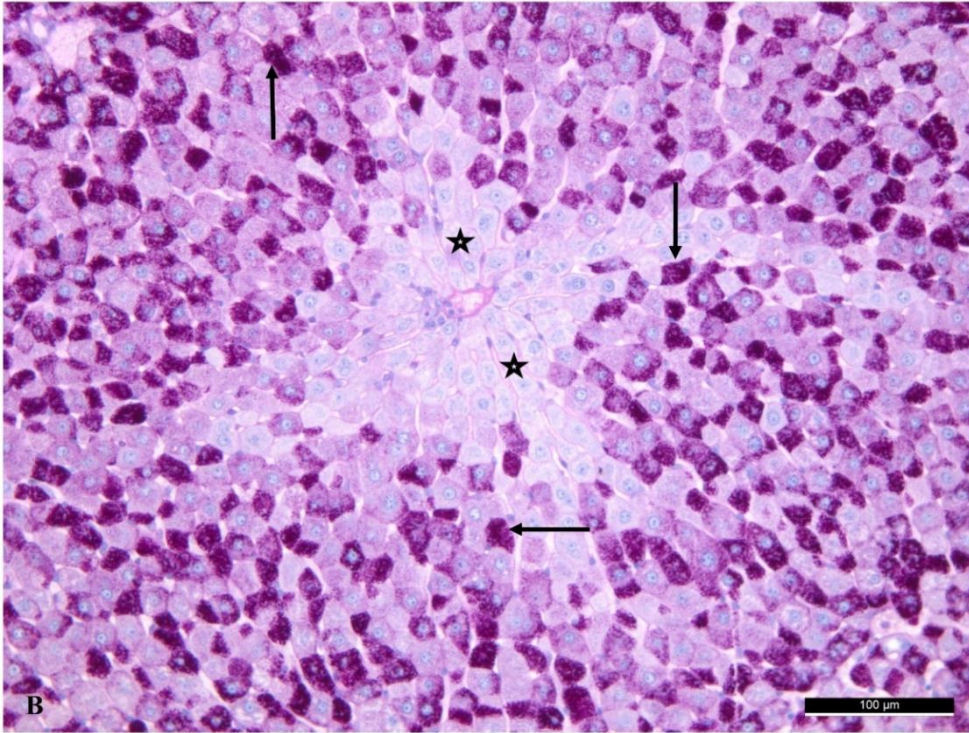
Resim 4.8. (devam) (B): APAP grubu. Sentrilobüler alandaki yoğun glikojen kaybının olduğu hepatositler (★) ve glikojen içeriği korunmuş bazı PAS (+) hepatositler (↑) görülmekte, v. centralis (vc) (PAS, $\times 200$)



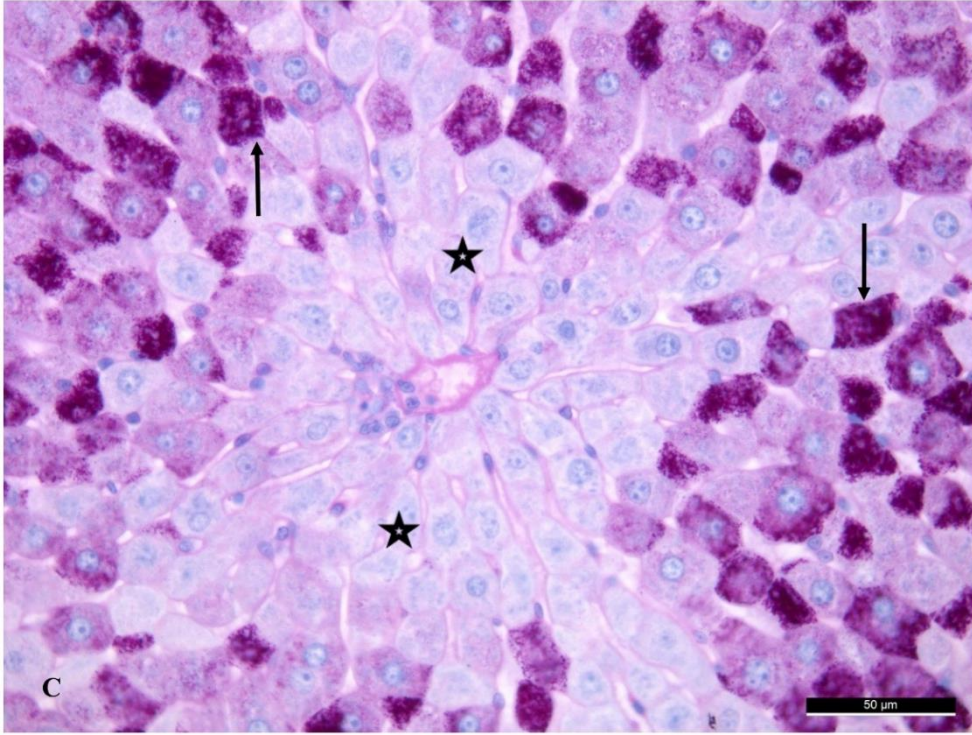
Resim 4.8. (devam) (C): APAP grubu. Karaciğer dokusunda sentrilobüler alanda yoğun glikojen kaybının olduğu PAS (-) hepatositler (★) görülmekte (PAS, ×400)



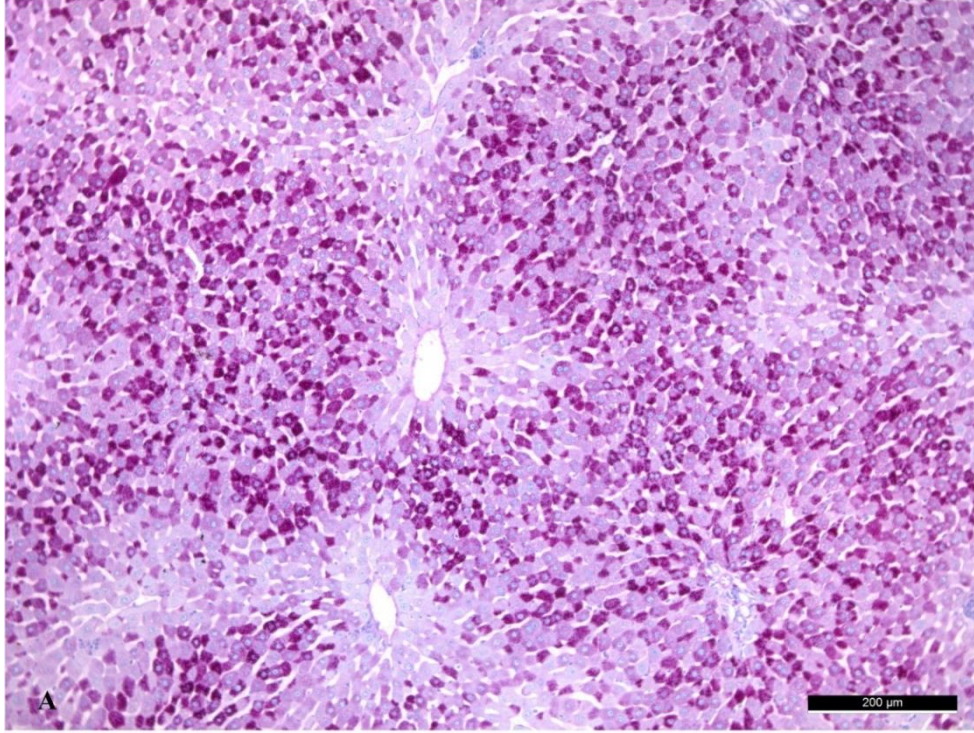
Resim 4.9. (A): APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan grup. Karaciğer dokusunda, sınırlı setrilobüler alanda glikojen kaybı görülen hepatositler ile perifere doğru glikojen içeriği artan hepatositler görülmekte (PAS, $\times 100$)



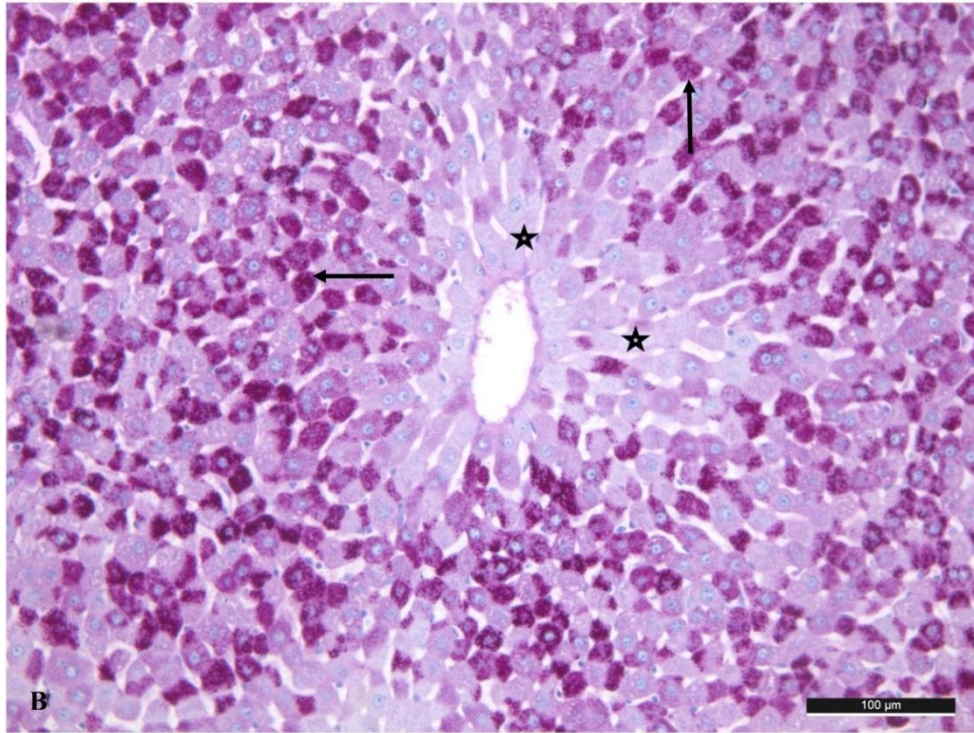
Resim 4.9. (devam) (B): APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan grup. Karaciğer dokusunda, sınırlı setrilobüler alanda glikojen kaybı görülen hepatositler (★) ile perifere doğru glikojen içeriği artan hepatositler (↑) görülmekte (PAS, $\times 200$)



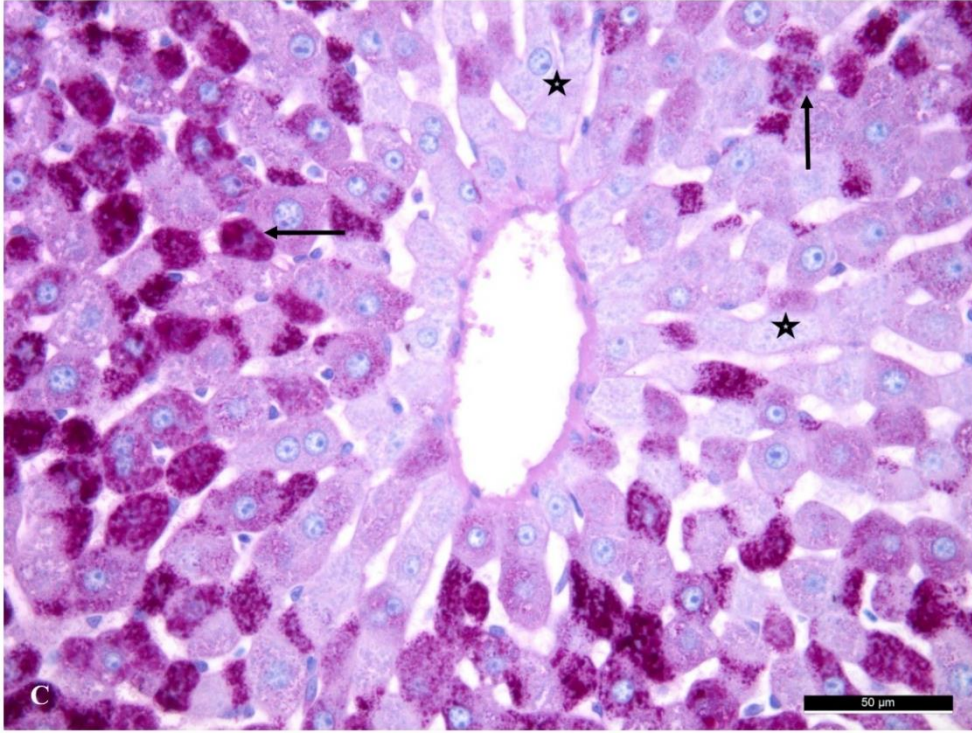
Resim 4.9. (devam) (C): APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan grup. Karaciğer dokusunda, sınırlı setrilobüler alanda glikojen kaybı görülen PAS (-) hepatositler (★) ile perifere doğru glikojen içeriği artan PAS (+) hepatositler (↑) görülmekte (PAS, ×400)



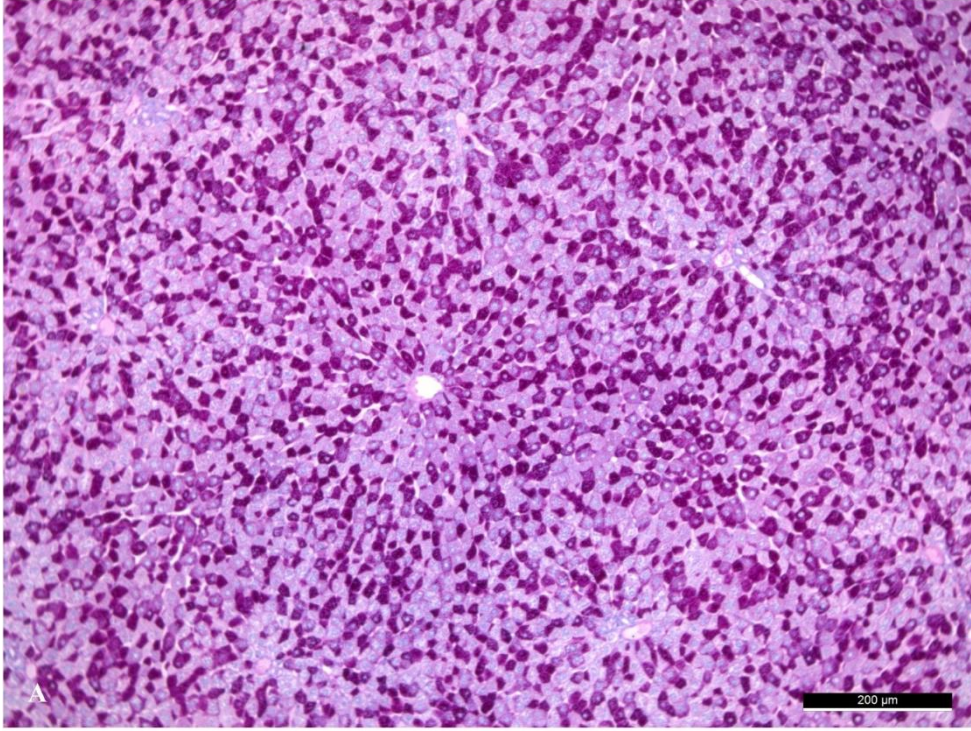
Resim 4.10. (A): APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan grup. Sentrilobüler alanda sınırlı bölgede glikojen kaybı görülen hepatositler ile perifere doğru glikojen içeriği giderek artan hepatositler izlenmekte (PAS, $\times 100$)



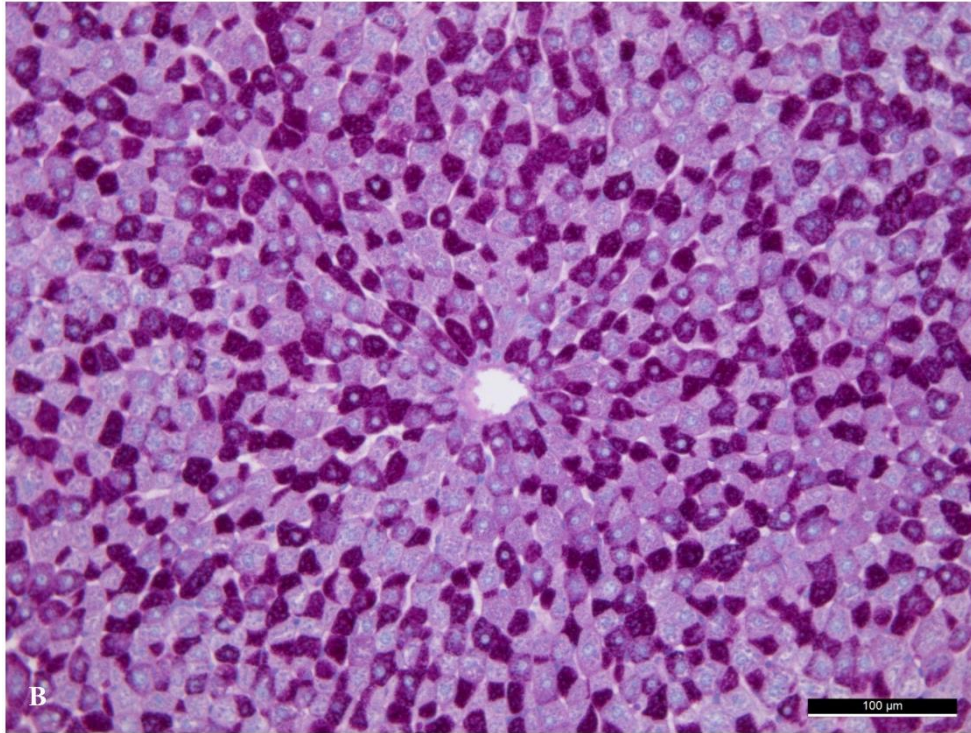
Resim 4.10. (devam) (B): APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan grup. Sentrilobüler alanda sınırlı bölgede glikojen kaybı görülen PAS (-) hepatositler (★) ile perifere doğru glikojen içeriği giderek artan PAS (+) hepatositler (↑) izlenmekte (PAS, $\times 200$)



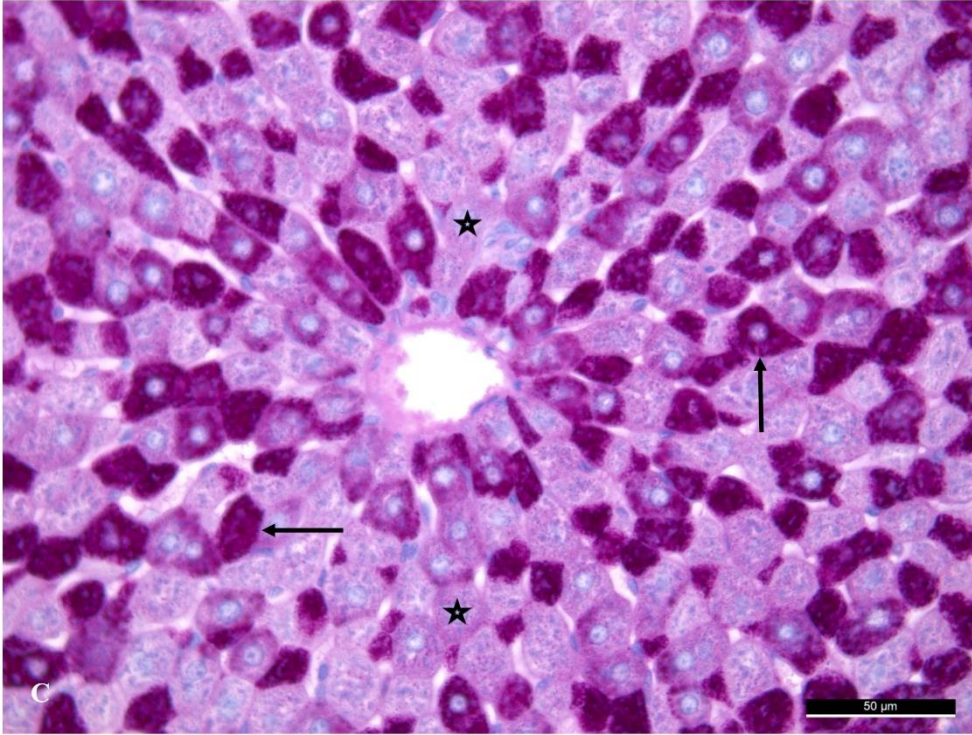
Resim 4.10. (devam) (C): APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan grup. Setrilobüler alanda sınırlı bölgede glikojen kaybı görülen PAS (-) hepatositler (★) ile perifere doğru glikojen içeriği giderek artan PAS (+) hepatositler (↑) izlenmekte (PAS, ×400)



Resim 4.11. (A): Borik asit uygulanan grup. Karaciğer dokusunda farklı yoğunlukta glikojen içeriğine sahip hepatositlerin diffüz bir dağılım gösterdiği izlenmekte (PAS, $\times 100$)

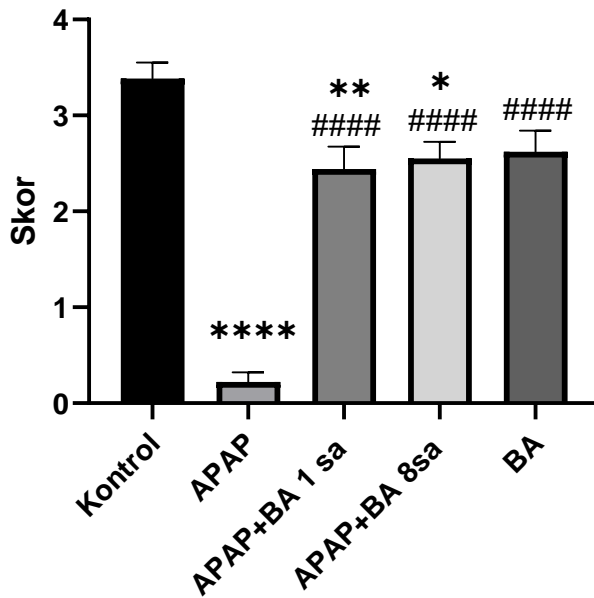


Resim 4.11. (devam) (B): Borik asit uygulanan grup. Karaciğer dokusunda farklı yoğunlukta glikojen içeriğine sahip hepatositlerin diffüz bir dağılım gösterdiği izlenmekte (PAS, $\times 200$)



Resim 4 11. (devam) (C): Borik asit uygulanan grup. Karaciğer dokusunda farklı yoğunlukta glikojen içeriğine sahip hepatositlerin diffüz bir dağılım gösterdiği izlenmekte, PAS (+) (↑), PAS (-) (★) (PAS, ×400)

PAS (+) Boyanma Düzeyi



Şekil 4.3. Karaciğer dokularında glikojen yoğunluğu değerlendirme sonuçları (APAP; Asetaminofen, BA; Borik Asit, PAS; Periyodik Asit Schiff) Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; *p <0,05, **p <0,01, ****p <0,0001. APAP grubu ile karşılaştırıldığında; #####p <0,0001

4.2.3. İmmunohistokimyasal boyama bulguları

VEGF-A immünoaktivitesinin değerlendirilmesi

Değerlendirilmelerde sentrilobüler nekroz kaynaklı farklılık olmaması için portal alan merkezli ve santral ven merkezli olmak üzere iki farklı histolojik bölgeden değerlendirme yapılmıştır.

Deney gruplarında periportal alandaki vaskülarizasyonu göstermek amacıyla VEGF-A ile yapılan immünohistokimyasal boyamaların değerlendirilmesi sonucunda; kontrol grubunda periportal alan hepatositlerinde daha zayıf immünoaktivite görüldü (Resim 4.12 A). Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında en kuvvetli immünoaktivitenin APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan grupta olduğu belirlendi (Resim 4.12 C). APAP ve APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan gruplarda ise kontrol grubuna göre daha kuvvetli ancak 1 saat sonra borik asit verilen gruba göre daha zayıf immünoaktivite görüldü (Resim 4.12 B-D). Borik asit uygulanan grupta ise kontrol grubuna benzer bir tutulum olduğu izlendi (Resim 4.12 E).

Deney gruplarında sentrilobüler alandaki vaskülarizasyonu değerlendirmek amacıyla VEGF-A ile yapılan immünohistokimyasal boyamaların sonucunda; kontrol grubunda sentrilobüler alan hepatositlerinde daha zayıf immünoaktivite izlendi (Resim 4.13 A). APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan grupta ise en kuvvetli immünoaktivite görüldü (Resim 4.13 C). APAP ve APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan gruplarda orta derecede VEGF-A immünoaktivitesi dikkati çekti (Resim 4.13 B-D). Borik asit uygulanan grupta kontrol grubuna benzer bir tutulum izlendi (Resim 4.13 E).

İstatistiksel analizlerde periportal ve sentrilobüler alanların değerlendirilmesinin yanı sıra her iki alanın H-skorlarından elde edilen sonuçlar ile tüm alanları içeren genel bir H-skor değerlendirilmesi de yapıldı.

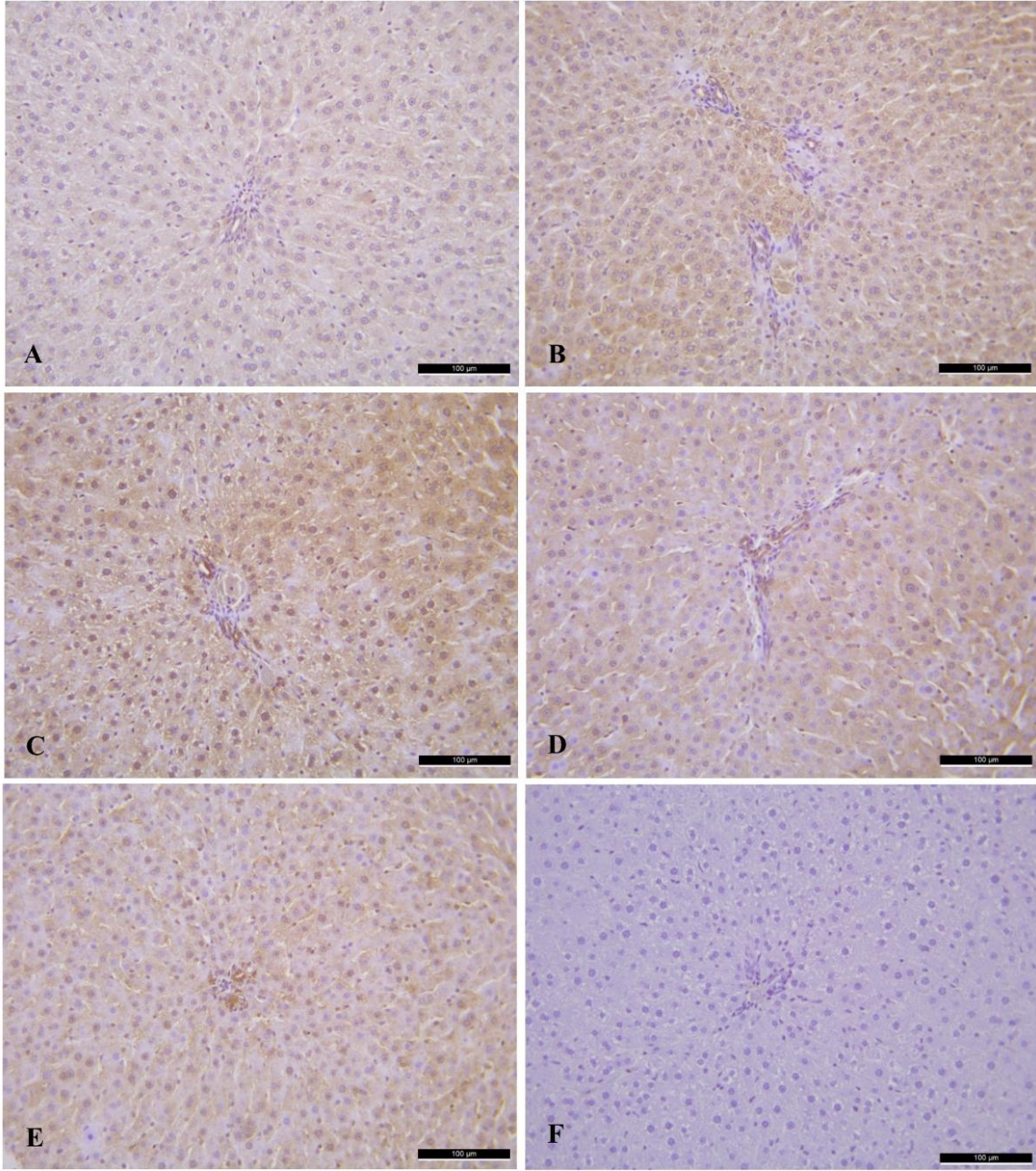
Periportal alandaki her grup için VEGF-A immünoaktivitesinden elde edilen H-skor değerlerinin ortalaması kontrol grubunda $129,1 \pm 4,3$; APAP grubunda $161,6 \pm 8,6$; APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan grupta $169,4 \pm 5,6$; APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan grupta $153,3 \pm 3,9$ ve borik asit grubunda $136,5 \pm 3,9$ olarak

bulundu. H-skor ile yapılan istatistiksel analiz sonucunda periportal alanda kontrol grubuna göre en yüksek VEGF-A H-skoru APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan grupta görüldü ($p<0,0001$). APAP grubu ve APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan grupta da kontrol grubuna göre periportal alanda daha yüksek VEGF-A H-skoru olduğu gösterildi (sırasıyla $p<0,01$ ve $p<0,05$) (Şekil 4.4 A).

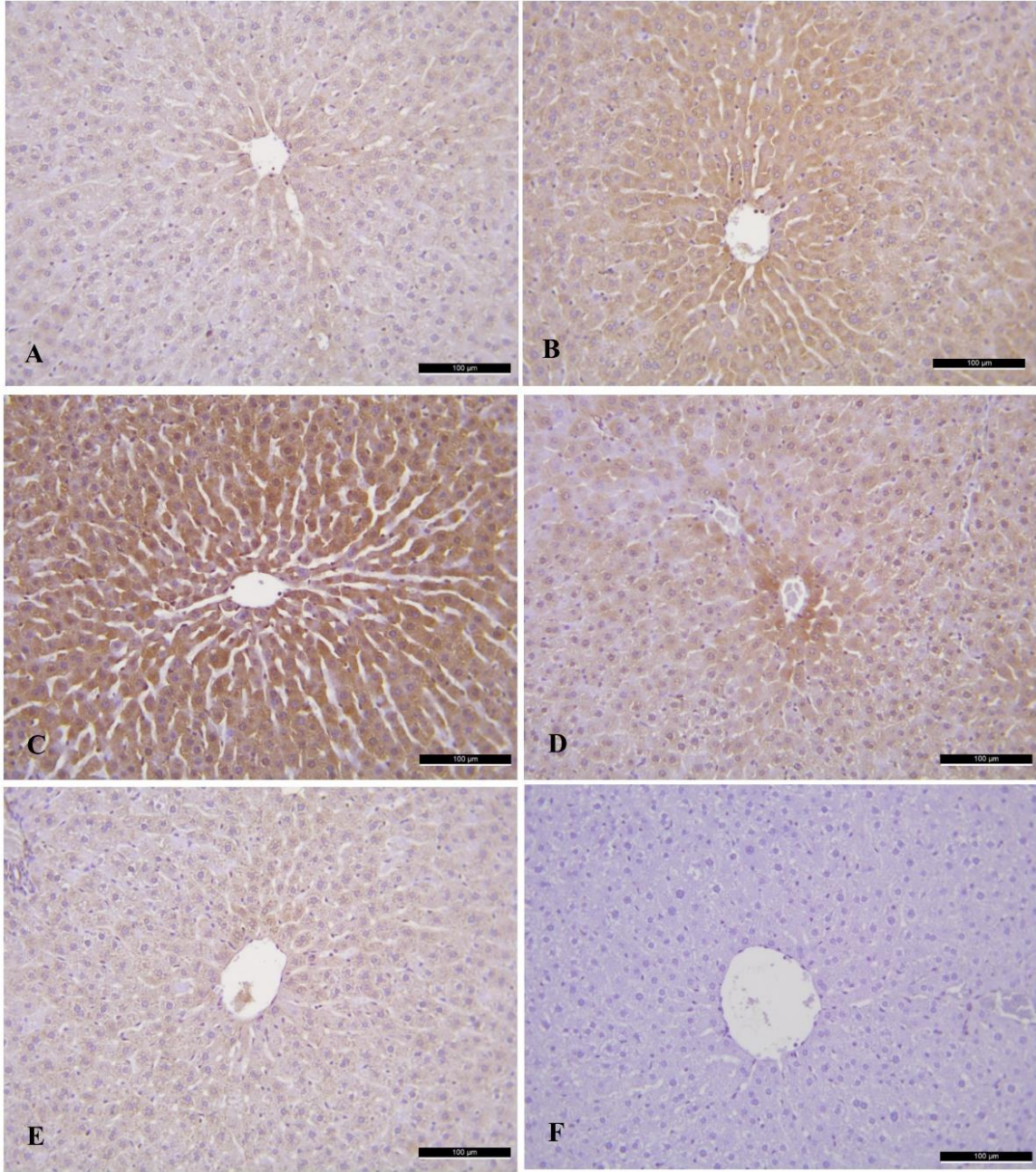
Sentrilobüler alandaki her grup için VEGF-A immünoaktivitesinden elde edilen H-skor değerlerinin ortalaması kontrol grubunda $135,5\pm 5,6$; APAP grubunda $170,0\pm 5,2$; APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan grupta $178,1\pm 5,7$; APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan grupta $160,8\pm 5,0$; ve borik asit grubunda $142,4\pm 5,9$ olarak bulundu. H-skor ile yapılan istatistiksel analiz sonucunda sentrilobüler alanda kontrol grubuna göre en yüksek VEGF-A H-skoru APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan grupta görüldü ($p<0,01$). Kontrol grubuna göre, APAP grubunda daha yüksek VEGF-A H-skoru izlenirken ($p<0,05$) APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan grupta ve borik asit grubunda VEGF-A H skoru bakımından anlamlı farklılık görülmedi ($p>0,05$) (Şekil 4.4 B).

Hem periportal hem de sentrilobüler alanların VEGF-A H-skor sonuçları beraber değerlendirildiğinde ise periportal alandaki VEGF-A H-skor sonuçları ile benzer sonuçlar elde edildi (Şekil 4.4 C).

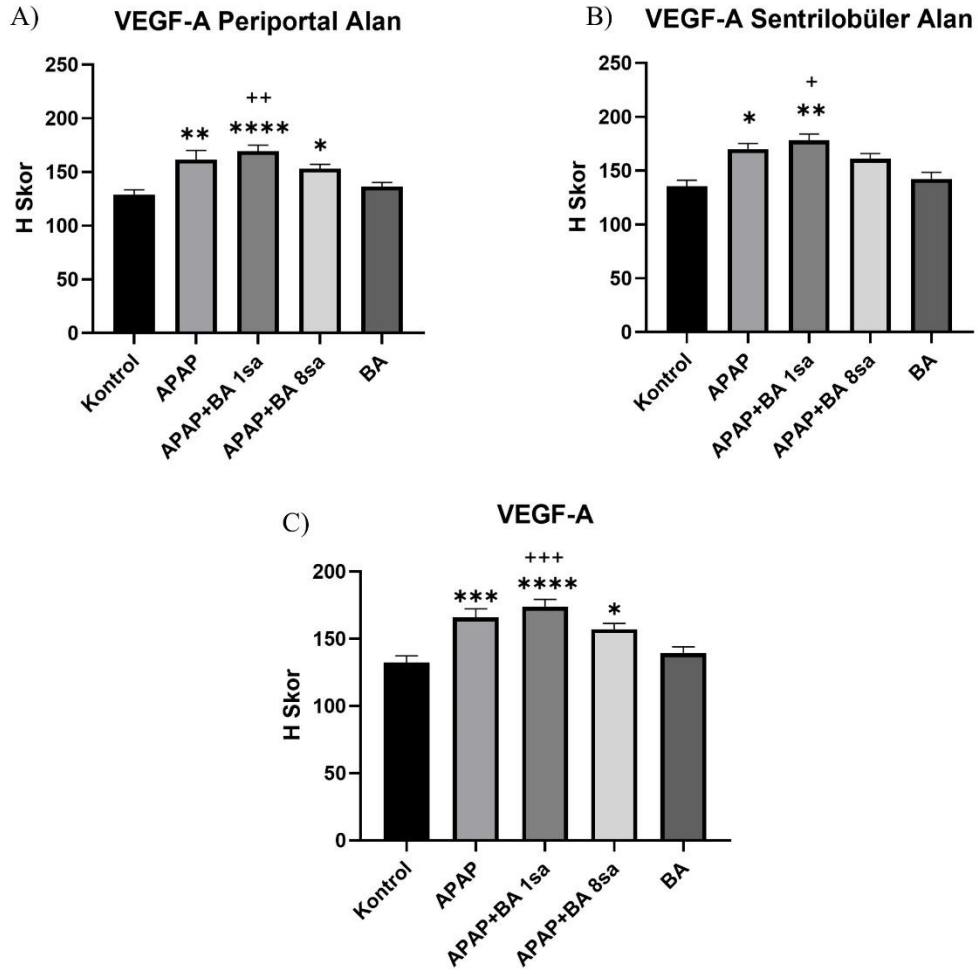
Her grubun kendi periportal alan VEGF-A H-skoru, sentrilobüler alan VEGF-A H-skoru ile karşılaştırıldığında, tüm gruplarda VEGF-A H-skorunun sentrilobüler alanda periportal alana göre daha yüksek olduğu belirlendi. İstatistiksel anlamlılık ise kontrol grubu, APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan grupta ve APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan grupta görüldü ($p<0,05$) (Şekil 4.5).



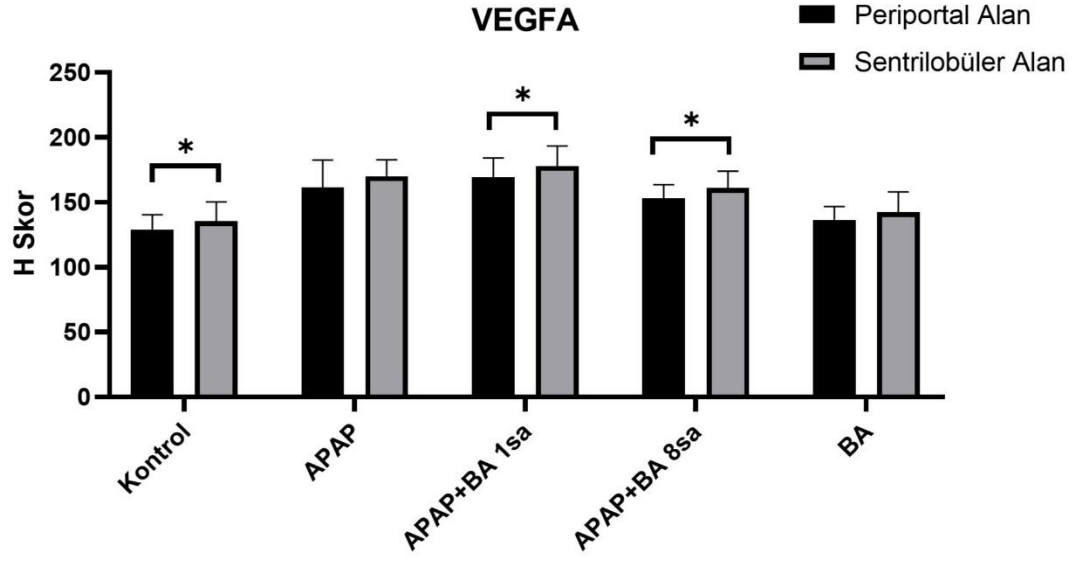
Resim 4.12. Periportal alanda VEGF-A immünoreaktivitesi gösteren hepatositler görülmekte. A) Kontrol; B) APAP; C) APAP verildikten 1 saat sonra borik asit; D) APAP verildikten 8 saat sonra borik asit; E) Borik Asit; F) Negatif Kontrol (DAB & Hematoksilen, $\times 200$)



Resim 4.13. Sentrilobüler alanda VEGF-A immünoaktivitesi gösteren hepatositler görülmekte. A) Kontrol; B) APAP; C) APAP verildikten 1 saat sonra borik asit; D) APAP verildikten 8 saat sonra borik asit; E) Borik Asit; F) Negatif Kontrol (DAB & Hematoksilen, $\times 200$)



Şekil 4.4. VEGF-A immünoreaktivite değerlendirmesi (A) Periportal Alan, (B) Sentrilobüler Alan, (C) Total Alan, (APAP; Asetaminofen, BA; Borik Asit) Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. BA grubu ile karşılaştırıldığında; + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$



Şekil 4.5. VEGF-A immünoreaktivitelerinin periportal ve sentrilobüler alanlarının değerlendirilmesi (APAP; Asetaminofen, BA; Borik Asit) (*p <0,05)

Alfa fetoprotein (AFP) immünoaktivitesinin değerlendirilmesi

Deney gruplarında sentrilobüler ve periportal alandaki rejenerasyonu göstermek amacıyla AFP ile yapılan immünohistokimyasal boyamaların değerlendirilmesi sonucunda; kontrol grubunda periportal alan hepatositlerinin sitoplazmasında orta derece immünoaktivite izlendi (Resim 4.14 A). Gruplar arasında en fazla AFP immünoaktivitesinin APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan grupta olduğu görüldü (Resim 4.14 D). APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan grupta ise APAP grubuna göre daha fazla APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan gruba göre ise daha az immünoaktivite görüldü (Resim 4.14 C). Diğer gruplarda ise kontrol grubuna benzer immünoaktivite olduğu dikkati çekti (Resim 4.14).

AFP ile yapılan immünohistokimyasal boyamaların değerlendirilmesi sonucunda; sentrilobüler alanda kontrol, APAP ve borik asit grubunda orta derece immünoaktivite izlendi (Resim 4.15 A-B-E). Periportal alanda olduğu gibi sentrilobüler alan değerlendirmesinde de en fazla AFP immünoaktivitesi APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan grupta izlendi (Resim 4.15 D). APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan grupta ise APAP grubuna göre daha fazla, APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan gruba göre ise daha az AFP immünoaktivitesi görüldü (Resim 4.15 C).

İstatistiksel analizlerde periportal ve sentrilobüler alanların AFP H-skor değerlendirilmesinin yanı sıra her iki alandan elde edilen sonuçlar genel olarak da değerlendirildi.

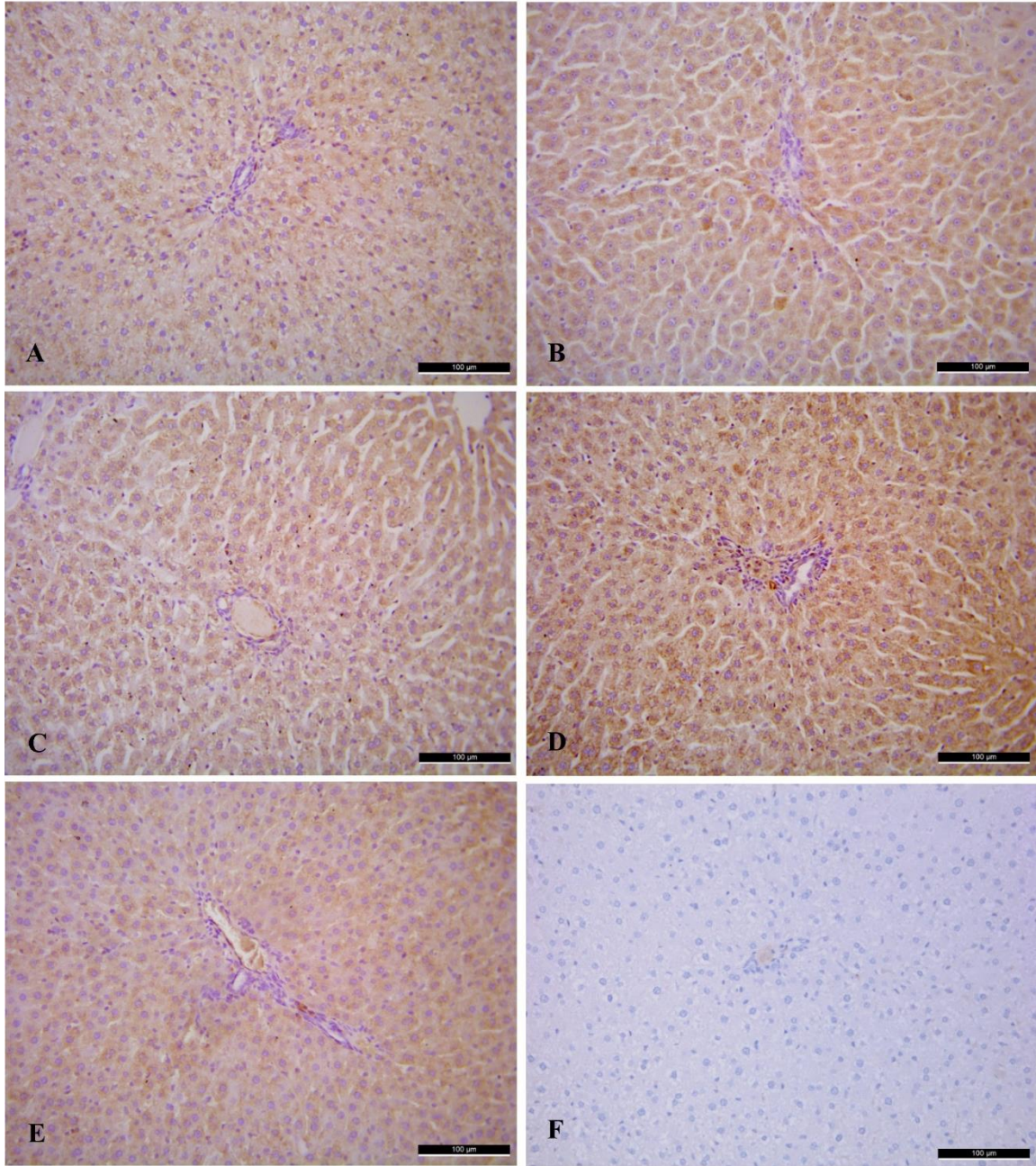
Periportal alandaki her grup için yapılan AFP H-skor değerlerinin ortancaları ve çeyreklikler arası uzaklıkları kontrol grubunda 116,2 (26,65); APAP grubunda 121,6 (22,73); APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan grupta 128,4 (29,90); APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan grupta 134,6 (18,18) ve borik asit grubunda 107,6 (21,0) olarak bulundu. Periportal alandaki AFP H-skor sonuçlarına göre gruplar kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında AFP immünoaktivitesinde anlamlı farklılık olmadığı belirlendi ($p>0,05$) (Şekil 4.6 A).

Sentrilobüler alandaki her grup için yapılan AFP H-skor değerlerinin ortancaları ve çeyreklikler arası uzaklıkları kontrol grubunda 118,8 (28,74); APAP grubunda 121,4

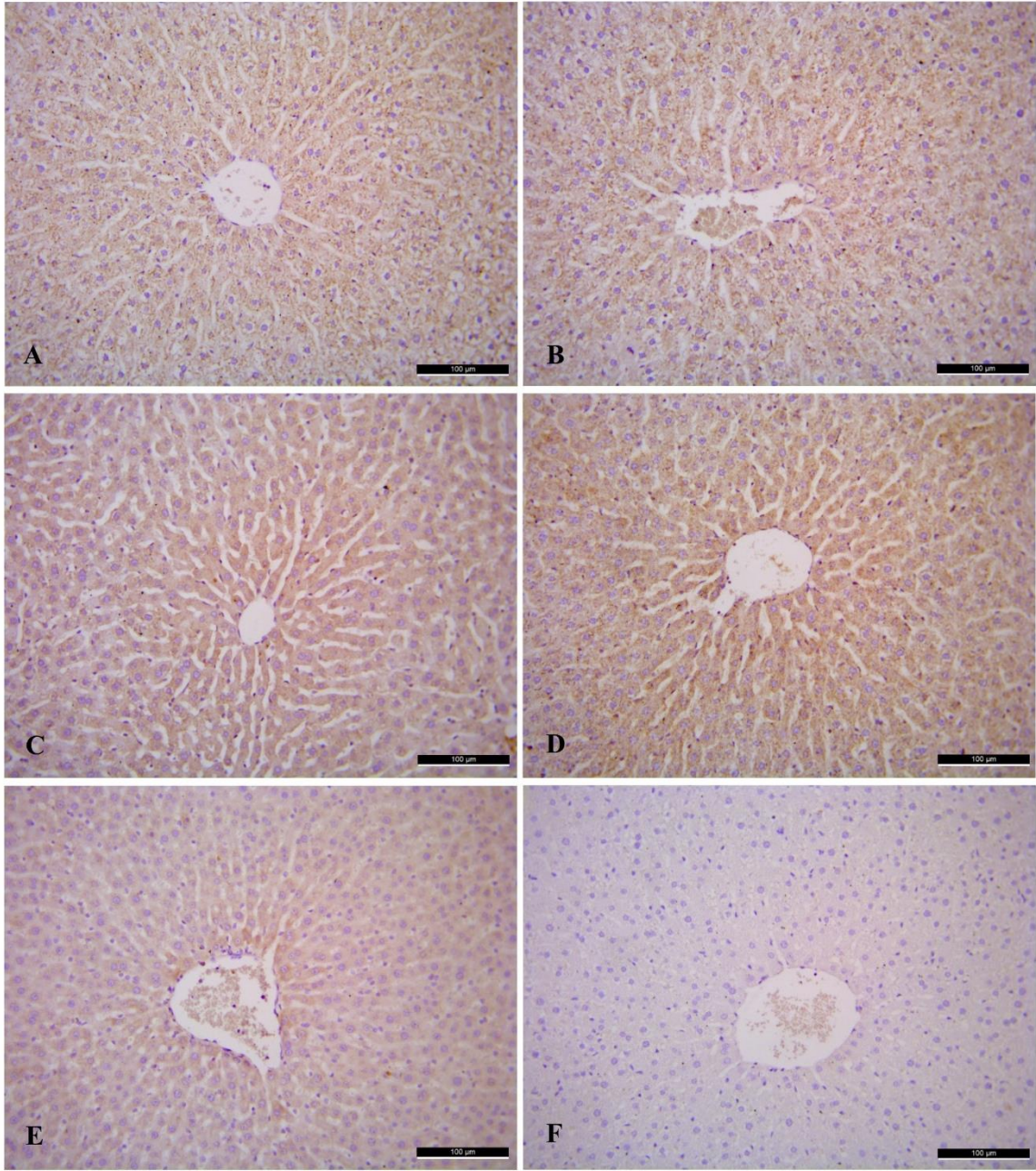
(13,61); APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan grupta 133,4 (38,89); APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan grupta 149,0 (13,33) ve borik asit grubunda 111,9 (31,34) olarak bulundu. Sentrilobüler alandaki AFP H-skor sonuçlarına göre gruplar arası anlamlı farklılık olduğu görüldü. Bu farklılığın APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan grubun borik asit grubuna göre daha yüksek AFP H-skor değerine sahip olmasından kaynaklandığı belirlendi ($p < 0,05$). Ancak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında diğer gruplarda AFP H-skor düzeyi bakımından anlamlı farklılık görülmedi (Şekil 4.6 B).

Hem periportal hem de sentrilobüler alanların AFP H-skor sonuçları beraber değerlendirildiğinde ise sentrilobüler alan ile benzer sonuçlar elde edildi (Şekil 4.6 C).

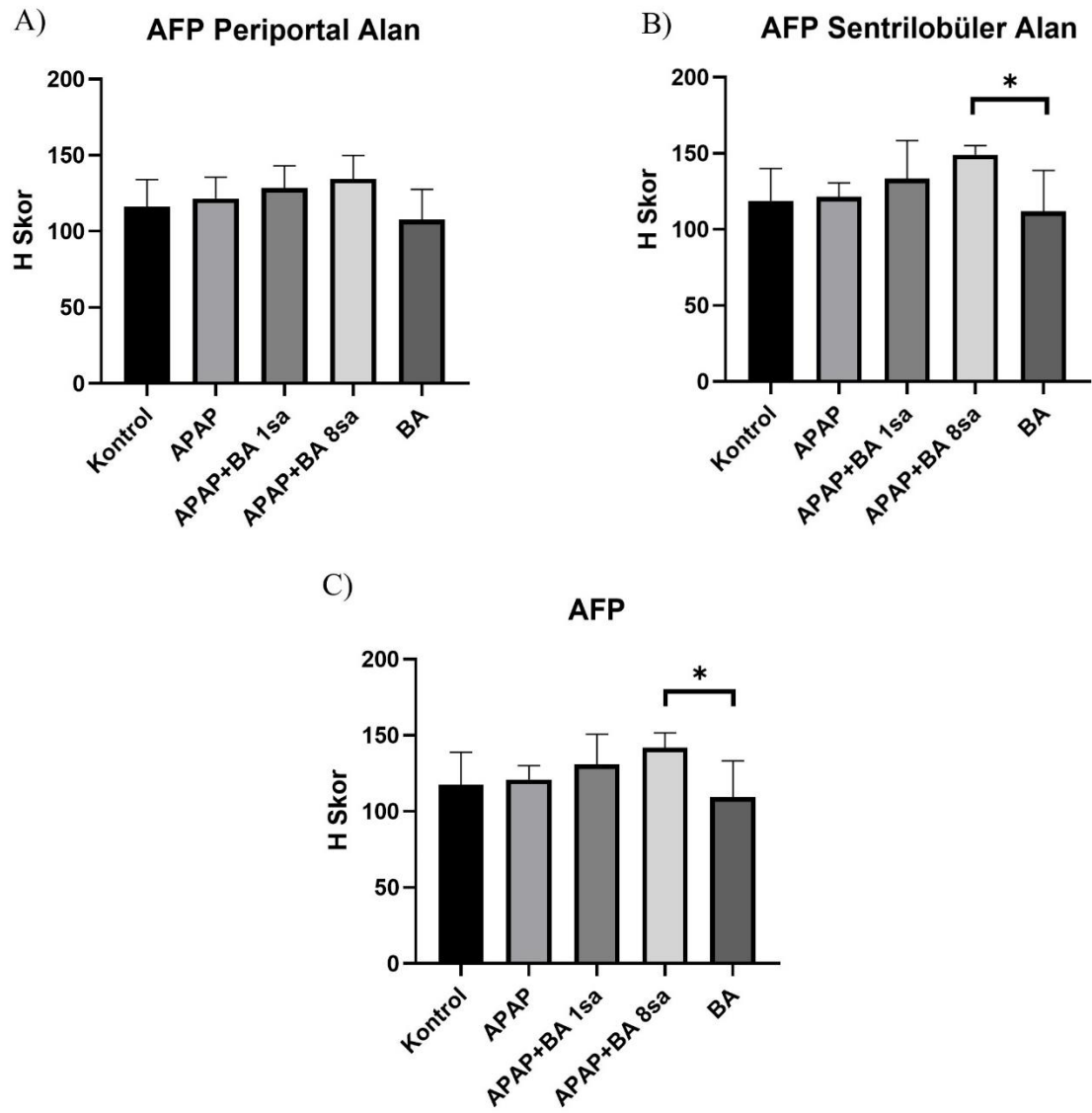
Her grubun kendi periportal alan AFP H-skoru, sentrilobüler alan AFP H-skoruna ile karşılaştırıldığında, APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan ve APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan gruplarda sentrilobüler alanda AFP H-skorunun daha yüksek olduğu belirlendi (sırası ile $p < 0,01$; $p < 0,05$) (Şekil 4.7).



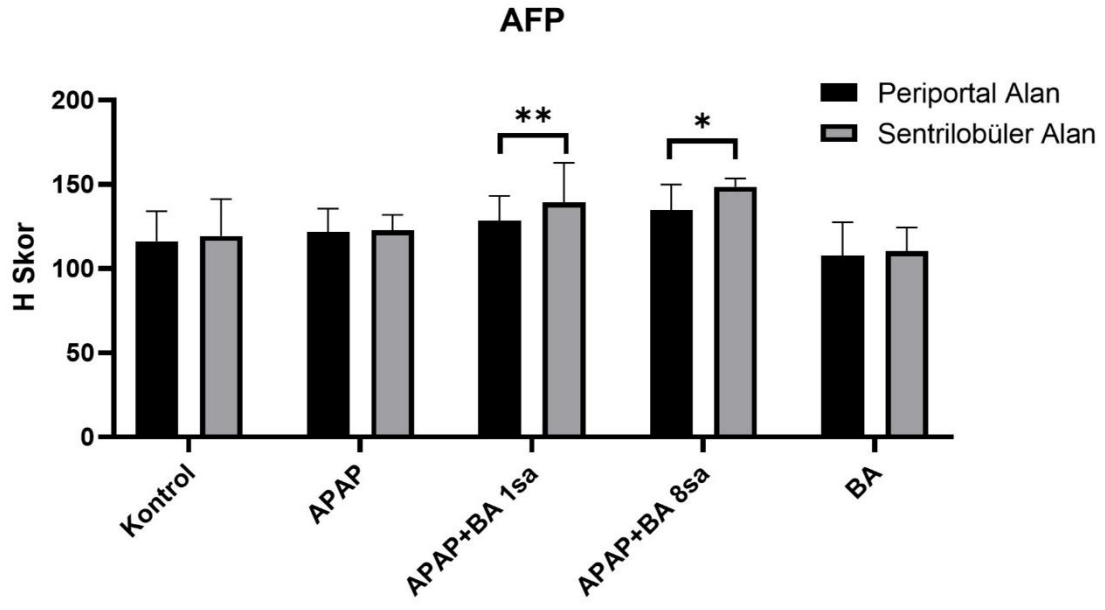
Resim 4.14. AFP immünoaktivitesi gösteren periportal alan hepatositleri görülmekte. A) Kontrol; B) APAP; C) APAP verildikten 1 saat sonra borik asit; D) APAP verildikten 8 saat sonra borik asit; E) Borik Asit; F) Negatif Kontrol (DAB & Hematoksilen, ×200)



Resim 4.15. AFP immünoaktivitesi gösteren sentrilobüler alan hepatositleri görülmekte. A) Kontrol; B) APAP; C) APAP verildikten 1 saat sonra borik asit; D) APAP verildikten 8 saat sonra borik asit; E) Borik Asit; F) Negatif Kontrol (DAB & Hematoksilen, $\times 200$)



Şekil 4.6. AFP immünoreaktivite değerlendirilmesi (A) Periportal Alan, (B) Sentrilobüler Alan, (C) Tüm Alanlar (APAP; Asetaminofen, BA; Borik Asit) (* $p < 0,05$)

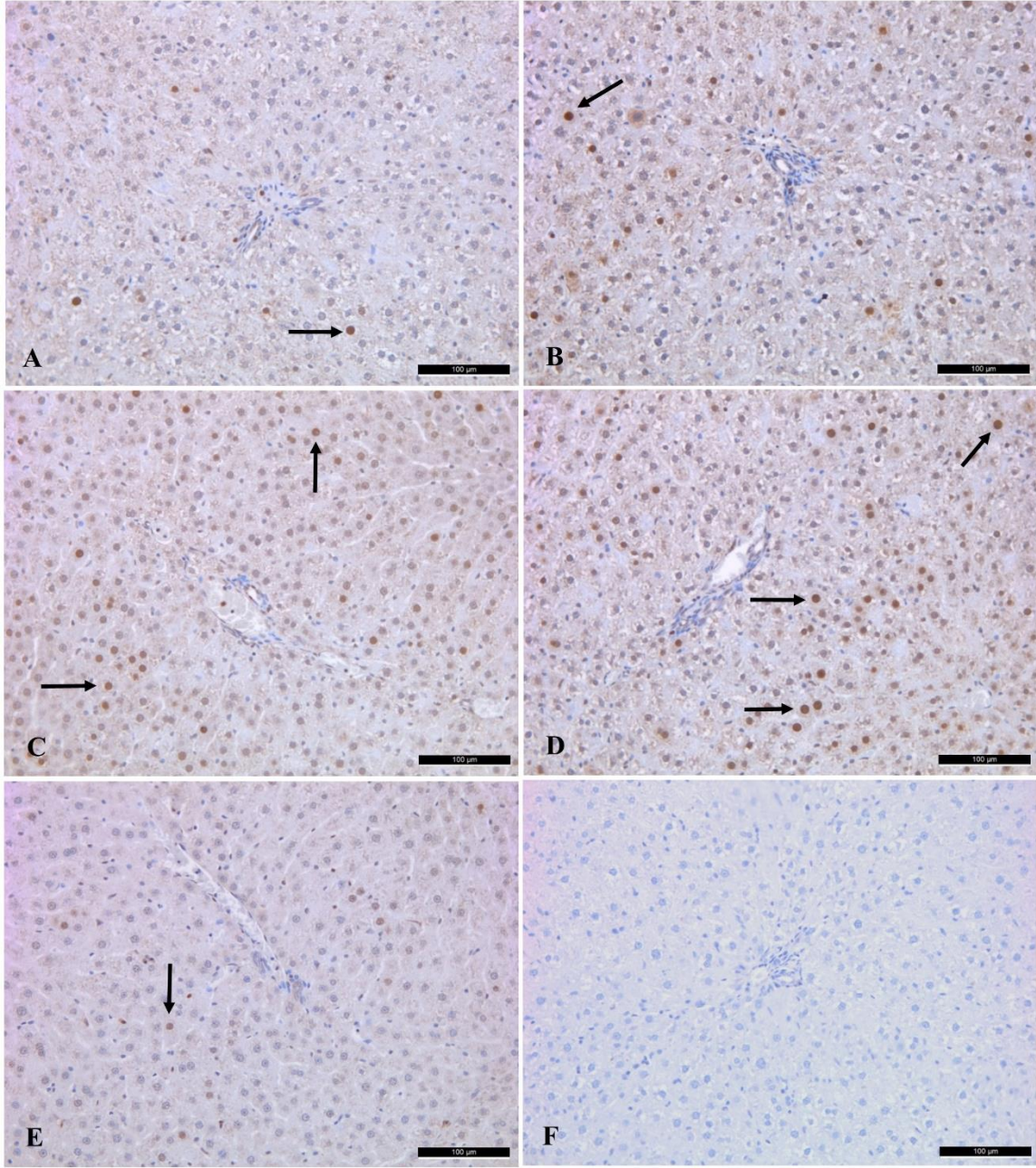


Şekil 4.7. AFP immünoreaktivitelerinin periportal ve sentrilobüler alanlarının değerlendirilmesi (APAP; Asetaminofen, BA; Borik Asit) (*p <0,05, **p <0,01)

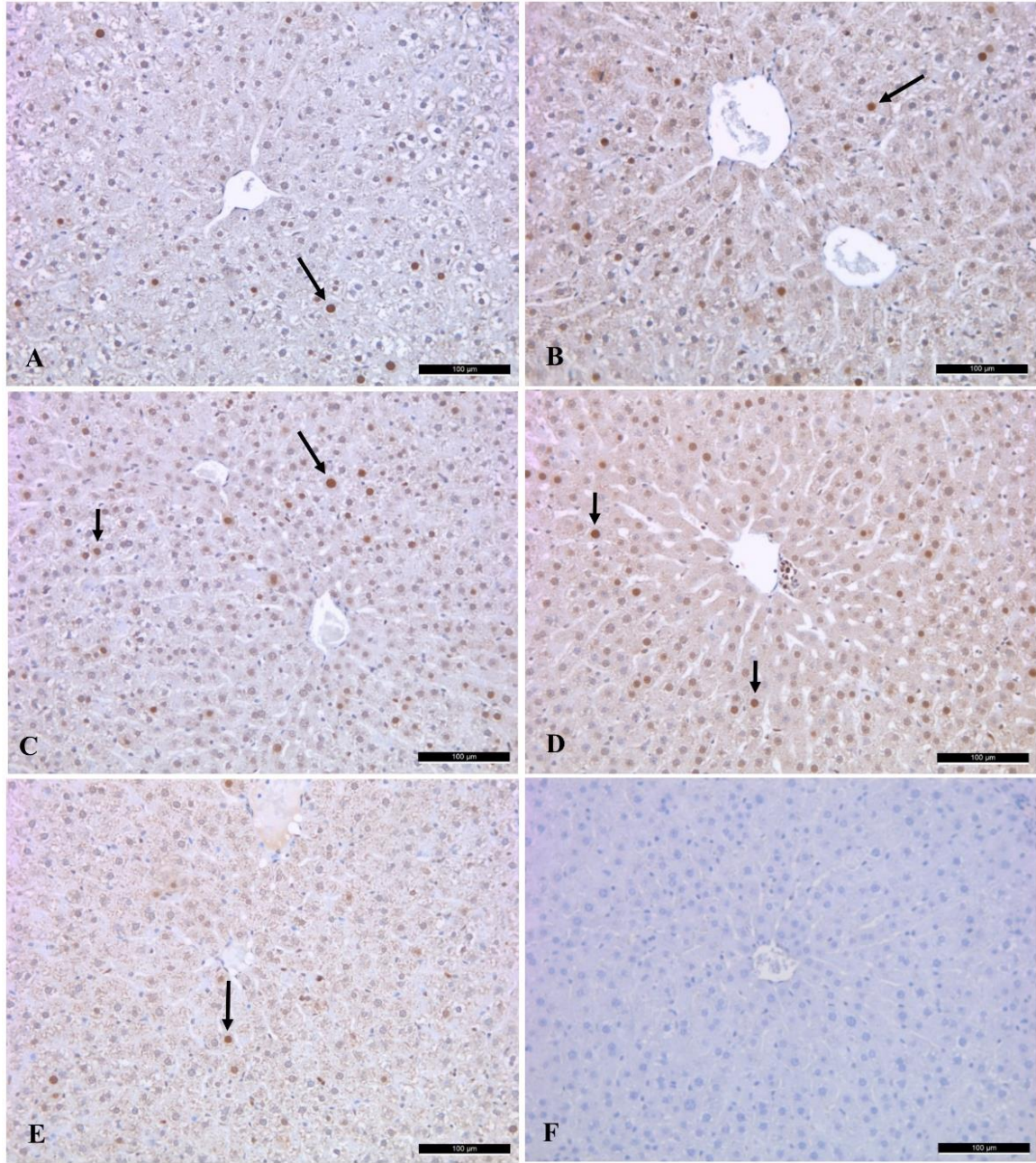
PCNA immünoaktivitesinin değerlendirilmesi

Deney gruplarında sentrilobüler ve periportal alandaki hepatosit proliferasyonunu göstermek amacıyla PCNA ile yapılan immünohistokimyasal boyamaların değerlendirilmesi sonucunda; belirgin kahverengi boyanan hepatosit çekirdekleri PCNA pozitif olarak kabul edildi. Kontrol grubuna göre APAP uygulanan tüm gruplarda PCNA pozitif hücre çekirdek sayısında artış olduğu görüldü. APAP uygulanan grup ile karşılaştırıldığında ise APAP verildikten hem 1 saat hem de 8 saat sonra borik asit uygulanan grupta PCNA pozitif hücre çekirdek sayılarının arttığı izlendi (Resim 4.16-17).

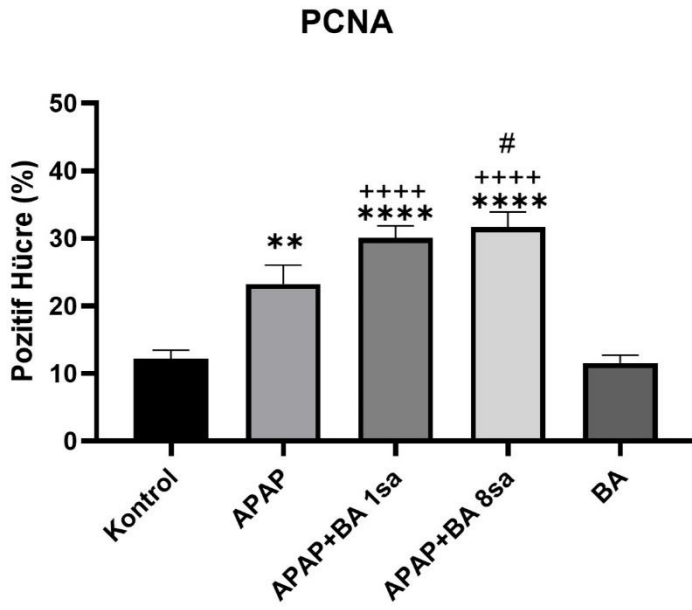
PCNA pozitif hücre yüzdesinin ortalamaları kontrol grubunda %12,24±1,2; APAP grubunda %23,29±2,78; APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan grupta %30,08±1,79; APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan grupta %31,63±2,29 ve borik asit grubunda %11,54±1,19 olarak bulundu. İstatistiksel analizler sonucunda gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında APAP grubunda, APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan grupta ve APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan grupta daha yüksek PCNA pozitif hücre yüzdesi belirlendi (sırası ile $p < 0,01$; $p < 0,0001$ ve $p < 0,0001$). Gruplar APAP uygulanan grup ile karşılaştırıldığında ise APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan grubun daha fazla PCNA pozitif hücreye sahip olduğu görülürken tek başına borik asit uygulanan grubun daha az sayıda PCNA pozitif hücre içerdiği belirlendi ($p < 0,05$). APAP verildikten sonra borik asit uygulanan gruplar PCNA pozitif hücre yüzdesi bakımından birbiri ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık olmadığı görüldü ($p > 0,05$) (Şekil 4.8).



Resim 4.16. Periportal alandaki hepatosit çekirdeklerinde PCNA immünreaktivite (↑) görülmekte. A) Kontrol; B) APAP; C) APAP verildikten 1 saat sonra borik asit; D) APAP verildikten 8 saat sonra borik asit; E) Borik Asit; F) Negatif Kontrol (DAB & Hematoksilen, ×200)



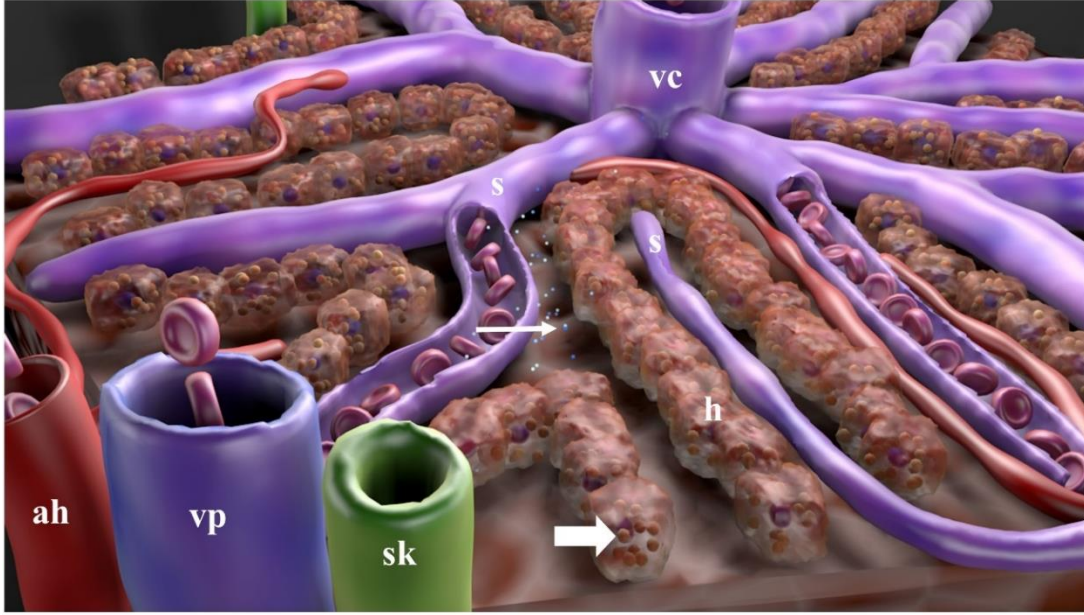
Resim 4.17. Sentrilobüler alandaki hepatosit çekirdeklerinde PCNA immünreaktivite (↑) görülmekte. A) Kontrol; B) APAP; C) APAP verildikten 1 saat sonra borik asit; D) APAP verildikten 8 saat sonra borik asit; E) Borik Asit; F) Negatif Kontrol (DAB & Hematoksilen, ×200)



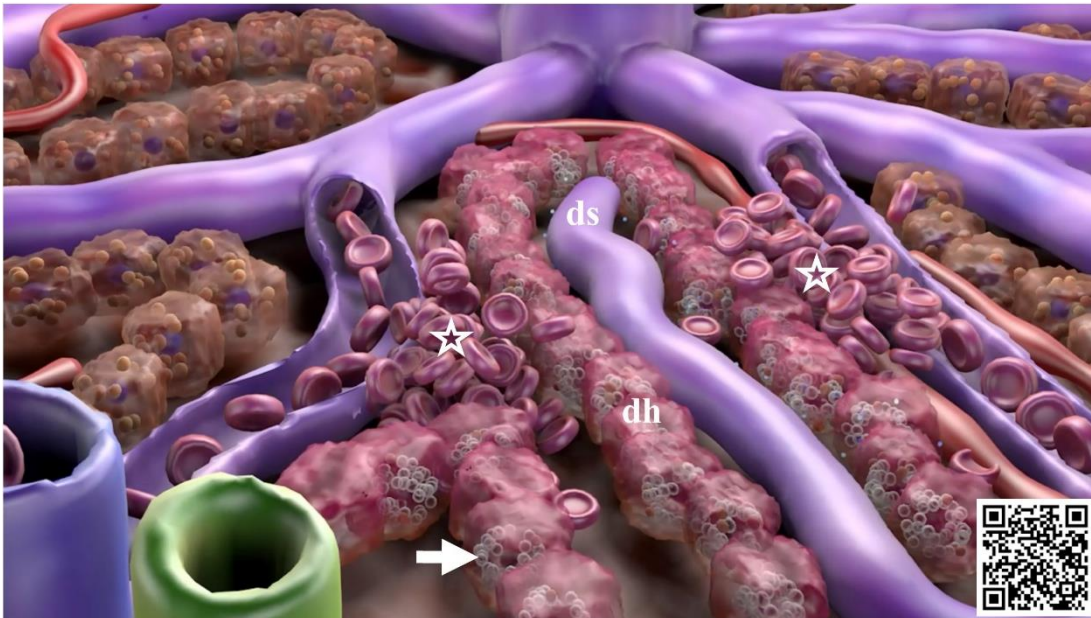
Şekil 4.8. PCNA pozitif hücre yüzdeleri (APAP; Asetaminofen, BA; Borik Asit) Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; **p <0,01; ****p <0,0001. APAP grubu ile karşılaştırıldığında; #p <0,05. BA grubu ile karşılaştırıldığında; ++++p <0,0001

4.3. Üç Boyutlu Modelleme Bulguları

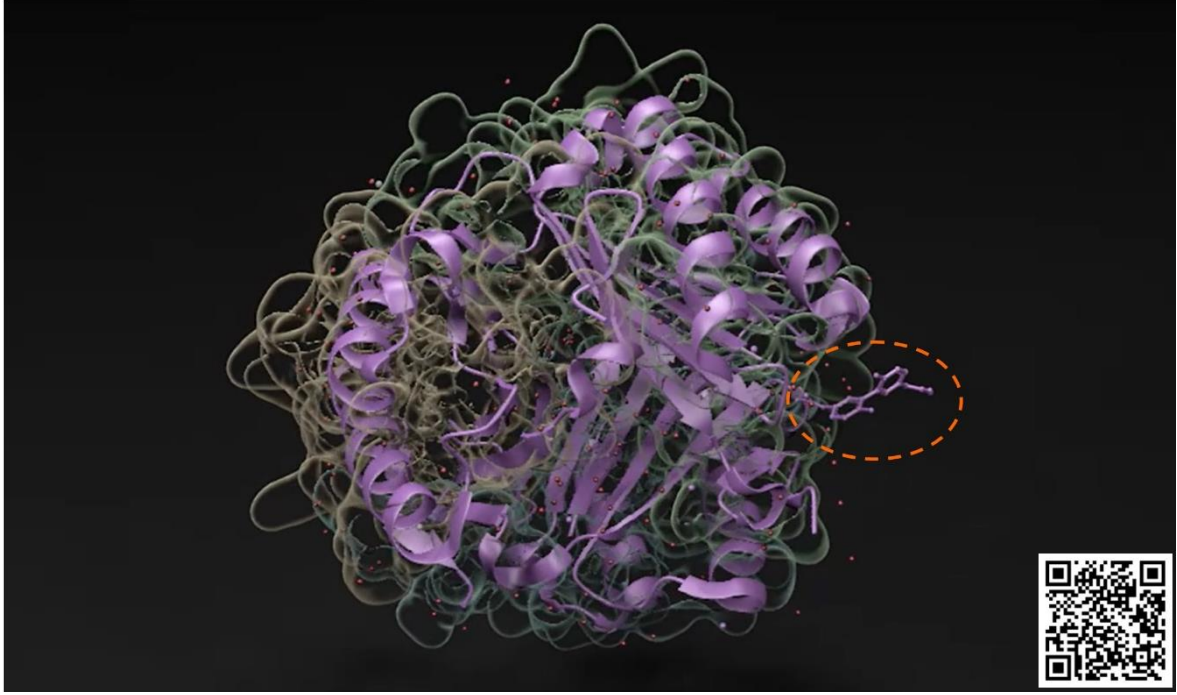
Deney gruplarına ait HE ve PAS boyamaları sonucu elde edilen bulgular kullanılarak asetaminofen kaynaklı karaciğer hasarında görülen patolojik değişiklikler 3 boyutlu hale getirilerek derinlik kazandırılmış ve bu görüntülerden histopatolojik sürecin anlaşılmasını kolaylaştırmak amacı ile animasyon hazırlanmıştır. QR kod okutarak izlenebilecek olan animasyonda sağlıklı bir klasik karaciğer lobülündeki (Resim 4.18) asetaminofene etkin kalma sonrası oluşan dejeneratif hepatositler, dilate sinüzoidler, hemoraji, hepatositlerde azalan glikojen içeriği ve ortaya çıkan vakuolizasyon görülmektedir (Resim 4.19). QR kodu okutarak asetaminofenin hepatositlerde sitokrom P450 enzimi ile metabolize olması sonucu ortaya çıkan ve proteinlere bağlanarak hücrede hasara sebep olan NAPQI'nın makrofaj migrasyon inhibitör faktöre bağlanmış olduğu 3 boyutlu modelden elde edilen animasyonu izlenmektedir (Resim 4.20) [120,121].



Resim 4.18. Sağlıklı sıçan karaciğerine ait klasik lobülün 3 boyutlu modellemesi; v. centralis (vc), sinüzoidler (s), a. hepatica (ah), v. porta (vp), safra kanalı (sk), normal hepatositler (h), hepatositlerde glikojen (➡) ve asetaminofenin sinüzoidlere geçişi (→) görülmekte (3 boyutlu modelleme Prof. Dr. Tuncay Veysel PEKER tarafından hazırlanmıştır)



Resim 4.19. Asetaminofen kaynaklı karaciğer hasarı görülen klasik lobülün 3 boyutlu modellemesi ve animasyonu; eozinofilik boyanan dejeneratif hepatositler (dh), dilate sinüzoidler (ds), hepatositlerde vakuolizasyon (➡), hemoraji (★) görülmekte (QR kodu okutarak animasyona ulaşabilirsiniz) (3 boyutlu modelleme ve animasyon Prof. Dr. Tuncay Veysel PEKER tarafından hazırlanmıştır)



Resim 4.20. Proteine (Makrofaj Migrasyon İnhibitor Faktör) bağı NAPQI'dan elde edilmiş Asetaminofen dimeri (kesikli çizgi içerisinde) görülmekte (QR kodu okutarak animasyona ulaşabilirsiniz) (3 boyutlu modelleme ve animasyon Prof. Dr. Tuncay Veysel PEKER tarafından hazırlanmıştır) [120,121]

4.4. Biyokimyasal Analiz Bulguları

Kontrol grubu, APAP grubu, APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan grup, APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan grup ve borik asit grubuna ait serum örneklerinde karaciğer fonksiyonlarını kontrol grubu ile karşılaştırılmalı olarak incelemek amacı ile biyokimyasal analizler yapıldı.

Serum örneklerinden elde edilen ALT değerleri ortalamaları kontrol grubunda $58,17 \pm 4,05$ U/L; APAP grubunda $115,1 \pm 21,20$ U/L; APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan grupta $90,2 \pm 12,11$ U/L; APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan grupta $69,89 \pm 4,67$ U/L ve borik asit grubunda $59,51 \pm 8,57$ U/L olarak belirlendi. İstatistik analizi sonucunda gruplar arası serum ALT değerleri bakımından anlamlı farklılık bulundu ($p=0,0077$). Gruplar arasında çoklu karşılaştırma yapıldığında APAP uygulanan grupta kontrol grubuna göre serum ALT düzeyinde anlamlı artış görüldü ($p < 0,05$). APAP verildikten 1 saat sonra borik asit ve APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan gruplarda APAP uygulanan gruba göre ALT değerinde düşüş izlenirken gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmadı ($p > 0,05$) (Şekil 4.9 A).

Serum örneklerinden elde edilen AST değerleri ortancaları ve çeyreklikler arası uzaklık değerleri kontrol grubunda $129,7$ (33,5) U/L; APAP grubunda $164,3$ (121,5) U/L; APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan grupta $142,2$ (249,3) U/L; APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan grupta $137,0$ (68,5) U/L ve borik asit grubunda $158,6$ (95,9) U/L olarak belirlendi. İstatistiksel analiz sonucunda gruplar arası serum AST değerleri bakımından anlamlı farklılık bulunmadı ($p= 0,842$) (Şekil 4.9 B).

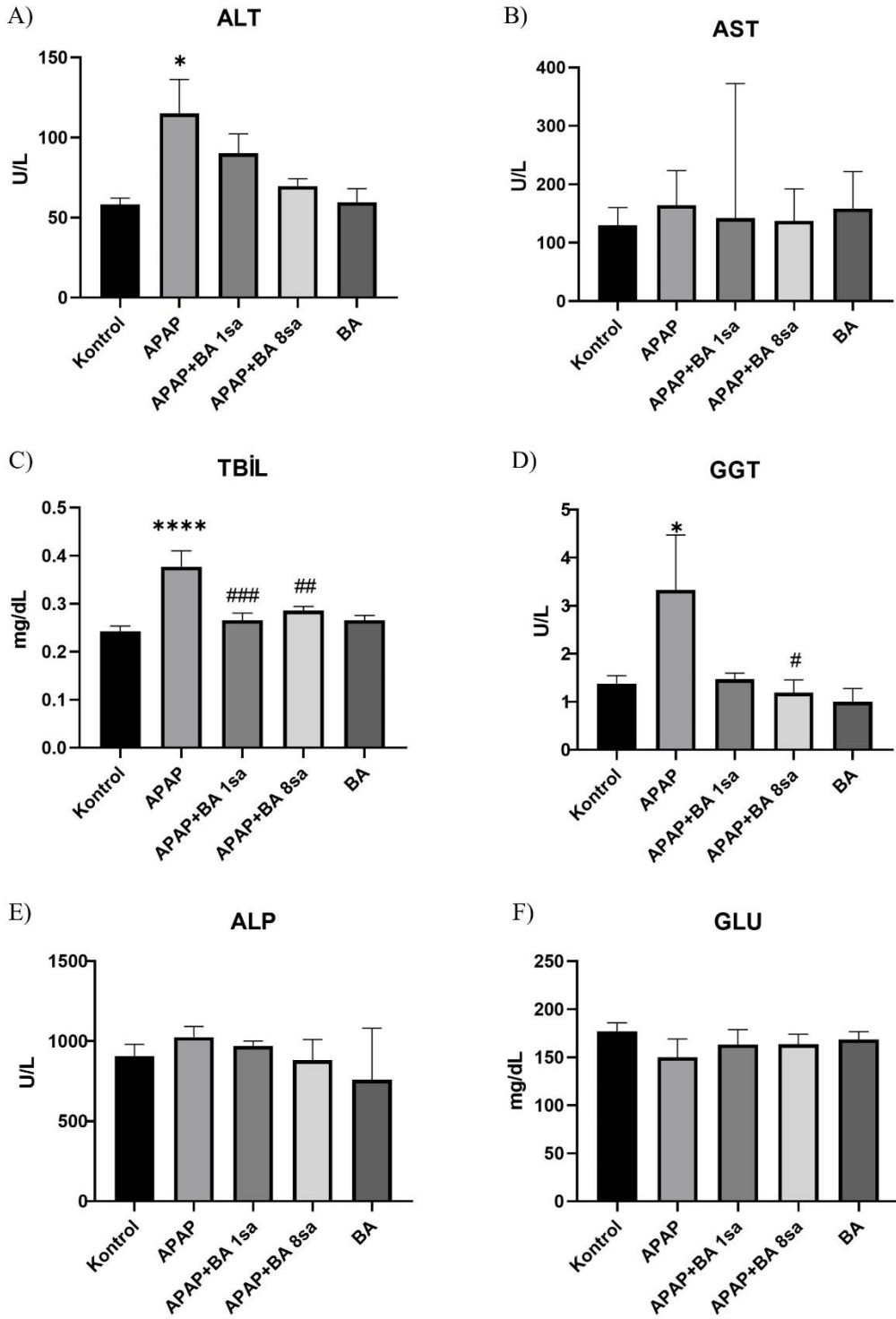
Serum örneklerinden elde edilen total bilirubin değerleri ortalamaları kontrol grubunda $0,243 \pm 0,01$ mg/dL; APAP grubunda $0,377 \pm 0,03$ mg/dL; APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan grupta $0,267 \pm 0,01$ mg/dL; APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan grupta $0,286 \pm 0,01$ mg/dL ve borik asit grubunda $0,266 \pm 0,01$ mg/dL olarak belirlendi. İstatistik analizi sonucunda total bilirubin değerleri bakımından gruplar arası anlamlı farklılık olduğu görüldü ($p < 0,0001$). Gruplar arasında çoklu karşılaştırma yapıldığında APAP uygulanan grupta kontrol grubuna göre total bilirubin düzeyinde anlamlı artış görüldü ($p < 0,0001$). APAP verildikten 1 saat sonra borik asit ve APAP verildikten 8

saat sonra borik asit uygulanan gruplarda APAP uygulanan gruba göre total bilirubin değerinde anlamlı azalma görüldü (sırası ile $p < 0,001$; $p < 0,01$) (Şekil 4.9 C).

Serum örneklerinden elde edilen GGT değerleri ortalamaları kontrol grubunda $1,379 \pm 0,17$ U/L; APAP grubunda $3,328 \pm 1,15$ U/L; APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan grupta $1,470 \pm 0,13$ U/L; APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan grupta $1,190 \pm 0,27$ U/L ve borik asit grubunda $1,00 \pm 0,74$ U/L olarak belirlendi. İstatistiksel analiz sonucunda GGT değerleri bakımından gruplar arası anlamlı farklılık olduğu görüldü ($p=0,0125$). Gruplar arasında çoklu karşılaştırma yapıldığında APAP uygulanan grupta kontrol grubuna göre serum GGT düzeyinde anlamlı artış görüldü ($p < 0,05$). APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan grupta APAP uygulanan gruba göre GGT değerinde anlamlı azalma görüldü ($p < 0,05$) (Şekil 4.9 D).

Serum örneklerinden elde edilen ALP değerlerinin ortancaları ve çeyreklikler arası uzaklıkları kontrol grubunda $904,0$ ($231,0$) U/L; APAP grubunda $1026,0$ ($199,0$) U/L; APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan grupta $969,0$ ($95,0$) U/L; APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan grupta 881 ($213,0$) U/L ve borik asit grubunda 759 ($498,0$) U/L olarak belirlendi. İstatistiksel analiz sonucunda ALP değerleri bakımından gruplar arası anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0,386$) (Şekil 4.9 E).

Serum örneklerinden elde edilen GLU değerlerinin ortalamaları kontrol grubunda $176,9 \pm 9,0$ mg/dL; APAP grubunda $150,0 \pm 19,11$ mg/dL; APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan grupta 163 ± 4 mg/dL; APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan grupta $163,6 \pm 10,41$ mg/dL ve borik asit grubunda $168,7 \pm 8,16$ mg/dL olarak belirlendi. İstatistiksel analiz sonucunda GLU değeri bakımından gruplar arası anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0,69$) (Şekil 4.9 F).



Şekil 4.9. Karaciğer fonksiyonlarının biyokimyasal değerlendirilmesi (APAP; Asetaminofen, BA; Borik Asit) Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$. APAP grubu ile karşılaştırıldığında; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$

5. TARTIŞMA

Karaciğer, birçok ilacın ve kimyasalın metabolize ve detoksifiye edildiği birincil organ olduğu için hasarlanmaya diğer organlardan daha yatkındır. İlaç kaynaklı karaciğer hasarı, oluşan hasarın süresi ve şiddetine göre akut karaciğer yetmezliğine veya kronik karaciğer hastalığına sebep olur [122]. Akut karaciğer yetmezliğinin en yaygın sebebi, onaylandığı günden beri en popüler analjezik ve antipiretik ajan olarak kullanılan asetaminofendir. Tek seferde yüksek dozda veya asetaminofen içeren diğer ilaçlarla beraber alındığı, istemsiz olarak tedavi dozunun aşıldığı durumlarda asetaminofen karaciğerde hasara sebep olur. Her yıl APAP toksisitesi sebebiyle hastaneye başvuran kişi sayısı oldukça fazla iken bu kişilerden hastaneye yatışı yapılan ve bunlardan da ölümle sonuçlanan vaka sayısı göz ardı edilemeyecek kadar yüksek bir orandadır. Bu sebeple APAP kaynaklı karaciğer hasarı günümüzde hala klinik açıdan büyük bir sorun teşkil etmektedir [65].

APAP, sitokrom P450 enzim ailesi tarafından özellikle CYP2E1, CYP1A2 ve CYP 3A4 enzimleriyle metabolize olur. APAP bu enzimler aracılığı ile NAPQI metabolitine dönüşür. Teröpatik doz aralığında bu metabolitin oluşması zararsızken yüksek doz APAP alımında NAPQI birikimi hepatositlere ve karaciğerde yer alan hücre popülasyonlarına zarar verir. Duyarlılığı yüksek kişilerde güvenli doz aralığında bile karaciğer hasarı oluşabildiği görülmüştür. Bu duruma terapötik talihsizlik denir. Sitokrom P450 enzimleri ve APAP metabolizmasında önemli bir yeri olan GSH düzeyleri bu durumu etkileyen faktörler arasındadır. Diğer ilaç kullanımları veya bitkisel preparasyonlar sitokrom P450 enzimlerinin indüklenmesine sebep olurken, hepatik GSH seviyesinin düşüklüğüne sebep olan malnütrisyon ve faz II ilaç metabolizma enzimlerinin genetik eksikliği APAP kaynaklı hepatotoksisiteye karşı duyarlılığı artırır [65,123].

Karaciğerde APAP'ın metabolize olması çok fazla araştırılmış bir konudur. Çoğunluğu sülfatlaşma ve glukuronidasyon yolu ile metabolize olan APAP'ın az bir kısmı sitokrom P450 enzimleri ile hayli reaktif bir metabolit olan NAPQI'ya yükseltgenir. Bu ara metabolit de glutatyonun sülfhidril grubu ile birleşerek APAP-GSH bileşimini oluşturur. Toksik olmayan bu bileşimin çoğu idrar ile atılırken az bir kısmı da safra içeriğine katılır [124,125]. NAPQI, serbest tiyol gruplarına saldıran bir bileşiktir. Yüksek doz APAP varlığında GSH miktarının azalması ile NAPQI, hücrel ve mitokondriyal proteinlerin tiyol gruplarına kovalent bağlarla bağlanır. Bu da mitokondriyal disfonksiyon, mitokondriyal reaktif oksijen

türlerinin üretimi ve tüm bu süreçlerin sonucu olarak nekroza sebep olur [124]. Toksisitenin geliştiği ilk evrelerde apoptozis görülse de hasarın şiddetlendiği sonraki evrelerde hepatositlerde görülen hücre ölüm şekli apoptozisten nekroza döner [126].

APAP toksisitesinin tedavisinde antidot olarak FDA tarafından onaylı NAC kullanılır [127,128]. GSH öncülü olan NAC, GSH sentezini arttırarak yüksek miktar NAPQI birikimini önler. Ayrıca antioksidan özelliği ile artan reaktif oksijen türlerinin etkilerini azaltırken mitokondriyodaki Krebs döngüsüne de etki ederek hepatik ATP miktarını arttırır. Böylece birçok farklı yolak üzerinden APAP toksisitesinin sebep olduğu hasarı tedavi eder [129-131]. NAC, fizyolojik pH ortamında negatif yüklü şekilde bulunduğu için hücre membranından geçmesi de sınırlıdır. Bu da yeterli etkinliğe ulaşması için ihtiyaç duyulan dozun arttırılmasını gerektirirken tedavi süresini de uzatır [130]. Ortaya çıkabilecek yan etkiler de göz önüne alındığında N-asetilsistein'e alternatif olabilecek biyoyararlanımı daha yüksek olan maddeler aranmaktadır.

Ülkemiz dünyada en yüksek bor rezervleri bulunan coğrafi bölgelerden biridir. Borun seramik, antiseptikler, pestisitler ve farmasötik ürünleri de kapsayan birçok farklı kullanım alanı mevcuttur [20,21]. Son zamanlarda farklı deney modellerinde borik asitin antioksidan ve anti-inflamatuar etkileri araştırılmakta, kullanımı ve etkinliği ile ilgili çalışmalar dikkati çekmektedir. Çalışma modelleri genel olarak karaciğer ve böbrek hasarı üzerine yoğunlaşmış görünse de Alzheimer modeli [132], kırık modeli [133], kanser modeli [134] ve yara iyileşmesi [135] gibi farklı alanlarda borik asit uygulamalarının etkileri araştırılmaktadır. Bu çalışmada da, APAP kaynaklı karaciğer hasarında borik asitin etkileri araştırılmıştır.

CCl₄ kaynaklı karaciğer hasarında borik asitin etkisini inceleyen bir çalışmada farklı dozlarda (50 mg/kg, 100 mg/kg ve 200 mg/kg) borik asit uygulamaları yapılmıştır. CCl₄ ve borik asit uygulanan grupta sadece CCl₄ uygulanan gruba göre ALT, AST ve MDA seviyesinde azalma ve GSH seviyesinde artış olduğu gösterilmiştir. Elde edilen sonuçların incelenmesinde en etkin düzelmenin 200 mg/kg borik asit uygulanan grupta olduğu görülmüştür [136]. Bu çalışmada da, borik asit dozu 200 mg/kg olacak şekilde uygulanmıştır.

Biyoyararlanımı %10'dan daha düşük olan NAC, yüksek doz APAP uygulamasından sonra ilk 10 saat içerisindeki uygulamalarda toksisitenin oluşturacağı hasarı azaltır ancak geç uygulamalarda etkinliği düşüktür [137]. NAC tedavisinde APAP alımından sonraki ilk 8 saatte NAC uygulandığında hepatik hasarın en aza indirildiği, ilk 8 saatten sonra yapılan NAC uygulamalarında ise hepatotoksisite riskinin arttığı belirtilmiştir [30]. Bu çalışmada da APAP verildikten sonra bir gruba 1 saat sonra, diğer gruba ise 8 saat sonra borik asit uygulaması yapılarak karaciğer hasarında farklı zamanlarda borik asitin uygulanabilirliğinin araştırılması hedeflenmiştir.

APAP kaynaklı karaciğer hasarını incelemek amacı ile yüksek doz APAP verildikten 24 saat sonra kurban edilen Sprague Dawley cinsi sıçanlar ile yapılan çalışmalarda herhangi bir mortalite bildirilmemiştir [112,117]. Ancak bu çalışmada APAP grubunda bir hayvanda mortalite görülmüştür.

Yüksek doz APAP kaynaklı karaciğer hasarı ile ilgili yapılan bir çalışmada organ makroskopik olarak incelendiğinde sağlıklı karaciğerde homojen ve kırmızımsı bir renk görülürken APAP verilen grupta yer yer koyu kahverengi alanların olduğu gösterilmiştir [138]. Bu çalışmada da makroskopik incelemelerde kontrol grubunda kahverengi-kırmızı ve homojen bir görünüm varken APAP verilen grupta karaciğer loblarında koyu kahverengi renk değişikliği olan alanlar dikkati çekti. APAP verildikten 1 saat ve 8 saat sonra borik asit verilen gruplarda ise APAP verilen gruba göre daha az renk değişimi olduğu görüldü.

Chen ve arkadaşları (2009) APAP kaynaklı karaciğer hasarı modeli oluşturdukları bir çalışmada 8 ve 24 saat APAP verilen gruplar ile kontrol grubunu karşılaştırdıklarında vücut ağırlığında bir farklılık olmadığını bildirmişlerdir [139]. Bu çalışmada da vücut ağırlığında gruplar arası fark görülmemiştir.

Park ve arkadaşları (2021) 24 saat APAP uygulayarak yaptıkları bir çalışmada, kontrol grubuna göre APAP verilen grubun vücut ağırlığının değişmediğini ancak karaciğer ağırlığında azalma olduğunu göstermişlerdir [140]. Yapılan çalışmalarda, karaciğer ağırlığının ilk 6 saatte artabileceği, 24. saate gelindiğinde ise ağırlıklarda düşüş olabileceği belirtilmiştir. Buna sebep olarak, konjesyonun nekrozdan daha erken bir evrede görülmesi sonucu eritrositlerin birikimi ile birlikte karaciğer ağırlığında ilk aşamada bir artış olduğu

ancak ilerleyen süreçte hepatositlerdeki nekroz ve lizisin yanı sıra seruma yüksek oranda ALT ve AST kaçıışı sebebi ile organ ağırlığında düşüş görülebileceği belirtilmiştir [123].

Bu çalışmada, gruplar hayvan ağırlıkları ve karaciğer ağırlığı/vücut ağırlığı oranı açısından değerlendirildiğinde gruplar arası bir fark görülmedi. Karaciğer ağırlığı/vücut ağırlığı oranında bir düşüş görülmemesine sebep olarak seruma yüksek oranda ALT ve AST kaçıışı olmaması düşünüldü.

Çalışmalar akut hepatosellüler hasarın karaciğerde nekroz ile sonuçlandığını göstermektedir. Hasarın şiddetine göre tek bir hepatositte (noktasal nekroz) veya bir grup hepatositte (yaygın nekroz) nekroz görülebilir. Asetaminofen kaynaklı karaciğer hasarında görülen en karakteristik histopatoloji ise zonal nekrozdur [141]. Yüksek doz APAP uygulaması sonrası karaciğerde görülen ilk morfolojik değişikliklerden biri; v. centralis çevresinde (3. zonda) sentrilobüler bölgedeki hepatositlerde vakuolizasyon, glikojen kaybı, eozinofilik dejenerasyon ile birlikte piknotik nukleus varlığının gözlemlendiği nekrozdur [142,143]. Bu çalışmada da APAP verilen gruba ait karaciğer dokuları incelendiğinde sentrilobüler alandaki hepatositlerde nekroz, vakuoler oluşumlar, piknotik çekirdekli, koyu eozinofilik boyanan ve poligonal şekillerini kaybetmiş dejeneratif hepatositlerin varlığı görülmüştür. APAP verildikten 1 saat ve 8 saat sonra borik asit uygulanan grupların her ikisinde de kontrol grubuna göre fazla, APAP verilen gruba göre ise daha sınırlı bir alanda sentrilobüler nekroz, daha az vakuoler oluşumlar ve piknotik çekirdekli eozinofilik boyanan dejeneratif hepatositler görülmüştür. Borik asit uygulanan gruplardan APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan grupta nekrozun ve dejeneratif hepatosit varlığının daha az olduğu görüldü. Bu histopatolojik görünümler bakımından farklı zamanlarda borik asit uygulanan gruplar arasında ise anlamlı farklılık olmadığı görüldü.

Blazka ve arkadaşları (1996) APAP kaynaklı karaciğer hasarında TNF- α ve IL1 β etkisini araştırmıştır. Bu amaçla APAP verilen gruplara anti-TNF- α ve anti-IL1 β uygulamışlardır. APAP verilen gruplarda kontrol grubuna göre sentrilobüler nekroz, konjesyon ve hemoraji varlığı görülmüştür. Anti-TNF- α ve anti-IL1 β verilen gruplarda ise APAP verilen gruba göre sentrilobüler nekroz, konjesyon ve hemoraji azalmıştır. Bu çalışmada inflamasyonun APAP kaynaklı karaciğer hasarını etkilediği gösterilmiştir [142]. Bu çalışmada da inflamatuvar hücre infiltrasyonu incelendiğinde diğer gruplara göre APAP verilen grupta daha yüksek oranda infiltrasyon olduğu görüldü. APAP verildikten 1 saat ve 8 saat sonra borik asit

uygulanan grupların her ikisinde de APAP verilen gruba göre infiltrasyonda azalma olduğu görülürken, bu iki grup birbiri ile karşılaştırıldığında ise APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan grupta inflamatuvar hücre infiltrasyonundaki azalmanın daha fazla olduğu dikkati çekti.

Asetaminofen kaynaklı karaciğer hasarında nekroz ilk sentrilobüler alanda ortaya çıkar. Bu alandaki hücrelerde eozinofilik dejenerasyonla birlikte vakuolizasyon ve piknotik çekirdek görülür. Yüksek doz APAP'a etkin kalma durumunda konjesyon ve polimorfonükleer lökosit infiltrasyonu da görülür [123,142-144]. Yapılan çalışmalar APAP toksisitesinin hem hepatosit hem de karaciğer sinüzoid endotel hücreleri üzerinde hasara sebep olduğunu belirtmektedir [145]. Toksikite sebebiyle hepatik dolaşımın bozulması ve konjesyonun temel sebebi sinüzoid endotel hücrelerinde porların oluşması ve Disse aralığında eritrosit birikiminin olması şeklinde bildirilmiştir [144]. Sinüzoid endotel hücrelerinin hepatosit proliferasyonunu desteklemenin yanı sıra fonksiyonel vasküler yapıyı yeniden düzenleyerek karaciğer rejenerasyonunda rol aldığı farklı karaciğer hasar modellerinde gösterilmiştir [146-148]. APAP kaynaklı karaciğer hasarının iyileşme süreci; hepatik vaskülarizasyonun yeniden yapılandırılması, hepatosit proliferasyonu, nekrotik dokunun uzaklaştırılması ve yenilenmesi şeklinde gerçekleşmektedir [83].

Gül ve arkadaşları (2012) 24 saat APAP verilerek oluşturulan karaciğer hasarında APAP verildikten 1 saat sonra yapılan ozon uygulamasının etkilerini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda APAP verilen grupta belirgin olarak nekroz, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, sinüzoidal dilatasyon ve hemoraji varlığı gösterilmiş, ozon verilen grupta ise bu patolojilerin azaldığı belirtilmiştir [149].

Bu çalışmada da, APAP verilen grupta sentrilobüler nekroz, sinüzoidlerde dilatasyon, konjesyon, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, hemoraji nedeniyle karaciğer parankim yapısının ileri derecede bozulduğu dikkati çekti. APAP verildikten 1 saat ve 8 saat sonra borik asit uygulanan gruplarda bu patolojilerin APAP uygulanan gruba göre azaldığı, karaciğer parankim yapısının daha iyi korunduğu ancak yer yer inflamasyonun, konjesyonun, piknotik çekirdekli daha eozinofilik boyanan hepatositlerin varlığının devam ettiği görüldü.

Lim ve arkadaşları (1995) karaciğerdeki APAP kaynaklı damar hasarını incelemek amacı ile farklı sürelerde APAP uygulanan gruplarda akrilik resin ile mikrovasküler kast tekniği uygulanarak elde ettikleri damar modelini taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlarda periportal alandaki damarlarda kontrol grubu ile benzer yapı görülürken 36 saat APAP verilen grupta sentrilobüler alanda boşluklar izlenmiştir. Bu boşlukların HE ile izlenen sentrilobüler nekroz ile uyumlu olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca sentrilobüler alandaki boşlukların 8 saat APAP uygulanan grupta görülmeye başlaması damar hasarlanmasının erken dönemde gerçekleştiğini göstermiştir. APAP uygulanan sürenin artması ile sentrilobüler alanda boşlukların artmasının sebebi olarak, döküm malzemesinin sinüzoidlerde hapsolup katılaşmaması sonucu olduğu ve bunun o alanda meydana gelen sinüzoidal dilatasyon, konjesyon ve mikrosirküler hasardan kaynaklı olabileceği belirtilmiştir [150].

Bu çalışmada da APAP grubunda sentrilobüler alanda kontrol grubuna göre artan, borik asit verilen gruplarda ise APAP grubuna göre azalan konjesyon, dilatasyon ve hemoraji varlığı görülmüştür.

APAP kaynaklı akut karaciğer hasarı üzerine alfa lipoik asitin etkilerinin incelendiği bir çalışmada APAP verilen grupta sentrilobüler nekroz, vakuoler dejenerasyon ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu varlığı ifade edilmiştir. Ayrıca APAP grubunda, PAS boyaması ile azalan glikojen içeriği ve civa bromofenol mavisi boyaması ile de azalan protein içeriği gösterilmiştir. APAP verilmeden 1 saat önce alfa lipoik asit uygulanan gruplarda nekroz ve inflamasyon varlığı APAP grubuna göre azalırken bu grupta hepatositlerde vakuoler oluşumların, azalmış glikojen ve protein içeriğinin görülmeye devam ettiği bildirilmiştir [151].

Bu çalışmada da benzer şekilde HE boyaması sonucunda en yüksek seviyede nekrozun, vakuoler oluşumların ve inflamatuvar hücre infiltrasyonunun ve ayrıca PAS boyaması sonucunda da en az glikojen içeriğinin APAP verilen grupta olduğu gözlemlendi. Borik asit verilen gruplarda bu patolojilerde azalma görülürken glikojen içeriğinde de artış olduğu belirlendi.

Hinson ve arkadaşları (1983) yüksek doz APAP uygulamasının karaciğerde glikojen içeriği üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Bu amaçla farklı sürelerde APAP'a etkin bırakılan

gruplarda zaman geçtikçe glikojen içerik kaybının arttığını göstermişlerdir. Yapılan PAS boyaması sonucunda sentrilobüler alandaki hepatositlerde belirgin bir glikojen kaybı görülürken periportal alanlarda PAS pozitif hücrelerin bulunduğunu belirtmişlerdir. Glikojen kaybının APAP toksisitesinin ortaya çıkmasında önemli olan GSH ile ilişkisini incelediklerinde glikojene göre kaybının daha erken evrede başladığını göstermişlerdir. Ayrıca APAP ile NAC uygulanan grupta kontrol grubu ile benzer glikojen miktarı olduğu ve NAC uygulamasının glikojen kaybını engellediğini belirtmişlerdir [152].

Bu çalışmada da, PAS ile boyanmış preparatlar değerlendirildiğinde sonuçların literatür ile uyumlu olarak, APAP uygulanan grupta kontrol grubuna göre glikojen içeriğinin sentrilobüler alanda azaldığı ve APAP verildikten 1 ve 8 saat sonra borik asit uygulanan grupların her ikisinde de APAP verilen gruba göre glikojen kaybının sentrilobüler alanda sınırlı bir bölgede kalacak şekilde azaldığı görüldü.

Ayrıca Hinson ve arkadaşları (1983) yaptıkları çalışmada kontrol grubundaki bazı hayvanlarda da glikojen kaybı görüldüğü ancak bu kaybın olduğu hepatositlerin APAP grubundaki gibi sentrilobüler alanda sınırlı olarak değil, dokuda genel bir yayılım göstererek diffüz bir azalma şeklinde izlendiğini belirtmişlerdir [152]. Bu çalışmada da borik asit uygulanan grupta PAS (+) hücrelerde bir azalma olduğu ancak bunun APAP grubu gibi belirli bir alanda olmayıp diffüz bir yayılım gösterdiği görüldü.

Özetle, bu çalışmada da daha önceki çalışmalarla uyumlu olarak yüksek doz APAP verilen gruba ait karaciğer dokuları incelendiğinde, sentrilobüler alandaki hepatositlerde nekroz, vakuoler oluşumlar, piknotik çekirdekli koyu eozinofilik boyanan ve poligonal şekillerini kaybetmiş dejeneratif hepatositler, vasküler konjesyon ve endotel tabakası bütünlüğünde bozulma, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, hemoraji ve sinüzoidal dilatasyon varlığı görüldü. Bu patolojiler göz önüne alınarak yapılan histopatolojik skorlamaların toplamı hepatik hasar olarak değerlendirildi. APAP verildikten sonra farklı saatlerde borik asit uygulanan grupların her ikisinde de hepatik hasarın azaldığı ancak bazı alanlarda inflamasyonun, konjesyonun ve daha eozinofilik boyanan dejeneratif hepatosit varlığının devam ettiği görüldü. APAP verildikten 1 saat sonra borik asit verilen ve APAP verildikten 8 saat sonra borik asit verilen gruplar karşılaştırıldığında, benzer hepatik hasar skoruna sahip oldukları ancak farklı patolojilerin görülme şiddetinde farklılıklar olduğu dikkati çekti. Sentrilobüler alandaki hepatositlerde en yaygın nekroz APAP verilen grupta görüldü. APAP verildikten 1 saat ve

8 saat sonra borik asit uygulanan grupların her ikisinde de hepatosit nekrozunda, APAP verilen grup ile karşılaştırıldıklarında azalma olduğu görülürken bu gruplardan APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan grupta sentrilobüler nekrozdaki azalmanın daha fazla olduğu görüldü. Histopatolojik değerlendirmeler analiz edildiğinde APAP verildikten 1 saat sonra ve 8 saat sonra borik asit uygulanan iki grup arasında anlamlı bir farklılık görülmedi. Ayrıca bu çalışmada, PAS ile boyanmış preparatlar değerlendirildiğinde, sonuçların literatür ile uyumlu olarak, APAP uygulanan grupta kontrol grubuna göre glikojen içeriğinin sentrilobüler alanda azaldığı ve APAP verildikten 1 ve 8 saat sonra borik asit uygulanan grupların her ikisinde de APAP verilen gruba göre glikojen kaybının sentrilobüler alanda sınırlı bir bölgede kalacak şekilde azaldığı görüldü. PAS boyanma sonuçları HE boyanma sonuçları ile karşılaştırıldığında hepatositlerde görülen sentrilobüler nekrozun ve glikojen kaybının birbirleri ile uyumlu alanlarda olduğu dikkati çekti. Periferdeki PAS pozitif boyanan hepatositlerin borik asit uygulaması sonucu artan sağlıklı hepatositlere karşılık geldiği düşünüldü. Borik asit uygulanan grupta ise diffüz bir alanda hem PAS (+) hem de PAS (-) hepatositlerin varlığı görülürken kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu bakımdan anlamlı bir farklılık olmadığı görüldü.

Karaciğer hücreleri arasından toksik maddeye ilk etkin kalan hücreler sinüzoid endotel hücreleridir [82]. Yüksek doz APAP varlığında sinüzoid endotel hücrelerinde porlar oluşur, bu sebeple Disse aralığına eritrosit birikimi başlar ve sinüzoid lümeni kollabe olur. Bu sürecin sonucunda vaskülarizasyon bozulur, hepatik dolaşım hasarlanır ve dokuda hipoksi ortaya çıkar [144].

Wang ve arkadaşlarının (2020) yaptığı bir çalışmada, farelere verilen yüksek doz APAP sonrasında bir grup fare 2. saatte sakrifiye edilirken diğer grubun sakrifikasyonu 12. saatte yapılmıştır. HE boyama sonuçlarına göre, ilk sinüzoidal konjesyon varlığı APAP uygulamasından 2 saat sonra hepatosit hasarı belirginleşmeden görülmüştür. Elektron mikroskobu sonuçlarında ise 2. saat grubunda endotel hücrelerinde şişme görülürken 12. saat grubunda bu hücrelerdeki hasarın belirgin bir şekilde şiddetlendiği gösterilmiştir. APAP uygulaması sonrası oluşan hasarın moleküler mekanizmasını anlamak amacı ile *in vivo* ve *in vitro* örneklerde yapılan kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) analizlerinde hücrelerarası adezyon molekülü (ICAM1) ve VEGF-A ifadelerinin arttığı ve böylece APAP'ın lökosit birikimi ve endotel hücre hasarına sebep olduğu sonucuna varılmıştır. Aynı çalışmada dokudaki oksijen seviyesine bakıldığında kontrol grubuna göre APAP uygulanan

gruplarda düşüş olduğu ve bu düşüşün 12. saat grubunda daha fazla olduğu belirtilmiştir. Ayrıca mikrovasküler perfüzyonun bozulduğu ve karaciğerdeki kan akış hızının APAP verilmesinden sonra azaldığı gösterilmiştir. Sonuç olarak, APAP hepatotoksitesinde karaciğer sinüzoid endotel hücrelerinde ve mikrosirkülasyonda hasarın erken evrede ortaya çıktığı belirtilmiştir [153]. Bu çalışmada da, en yüksek oranda vasküler konjesyon, sinüzoidal dilatasyon ve hemoraji APAP verilen grupta görüldü. APAP verildikten 1 saat ve 8 saat sonra borik asit uygulanan gruplarda vasküler konjesyon ve hemorajinin azaldığı ancak sinüzoidal dilatasyonun devam ettiği görüldü.

Rejenerasyon süreci parankimal ve parankimal olmayan hücrelerin beraber rol aldığı bir süreçtir. Bu süreçte karaciğer sinüzoid endotel hücreleri hem neovaskülarizasyonu hem de HGF salgılayarak rejenerasyonu destekler. VEGF, hepatosit ve sinüzoid endotel hücre proliferasyonunu destekleyen bir düzenleyici protein ve büyüme faktörüdür. Bu bağlamda hepatositler VEGF salgılayarak sinüzoid endotel hücrelerinin proliferasyonunu artırır ve yeni damar oluşumu ile vasküler hasarın azalmasını sağlar. Ayrıca VEGF sinüzoid endotel hücrelerinden HGF salınımını indükler. Bunun sonucunda endotel hücreleri hepatosit proliferasyonunu destekleyerek rejenerasyona katılır [72,82]. Yeni damar oluşumu hasarlı karaciğerdeki vasküler perfüzyonu iyileştirerek v. porta ile gelen besinden zengin kanın daha iyi dağılması ve metabolik artıkların daha hızlı uzaklaştırılmasını sağlayarak rejenerasyona ve böylece karaciğer fonksiyonlarının iyileşmesine katkıda bulunur [146].

Deneysel olarak oluşturulan farklı hepatik hasar modellerinde VEGF-A ifadesinin arttığı gösterilmiştir [154-156]. Donahower ve arkadaşları, anjiyogenez sürecinde önemli rol oynayan VEGF-A'nın yüksek doz APAP kaynaklı karaciğer hasarındaki rejenerasyona etkisini araştırmışlardır. Çalışmada APAP uygulandıktan sonra farklı sürelerde sakrifiye edilen gruplar ile hasar oluşum ve rejenerasyon süreçlerinde VEGF-A ifadesindeki değişiklikleri incelediklerinde, VEGF-A ifadesinin ilk anlamlı yükselme gösterdiği grubun APAP uygulandıktan 8 saat sonra sakrifiye olan grup, en yüksek VEGF-A ifadesinin görüldüğü grubun ise APAP uygulandıktan 24 saat sonra sakrifiye edilen grup olduğunu belirlemişlerdir. VEGF-A reseptör (1, 2 ve 3) ifadelerinde de APAP uygulandıktan sonra farklı sürelerde artış olduğu gösterilmiştir [96]. Bu çalışmada da, APAP kaynaklı karaciğer hasarında borik asitin vaskülarizasyon ve rejenerasyon üzerindeki etkisini incelemek amacı ile VEGF-A ifadesi immünohistokimyasal boyama yöntemiyle incelendi. VEGF-A ifadesinin, kontrol grubuna göre APAP uygulanan grupta literatür ile uyumlu olarak arttığı

görüldü. Gruplar arasında en yüksek VEGF-A ifadesinin ise APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan grupta olduğu görüldü. APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan grupta ise VEGF-A ifadesinin kontrol grubuna göre arttığı ancak bu artışın 1 saat sonra borik asit verilen gruptaki kadar yüksek olmadığı belirlendi. APAP verilen grupların tümünde kontrol grubuna göre VEGF-A ifadesinde artış bulunurken bu gruplar birbiri ile karşılaştırıldığında ise gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmedi.

Donahower ve arkadaşlarının (2006) çalışmasının devamında VEGF reseptör inhibitörü uygulanan grupta APAP uygulanan gruba göre PCNA, CD31 ve eNOS ifadelerinde azalma olduğu belirlenmiş ve VEGF sinyal yolağının rejenerasyon sürecinde yer aldığı ve baskılanmasının bu süreci geciktirebileceği ifade edilmiştir [96]. Donahower ve arkadaşlarının (2010) yaptığı başka bir çalışmada ise farelere APAP ve insan rekombinant VEGF (hrVEGF) uygulaması yapıldığında, APAP verilen gruba göre ALT seviyesi ve nekrozda azalma görülürken PCNA (+) hücre yüzdesinde artış olduğu gösterilmiştir [157]. Her iki çalışma da VEGF sinyal yolağının karaciğer rejenerasyonunu destekleyici etkisi olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada da APAP verildikten sonra borik asit uygulanan gruplarda ve APAP uygulanan grupta kontrol grubuna göre VEGF-A ifadesinde artış görüldü. APAP grubuna göre APAP verildikten 1 saat sonra borik asit uygulanan grupta VEGF-A ifadesinde hafif bir artış olduğu ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. Borik asit uygulanan grupta ise kontrol grubuna göre VEGF-A ifadesinde artış görülürken istatistiksel anlamlılık bulunmadı. Bu sonuçlara göre APAP verildikten sonra borik asit uygulamasının rejenerasyona katkı sağlamış olabileceği düşünüldü.

Papastefanou ve arkadaşları (2007) farklı sürelerde APAP uygulanan sıçanlardaki VEGF ifadesinin hasarlanma ve rejenerasyon sürecindeki değişimlerini incelemişlerdir. Bu amaçla APAP uygulamasından sonra 12 -288 saat aralıkların belirli sürelerde gruplar sakrifiye edilerek incelenmiştir. Tek doz olacak şekilde 3,5 g/kg APAP uygulanan gruplarda VEGF immünoreaktivitesi en yüksek grupların 24 saat, 72 saat ve 240 saat APAP uygulanan gruplar olduğu gösterilmiştir. İmmünoreaktivite değerlendirmeleri yapılırken sentrilobüler alandaki nekroz varlığından ötürü ayrı ayrı perisantral ve periportal alanlar değerlendirilmiştir. Kontrol grubunda bu alanlara bakıldığında perisantral alanda daha yüksek VEGF immünoreaktivitesi olduğu görülürken 24 ve 36 saat APAP uygulanan gruplarda periportal alandaki immünoreaktivite daha fazla bulunmuştur. Ancak 12, 48 ve 72 saat APAP uygulanan gruplarda perisantral alandaki VEGF immünoreaktivitesinin daha

fazla olduğu belirtilmiştir [117]. Bu çalışmada da periportal ve sentrilobüler alanlardaki VEGF-A immünoreaktivitesi ayrı ayrı değerlendirildiğinde tüm gruplarda sentrilobüler alandaki immünoreaktivitenin daha fazla olduğu görüldü. Bunun sebebinin ise rejenerasyon sürecinde VEGF-A ifadesinde genel olarak kontrol grubuna göre bir artış olmasına rağmen sentrilobüler ve periportal alanlardaki değişimin zamanla farklılık gösterebileceği düşünüldü.

Karaciğer rejenerasyon kapasitesi yüksek bir organdır. Bu özelliğinden ötürü hasarlanma sonrası gerek yapısal gerekse işlevsel iyileşme görülür. Bu iyileşme süreci rejenerasyonun yoğun olarak gerçekleştiği yolaklara bağlı olarak hepatositler veya karaciğerde bulunan progenitör hücreler ile gerçekleşir [12,76]. Hasarın şiddetine ve şekline göre rejenerasyon sağlıklı hepatositlerin proliferasyonu ve progenitör hücrelerden farklılaşma şeklinde gerçekleşebilir. Örneğin, parsiyel hepatektomi modelinde rejenerasyon genellikle hepatosit proliferasyonu üzerinden gerçekleşir. Bunun sebebi ise rejenerasyon sürecine progenitör hücre farklanmasının katılması için çok sayıda hepatositin hasarlanması ve proliferasyon ile iyileşmenin sağlanacağı sağlıklı hepatosit sayısının yetersiz kalması olarak düşünülebilir [158]. Rejenerasyonun gerçekleşmesi oluşan hasarın şiddetine bağlı olduğu için bazı çalışmalar bu sürece progenitör hücre katılımının çok az olduğunu veya hiç olmadığını belirtirken bazı çalışmalar ise önemli katkıları olduğunu gösterebilmektedir [159]. Karaciğerde progenitör hücreler genellikle periportal alanda bulunarak rejenerasyona katkı sağlar. ALB, AFP, sitokeratin 8 ve 18 ifadeleri bu hücreler için belirteç olarak kabul edilir [160,161]. Bu çalışmada da AFP, APAP kaynaklı karaciğer hasarında borik asitin rejenerasyon üzerine etkisini değerlendirmek için kullanılan belirteçlerden biridir. AFP varlığı serum örneklerinde de değerlendirilen bir belirteçtir. Kakisaka ve arkadaşlarının (2015) yaptığı sağlıklı donörlerin ve akut karaciğer hasarı görülen kişilerin yer aldığı bir çalışmada, serum AFP seviyesi ile karaciğerdeki progenitör hücre miktarı (sitokeratin-7 (+)) arasında pozitif korelasyon olduğu bildirilmiş ve serum AFP'nin progenitör hücre artışının bir belirteci olabileceği düşünülmüştür [162] Kayano ve arkadaşlarının (1992) yaptığı çalışmada ise karaciğer yetmezliği olan hastalardan alınan örneklerde hayatta kalanlar ile ölümü gerçekleştirenler karşılaştırıldığında plazma AFP değerleri ile PCNA pozitifliği arasında pozitif korelasyon olduğu bildirilmiştir [163]

Karaciğer progenitör hücreleri, Hering kanalında bulunan ve hem hepatositlere hem de kolanjiyositlere farklılaşabilme yeteneğine sahip hücrelerdir. Ayrıca, bu hücrelerin AFP

ifade ettiği bilinmektedir [164,165]. Kuhlmann ve arkadaşları (1979) yaptıkları bir çalışmada sağlıklı farelerin karaciğerlerindeki erişkin hepatositlerde de AFP ifadesinin varlığını ve bu ifadenin sitoplazmik olduğunu immünohistokimyasal boyama yöntemi ile göstermişlerdir [166]. Yapılan bir çalışmada farelerde CCl₄ uygulamasının 2. gününde AFP (+) hücreler portal ve periportal alanlarda görülmüştür. En güçlü immün reaktivitenin 3. ve 4. gün nekrotik bölgeye komşu, hasar görmemiş hepatositlerde olduğu belirtilmiştir [161]. Bu çalışmada da APAP kaynaklı karaciğer hasarında borik asitin rejenerasyon üzerindeki etkisini incelemek amacı ile AFP ifadesi immünohistokimyasal olarak değerlendirildi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en yüksek immünoreaktivitenin APAP verildikten 8 saat sonra borik asit uygulanan grupta olduğu görüldü ancak istatistiksel bir anlamlılık bulunmadı. APAP verildikten sonra borik asit uygulanan gruplarda diğer gruplara göre artış görülmesinin ancak anlamlı farklılık bulunmamasının sebebi olarak APAP verilmesi üzerinden 24 saat geçtiği için henüz progenitör hücre farklanması olmadığı ve AFP artışının görülmesi için bu sürenin yetersiz gelmiş olabileceği düşünöldü. Kuhlmann ve arkadaşlarının (2006) yaptığı çalışmada da AFP immünoreaktivitesinin hasarlanmadan sonraki 2. günde başlayarak 3 ve 4. günlerde en yüksek immünoreaktiviteye ulaştığı gösterilmiştir [161].

Farklı karaciğer hasarlanmalarında rejenerasyonu değerlendirmek için yapılan çalışmalarda bir proliferasyon belirteci olan PCNA kullanılmıştır [118,167,168]. PCNA, APAP kaynaklı karaciğer hasarı ile ilgili çalışmalarda da en yaygın kullanılan proliferasyon belirteçlerinden biridir [169-172]. Bhushan ve arkadaşları (2014) APAP kaynaklı karaciğer hasarı ile ilgili rejenerasyon konusunda yapılacak araştırmalar için uygun bir model oluşturmak amacı ile farklı APAP dozları ve süreleri uygulanan deney gruplarını karşılaştırmışlardır. Yüksek ve düşük dozda APAP uyguladıkları gruplarda 24. saatte, APAP kaynaklı hasarın en önemli göstergesi olan sentriloböler nekroz açısından bir farklılık olmadığını belirlemişlerdir. Ancak, 48, 72 ve 96. saate kadar devam eden süreler incelendiğinde, düşük doz gruplarında sentriloböler nekrozun 48. saatte azalmaya başladığı, 72 ve 96. saatlerde nekrozun neredeyse tamamen iyileştiği ve ALT değerlerinin normal seviyeye döndüğü görülmüştür. Yüksek doz gruplarında hasar 96. saate kadar devam etmiş ve iyileşme görülmemiştir. PCNA (+) hücreler sayıldığında düşük doz grubunda en yüksek pozitif hücre sayısı 12. saatte ve sonrasında görülürken, yüksek doz gruplarında PCNA (+) hücrelerin ancak 24. saatten sonra artmaya başladığı belirtilmiştir. Ayrıca hücre siklusunu (siklin D1, p21 ve p27) ve proliferasyonda yer alan sinyal yollarını (ERK, JNK, p38) incelediklerinde düşük doz

APAP uygulanan gruplarda yüksek doz uygulanan gruplara göre hücre bölünmesinin daha erken zamanda ve daha fazla oranda olduğunu göstermişlerdir. Tüm bunların sonucunda yüksek doz APAP uygulamasının rejenerasyonu olumsuz etkileyerek erteleyebileceğini belirtmişlerdir [97]

Yapılan bir çalışmada, antioksidan etkisi olduğu bilinen resveratrolün APAP kaynaklı karaciğer hasarı üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada resveratrolün CYP450 enzim aktivitelerini baskıladığı ve aynı zamanda hücre bölünmesi ile ilişkili proteinlerden SİRT, siklin D1, CDK4 ve PCNA ifadelerini arttırarak rejenerasyonu sağladığını göstermişlerdir [15]. Bu çalışmada da APAP kaynaklı karaciğer hasarında borik asitin rejenerasyon üzerindeki etkisini hepatosit proliferasyonu ile değerlendirmek amacı ile PCNA ifadesi immünohistokimyasal boyama yöntemi ile değerlendirildi. Elde edilen görüntülerde belirgin kahverengi tutulumu ile ayırt edilen hücre çekirdekleri pozitif olarak sayıldı ve toplam hücre sayısı ile yüzde hesaplaması yapıldı. Gruplardaki PCNA (+) hücre çekirdekleri değerlendirildiğinde, tek başına borik asit uygulanan grubun dışında tüm gruplarda kontrol grubuna göre PCNA (+) hücre sayısında artış olduğu görüldü. Ayrıca APAP sonrası borik asit verilen gruplar APAP grubu ile karşılaştırıldığında PCNA (+) hücre çekirdeklerinin bu gruplarda daha fazla sayıda olduğu dikkati çekti. Elde edilen bu sonuçlarla borik asitin APAP kaynaklı karaciğer hasarında hücre proliferasyonunu arttırarak rejenerasyona katkı sağlamış olabileceği düşünüldü.

Asetaminofen kaynaklı karaciğer hasarının araştırıldığı çalışmalarda morfometrik değerlendirmelerin yanı sıra karaciğer fonksiyonlarını gösteren serumdaki ALT, AST, ALP, GGT ve total bilirubin analizleri de incelenmektedir. ALT ve AST hepatosit sitoplazmasında ve mitokondisinde bulunur. Yüksek doz APAP kaynaklı karaciğer hasarı sebebi ile serumda ALT ve AST seviyeleri yükselir [123,173]. ALT, AST'ye göre karaciğere daha spesifik bir belirteçtir. AST ise böbrekte, iskelet kasında, karaciğerde ve yüksek miktarda kalpte bulunur [174,175].

Yüksek antioksidan kapasitesi, anti-inflamatuar ve antikarsinojenik özellikleri olan kurkuminin APAP kaynaklı karaciğer hasarı üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, farklı zamanlarda ve miktarlarda uygulanan kurkumin ve NAC'ın, APAP uygulanan gruba göre AST, ALT, katalaz ve MDA seviyelerini düşürürken glutatyon peroksidaz seviyesini ise arttırdığı bulunmuştur. Yapılan histopatolojik değerlendirmede de

biyokimyasal analizleri destekleyen sonuçlar olduğu belirtilmiştir [113]. Janbaz ve arkadaşlarının (2004) yaptığı bir çalışmada antioksidan özellikleri olan kersetin ve kafeik asitin APAP kaynaklı karaciğer hasarına etkileri incelenmiş ve bu maddelerin ALT ve AST değerlerini düşürdüğü gösterilmiştir [176]. Bu çalışmada karaciğer fonksiyonlarını gösteren biyokimyasal testlerin sonuçlarında, APAP verilen grupta ALT değerinin kontrol grubuna göre arttığı ve diğer gruplarda ise APAP verilen gruba göre azaldığı görüldü. AST sonuçlarında ise gruplar arası anlamlı farklılık olmadığı belirlendi. Literatürdeki araştırmalar APAP kaynaklı karaciğer hasarında görülen nekrozun şiddeti ile ALT ve AST seviyeleri arasında her zaman korelasyon görülemeyebileceğine, bu sebeple sonuçların morfolojik açıdan da değerlendirilmeleri gerektiğine dikkat çekmiştir. Ayrıca APAP hasarından sonraki iyileşme sürecinde ALT ve AST değerleri ile nekroz arasında bu belirteçlerin yarı ömürleri sebebiyle uyumsuzluk olabileceği ifade edilmiştir [97]. İlaç kaynaklı karaciğer hasarı görülen hastaların bazılarında biyokimyasal belirteçlerde çok az yükselme görüldüğü halde, histolojik düzeyde şiddetli hasarın meydana gelebildiği bildirilmiştir [174]

Serumdaki ALP seviyesi kolestatik hastalıklarda biliyer epitel hücrelerinin veya kanalikül membranının hasarlandığı durumlarda yükselir. Ayrıca serumdaki ALP karaciğerin yanı sıra kemiklerden de kaynaklanır. GGT, hepatositlerde ve biliyer epitel hücrelerinde bulunan mikrozomal bir enzimdir. Total bilirubin serumda bulunan ve karaciğer fonksiyonunu ALT, AST ve ALP'den daha iyi yansıtan bir belirteçtir. Karaciğer hasarında bilirubin yeterli miktarda metabolize edilememesi sebebi ile serumdaki bilirubin miktarı yükselir ve organın işlevlerinde sorunlar olduğu anlaşılır [175,177,178].

APAP kaynaklı karaciğer hasarı oluşturulan bir çalışmada antioksidan etkisi olan silmarinin etkisi incelenmiş, APAP ve silmarin uygulanan grupta APAP uygulanan gruba göre ALP ve GGT seviyelerinde düşüş görülürken glikojen miktarında artış olduğu belirtilmiştir [179].

Bu çalışmada da, APAP verilen grupta GGT değerinde artış görülürken APAP verildikten sonra borik asit uygulanan gruplarda azalma olduğu görüldü. ALP değerlerinde ise gruplar arasında benzer değerler olduğu belirlendi. ALP düzeyinde gruplar arası fark görülmemesinin sebebi olarak çalışmamızda biliyer epitelde hasarlanmaya sebep olacak kadar periportal alana yayılan şiddetli bir hasar olmaması düşünüldü.

Cengiz ve arkadaşları (2019) yaptıkları bir çalışmada borik asitin kemoterapötik bir ajan olan siklofosfamid kaynaklı karaciğer hasarı üzerine etkilerini araştırmışlardır. Çalışmalarında sıçanlara 6 gün boyunca 200 mg/kg miktarında borik asit uygulamışlar ve 4. gün siklofosfamid vermişlerdir. Karaciğer fonksiyonlarını incelemek amacı ile yaptıkları analizlerde siklofosfamid öncesi borik asit uygulamasının, sadece siklofosfamid uygulanan gruba göre ALT, AST, ALP seviyelerini ve oksidatif stres indeksini düşürdüğü gösterilmiştir [25].

Çoban ve Kuru (2019) APAP kaynaklı karaciğer hasarında borik asitin oksidatif stres üzerine olan etkilerini araştırmışlardır. Bunun için karaciğer hasarında 50 mg/kg, 100 mg/kg ve 200 mg/kg borik asit uygulamaları yapılmıştır. Elde edilen sonuçlarda APAP grubunda artan ALT, AST ve oksidatif stres indeksi görülürken, borik asit uygulanan gruplarda tüm doz gruplarında ALT, AST ve oksidatif stres indeksi değerlerinde azalma olduğu görülmüştür [180].

Bu çalışmada da APAP ile oluşturulan karaciğer hasarında borik asitin karaciğer fonksiyonları üzerindeki etkisi biyokimyasal analizler ile değerlendirildiğinde, APAP uygulanan grupta ALT, total bilirubin ve GGT değerinin yükseldiği APAP verildikten sonra borik asit uygulanan gruplarda ise bu değerlerde azalma olduğu görüldü. Grupların ALP ve glukoz değerlerinde ise anlamlı bir değişiklik bulunmadı.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Asetaminofen, analjezik ve antipiretik olarak kullanılan, reçetesiz ve düşük maliyetli olması nedeniyle de ulaşılabilirliği kolay bir ilaçtır. Bu sebeple yüksek doza etkin kalma ve sonucunda karaciğer hasarı görülme oranı en yüksek ilaçlardan biridir. APAP toksisitesinde kullanılan NAC tedavisinde oluşabilecek kusma ve anafilaksi gibi olası etkiler göz önünde bulundurularak, NAC'a alternatif olabilecek maddeler aranmaktadır.

Dünyanın en önemli bor rezervlerinin bulunduğu ülkemizde bu doğal zenginliğin değerlendirilmesi amacıyla birçok çalışma yapılmaktadır. Son çalışmalar borik asitin anti-inflamatuar ve antioksidan etkisi ile farklı patolojik modellerde oluşan hasarı azaltabileceğini göstermiştir.

Bu çalışmada, asetaminofen kaynaklı karaciğer hasarında borik asitin vaskülarizasyon ve rejenerasyon üzerine etkisi araştırılmıştır. Borik asitin hasar oluşumu sürecinde farklı zamanlardaki etkileri de karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlarda asetaminofen uygulamasıyla oluşan karaciğer hasarının borik asit etkisiyle azaldığı görülmüştür. Histopatolojik değerlendirmeler asetaminofen kaynaklı sentrilobüler nekrozun ve glikojen kaybının borik asit uygulanan her iki grupta da azaldığını göstermiştir. Vaskülarizasyon ve rejenerasyonun değerlendirilmesi amacı ile incelenen VEGF-A ve PCNA ifadesinde görülen artış asetaminofen grubunda da görülmüş ancak borik asit uygulanan gruplarda daha fazla olduğu dikkati çekmiştir. Çalışmanın sonucunda farklı zamanlarda borik asit uygulanan gruplar arasında belirgin bir farklılık görülmemiştir. APAP kaynaklı karaciğer hasarında farklı zamanlardaki borik asit uygulamasına ilişkin farklı yöntemlerle daha ileri çalışmaların yapılması gerektiği düşünülmüştür. Gelecekteki çalışmalarda bu gruplarla NAC uygulamasının karşılaştırılması, uzun süreli NAC tedavisinde karşılaşılan sınırlamalara bir alternatif olarak borik asitin kullanılabilirliği açısından faydalı olacağı düşünülmüştür.

KAYNAKÇA

1. Michalopoulos, G. K. (2020). Liver Regeneration. In M. I. Arias, H. J. Alter, J. L. Boyer, D. E. Cohen, D. A. Shafritz, S. S. Thorgeirsson and A. W. Wolkoff (Eds.), *The Liver Biology and Pathobiology*. NJ:Wiley, pp. 566-584.
2. Strohmeyer, G. and Weik, C. (1999). Liver damage caused by drugs. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 37, 367-378.
3. Park, B. K., Kitteringham, N. R., Maggs, J. L., Pirmohamed, M. and Williams, D. P. (2005). The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45, 177-202.
4. Roy, J. (2011). 10 - The top five most common or long-selling drugs. In J. Roy (Eds.), *An Introduction to Pharmaceutical Sciences*. Sawston:Woodhead Publishing, pp. 231-296.
5. Rotundo, L. and Pirsopoulos, N. (2020). Liver injury induced by paracetamol and challenges associated with intentional and unintentional use. *World Journal of Hepatology*, 12, 125-136.
6. Lee, W. M. (2017). Acetaminophen (APAP) hepatotoxicity—Isn't it time for APAP to go away? *Journal of Hepatology*, 67, 1324-1331.
7. Yan, M., Huo, Y., Yin, S. and Hu, H. (2018). Mechanisms of acetaminophen-induced liver injury and its implications for therapeutic interventions. *Redox Biology*, 17, 274-283.
8. Deleve, L. D. (2007). Hepatic Microvasculature in Liver Injury. *Seminars in Liver Disease*, 27, 390-400.
9. Campana, L., Esser, H., Huch, M. and Forbes, S. (2021). Liver regeneration and inflammation: from fundamental science to clinical applications. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22, 608-624.
10. Deleve, L. D. (2013). Liver sinusoidal endothelial cells and liver regeneration. *Journal of Clinical Investigation*, 123, 1861-1866.
11. Abu Rmilah, A., Zhou, W., Nelson, E., Lin, L., Amiot, B. and Nyberg, S. L. (2019). Understanding the marvels behind liver regeneration. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 8, e340.
12. So, J., Kim, A., Lee, S. H. and Shin, D. (2020). Liver progenitor cell-driven liver regeneration. *Experimental & Molecular Medicine*, 52, 1230-1238.
13. Liao, J., Lu, Q., Li, Z., Li, J., Zhao, Q. and Li, J. (2023). Acetaminophen-induced liver injury: Molecular mechanism and treatments from natural products. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1122632, 1-12.
14. Antoine, D. J. and Dear, J. W. (2016). How to treat paracetamol overdose and when to do it. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 9, 633-635.

15. Wang, Y., Jiang Y, Fan X, Tan H, Zeng H, Wang Y, Chen P, Huang M, Bi H. (2015). Hepato-protective effect of resveratrol against acetaminophen-induced liver injury is associated with inhibition of CYP-mediated bioactivation and regulation of SIRT1-p53 signaling pathways. *Toxicology Letters*, 236, 82-89.
16. Somanawat, K., Thong-Ngam, D. and Klaikeaw, N. (2013). Curcumin attenuated paracetamol overdose induced hepatitis. *World Journal of Gastroenterology*, 19, 1962-1967.
17. Papackova, Z., Heczkova M, Dankova H, Sticova E, Lodererova A, Bartonova L, Poruba M, Cahova M. (2018). Silymarin prevents acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Plos One*, 13(1), e0191353, 1-20.
18. Zhang, J. Song Q, Han X, Zhang Y, Zhang Y, Zhang X, Chu X, Zhang F, Chu L. (2017). Multi-targeted protection of acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice by tannic acid. *International Immunopharmacology*, 47, 95-105.
19. Truong, V. L., Bak, M. J., Jun, M., Kong, A. N., Ho, C. T. and Jeong, W. S. (2014). Antioxidant defense and hepatoprotection by procyanidins from almond (*Prunus amygdalus*) skins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 8668-8678.
20. Yenmez, N. (2011). Stratejik Bir Maden Olarak Bor Minerallerin Türkiye İçin Önemi. *Coğrafya Dergisi* 0, 59-94.
21. Lopalco, A., Lopodota, A. A., Laquintana, V., Denora, N. and Stella, V. J. (2020). Boric Acid, a Lewis Acid With Unique and Unusual Properties: Formulation Implications. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 109, 2375-2386.
22. Keren, R. and Bingham, F. T. (1985). Boron in Water, Soils, and Plants. In B.A. Stewart (Eds.), *Advances in Soil Science* New York:Springer pp. 229-276.
23. Murray, F. J. (1998). A comparative review of the pharmacokinetics of boric acid in rodents and humans. *Biological Trace Element Research*, 66, 331-341.
24. Tanaka, M. and Fujiwara, T. (2008). Physiological roles and transport mechanisms of boron: perspectives from plants. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 456 (4), 671-677.
25. Cengiz, M., Cetik Yildiz, S., Demir, C., Sahin, I. K., Teksoy, O. and Ayhanci, A. (2019). Hepato-preventive and anti-apoptotic role of boric acid against liver injury induced by cyclophosphamide. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 53, 1-7.
26. Hazman, Ö., Bozkurt, M. F., Fidan, A. F., Uysal, F. E. and Çelik, S. (2018). The Effect of Boric Acid and Borax on Oxidative Stress, Inflammation, ER Stress and Apoptosis in Cisplatin Toxication and Nephrotoxicity Developing as a Result of Toxication. *Inflammation* 41, 1032-1048.
27. Sogut, I., Paltun, S. O., Tuncdemir, M., Ersoz, M. and Hurdag, C. (2018). The antioxidant and antiapoptotic effect of boric acid on hepatotoxicity in chronic alcohol-fed rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 96, 404-411.

28. Ahtzaz, S., Sher Waris, T., Shahzadi, L., Anwar Chaudhry, A., Ur Rehman, I. and Yar, M. (2020). Boron for tissue regeneration-it's loading into chitosan/collagen hydrogels and testing on chorioallantoic membrane to study the effect on angiogenesis. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* 69, 525-534.
29. Demirci, S. Doğan A, Karakuş E, Halıcı Z, Topçu A, Demirci E, Sahin F. (2015). Boron and Poloxamer (F68 and F127) Containing Hydrogel Formulation for Burn Wound Healing. *Biological Trace Element Research* 168, 169-180.
30. Wightman R.S. and Nelson L.S. (2016). In Tintinalli, J. E., Stapczynski, J. S., Ma, O. J., Cline, D. M. and Meckler, G. D. (Eds.), *Tintinalli's Emergency Medicine: A Comprehensive Study Guide* (8th edn). McGraw Hill LLC, pp. 1252-1259.
31. Mescher, A. (Editor). (2015). Organs Associated with the Digestive Tract. *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas* (14th edn) McGraw-Hill Education, pp. 335-348.
32. Yıldırım, M. (2014). Sindirim Sistemi. *İnsan Anatomisi* (7. baskı). İstanbul:Nobel Tıp Kitapevi, s. 196-198
33. Agur, A. M. R., Moore, K. L. and Dalley, A. F. (Editors). (2019). Alimentary System. *Moore's Essential Clinical Anatomy* (11th edn). Philadelphia:Wolters Kluwer, pp.300-308.
34. Yıldırım, M. (2006). *İnsan Anatomisi 2; Dolaşım sistemi, iç organlar, sinir sistemine giriş, duyu organları* (1. baskı). İstanbul:Nobel Tıp Kitapevi, 122-127.
35. Arıncı, K. ve Elhan, A. (2020). Karaciğer. *Anatomi 1. Cilt; Kemikler, Eklemler, Kaslar, İç Organlar* (7. baskı). İstanbul:Güneş Tıp Kitapevi 268-271,
36. Kierszenbaum, A. L. and Tres, L. L. (Editors). (2020). *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology* (5th edn), Philadelphia:Elsevier, 538-554.
37. Lowe, J. S., Anderson, P. G. and Anderson, S. I. (Editors). (2024). *Stevens & Lowe's Human Histolog.*(5th edition). Elsevier Health Sciences. 209-221.
38. Pawlina, W. and Ross M. H. (Editors). (2016). *Histology: A Text and Atlas, International Edition: With Correlated Cell and Molecular Biology* (7th edn). Philadelphia: Lippincott Williams&Wilki, 628-643.
39. Sadler, T. W. and Langman, J. (2012). *Langman's medical embryology* (12th edn). Philadelphia:Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 217-222.
40. Moore, K. L., Persaud, T. V. N. and Torchia, M. G. (Editors). (2015). *The Developing Human E-Book: Clinically Oriented Embryology* (9th edn). Philadelphia:Elsevier Health Sciences, pp. 141-143.
41. Cochard, L. R. (2012). The GI System and Abdominal Wall. *Netter's Atlas of Human Embryology* Philadelphia:Elsevier, pp. 134-136.
42. Carlson, B. M. (Editor). (2024). *Human Embryology and Developmental Biology* (7th edn). Philadelphia:Elsevier Health Sciences, pp. 335-338.

43. Gartner, L. P. (2021). *Textbook of Histology* (6th edn). Philadelphia:Elsevier, pp. 357-378.
44. Cui, D. (Editor) (2011). *Atlas of Histology: With Functional and Clinical Correlations* Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, pp. 317-321.
45. Hossler, F. (2014). *Ultrastructure Atlas of Human Tissues*. (1st edn). New Jersey:Wiley, pp. 507-540.
46. Ovalle, W. K., Nahirney, P. C. and Netter, F. H. (Editors). (2021). *Netter's Essential Histology: With Correlated Histopathology* (3rd edn). Philadelphia:Elsevier, pp. 333-337.
47. Gartner, L. P. (2020). *Textbook of Histology E-Book*. (5th edn). Elsevier Health Sciences, pp. 431-458.
48. Hall, J. E. and Hall, M. E. (2020). *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology E-Book: Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology E-Book* (14th edn). Elsevier Health Sciences, pp. 871-876.
49. Toti, L., Manzia TM, Sensi B, Blasi F, Baiocchi L, Lenci I, Angelico R, Tisone G. (2021). Towards tolerance in liver transplantation. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 54-55, 101770.
50. Perera, M. T. P., Mirza, D. F. and Elias, E. (2009). Liver transplantation: Issues for the next 20 years. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 24, 124-131.
51. Geller, D. A., Goss, J. A., Busuttill, R. W. and Tsung, A. (2019). Liver. In F. Brunicaardi, D. K. Andersen, T. R. Billiar, D. L. Dunn, L. S. Kao, J. G. Hunter, J. B. Matthews and R. E. Pollock (Eds.), *Schwartz's Principles of Surgery*, 11e McGraw-Hill Education
52. Apte, U. M. (2015). Liver Regeneration: An Introduction. In U. Apte (Editor). *Liver Regeneration :Basic Mechanisms, Relevant Models and Clinical Applications*. Oxford:Academic Press, pp.3-10.
53. İnternet: National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 86986, 4-Hydroxyphenylacetamide. CID 1983 ve Acetaminophen. PubChem. Web: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/39763#section=2D-Structure> ve <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1983#section=2D-Structure> adresinden 20 Nisan 2024'de alınmıştır.
54. Marin, T. M., de Carvalho Indolfo N, Rocco SA, Basei FL, de Carvalho M, de Almeida Gonçalves K, Pagani E. (2019). Acetaminophen absorption and metabolism in an intestine/liver microphysiological system. *Chemico-Biological Interactions* 299, 59-76.
55. Hodgman, M. J. and Garrard, A. R. (2012). A Review of Acetaminophen Poisoning. *Critical Care Clinics* 28, 499-516.
56. Freo, U., Ruocco, C., Valerio, A., Scagnol, I. and Nisoli, E. (2021). Paracetamol: A Review of Guideline Recommendations. *J Clin Med* 10:3420, 1-22.

57. İnternet:Gerriets, V., Anderson, J., Patel, P. and Nappe, T. M. (2024). Acetaminophen. In *StatPearls*, StatPearls Publishing Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482369/> adresinden 18 Mart 2024 tarihinde alınmıştır.
58. Moriarty, C. and Carroll, W. (2016). Paracetamol: pharmacology, prescribing and controversies. *Archives of Disease in Childhood - Education and Practice Edition* 101, 331-334.
59. Bunchorntavakul, C. and Reddy, K. R. (2013). Acetaminophen-related hepatotoxicity. *Clinics in Liver Disease* 17, 587-607.
60. Mitchell, R. A., Rathi, S., Dahiya, M., Zhu, J., Hussaini, T. and Yoshida, E. M. (2020). Public awareness of acetaminophen and risks of drug induced liver injury: Results of a large outpatient clinic survey. *Plos One* 15, e0229070. 10.1371/journal.pone.0229070
61. Lee, J. Y. and Hong, S. H. (2020). Hematopoietic Stem Cells and Their Roles in Tissue Regeneration. *International Journal of Stem Cells* 13, 1-12.
62. Przybyła, G. W., Szychowski, K. A. and Gmiński, J. (2021). Paracetamol - An old drug with new mechanisms of action. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 48, 3-19.
63. McGill, M. R. and Jaeschke, H. (2019). Animal models of drug-induced liver injury. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1865, 1031-1039.
64. Moles, A., Torres, S., Baulies, A., Garcia-Ruiz, C. and Fernandez-Checa, J. C. (2018). Mitochondrial-Lysosomal Axis in Acetaminophen Hepatotoxicity. *Frontiers in Pharmacology* 9, 453. 10.3389/fphar.2018.00453
65. Ramachandran, A. and Jaeschke, H. (2019). Acetaminophen Hepatotoxicity. *Seminars in Liver Disease* 39, 221-234.
66. Hanawa, N., Shinohara, M., Saberi, B., Gaarde, W. A., Han, D. and Kaplowitz, N. (2008). Role of JNK translocation to mitochondria leading to inhibition of mitochondria bioenergetics in acetaminophen-induced liver injury. *Journal of Biological Chemistry* 283, 13565-13577.
67. Woolbright, B. L. and Jaeschke, H. (2017). Role of the inflammasome in acetaminophen-induced liver injury and acute liver failure. *Journal of Hepatology* 66, 836-848.
68. Abdulkhaleq, F. M. Alhussainy T. M., Badr M. M., Khalil A. A., Gammoh O., Ghanim B. Y., Qinna N. A. (2018). Antioxidative stress effects of vitamins C, E, and B(12), and their combination can protect the liver against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Drug Design, Development and Therapy* 12, 3525-3533.
69. Soliman, M. M., Abdo Nassan, M. and Ismail, T. A. (2014). Immunohistochemical and molecular study on the protective effect of curcumin against hepatic toxicity induced by paracetamol in Wistar rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 14:457, 2-11.

70. Michalopoulos, G. K. and DeFrances, M. C. (1997). Liver regeneration. *Science* 276, 60-66.
71. Bangru, S. and Kalsotra, A. (2020). Cellular and molecular basis of liver regeneration. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 100, 74-87.
72. Michalopoulos, G. K. and Bhushan, B. (2021). Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 18, 40-55.
73. Kiseleva, Y. V., Antonyan, S. Z., Zharikova, T. S., Tupikin, K. A., Kalinin, D. V. and Zharikov, Y. O. (2021). Molecular pathways of liver regeneration: A comprehensive review. *World Journal of Hepatology* 13, 270-290.
74. Tao, Y., Wang, M., Chen, E. and Tang, H. (2017). Liver Regeneration: Analysis of the Main Relevant Signaling Molecules. *Mediators of Inflammation* 2017, 4256352. 10.1155/2017/4256352
75. Walesky, C. and Apte, U. (2015). Chapter 7 - Mechanisms of Termination of Liver Regeneration. In U. Apte (Eds.), *Liver Regeneration*. NY:Academic Press, pp. 103-111,
76. Kholodenko, I. V. and Yarygin, K. N. (2017). Cellular Mechanisms of Liver Regeneration and Cell-Based Therapies of Liver Diseases. *BioMed Research International* 2017, 8910821, 1-17.
77. Michalopoulos, G. K. (2014). Advances in liver regeneration. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology* 8, 897-907.
78. Pérez-Gutiérrez, L. and Ferrara, N. (2023). Biology and therapeutic targeting of vascular endothelial growth factor A. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 24, 816-834.
79. Shibuya, M. (2008). Vascular endothelial growth factor-dependent and -independent regulation of angiogenesis. *BMB Reports* 41, 278-286.
80. Maniscalco, W. M. and D'Angio, C. T. (2006). Vascular Endothelial Growth Factor. In G.J. Laurent and S.D. Shapiro (Eds.), *Encyclopedia of Respiratory Medicine*. NY:Academic Press pp. 413-418.
81. Shibuya, M. (2011). Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes Cancer* 2, 1097-1105.
82. Lafoz, E., Ruart, M., Anton, A., Oncins, A. and Hernandez-Gea, V. (2020). The Endothelium as a Driver of Liver Fibrosis and Regeneration. *Cells* 9, 929, 1-26.
83. Kato, T., Ito Y., Hosono K., Suzuki T., Tamaki H., Minamino T., Kato S., Sakagami H., Shibuya M., Majima M. (2011). Vascular endothelial growth factor receptor-1 signaling promotes liver repair through restoration of liver microvasculature after acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicological Sciences* 120, 218-229.

84. Yeo, Y. H., Lee Y. T., Tseng H. R., Zhu Y., You S., Agopian V. G., Yang J. D. (2024). Alpha-fetoprotein: Past, present, and future. *Hepatology Communications* 8:e0422, 1-16.
85. Zhu, M., Lin, B., Zhou, P. and Li, M. (2015). Molecular Analysis of AFP and HSA Interactions with PTEN Protein. *BioMed Research International* 2015, 256916. 1-7.
86. Jin, D. K., Vacher, J. and Feuerman, M. H. (1998). alpha-Fetoprotein gene sequences mediating Afr2 regulation during liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8767-8772.
87. Nakano, Y., Nakao S., Sumiyoshi H., Mikami K., Tanno Y., Sueoka M., Kasahara D., Kimura H., Moro T., Kamiya A., Hozumi K., Inagaki Y. (2017). Identification of a novel alpha-fetoprotein-expressing cell population induced by the Jagged1/Notch2 signal in murine fibrotic liver. *Hepatology Communications* 1, 215-229.
88. Santoni-Rugiu, E., Jelnes, P., Thorgeirsson, S. S. and Bisgaard, H. C. (2005). Progenitor cells in liver regeneration: molecular responses controlling their activation and expansion. *APMIS* 113, 876-902.
89. Xue, G., Han X., Ma X., Wu H., Qin Y., Liu J., Hu Y., Hong Y., Hou Y. (2016). Effect of Microenvironment on Differentiation of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells into Hepatocytes In Vitro and In Vivo. *BioMed Research International* 2016, 8916534, pp. 1-13.
90. Strzalka, W. and Ziemienowicz, A. (2011). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Annals of Botany* 107, 1127-1140.
91. Hoffmann, K., Nagel A.J., Tanabe K., Fuchs J., Dehlke K., Ghamarnejad O., Lemekhova A., Mehrabi A. (2020). Markers of liver regeneration-the role of growth factors and cytokines: a systematic review. *Biomed Central Surgery* 20, 31. 10.1186/s12893-019-0664-8
92. Kurki, P., Vanderlaan, M., Dolbeare, F., Gray, J. and Tan, E. M. (1986). Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin during the cell cycle. *Experimental Cell Research* 166, 209-219.
93. Bhushan, B., Gunewardena, S., Edwards, G. and Apte, U. (2020). Comparison of liver regeneration after partial hepatectomy and acetaminophen-induced acute liver failure: A global picture based on transcriptome analysis. *Food and Chemical Toxicology* 139, 111186, 1-24.
94. Assy, N. and Minuk, G. Y. (1997). Liver regeneration: methods for monitoring and their applications. *Journal of Hepatology* 26, 945-952.
95. Dietrich, D. R. (1993). Toxicological and pathological applications of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), a novel endogenous marker for cell proliferation. *Critical Reviews in Toxicology* 23, 77-109.

96. Donahower, B. McCullough S.S., Kurten R., Lamps L.W., Simpson P., Hinson J.A., James L.P. (2006). Vascular endothelial growth factor and hepatocyte regeneration in acetaminophen toxicity. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 291, 102-109.
97. Bhushan, B. Walesky C., Manley M., Gallagher T., Borude P., Edwards G., Monga S.P., Apte U. (2014). Pro-regenerative signaling after acetaminophen-induced acute liver injury in mice identified using a novel incremental dose model. *The American Journal of Pathology* 184, 3013-3025.
98. Elevli, B., Yaman, İ. and Laratte, B. (2022). Estimation of the Turkish Boron Exportation to Europe. *Mining* 2, 155-169
99. İnternet: Türkiye Enerji Nükleer Ve Maden Araştırma Kurumu (2017). Bor Araştırma Enstitüsü, Bor Rezervi. Tenmak Boren. <https://boren.tenmak.gov.tr/tr/calisma- Alanlari/rezervler.html> adresinden 15 Ocak 2024 tarihinde alınmıştır.
100. Devirian, T. A. and Volpe, S. L. (2003). The Physiological Effects of Dietary Boron. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 43, 219-231.
101. Nielsen, F. H. (1994). Biochemical and physiologic consequences of boron deprivation in humans. *Environmental Health Perspectives* 102 Suppl 7, 59-63.
102. Zumreoglu-Karan, B. and Kose, D. A. (2015). Boric acid: a simple molecule of physiologic, therapeutic and prebiotic significance. *Pure and Applied Chemistry* 87, 155-162.
103. Kochkodan, V., Darwish, N. B. and Hilal, N. (2015). Chapter 2 - The Chemistry of Boron in Water. In N. Kabay, M. Bryjak and N. Hila (Eds.), *In Boron Separation Processes*. Elsevier, pp. 35-63.
104. Kabay, N. and Bryjak, M. (2015). Chapter 9 - Boron Removal From Seawater Using Reverse Osmosis Integrated Processes. In N. Kabay, M. Bryjak and N. Hila (Eds.), *In Boron Separation Processes*. Elsevier, pp. 219-235.
105. İnternet: National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 7628, Boric Acid. PubChem. Web: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Boric-Acid#section=2D-Structure> adresinden 20 Mayıs 2024'de alınmıştır.
106. Cikler-Dulger, E. and Sogut, I. (2020). Investigation of the protective effects of boric acid on ethanol induced kidney injury. *Biotechnic & Histochemistry* 95, 186-193.
107. Basbug, M., Yildar, M., Yaman, I., Ozkan, O. F., Aksit, H., Cavdar, F., Derici, H (2015). Effects Of Boric Acid In An Experimental Rat Model Of Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury. *Acta Medica Mediterranea* 31, 1067-1073
108. Tepedelen, B. E., Soya, E. and Korkmaz, M. (2016). Boric Acid Reduces the Formation of DNA Double Strand Breaks and Accelerates Wound Healing Process. *Biological Trace Element Research* 174, 309-318.

109. Çolak, S., Geyikoğlu, F., Keles, O. N., Türkez, H., Topal, A. and Unal, B. (2011). The neuroprotective role of boric acid on aluminum chloride-induced neurotoxicity. *Toxicology and Industrial Health* 27, 700-710.
110. Tombuloglu, A., Copoglu, H., Aydin-Son, Y. and Guray, N. T. (2020). In vitro effects of boric acid on human liver hepatoma cell line (HepG2) at the half-maximal inhibitory concentration. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 62, 126573, 1-9.
111. Micheli, L., Cerretani, D., Fiaschi, A. I., Giorgi, G., Romeo, M. R. and Runci, F. M. (1994). Effect of acetaminophen on glutathione levels in rat testis and lung. *Environmental Health Perspectives* 102 Suppl 9, 63-64.
112. Ajith, T. A., Hema, U. and Aswathy, M. S. (2007) Zingiber officinale Roscoe prevents acetaminophen-induced acute hepatotoxicity by enhancing hepatic antioxidant status. *Food and Chemical Toxicology* 45, 2267-2272.
113. Kheradpezhohu E., Panjehshahin M.R., Miri R., Javidnia K., Noorafshan A. Monabati A., Dehpour A. R. (2010). Curcumin protects rats against acetaminophen-induced hepatorenal damages and shows synergistic activity with N-acetyl cysteine. *European Journal of Pharmacology* 628, 274-281.
114. Sajedianfard, J., Khodakaramtafti, A. and Esmailpour, H. (2006). Therapeutic effects of cimetidine on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Comparative Clinical Pathology* 15, 55-57.
115. El-Bakry, H. A., El-Sherif, G. and Rostom, R. M. (2017). Therapeutic dose of green tea extract provokes liver damage and exacerbates paracetamol-induced hepatotoxicity in rats through oxidative stress and caspase 3-dependent apoptosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 96, 798-811.
116. Ahmed, E. A., Khaled, H. E. and Elsayed, A. K. (2021). Long-term exposure to p-Nitrophenol induces hepatotoxicity via accelerating apoptosis and glycogen accumulation in male Japanese quails. *Environmental Science and Pollution Research International* 28, 44420-44431.
117. Papastefanou, V. P., Bozas E., Mykoniatis M. G., Grypioti A., Garyfallidis S., Bartsocas C. S., Nicolopoulou-Stamati P. (2007). VEGF isoforms and receptors expression throughout acute acetaminophen-induced liver injury and regeneration. *Archives of Toxicology* 81, 729-741.
118. Yang, I., Son, Y., Shin, J. H., Kim, I. Y. and Seong, J. K. (2022). Ahnak depletion accelerates liver regeneration by modulating the TGF- β /Smad signaling pathway. *BMB Reports* 55, 401-406.
119. Bacus, S., Flowers, J. L., Press, M. F., Bacus, J. W. and Mccarty, K. S., Jr. (1988). The Evaluation of Estrogen Receptor in Primary Breast Carcinoma by Computer-Assisted Image Analysis. *American Journal of Clinical Pathology* 90, 233-239.
120. Crichlow, G. V., Lubetsky, J. B., Leng, L., Bucala, R. and Lolis, E. J. (2009). Structural and kinetic analyses of macrophage migration inhibitory factor active site interactions. *Biochemistry* 48, 132-139.

121. İnternet: The Protein Data Bank (2024). Crystal Structure of Macrophage Migration Inhibitory Factor Bound to an Acetaminophen Dimer Derived from NAPQI. RCSB PDB. <https://www.rcsb.org/structure/3DJI> adresinden 15 Nisan 2024 tarihinde alınmıştır.
122. David, S. and Hamilton, J. P. (2010). Drug-induced Liver Injury. *US Gastroenterology & Hepatology Review* 6, 73-80
123. McGill, M. R. and Hinson, J. A. (2020). The development and hepatotoxicity of acetaminophen: reviewing over a century of progress. *Drug Metabolism Reviews* 52, 472-500.
124. Yuan, L. and Kaplowitz, N. (2013). Mechanisms of drug-induced liver injury. *Clinics in Liver Disease* 17, 507-518.
125. Mazaleuskaya, L. L., Sangkuhl, K., Thorn, C. F., Fitzgerald, G. A., Altman, R. B. and Klein, T. E. (2015). PharmGKB summary: pathways of acetaminophen metabolism at the therapeutic versus toxic doses. *Pharmacogenet Genomics* 25, 416-426.
126. Antoine, D. J., Williams D. P., Kipar A., Jenkins R.E., Regan S. L., Sathish J. G., Kitteringham N. R., Park B. K. (2009). High-mobility group box-1 protein and keratin-18, circulating serum proteins informative of acetaminophen-induced necrosis and apoptosis in vivo. *Toxicological Sciences* 112, 521-531.
127. İnternet:Ershad M, N. A., Vearrier D. (2023). N-Acetylcysteine. In: *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537183/> adresinden 2 Nisan tarihinde alınmıştır.
128. Fisher, E. S. and Curry, S. C. (2019). Evaluation and treatment of acetaminophen toxicity. *Advances in Pharmacology* 85, 263-272.
129. Parasassi, T., Brunelli R., Costa G., De Spirito M., Krasnowska E., Lundeberg T., Pittaluga E., Ursini F. (2010). Thiol redox transitions in cell signaling: a lesson from N-acetylcysteine. *ScientificWorldJournal* 10, 1192-1202.
130. Tobwala, S., Khayyat, A., Fan, W. and Ercal, N. (2015). Comparative evaluation of N-acetylcysteine and N-acetylcysteineamide in acetaminophen-induced hepatotoxicity in human hepatoma HepaRG cells. *Experimental Biology and Medicine* 240, 261-272.
131. Aldini, G., Altomare A., Baron G., Vistoli G., Carini M., Borsani L., Sergio F. (2018). N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why. *Free Radical Research* 52, 751-762.
132. Özdemir, Ç., Arslan, M., Küçük, A., Yiğman, Z. and Dursun, A. D. (2023). Therapeutic Efficacy of Boric Acid Treatment on Brain Tissue and Cognitive Functions in Rats with Experimental Alzheimer's Disease. *Drug Design, Development and Therapy* 17, 1453-1462.
133. Gölge, U. H., Kaymaz B., Arpacı R., Kömürcü E., Göksel F., Güven M., Güzel Y., Cevizci S. (2015). Effects of Boric Acid on Fracture Healing: An Experimental Study. *Biological Trace Element Research* 167, 264-271.

134. Yıldırım, O., Seçme, M., Dodurga, Y., Mete, G. A. and Fenkci, S. M. (2024). In Vitro Effects of Boric Acid on Cell Cycle, Apoptosis, and miRNAs in Medullary Thyroid Cancer Cells. *Biological Trace Element Research*. 10.1007/s12011-024-04188-3
135. Demirci, S., Doğan, A., Aydın, S., Dülger, E. and Şahin, F. (2016). Boron promotes streptozotocin-induced diabetic wound healing: roles in cell proliferation and migration, growth factor expression, and inflammation. *Molecular and Cellular Biochemistry* 417, 119-133.
136. Ince, S., Keles, H., Erdogan, M., Hazman, O. and Kucukkurt, I. (2012). Protective effect of boric acid against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. *Drug and Chemical Toxicology* 35, 285-292.
137. Flanagan, R. J. and Meredith, T. J. (1991). Use of N-acetylcysteine in clinical toxicology. *The American Journal of Medicine* 91, 131-139.
138. Yahya, F., Mamat S. S., Kamarolzaman M. F., Seyedan A. A., Jakius K. F., Mahmood N. D., Shahril M. S., Suhaili Z., Mohtarrudin N., Susanti D., Somchit M. N., Teh L. K., Salleh M. Z., Zakaria Z. A. (2013). Hepatoprotective Activity of Methanolic Extract of Bauhinia purpurea Leaves against Paracetamol-Induced Hepatic Damage in Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013, 636580, 1-10.
139. Chen, Y. H., Lin F. Y., Liu P. L., Huang Y. T., Chiu J. H., Chang Y. C., Man K. M., Hong C. Y., Ho Y. Y., Lai M. T. (2009). Antioxidative and hepatoprotective effects of magnolol on acetaminophen-induced liver damage in rats. *Archives of Pharmacal Research* 32, 221-228.
140. Park, D. W., Jeon H., Kwon J. E., Lee Y. G., So R., Choe T. H., Jeong Y. J., Kang S. C. (2021). Hepatoprotective effect of Centella asiatica 50% ethanol extract against acetaminophen-induced acute liver injury in BALB/c mice. *Toxicological Research* 37, 261-275.
141. Ramachandran, R. and Kakar, S. (2009). Histological patterns in drug-induced liver disease. *Journal of Clinical Pathology* 62, 481-492.
142. Blazka, M. E., Elwell, M. R., Holladay, S. D., Wilson, R. E. and Luster, M. I. (1996). Histopathology of Acetaminophen-Induced Liver Changes: Role of Interleukin 1 α and Tumor Necrosis Factor α . *Toxicologic Pathology* 24, 181-189.
143. Hinson, J. A., Roberts, D. W. and James, L. P. (2010). Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 196, 369-405.
144. Walker, R. M., Racz, W. J. and Mcelligott, T. F. (1985). Acetaminophen-induced hepatotoxic congestion in mice. *Hepatology* 5, 233-240.
145. Badmann, A., Langsch, S., Keogh, A., Brunner, T., Kaufmann, T. and Corazza, N. (2012). TRAIL enhances paracetamol-induced liver sinusoidal endothelial cell death in a Bim- and Bid-dependent manner. *Cell Death & Disease* 3, e447, 1-11.

146. Dirscherl, K., Chlöpfer M., Roth Z'graggen B., Wenger R. H., Booy C., Flury-Frei R., Fatzner R., Aloman C., Bartosch B., Parent R., Kurtcuoglu V., de Zélicourt D., Spahn D.R., Beck Schimmer B., Schadde E. (2020). Hypoxia sensing by hepatic stellate cells leads to VEGF-dependent angiogenesis and may contribute to accelerated liver regeneration. *Scientific Reports* 10, 4392. 1-13.
147. Riehle, K. J., Riggle, K. and Campbell, J. S. (2015). Chapter 4 - The Priming and Progression Theory of Liver Regeneration. In U. Apte (Eds.), *Liver Regeneration*. NY:Academic Press, pp. 50-63
148. Ding, B. S., Nolan D. J, Butler J. M., James D., Babazadeh A. O., Rosenwaks Z., Mittal V., Kobayashi H., Shido K., Lyden D., Sato T. N., Rabbany S. Y., Rafii S. (2010). Inductive angiocrine signals from sinusoidal endothelium are required for liver regeneration. *Nature* 468, 310-315.
149. Gul, H., Uysal B., Cakir E., Yaman H., Macit E., Yildirim A. O., Eyi Y. E., Kaldirim U., Oztas E., Akgul E. O., Cayci T., Ozler M., Topal T., Oter S., Korkmaz A., Toygar M., Demirbag S. (2012). The protective effects of ozone therapy in a rat model of acetaminophen-induced liver injury. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 34, 81-86.
150. Lim, S. P., Andrews, F. J. and O'brien, P. E. (1995). Acetaminophen-induced microvascular injury in the rat liver: Protection with misoprostol. *Hepatology* 22, 1776-1781.
151. Mahmoud, Y. I., Mahmoud, A. A. and Nassar, G. (2015). Alpha-lipoic acid treatment of acetaminophen-induced rat liver damage. *Biotechnic & Histochemistry* 90, 594-600.
152. Hinson, J. A. Mays, J. B. and Cameron, A. M. (1983). Acetaminophen-induced hepatic glycogen depletion and hyperglycemia in mice. *Biochemical Pharmacology* 32, 1979-1988.
153. Wang, Y., Zhong, M., Wang, W. and Li, Y. H. (2020). Chi311 regulates APAP-induced liver injury by promoting macrophage infiltration. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 24, 9775.
154. Wang, Z., Zhou, J., Lin, J., Wang, Y., Lin, Y. and Li, X. (2011). RhGH attenuates ischemia injury of intrahepatic bile ducts relating to liver transplantation. *Journal of Surgical Research* 171, 300-310.
155. Wang, L., Wang X., Wang L., Chiu J. D., van de Ven G., Gaarde W. A., Deleve L. D. (2012). Hepatic vascular endothelial growth factor regulates recruitment of rat liver sinusoidal endothelial cell progenitor cells. *Gastroenterology* 143, 1555-1563.e1552.
156. Mochida, S., Ishikawa, K., Inao, M., Shibuya, M. and Fujiwara, K. (1996). Increased expressions of vascular endothelial growth factor and its receptors, flt-1 and KDR/flk-1, in regenerating rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 226, 176-179.

157. Donahower, B. C., McCullough S. S., Hennings L., Simpson P. M., Stowe C. D., Saad A. G., Kurten R. C, Hinson J. A, James L. P. (2010). Human recombinant vascular endothelial growth factor reduces necrosis and enhances hepatocyte regeneration in a mouse model of acetaminophen toxicity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 334, 33-43.
158. Miyajima, A., Tanaka, M. and Itoh, T. (2014). Stem/progenitor cells in liver development, homeostasis, regeneration, and reprogramming. *Cell Stem Cell* 14, 561-574.
159. Lukacs-Kornek, V. and Lammert, F. (2017). The progenitor cell dilemma: Cellular and functional heterogeneity in assistance or escalation of liver injury. *Journal of Hepatology* 66, 619-630.
160. Li, J., Xin J., Zhang L., Wu J., Jiang L., Zhou Q., Li J., Guo J., Cao H., Li L. (2014). Human hepatic progenitor cells express hematopoietic cell markers CD45 and CD109. *International Journal of Medical Sciences* 11, 65-79.
161. Kuhlmann, W. D. and Peschke, P. (2006). Hepatic progenitor cells, stem cells, and AFP expression in models of liver injury. *International Journal of Experimental Pathology* 87, 343-359.
162. Kakisaka, K., Kataoka K., Onodera M., Suzuki A., Endo K., Tatemichi Y., Kuroda H., Ishida K., Takikawa Y. (2015). Alpha-fetoprotein: A biomarker for the recruitment of progenitor cells in the liver in patients with acute liver injury or failure. *Hepatology Research* 45, 12-20.
163. Kayano, K., Yasunaga M., Kubota M., Takenaka K., Mori K., Yamashita A., Kubo Y., Sakaida I., Okita K., Sanuki K. (1992). Detection of proliferating hepatocytes by immunohistochemical staining for proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in patients with acute hepatic failure. *Liver* 12, 132-136.
164. Ray, D., Han Y., Maroni L., Marzioni M., Meng F., Alpini G., Glaser S. (2015). Chapter 16 - Liver Regeneration: The Biliary Perspective. In U. Apte (Eds.), *Liver Regeneration* NY:Academic Press pp. 229-241.
165. H. Afroze, S., Jensen, K., Rahal, K., Meng, F., Alpini, G. and Glaser, S. S. (2014). Chapter 26 - Liver Regeneration: The Stem Cell Approach. In G. Orlando (Eds), *Regenerative Medicine Applications in Organ Transplantation*. NY:Academic Press pp. 375-390.
166. Kuhlmann, W. D. (1979). Immunoperoxidase labelling of alpha 1-fetoprotein (AFP) in normal and regenerating livers of a low and a high AFP producing mouse strain. *Histochemistry* 64, 67-75.
167. Wolf, H. K. and Michalopoulos, G. K. (1992). Hepatocyte regeneration in acute fulminant and nonfulminant hepatitis: a study of proliferating cell nuclear antigen expression. *Hepatology* 15, 707-713.
168. Liang, C., Takahashi, K., Furuya, K., Oda, T. and Ohkohchi, N. (2021). Platelets Stimulate Liver Regeneration in a Rat Model of Partial Liver Transplantation. *Liver Transplantation* 27, 719-734.

169. Shankar, K., Vaidya V. S., Apte U. M., Manautou J. E., Ronis M. J., Bucci T. J., Mehendale H. M. (2003). Type 1 diabetic mice are protected from acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicological Sciences* 73, 220-234.
170. Milesi-Hallé, A., McCullough S., Hinson J. A., Kurten R. C., Lamps L. W., Brown A., James L. P. (2012). Echinomycin decreases induction of vascular endothelial growth factor and hepatocyte regeneration in acetaminophen toxicity in mice. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 110, 327-334.
171. Chen, S., Tang, Y., Fang, W., He, T., Chen, X. and Zhang, P. (2021). CoQ10 Promotes Resolution of Necrosis and Liver Regeneration After Acetaminophen-Induced Liver Injury. *Toxicological Sciences* 185, 19-27.
172. Bhushan, B. and Apte, U. (2020). Acetaminophen Test Battery (ATB): A Comprehensive Method to Study Acetaminophen-Induced Acute Liver Injury. *Gene Expression* 20, 125-138.
173. McGill, M. R. and Curry, S. C. (2023). The Evolution of Circulating Biomarkers for Use in Acetaminophen/Paracetamol-Induced Liver Injury in Humans: A Scoping Review. *Livers* 3, 569-596.
174. Yu, Y. C., Mao Y. M., Chen C. W., Chen J. J., Chen J., Cong W. M., Ding Y., Duan Z. P., Fu Q. C., Guo X. Y., Hu P., Hu X. Q., Jia J. D., Lai R. T., Li D. L., Liu Y. X., Lu L. G., Ma S. W., Ma X., Nan Y. M., Ren H., Shen T., Wang H., Wang J. Y., Wang T. L., Wang X. J., Wei L., Xie Q., Xie W., Yang C. Q., Yang D. L., Yu Y. Y., Zeng M. D., Zhang L., Zhao X. Y., Zhuang H. (2017). CSH guidelines for the diagnosis and treatment of drug-induced liver injury. *Hepatology International* 11, 221-241.
175. Fu, S., Wu D., Jiang W., Li J., Long J., Jia C. and Zhou T. (2019). Molecular Biomarkers in Drug-Induced Liver Injury: Challenges and Future Perspectives. *Frontiers in Pharmacology* 10, 1667, 1-15.
176. Janbaz, K. H., Saeed, S. A. and Gilani, A. H. (2004). Studies on the protective effects of caffeic acid and quercetin on chemical-induced hepatotoxicity in rodents. *Phytomedicine* 11, 424-430.
177. Ravindra, K. C., Vaidya V. S., Wang Z., Federspiel J. D, Virgen-Slane R., Everley R. A., Grove J. I., Stephens C., Ocana M. F., Robles-Díaz M., Isabel Lucena M., Andrade R. J., Atallah E., Gerbes A. L., Weber S., Cortez-Pinto H., Fowell A. J., Hussaini H., Bjornsson E. S., Patel J., Stirnimann G., Verma S., Elsharkawy A. M., Griffiths W. J. H. , Hyde C., Dear J. W., Aithal G. P., Ramaiah S. K. (2023). Tandem mass tag-based quantitative proteomic profiling identifies candidate serum biomarkers of drug-induced liver injury in humans. *Nature Communications* 14, 1215, 1-14.
178. Li, X., Ni, J. and Chen, L. (2023). Advances in the study of acetaminophen-induced liver injury. *Frontiers in Pharmacology* 14, 1239395, 1-13.
179. Muriel, P., Garcapiña, T., Perez-Alvarez, V. and Mourelle, M. (1992). Silymarin protects against paracetamol-induced lipid peroxidation and liver damage. *Journal of Applied Toxicology* 12, 439-442.

180. Karabag Coban, F. and Kuru, B. (2019). Effect of Boron on Trace Element Level In Paracetamol Induced Hepatotoxicity Model. *Journal of Boron*. 4 (2), 92-99.51

EKLER

EK-1. Deneý Hayvanları Etik Kurul Onay Belgesi



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı :
Konu :

22.04.2021

Sayın Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Suna ÖMEROĞLU, Müşerref Şeyma CEYHAN, Tuncay Veysel PEKER, Mürşide Ayşe DEMİREL, Zeynep YIĞMAN ve Ali Doğan DURSUN'dan oluşan, G.Ü.ET 21.025 kod numaralı ve "*Asetaminofen ile Oluşturulan Karaciğer Hasarında Borik Asit'in Vaskülarizasyon ve Rejenerasyon Üzerine Etkisinin Histolojik Olarak İncelenmesi ve Üç Boyutlu Modellenmesi*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-21.025 and entitled "*Histological Investigation and Three Dimensional Modeling of the Boric Acid Effects on Vascularization and Regeneration in Acetaminophen-Induced Liver Injury*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

Hayvan Türü : Sıçan Sprague Dawley
Hayvan Sayısı : 35

Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ
Kurul Başkanı

Ek:1 Liste

EK-1. (devam) Deney Hayvanları Etik Kurul Onay Belgesi

GAZİ ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM LİSTESİ
--

TOPLANTI TARİHİ : 16/04/2021	TOPLANTI SAYISI : 03
ADI-SOYADI	İMZA
Prof.Dr.Abdulkadir BEDİRLİ (Başkan)	
Doç.Dr.Mürşide Ayşe DEMİREL (Başkan Yrd.)	
Prof.Dr.Suna ÖMEROĞLU	
Prof.Dr.Tuncay PEKER	
Prof.Dr.Fatma AKAR	
Prof.Dr.Emin Ümit BAĞRIAÇIK	
Prof.Dr.Mecit Orhan ULUDAĞ	
Doç.Dr.Emre BARIŞ	
Doç.Dr.İpek SÜNTAR	
Doç.Dr.Neşet Volkan ASAR	
Öğr.Gör.Dr.Şeyda DİKER	
Öğr.Gör.Dr.Burcu EKİM	
Vet.Hek.Burcu AVCI	
Osman İÇ	

EK-2. Deneý Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu Sertifikası



**XIX. DENEY HAYVANLARI
UYGULAMA VE ETİK KURSU**
23-31 Mayıs 2016
KATILIM SERTİFİKASI

Sayın, Müşerref Seyma CİYHAN

Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul onayı ile Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi tarafından, 23-31 Mayıs 2016 tarihleri arasında düzenlenen “*Deneý Hayvanları Uygulama ve Etik Kurs XIX*” a katılarak, Teorik ve Pratik Eğitimleri başarı ile tamamlamış ve bu sertifikayı almaya hak kazanmıştır.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : CEYHAN, Müşerref Şeyma
Uyruğu : T.C.

Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet Yılı
Doktora	Gazi Üniversitesi / Histoloji-Embriyoloji Ana Bilim Dalı	Devam ediyor
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi / Histoloji-Embriyoloji Ana Bilim Dalı	2018
Yüksek Lisans	Orta Doğu Teknik Üniversitesi / Biyoloji	2014
Lisans	Orta Doğu Teknik Üniversitesi / Biyoloji	2011
Lise	Lüleburgaz Anadolu Lisesi	2006

İş Deneyimi, Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
2015-Devam ediyor	Gazi Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

Uluslararası Yayınlar

1. **Ceyhan, MŞ.**, Ömeroğlu, S., and Yığman, Z., (2024). A General Overview of Mesenchymal Stem Cell Therapies in Drug- and Chemical- Induced Liver Injury Models Gazi Medical Journal, vol.35, no.2, 212-221.
2. Osmanlıoğlu Ş, Arslan M, Dağ RO, Yığman Z, **Ceyhan MŞ**, Er F, Kavutçu M. Artemisinin reduces acute ovarian ischemia-reperfusion injury in rats. *Reprod Toxicol.* 2023 Aug;119:108417. doi: 10.1016/j.reprotox.2023.108417. Epub 2023 May 30. PMID: 37263547.

3. Enayat S, **Şeyma Ceyhan M**, Taşkoparan B, Stefek M, Banerjee S. CHNQ, a novel 2-Chloro-1,4-naphthoquinone derivative of quercetin, induces oxidative stress and autophagy both in vitro and in vivo. *Arch Biochem Biophys*. 2016 Apr 15;596:84-98. doi: 10.1016/j.abb.2016.03.004. Epub 2016 Mar 4. PMID: 26946942.
4. Bounaama A, Enayat S, **Ceyhan MS**, Moulahoum H, Djerdjouri B, Banerjee S. Ethanollic Extract of Bark from *Salix aegyptiaca* Ameliorates 1,2-dimethylhydrazine-induced Colon Carcinogenesis in Mice by Reducing Oxidative Stress. *Nutr Cancer*. 2016;68(3):495-506. doi: 10.1080/01635581.2016.1152379. PMID: 27093594.
5. Soltesova Prnova M, Majekova M, Milackova I, Díez-Dacal B, Pérez-Sala D, **Ceyhan MS**, Banerjee S, Stefek M. [5-(Benzyloxy)-1H-indol-1-yl]acetic acid, an aldose reductase inhibitor and PPAR γ ligand. *Acta Biochim Pol*. 2015;62(3):523-8. doi: 10.18388/abp.2014_953. Epub 2015 Sep 8. PMID: 26345091.
6. Enayat S, **Ceyhan MŞ**, Başaran AA, Gürsel M, Banerjee S. Anticarcinogenic effects of the ethanollic extract of *Salix aegyptiaca* in colon cancer cells: involvement of Akt/PKB and MAPK pathways. *Nutr Cancer*. 2013;65(7):1045-58. doi: 10.1080/01635581.2013.850966. Epub 2013 Oct 29. PMID: 24168160.

Ulusal Yayınlar

1. Erişgin, Z., Atasever, M., Ceyhan, M. S., Ömeroğlu, S., and Çetinkaya, K. (2020). Protective effect of nigella sativa oil on carboplatin induced nephrotoxicity in rats. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 21(3), 236-243.

Kongreler ve Seminerler

Sözlü Sunumlar

1. Türkoğlu İ., Demirel M.A., Peker T.V., **Ceyhan M.Ş.**, Ömeroğlu S. Investigation of Effect of Quercetin on Structural and Vascular Changes in Experimental Ovarian Hyperstimulation Syndrome Model. 7th International Conference on Medical & Health Sciences, 6-8 July, 2023 Ordu, Turkey
2. Enayat S, **Ceyhan S.M**, Başaran A, Gürsel M and Banerjee S. Anticarcinogenic effects of the ethanollic extract of *Salix aegyptiaca* and its active fractions in colon cancer cells: involvement of PI3K/AKT and MAPK pathways. 10th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, ISOPS10, 26 Jun -29 Jun, 2012 Ankara, Turkey.
3. Enayat S, **Ceyhan S.M**, Başaran A, Gürsel M and Banerjee S. Anticarcinogenic effects of the ethanollic extract of *Salix aegyptiaca* and its active fractions in colon cancer cells: involvement of PI3K/AKT and MAPK pathways. EMBO Young Scientist Forum, 14 Jun- 16 Jun, 2012 Istanbul, Turkey.

Poster Bildirileri

1. **Müşerref Şeyma Ceyhan**, Suna Ömeroğlu, Deniz Karcaaltıncaba, Tuncay Peker, Saadet Özen Akarca Dizakar, İsmail Türkoğlu, Sreeparna Banerjee. Tip-2 Ve Gestasyonel Diyabetli Gebe Plasentalarının Trofoblast Gelişimi, Anjiyogenezis Yönünden Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi. 1. Uluslararası Sağlık Bilimleri ve Yaşam Kongresi (IHSLC 2018) 02-05 Mayıs 2018, Burdur.
2. Sinem Tunçer, İsmail Çimen, Ayşe Keskus, Alper Duranel, Özlen Konu, **M. Şeyma Ceyhan**, Melis Çolakoğlu, Caner Yener, Sreeparna Banerjee. 15-Lipoxygenase-1 expression inhibits angiogenesis in colorectal cancer cell lines. 14th International Conference on Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Related Diseases, July 12-15, 2015, Budapest, Hungary. Travel award given to Sinem Tunçer.

Eğitimler

3. Deneysel İskemi/Reperfüzyon Modelleri Kursu
19. Deneysel Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu

Hobiler

Kitap, Pilates, Yürüyüş.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..