

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

SİKLOFOSFAMİD İLE OLUŞTURULMUŞ
KARACİĞER HASARI ÜZERİNE
VİTAMİN D₃'ÜN ETKİLERİ

Yüksek Lisans Tezi

Abdulsamet EFDAL

2014

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans standartlarına uygun bulunmuştur.



Prof. Dr. İ. Enver OZAN

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı

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

Prof. Dr. Neriman ÇOLAKOĞLU



Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri



Prof. Dr. İ. Enver OZAN

Prof. Dr. Neriman ÇOLAKOĞLU

Doç. Dr. Oğuz ÖZÇELİK

İTHAF SAYFASI

Canım Eşim ve Biricik Kızıma ...

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tez konumun seçimi, yürütülmesi ve değerlendirilmesinde tecrübelerinden yararlandığım değerli danışman hocam Prof. Dr. Neriman ÇOLAKOĞLU 'na,

Eğitimim süresince beni yönlendiren, manevi desteğini esirgemeyen Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İbrahim Enver OZAN 'a,

Bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım diğer değerli hocalarım; Prof. Dr. Leyla CANPOLAT KOYUTÜRK 'e ve Doç. Dr. Dürrin Özlem DABAK'a

Tezimin her aşamasında desteğini gördüğüm, deneyiminden ve bilgisinden faydalandığım Fırat Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan saygıdeğer hocalarım; Yrd. Doç. Dr. Tuncay KULOĞLU'na ve Yrd. Doç. Dr. Nevin KOCAMAN'a,

Tezime sağladığı finansmandan ötürü Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (FÜBAP) 'ne,

Manevi desteğini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
İTHAF SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
TABLolar LİSTESİ	ix
KISALTMALAR LİSTESİ	x
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
3.1. Karaciğer Anatomisi	5
3.1.1. Karaciğerin Lobları	6
3.1.2. Bağları	7
3.1.3. Arterleri	7
3.1.4. Venleri	8
3.1.5. Lenf Drenajı	8
3.1.6. Sinirleri	9
3.2. Karaciğerin Fizyolojisi	9
3.2.1. Karaciğerin Damar ve Lenf Sistemleri	11
3.2.2. Karaciğer Kütlesinin Düzenlenmesi - Yenilenmesi	12
3.2.3. Karaciğerin Makrofaj Sistemi - Karaciğerin Kan Temizleme İşlevi	13
3.2.4. Karaciğerin Metabolik İşlevleri	14
3.2.4.1. Karbonhidrat Metabolizması	14
3.2.4.2. Yağ Metabolizması	15
3.2.4.3. Protein Metabolizması	15
3.2.5. Karaciğerin Diğer Metabolik İşlevleri	15
3.2.5.1. Vitaminlerin Depo Edilmesi	15
3.2.5.2. Karaciğerin Demiri Ferritin Şeklinde Depolaması	16
3.2.6. Kan Pıhtılaşması ile Karaciğerin İlişkisi	16

3.2.7. İlaçların, Hormonların ve Diğer Maddelerin Karaciğer Tarafından Uzaklaştırılması	16
3.3. Karaciğerin Embriyolojisi	17
3.3.1. Karaciğer ve Peritonla İlişkisi	18
3.3.2. Fetal Karaciğerin İşlevi	19
3.4. Karaciğerin Histolojisi	19
3.4.1. Stroma	20
3.4.2. Karaciğer Lobülü	20
3.4.3. Karaciğer Asinüsünün Yapısı ve İşlevi	22
3.4.4. Karaciğer Hücresi (Hepatosit)	24
3.4.5. Hepatositlerin İnce Yapısı ve İşlevi	26
3.4.6. Karaciğer Sinüzoidlerinin İnce Yapısı	28
3.4.7. Disse Aralığının İnce Yapısı	29
3.4.8. Karaciğer Parankiminin Histolojik Yerleşimi	30
3.4.9. Glisson Kapsülünün Histolojisi	31
3.4.10. Portal Triadlardaki Kan ve Safra Akımı	32
3.4.11. Portal Yolun (Trakt) ve Santral Venin Histolojisi	33
3.4.12. Safra Kanaliküllerinin İnce Yapısı ve İşlevi	33
3.5. Siklofosfamid	35
3.5.1. Yapısı ve Özellikleri	35
3.5.2. Siklofosfamid Metabolizması	37
3.6. Oksidatif Stres	40
3.7. Antioksidan Mekanizmalar	41
3.8. Vitamin D	42
3.8.1. 1,25(OH)2D'nin Etkisi	45
4. GEREÇ VE YÖNTEM	48
4.1. Deney Hayvanları	48
4.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneysel Uygulamalar	49
4.3. Histolojik Çalışma	50
4.4. TUNEL Metodu	51
5. BULGULAR	54
5.1. Histolojik Bulgular	54

6. TARTIŞMA	66
7. KAYNAKLAR	75
8. ÖZGEÇMİŞ	84

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Karaciğerin alttan görünümü	7
Şekil 2. Karaciğer lobülünün yapılanması	21
Şekil 3. Karaciğer lobülünün histolojik sınıflandırılması	22
Şekil 4. Karaciğer lobülünün fonksiyonel sınıflandırılması	23
Şekil 5. Karaciğerdeki kan ve safra akış yönleri	29
Şekil 6. Siklofosfamid metabolizması	37
Şekil 7. Oksidatif Stres	40
Şekil 8. Antioksidan Savunma Sistemleri	41
Şekil 9. D vitamininin sentez ve metabolizması	43
Şekil 10. Kontrol grubu. Portal alan (kalın ok), sinüzoidler (ince ok) ve hepatositler (yıldız) normal yapıda izlenmekte. H & E X 400	55
Şekil 11. Kontrol grubu. Periportal alandaki hepatositlerin glikojen içeriği (ok). Periodic Acid Schiff x 200	56
Şekil 12. Kontrol grubu. TUNEL pozitif Kupffer hücresi (ok). TUNEL X 400	56
Şekil 13. Siklofosfamid grubu. Mononükleer hücre infiltrasyonu (siyah ok), hepatositlerdeki inklüzyon cisimcikleri (kırmızı ok). H & E X 400	57
Şekil 14. Siklofosfamid grubu. Periportal alandaki hepatositlerde makroveziküler yağlanma (ok). H & E X 400	57
Şekil 15. Siklofosfamid grubu. Periportal alanda yer alan nekroze alan (ok). H & E X 400	58
Şekil 16. Siklofosfamid grubu. Periportal alandaki heterokromatik çekirdekli hepatositler (ok). Masson Trichrome X 200	58
Şekil 17. Siklofosfamid grubu. Heterokromatik çekirdekli hepatositler (ok), bağ dokusu artışı ve hemoraji (yıldız). Masson Trichrome X 200	59
Şekil 18. Siklofosfamid grubu. Periportal alandaki sinüzoidal dilatasyon ve konjesyon (ok) ayırt edilmekte. Masson Trichrome X 200	59
Şekil 19. Siklofosfamid grubu. Periportal alanda yer alan hepatositlerdeki glikojen depolarının tükendiği gözlenmekte. Periodic Acid Schiff X 200	60
Şekil 20. Siklofosfamid grubu. TUNEL pozitif endotel hücresi (kırmızı ok) ve hepatositler (siyah ok). TUNEL X 400	60

Şekil 21. Siklofosfamid grubu. Sinüzoidlerde yer alan Kupffer hücrelerinde (a) ve v. santralis etrafındaki hepatositlerdeki (b) TUNEL pozitiflik (ok) ayırt edilmekte. TUNEL X 400	61
Şekil 22. Siklofosfamid grubu. Hepatositlerdeki (a,b) TUNEL pozitiflik (ok). TUNEL X 400	61
Şekil 23. Siklofosfamid grubu. Vasküler konjesyon (yıldız). H & E X 200	62
Şekil 24. Siklofosfamid + vitamin D ₃ grubu. Hepatositlerdeki glikojen içeriği. Periodic Acid Schiff X 200	62
Şekil 25. Siklofosfamid + vitamin D ₃ grubu. V. santralis etrafındaki hepatositlerde (siyah ok) ve sinüzoidlerde yer alan Kupffer hücreesindeki (kırmızı ok) TUNEL pozitiflik. TUNEL X 400	63
Şekil 26. Siklofosfamid + vitamin D ₃ grubu. TUNEL pozitif hücre (ok). TUNEL X 400	63
Şekil 27. Vitamin D ₃ grubu. Portal alan, hepatositler ve sinüzoidlerde yer alan Kupffer ve endotel hücreleri normal yapıda ayırt edilmekte. Masson Trichrome X 400	64
Şekil 28. Vitamin D ₃ grubu. Periportal alanda yer alan sinüzoidlerdeki Kupffer hücrelerinin TUNEL pozitifliği (ok). TUNEL X 400	64

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Deney hayvanlarına verilen sıçan yeminin terkihi	49
Tablo 2. Histolojik takip serileri	51
Tablo 3. TUNEL boyama prosedürü	53
Tablo 4. TUNEL boyanma yaygınlığının derecesi	65

KISALTMALAR LİSTESİ

AST	: Aspartat aminotransferaz
ALT	: Alanin aminotrasferaz
ALP	: Alkalen fosfataz
ATP	: Adenozin trifosfat
CAT	: Katalaz
CML	: N-Karboksimetil lizini
DAB	: Diaminobenzidin
DER	: Düz yüzlü endoplazmik retikulum
DM	: Diyabetes mellitus
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
G6PD	: Glikoz-6-fosfat dehidrogenaz
GPx	: Glutatyon peroksidaz
GR	: Glutatyon redüktaz
GSH	: Glutatyon
GST	: Glutatyon S-Transferaz
H&E	: Hematoksilen – Eozin
HBF	: Hepatosit büyüme faktörü
HDL	: Yüksek dansiteli lipoproteinler
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
İ.p	: İntraperitoneal
LDH	: Laktat dehidrojenaz
LDL	: Düşük dansiteli lipoproteinler
MDA	: Malondialdehid

NOS	: Nitrik oksit sentaz
PAS	: Periyodik Asit Schiff
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PTH	: Parathormon
RANK	: Receptor activator of NF-kappaB
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif oksijen türevleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
TNF	: Tümör nekrozis faktör
TUNEL	: Terminal deoxynucleotidyl transpherase- mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick-end labelling
UV	: Ultraviyole
VDR	: Vitamin D reseptörü
VLDL	: Çok düşük dansiteli lipoproteinler

1. ÖZET

Kanser hastaları için kemoterapötik bir ilaç olan siklofosfamid, aynı zamanda organ transplantasyonlarında immünosupresant olarak kullanılmaktadır. Siklofosfamid ayrıca romatoid artrit, sistemik lupus eritematozus ve multipl skleroz hastalıklarının tedavisinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Siklofosfamidin de içinde yer aldığı antikanser ilaçlar, terapötik etkinliklerinin yanı sıra çeşitli organlarda oluşturdukları toksisiteden dolayı ciddi yan etkilere yol açmaktadırlar. Biz bu deneysel araştırmada, siklofosfamidin karaciğerde oluşturduğu yapısal hasarı, vitamin D₃'ün oksidatif stresi azaltarak, bu hasarı önleyip önleyemeyeceğini belirlemeyi amaçladık.

Bu amaçla çalışmada 24 adet Wistar-Albino cinsi erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar; kontrol grubu (Grup I), intraperitoneal (i.p) olarak 200 mg/kg tek doz siklofosfamid uygulanan grup (Grup II), i.p olarak 200 mg/kg tek doz siklofosfamid ile birlikte 7 gün boyunca oral gavajla 50 IU/kg/gün vitamin D₃ uygulanan grup (Grup III) ve 7 gün boyunca oral gavajla 50 IU/kg/gün vitamin D₃ uygulanan grup (Grup IV) olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Denekler 7 günün sonunda anestezi altında servikal dekapitasyon yoluyla ötenazi edildi. Ötenaziden hemen sonra hızlıca batin açılarak karaciğer rezeke edildi. Çıkarılan karaciğer dokuları histokimyasal ve TUNEL teknikleri ile incelenmek için hazırlandı. Çalışmanın bulguları Olympus BH2 fotomikroskopta incelenip fotoğraflandı.

Siklofosfamide maruz kalan sıçanların doku kesitlerinde, mononükleer hücre infiltrasyonu, inklüzyon cisimcikleri, heterokromatik çekirdekli hepatositler, bağ dokusu artışı, hemoraji ve vasküler konjesyon gözlemlendi. Periportal alanda makroveziküler yağlanma, sinüzoidal dilatasyon ve vasküler

konjesyon ile birlikte hepatositlerdeki glikojen depolarının tükenmesi ayırt edildi. Siklofosfamid ile birlikte vitamin D₃ uygulanan grupta ise hepatositlerdeki glikojen içeriğinin siklofosfamid grubuna göre daha belirgin olduğu fakat vasküler konjesyonun devam ettiği gözlemlendi.

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamasının ışık mikroskopunda incelenmesi sonucunda grup II'de endotelial hücrelerin, Kupffer hücrelerinin ve v. santralis etrafındaki hepatositlerin +3 pozitiflik gösterdiği saptandı. Grup III'te ise bu hücrelerin TUNEL pozitifliği +2 yaygınlığında ayırt edildi.

Sonuç olarak siklofosfamid ile oluşturulan karaciğer hasarına karşı vitamin D₃'ün profilaktik olarak kullanılabileceği gözlemlendi. Böylece siklofosfamid tedavisi gerektiren hastalıklarda ortaya çıkabilecek yan etkiler azaltılabilir.

Anahtar Kelimeler: Siklofosfamid, Karaciğer Hasarı, Vitamin D₃, TUNEL

2. ABSTRACT

EFFECTS OF VITAMIN D₃ ON LIVER DAMAGE INDUCED BY CYCLOPHOSPHAMIDE

Cyclophosphamide is used as chemotherapeutic drug for patients with cancer, but also has been used as immunosuppressant in organ transplantations. Moreover cyclophosphamide has been widely used in the treatment of rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and multiple sclerosis too. Anticancer drugs including cyclophosphamide, despite to therapeutic efficacy leads to adverse side effects in various organs due to their toxicity. In this experimental research we aimed to determined liver damage induced by cyclophosphamide and whether vitamin D₃ has capability to prevent structural injury of liver by reducing oxidative stress or not.

Twenty-four male Wistar-Albino rats were used in this study. Rats were divided into four groups. Group I was used as control, rats in group II were injected 200 mg/kg single dose cyclophosphamide intraperitoneally (i.p) whereas rats in group III were injected 200 mg/kg single dose cyclophosphamide plus oral 50IU/kg/day vitamin D₃ for 7 days. Rats in the group IV were administred orally 50IU/kg/day vitamin D₃ for 7 days. At the end of the experiment, all animals were killed by decapitation under the anesthesia and their livers were removed. Liver tissues were prepared for analysis of histochemical and TUNEL techniques. Results of study examined and photographed in Olympus BH2 photomicroscope.

Tissue sections of rats exposed with cyclophosphamide had mononuclear cell infiltration, inclusion bodies and condensed nuclei in the

hepatocytes, increased connective tissue, haemorrhage and vascular congestion. Moreover in the periportal areas macrovesicular steatosis, sinusoidal dilatation, vascular congestion and depletion of glycogen stores were observed. However, those histopathological changes were reduced with the coadministration of cyclophosphamide and vitamin D₃. Glycogen contents of hepatocytes were more evident but vascular congestion was also prominent in this group.

TUNEL stained sections examined under light microscope. The endothelial cells, Kupffer cells and hepatocytes around the v. centralis of group II had TUNEL positive (+3). TUNEL positivity (+2) of Kupffer cells and hepatocytes around the v. centralis and endothelial cells were reduced by vitamin D₃ in the group III.

In conclusion, vitamin D₃ can be used a prophylactic supplement due to its protection capability against cyclophosphamide-induced liver damage. Thus, adverse side effects may be reduced in diseases that require cyclophosphamide treatment.

Key Words: Cyclophosphamide, Liver Damage, Vitamin D₃, TUNEL

3. GİRİŞ

3.1. Karaciğer Anatomisi

Vücuttaki en büyük bez olan karaciğer, karın boşluğunun üst tarafında, regio hypochondriaca (hypochondrium) dextra'nın tümünü, regio epigastrica'nın (epigastrium) büyük bir kısmını doldurur. Regio hypochondriaca sinistra'da ise linea medioclavicularis sinistra'ya kadar uzanır. 25-30 cm uzunluğunda olan karaciğerin sağ tarafı ön-arka yönde 14-16 cm, yüksekliği ise 8 cm kadardır. Karaciğer erkeklerde 1400 ila 1800 gr, kadınlarda ise 1200 ila 1400 gr kadardır.

Karaciğerin facies diaphragmatica ve facies visceralis olmak üzere iki yüzü vardır:

1) Facies diaphragmatica: Büyük olan bu yüz diafragma ile komşudur ve baktığı yönler göre bölümlere ayrılır.

Pars superior, facies diaphragmatica'nın üst kısmıdır. Bu yüz diafragma kubbesi aracılığı ile sağ tarafta pleura ve akciğerle, sol tarafta da pericardium ve kalp ile komşudur.

Pars anterior, karaciğerin diafragmatik yüzünün ön bölümüdür. Bu bölüm sağ tarafta 6.-10. kaburgalar ile sol tarafta ise 7.-8. kaburgalarla komşudur.

Pars posterior, sağ tarafta geniş ve künt, sol tarafta ise dardır. Orta kısmı omur gövdeleri üzerine oturduğu için konkavdır.

Pars dextra, diafragmatik yüzün peritonla örtülü sağ kısmıdır. Bu bölüm diafragma aracılığı ile kaburgalarla komşudur (1).

2) Facies visceralis: Karaciğerin karın organları ile komşu olan konkav alt yüzüne facies visceralis denilir. Bu yüz arkaya, aşağıya ve biraz da sol tarafa bakar. Tespit edilerek çıkarılmış karaciğerin visseral yüzünde, komşu olduğu

organların izleri bulunur. Bu yüzün ortalarında porta hepatis denilen büyük bir geçit bulunur. Porta hepatis'ten v. portae hepatis ve etrafındaki sinir ağı ile birlikte a. hepatica propria'nın dalları girer, safra kanalları ile lenf damarları da çıkarlar.

Karaciğerin arka ve alt olmak üzere iki kenarı vardır:

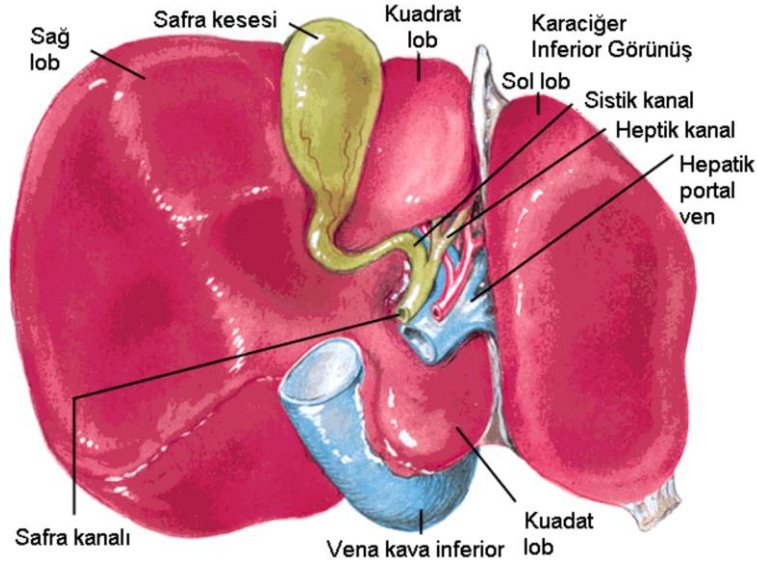
1) Arka kenar, facies visceralis ile facies diaphragmatica arasında arka tarafta oluşan kenardır.

2) Alt kenar, facies visceralis ile facies diaphragmatica arasında ön, kısmen de yan tarafta oluşan kenardır (1).

3.1.1. Karaciğerin Lobları

Karaciğer, içinde safra kesesi ve vena cava inferior'un olduğu çukurlar ile sağ ve sol loblara ayrılır. Lobus hepatis dexter büyük ama tek bir lobdur, lobus hepatis sinister ise daha küçüktür ve lobus quadratus ve lobus caudatus'u da içine alır:

- Lobus quadratus visseral yüzün üst kısmında görülür ve sol taraftan fissura ligamenti teretis, sağ taraftan fossa vesicae biliaris ile çevrilidir.
- Lobus caudatus visseral yüzün alt kısmında görülür ve sağ taraftan da sulcus venae cavae ile çevrilidir (2).



Şekil 1. Karaciğerin alttan görünümü (3)

3.1.2. Bağları

Karaciğer diafragmanın alt yüzüne ve karın ön duvarına 6 bağ aracılığı ile tutunur. Bunlardan beşi (lig. falciforme hepatis, lig. coronarium, lig. hepatorenale, lig. triangulare dextrum ve lig. triangulare sinistrum) peritoneumun oluşturduğu bağlardır. Birisi de (lig. teres hepatis) embriyolojik v. umbilicalis'in kapanması ile oluşan bağdır. Karaciğer ayrıca peritoneal bir yapı olan omentum minus (lig. hepatogastricum ve lig. hepatoduodenale) aracılığı ile mide ve duodenuma bağlanır (1).

3.1.3. Arterleri

Karaciğeri a. hepatica propria besler. Bu arter, truncus coeliacus'un bir dalı olan a. hepatica propria'nın bir dalıdır. Lig. hepatoduodenale içinde v. portae hepatis ve ductus choledochus ile birlikte uzanan bu arter, porta hepatis'e gelince

ramus dexter ve ramus sinister olmak üzere iki dala ayrılır. V. portae hepatis'in dalları ile birlikte karaciğerde dağılır.

3.1.4. Venleri

Karaciğerin v. portae hepatis ve vv. hepaticae olmak üzere iki grup veni vardır. V. portae hepatis, v. mesenterica superior ile v. linealis'in birleşmesiyle oluşur. A. hepatica propria ile birlikte lig. hepatoduodenale içinde uzanarak porta hepatis'e gelir. Karaciğerde a. hepatica propria'nın dalları ile birlikte uzanır ve sonunda, beraber seyrettiği arterle birlikte v. centralis'e açılır. V. centralis'ler birleşerek v. hepatica'ları oluştururlar. Bu venler porta hepatis'ten giren kanları v. cava inferior'a taşırlar (1).

3.1.5. Lenf Drenajı

Karaciğerin derinlerinden gelen lenf damarlarının çoğu porta hepatis'e gelerek buradaki nodi lymphatici hepatici'ye açılırlar. Bunların bir kısmı da safra kesesi boynunun etrafındaki nodus cysticus ile foramen bursa omentalis çevresindeki lenf nodüllerine (nodus foraminalis) açılır. Nodi lymphatici hepatici'den çıkan lenf damarları da nodi lymphatici coeliaci'den geçerek ductus thoracicus'a açılırlar. Derin lenf damarlarının bir kısmı v. hepaticae'yi takip ederek diafragmadaki foramen venae cavae'ye gelirler. Bu lenf damarları nodi lymphatici phrenici superiores'e, buradan da nodi lymphatici parasternales'e açılırlar. Karaciğerin yüzeysel lenf damarlarının çoğu porta hepatis'e giden derin lenf damarları ile birleşerek nodi lymphatici hepatici'ye, daha sonra da nodi lymphatici coeliaci'ye açılırlar. Area nuda'dan kaynaklanan lenf damarları,

diafragmaya geçer. Önde sternumun hemen yanından, arkada ise foramen venae cavae'den göğüs boşluğuna geçerek nodi lymphatici phrenici superiores, nodi lymphatici mediastinales anteriores ve posteriores'e açılırlar. Buralardan çıkan lenf damarları da truncus lymphaticus dexter ve ductus thoracicus' a açılırlar.

3.1.6. Sinirleri

Sempatikleri nn. slanchnici'den, parasempatikleri ise sağ ve sol n. vagus'tan gelir. Bu lifler önce plexus coeliacus'u oluştururlar. Buradan çıkan lifler a. hepatica propria ve v. portae hepatis etrafında plexus hepaticus adı altında karaciğere gider. Hepatik damarlarda sadece sempatik liflerin bulunduğu, buna karşılık safra kanalları ve safra kesesinde ise her ikisinin de bulunduğu belirtilmektedir. Sensitif lifler, sempatik liflerle birlikte uzanır ve 8.-11. torakal medulla spinalis segmentlerine gider. Karaciğeri örten peritonda sağ n. phrenicus'un dalları dağılır (1).

3.2. Karaciğerin Fizyolojisi

Karaciğerin önemli bir işlevi, gastrointestinal kanaldan gelen kan ile vücudun diğer kısmında kalan kan arasında filtre görevi yapmaktır (4). Karaciğerin işlevsel birimi birkaç milimetre uzunluğunda 0,8-2 mm çapında ve silindirik yapıda olan karaciğer lobülüdür. İnsan karaciğerinde 50.000-100.000 adet lobül bulunur (5).

Karaciğer lobülleri, hepatik venlere, oradan da vena kavaya boşalan bir santral venden etrafa doğru uzanan hepatik hücresel plaklardan yapılıdır. Her bir hepatik plak genellikle iki hücre kalınlığındadır. Komşu hücreler arasında bulunan

küçük safra kanalcıkları, komşu karaciğer lobüllerini ayıran fibröz bölmeler içindeki safra kanallarına dökülür.

Bölmeler içindeki küçük portal venüller, portal venler yolu ile gastrointestinal kanaldan ayrılan venlerden kanlanırlar. Kan, bu venüllerden hepatik plaklar arasında dallanarak uzanan yassı hepatik sinüzoidlere, oradan da santral vene dökülür. Böylece, karaciğer hücreleri sürekli olarak portal venöz kana maruz kalırlar. İnterlobüler septalarda hepatik arteriyoller de yer almaktadır. Bu arteriyoller komşu lobüller arasındaki septal dokuların arteriyel kanını sağlarlar ve çoğu kez interlobüler septadan lobülün uzunluğunun üçte biri kadar bir uzaklıkta doğrudan hepatik sinüzoidlere boşaltılırlar.

Venöz sinüzoidler tipik endotel hücreleri ve büyük Kupffer hücreleri (retiküloendotelyal hücre de denir) olmak üzere iki tip hücre ile döşelidir. Bir makrofaj tipi olan Kupffer hücreleri hepatik sinüs kanındaki bakteri ve diğer yabancı maddeleri fagosit ederler. Sinüzoidleri çevreleyen endotel hücrelerinde hemen hemen 1 mikron çapında çok geniş porlar bulunur.

Bu tabakanın altında, endotel hücreleriyle karaciğer hücreleri arasında çok dar bir doku aralığı vardır ve bu aralığa aynı zamanda perisinüzoidal aralık olarak da bilinen Disse aralığı adı verilir. İnterlobüler septalarda, milyonlarca Disse aralığı lenfatik damarlara bağlanır. Bu sayede, bu aralardaki sıvının fazlası lenfatik damarlar yardımıyla uzaklaştırılır. Endotelin büyük porları nedeniyle plazmadaki maddeler serbestçe Disse aralığına geçebilir. Hatta plazma proteinlerinin büyük bölümleri de bu aralığa serbestçe diffüze olabilir (5).

3.2.1. Karaciğerin Damar ve Lenf Sistemleri

Karaciğere kan, portal ven ve hepatik arter yoluyla ulaşır. Karaciğerde kan akımı yüksek, vasküler direnç düşüktür. Karaciğere yaklaşık olarak dakikada 1050 ml kan portal ven yoluyla gelir ve sinüzoidlere dökülür. Buna ek olarak dakikada 300 ml kan hepatik arter yoluyla gelir ve böylece toplam kan hacmi 1350 ml/dak'ya ulaşır. Bu miktar kalp debisinin % 27'sini oluşturur (5).

İnsanlarda portal venöz basınç normalde yaklaşık 10 mmHg ve hepatik venöz basınç da 5 mmHg'dır. Sinüzoidlerde birleşen hepatik arter dallarında ortalama basınç yaklaşık 90 mmHg'dır, ancak sinüzoidlerdeki basınç, portal venöz basınçtan düşüktür, böylece hepatik arteriyoller boyunca belirgin bir basınç düşüşü oluşur. Bu basınç düşüşü, hepatik arteriyel kan akımı ile portal venöz kan akımı arasında ters bir ilişki olacak şekilde ayarlanmıştır (4).

Karaciğerin parankim hücreleri tahrip olduğunda, bunların yerini fibrotik doku alır. Fibroz doku kan damarlarını daraltır ve portal vende kan akımını azaltır. Bu hastalık durumu karaciğer sirozu olarak bilinir. Sıklıkla alkolizme bağlıdır (5).

Karaciğer genişleyebilen bir organ olduğu için, kendi kan damarlarında büyük miktarlarda kan depolayabilir. Hepatik venlerdeki ve hepatik sinüslerdeki kan ile birlikte karaciğer normal kan volümü 450 mm yani yaklaşık olarak vücudun toplam kan hacminin % 10'u kadardır. Sağ atriyumda basınç yükseldiği zaman karaciğerde de basınç artar ve karaciğer genişleyerek 0,5 ile 1 litre daha fazla kan çok az olarak hepatik venler ve sinüslerde depo edilir. Bu, özellikle periferik konjesyonlu kalp yetmezliğinde meydana gelir. Aslında, karaciğer kan hacmi azaldığında ek kan sağlama yeteneği olan ve kan hacmi aşırı şekilde arttığında ise

önemli bir kan deposu olarak görev yapabilen büyük, genişleyebilen bir venöz organdır.

Hepatik sinüzoidlerin porları çok geçirgen olduğundan hem sıvı, hem de proteinler Disse aralıklarına kolayca geçebilirler. Karaciğerden gelen lenf yaklaşık 6 gr/dl protein içerir ve bu da plazmadaki protein konsantrasyonundan biraz düşüktür. Ayrıca karaciğer sinüzoid epitelinin aşırı permabilitesi, çok fazla miktarda lenf oluşumuna yol açar. Böylece dinlenme koşullarında, vücutta oluşan lenfin yaklaşık yarısı karaciğerden kaynaklanmaktadır.

3.2.2. Karaciğer Kütlesinin Düzenlenmesi - Yenilenmesi

Hasarlı olan bölge viral enfeksiyon ya da inflamasyon ile karşılaşmadığı sürece, kısmi hepatektomi veya akut karaciğer hasarından sonra anlamlı hepatik doku kaybı olduğunda, karaciğer kendi kendini olağanüstü bir şekilde yenileme yeteneğine sahiptir. Karaciğerin % 70'nin çıkarıldığı kısmi hepatektomi sonrası kalan lobların büyüyerek karaciğerin orjinal boyutuna gelmesini sağladığı bilinmektedir. Bu yeniden oluşum, olağanüstü bir şekilde hızlıdır ve sıçanlarda 5-7 gün arasında gerçekleşir. Karaciğerin yeniden oluşumu sırasında, hepatositlerin bir veya iki kez bölündüğü tahmin edilmektedir ve karaciğer özgün boyutuna ulaştığında hepatositler eski sakin haline dönerler (5).

Karaciğerin bu hızlı yeniden oluşumunun kontrolü henüz tam anlaşılmamıştır, fakat hepatosit büyüme faktörü (HBF) karaciğer hücresinin bölünmesine ve büyümesine yol açan önemli bir faktör olarak görülmektedir. HBF hepatositler tarafından değil, karaciğer ve diğer dokulardaki mezenkimal hücreler tarafından üretilir. Kısmi hepatektomiden sonra HBF'nin kan seviyeleri

20 kattan daha fazla yükselir, fakat mitojenik cevaplar bu operasyonlardan sonra genellikle sadece karaciğerde vardır; HBF'nin sadece etkilenmiş organda aktif hale gelebileceği ileri sürülmektedir. Diğer büyüme faktörleri, özellikle epidermal büyüme faktörü, tümör nekrozis faktör (TNF) ve interlökin-6 gibi sitokinler karaciğer hücrelerinin yenilenmesini uyarmada yer alabilir.

Karaciğer normal boyutuna döndükten sonra hepatik hücre bölünmesi sona erer. Karaciğer hücre çoğalmasında hepatik hücreler tarafından salgılanan bir sitokin olan transforme edici büyüme faktörünün güçlü bir baskılayıcı olmasına rağmen, henüz karaciğer yenilenmesindeki faktörler tam olarak anlaşılmamaktadır.

Fizyolojik deneyler, karaciğer büyümesinin vücut büyüklüğü ile ilgili bilinmeyen bazı sinyallerle hassas şekilde düzenlendiğini, bu şekilde en uygun metabolik işlev için uygun olan karaciğer-vücut oranının korunduğunu göstermektedir. Fibrozis, inflamasyon ya da viral enfeksiyonlarla ilişkili karaciğer hastalıklarında ise karaciğerin yeniden oluşum süreci ciddi bir şekilde hasar görür ve karaciğer işlevi bozulur.

3.2.3. Karaciğerin Makrofaj Sistemi - Karaciğerin Kan Temizleme İşlevi

Barsak kapillerlerinden akan kan, barsaklardan birçok bakteriyi de beraberinde götürür. Gerçekten de, karaciğere girmeden önce portal venlerdeki kan örneğinden kültür yapıldığı zaman hemen hemen daima kolon basili ürer. Oysa sistemik dolaşımdaki kanda kolon basili üremesi son derece nadirdir (5).

Hepatik venöz sinüslerde yer alan, büyük fagositik makrofajlar olan Kupffer hücrelerinin hızlandırılmış özgül video filmleri, bu hücrelerin sinüsler içinden geçen kanı son derece etkili bir şekilde temizleyebildiklerini göstermiştir. Bakteriler Kupffer hücrelerine temas ettiği zaman, 0,01 saniyeden daha az sürede Kupffer hücrelerinin duvarından içeriye girerek sindirilinceye kadar orada tutulur. Barsaklardan portal kana girerek karaciğer içinden geçip sistemik dolaşıma ulaşmayı başaran bakterilerin sayısı muhtemelen % 1'den fazla değildir.

3.2.4. Karaciğerin Metabolik İşlevleri

Karaciğer hücreleri çok yüksek bir metabolizma hızına sahip kimyasal aktif bir havuz oluştururlar. Burada çeşitli metabolik sistemler, substrat ve enerjilerini paylaşırlar. Vücudun diğer bölgelerine taşınacak birçok madde sentez edilir, işlenir ve diğer birçok metabolik işlev yürütülür (5).

3.2.4.1. Karbonhidrat Metabolizması

Karaciğer glikoz tampon işlevi olarak da adlandırılan aşırı glikozu kandan çekmek ve gerektiğinde kana geri vermek yoluyla yemekten sonraki dönemlerde kan glikoz düzeylerinin stabilitesinin düzenlenmesinde temel rol oynamaktadır (4). Karbonhidrat metabolizmasında karaciğer şu işlevleri yürütür: Büyük miktarlarda glikojen depolama, galaktoz ve fruktozu glikoza çevirme, glikoneogenezis, karbonhidrat metabolizmasının ara ürünlerinden birçok önemli kimyasal maddelerin oluşturulmasıdır (5).

3.2.4.2. Yağ Metabolizması

Yağ metabolizması vücuttaki bütün hücrelerde yürütülmesine rağmen, bu metabolizmanın bazı işlemleri başlıca karaciğerde yapılmaktadır. Karaciğerin yağ metabolizmasındaki özgül görevleri şöyle özetlenebilir: Diğer vücut işlevleri için enerji sağlamak üzere yağ asitlerinin oksidasyonu, büyük miktarda kolesterol, fosfolipit ve lipoprotein sentezi, karbonhidrat ve proteinlerden yağ sentezidir.

3.2.4.3. Protein Metabolizması

Vücut, karaciğerin protein metabolizmasına katkısı olmaksızın, ancak birkaç gün ölmeden dayanabilir. Karaciğerin protein metabolizmasındaki başlıca işlevleri şöyle sıralanabilir: Aminoasitlerin deaminasyonu, üre oluşumu ile amonyağın vücut sıvılarından uzaklaştırılması, plazma proteinlerinin oluşumu, vücuttaki metabolik olaylar için önemli aminoasitlerin ve öteki maddelerin birbirine dönüşümleridir.

3.2.5. Karaciğerin Diğer Metabolik İşlevleri

3.2.5.1. Vitaminlerin Depo Edilmesi

Karaciğerin vitaminleri depo etme özelliği vardır. Hastaları tedavi etmede karaciğerin iyi bir vitamin kaynağı olduğu uzun süreden beri bilinmektedir. Karaciğerde en fazla depo edilen A vitamini dir. Ancak, normal olarak büyük miktarda D vitamini ve B₁₂ vitamini de depo edilir. Karaciğer, A vitamini eksikliğini on ay gibi uzun bir süre önlemeye yetecek kadar, A vitamini depo edebilir. D vitamini eksikliğini üç-dört ay önleyecek kadar, B₁₂ vitaminini ise en az bir yıl ya da daha uzun bir süre eksikliği önleyecek kadar depo edebilir (5).

3.2.5.2. Karaciğerin Demiri Ferritin Şeklinde Depolaması

Vücutta, kandaki hemoglobinde bulunan demir dışında, demirin en büyük bölümü normalde karaciğerde ferritin şeklinde depo edilir. Karaciğer hücrelerinde, demirle az ya da çok miktarlarda birleşebilen bir protein olan apoferritin bol miktarda bulunur. Böylece, vücut sıvılarında demir miktarı arttığı zaman, apoferritinle birleşerek ferritini oluşturur ve gerektiğinde başka bir yerde kullanılmak üzere hepatik hücrelerde saklanır. Dolaşımdaki vücut sıvılarında demir düşük bir düzeye indiğinde ferritin, demiri serbestletir. Böylece, karaciğerdeki apoferritin-ferritin sistemi bir demir deposu görevi yaptığı gibi, kan demirinin tamponu işlevini de yürütür.

3.2.6. Kan Pıhtılaşması ile Karaciğerin İlişkisi

Karaciğerde yapılan ve pıhtılaşma işleminde kullanılan maddeler; fibrinojen, protrombin, akselerator globülin, faktör VII ve birçok diğer önemli koagülasyon faktörleridir. Karaciğerde protrombin, faktör VII, IX ve X'un oluşumundaki metabolik olaylar K vitamini gerektirir. K vitamini yokluğunda bu maddelerin konsantrasyonu çok düştüğünden pıhtılaşma hemen hemen tamamen ortadan kalkar (5).

3.2.7. İlaçların, Hormonların ve Diğer Maddelerin Karaciğer Tarafından Uzaklaştırılması

Karaciğer çok sayıda detoksifikasyon ve atılma reaksiyonlarına katılır. Bu işlemlerin en önemli iki tanesi amonyak ve etanolün uzaklaştırılmasıdır ve çeşitli biyotransformasyonlara da aracılık eder (6). Karaciğerdeki aktif kimyasal ortamın

sulfonamid, penisilin, ampisilin ve eritromisin gibi çeşitli ilaçları zehirsizleştirerek safra ile vücuttan uzaklaştırdığı iyi bilinmektedir. Aynı şekilde iç salgı bezlerinden salgılanan östrojen, kortizol, aldosteron gibi tüm steroid hormonlar ve tiroksin de karaciğer tarafından ya kimyasal olarak değiştirilir ya da atılır. Böylece karaciğer harabiyetinde, çok defa bu hormonlardan birinin ya da birçoğunun vücut sıvılarında birikmesi, hormonal sistemin aşırı faaliyetine yol açar.

Son olarak, vücuttan atılan kalsiyum da önce karaciğerden safraya salgılanır, daha sonra barsağa geçerek dışkıyla uzaklaştırılır (5).

3.3. Karaciğerin Embriyolojisi

Karaciğer, safra kesesi ve safra kanalı sistemi 4. haftada ön barsağın kaudal kısmından ventral bir çıkıntı şeklinde (hepatik çıkıntı) oluşmaya başlar. Hepatik çıkıntı gelişmekte olan kalp ve orta barsak arasında yer alan splanknik mezoderm kitlesi olarak septum transversum içerisine doğru uzar. Hepatik çıkıntı genişler ve ventral mezogastriumun tabakaları arasında büyümesine devam ederken, ventral mezogastriumu iki kısma ayırır: Geniş olan ve hepatik çıkıntının kraniyal kısmında yer alan kısım karaciğerin öncü yapısı (primordium) olarak adlandırılır (7). Hepatik divertikül veya karaciğer tomurcuğu olarak bilinen bu oluşum, perikard boşluğu ve yolk kesesi sapı arasında yer alan septum transversumu penetre eden hızlı proliferasyon gösteren hücre dizilerinden meydana gelir. Bu hücreler septumu delmeye devam ederken, hepatik divertikül ile duodenum arasındaki bağlantı daralarak safra kanallarını oluşturur (8). Sayıca artan endodermal hücreler birbirine geçmiş şekilde hepatosit plaklarını ve safra apparatusunun intrahepatik kısmının epitelyum örtüsünü oluştururlar. Hepatosit

kordonları, karaciğer sinüzoidlerinin öncü yapısı olan endotel ile döşeli boşlukların çevresinde anastomoz yaparlar (7). Safra kanalının ventral yüzünden küçük bir ventral çıkıntı safra kesesi ve sistik kanal haline gelir. Gelişimin daha sonraki dönemlerinde, epitelyal karaciğer kordonları vitellin ve umbilikal venlere karışarak hepatik sinüzoidleri meydana getirir. Karaciğer kordonları parankim içine farklanarak, safra kanallarını döşer. Hemopoietik hücreler, Kupffer hücreleri ve bağ dokusu hücreleri septum transversum mezoderminden türer (8).

3.3.1. Karaciğer ve Peritonla İlişkisi

Gösterdiği hızlı ve sürekli büyüme nedeniyle, karaciğer bir süre sonra septum transversum sınırları içine sığmayacak boyuta erişir ve karın boşluğuna doğru taşmaya başlar. Karın ön duvarı ile karaciğer arasında yer alan septum mezodermi gerilir, incilir ve falsiform ligament olarak bilinen membranı oluşturur. Başlangıçta septum transversum mezodermi içinde yer alan umbilikal ven artık, falsiform ligamentin kaudal kenarı boyunca uzanır. Benzer şekilde, karaciğer ve ön barsak (mide ve duodenum) arasındaki septum mezodermi de gerilir, membranöz bir yapı haline gelir ve küçük omentum (gastrohepatik ve duodenohepatik ligamentler) adını alır. Küçük omentum ve falsiform ligament birlikte, önbarsakla karın ön duvarı arasındaki peritoneal bağlantıyı meydana getirmeleri nedeniyle de ventral mezogastrium adını alır. Küçük omentum serbest kenarı boyunca safra kanalları, portal ven ve hepatik arter uzanır. Karaciğer yüzeyindeki mezoderm farklanarak, üst yüzdeki küçük bir alan dışında visseral periton haline gelir. Bu alanda karaciğer orjinal septum transversum ile ilişkisini devam ettirir. Bu kısımda yer alan septum, yoğun bir mezenşimal doku halindedir.

Bu bölgeye temas eden karaciğer yüzeyi peritonla hiçbir zaman örtülmez ve karaciğerin çıplak bölgesi olarak bilinir.

3.3.2. Fetal Karaciğerin İşlevi

Karaciğerin ağırlığı intrauterin yaşamın 10. haftasında, toplam vücut ağırlığının % 10'u kadardır. Organın ağırlığındaki bu fazlalık, kısmen sinüzoid sayısının yüksekliğine atfedilirse de, bir önemli etken de hemopoietik faaliyettir. Bu dönemde hepatik hücrelerle damar duvarları arasında beyaz ve kırmızı kürelerin üretildiği, proliferasyonla karakterize geniş bir hücre ağı olduğu görülür. Hemopoietik aktivite gebeliğin son iki ayna kadar yavaş yavaş azalır ve geride ancak birkaç hemopoietik hücre adası kalır. Doğumda, karaciğerin ağırlığı artık toplam vücut ağırlığının % 5'i kadardır.

Karaciğerin bir başka önemli işlevi de 12. haftadan itibaren hepatik hücrelerin safra üretmeye başlamasıdır. Bu sırada, safra kesesi ve sistik kanal da oluşmuş; sistik kanal hepatik kanalla birleşerek koledok kanalını meydana getirmiş ve üretilen safra, barsağa akabilme imkanı bulmuş olur (8).

3.4. Karaciğerin Histolojisi

Karaciğer ekzokrin ve endokrin sekresyon yapan bir organdır. Gerekli olan maddeler ihtiyaç durumunda gerekli yerlere gönderilmek üzere depolanır. Zararlı ürünler detoksifiye edilerek zararsızlaştırılır. Karaciğer, depoladığı maddeleri gerektiğinde kan dolaşımına salgıladığından dolayı endokrin bir organ olarak, ürettiği safrayı kanallar aracılığı ile duodenuma akıttığından dolayı da ekzokrin bir organ olarak kabul edilir (9).

3.4.1. Stroma

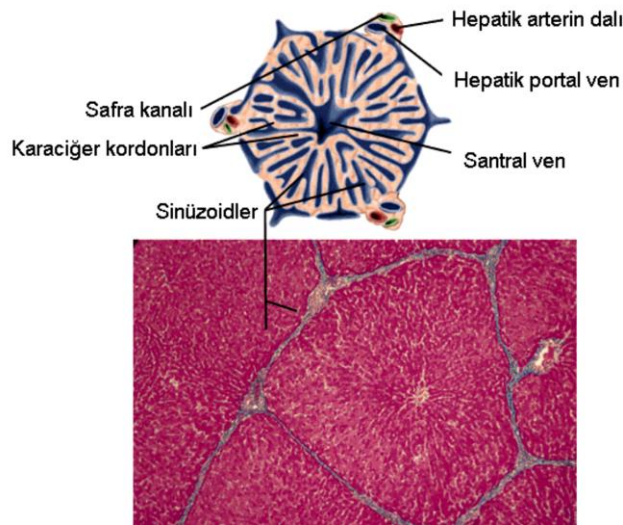
Karaciğer, hilumda kalınlaşan ince bir bağ dokusu kapsülü olan Glisson kapsülü ile örtülüdür. Hilumda, organa portal ven ve hepatik arter girer, sağ ve sol hepatik kanallar ve lenfatikler çıkar. Bu damarlar ve kanallar, klasik karaciğer lobülleri arasında sonlandıkları (ya da orjin aldıkları) portal alanlara dek bağ dokusu ile çevrilmiştir. Bu noktadan itibaren karaciğer lobüllerindeki hepatositlere ve sinüzoidal endotel hücrelerine destek sağlayan ince bir retiküler lif ağı oluşur (10).

3.4.2. Karaciğer Lobülü

Karaciğerin yapısal ve fonksiyonel birimleri karaciğer lobülleridir. Fonksiyonel olarak üç farklı karaciğer lobülü tanımlanmıştır. Geleneksel olarak en çok kullanılan tanım klasik karaciğer lobülüdür (9). Klasik karaciğer lobülü, $0,7 \times 2$ mm boyutlarında olan ve çevresinde portal aralıklar (portal boşluk) ile ortasında santral ya da santralobüler ven bulunan poligonal bir doku kitlesinden oluşur. Portal aralıklar lobüllerin köşelerinde yer alır ve bağ dokusu, safra kanalları, lenf damarları, sinirler ve kan damarları içerir (10). Hepatik arterin ve portal venin dalları, bir safra kanalı beraberliğinde, hekzagonal karaciğer lobülünü çevreleyen portal alanda yer alan klasik portal triadı oluşturmaktadır (11). İnsan karaciğer lobülünde 3-6 portal alan bulunur ve her bir portal alanda bir venül (portal venin bir dalı); bir arteriyol (hepatik arterin bir dalı); bir kanal (safra kanalı sisteminin bir parçası) ve lenfatik damarlar bulunur. Venül, superior ve inferior mezenterik venler ile dalak veninden gelen kanı içerir. Arteriyoldeki kan abdominal aortun çölyak dalından gelir. Kübik epitelle örtülü olan kanal,

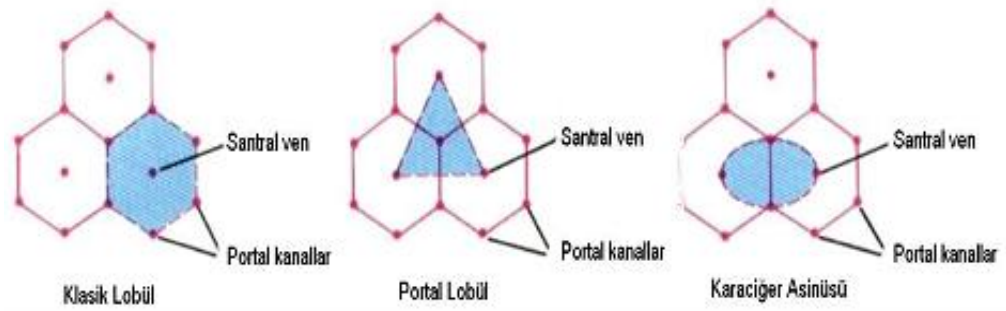
parankimdeki hücrelerden (hepatositler) gelen safrayı taşır ve sonunda hepatik kanal içine boşaltır. Lenf, bir ya da daha fazla lenfatikle taşınır ve sonuçta kan dolaşımına geçer. Bu yapıların hepsi bir bağ dokusu kılıfı içinde bulunur. Bazı hayvanlarda (örn. Domuz), lopçuklar birbirlerinden bir bağ dokusu tabakası ile ayrılır. İnsanda bu söz konusu değildir; lobüller birbirleri ile yakın temasta oldukları için, kesin sınırlarını belirlemek oldukça güçtür.

Karaciğer lobülü içindeki hepatositler ışınsal olarak dizilmiş ve hücreler bir duvarın tuğlalarına benzer biçimde düzenlenmiştir. Bu hücre plakları lobülün periferinden merkezine doğru yönlenmişlerdir. Labirent şeklinde ve sünger benzeri bir yapı oluşturacak biçimde anastomozlaşırlar. Bu plaklar arasındaki boşlukta karaciğer sinüzoidleri adı verilen kapillerler bulunur. Sinüzoidal kapillerler sadece kesintili pencereci endotel tabakasından oluşan düzensiz olarak genişlemiş damarlardır (10). Lobülün periferinin son sırasındaki hepatositler ile bağ dokusu elemanları arasında kalan dar mesafeye Mall mesafesi denir. Bu alanın karaciğer lenfinin kaynaklandığı alanlardan biri olduğu düşünülmektedir (9).



Şekil 2. Karaciğer lobülünün yapılanması (12).

Portal lobül ise üç santral ven arasında yer alan üçgen şekilli alandır. Ortada portal alan bulunur. Bu lobülün tanımlanması karaciğerin ekzokrin fonksiyonunu vurgulamak için uygundur. Bilindiği gibi hepatositlerde üretilen safra, karaciğerin ekzokrin ürünlerinden biridir. Safra kanalikülleri ve safra kanalları aracılığı ile duodenuma atılır (9).

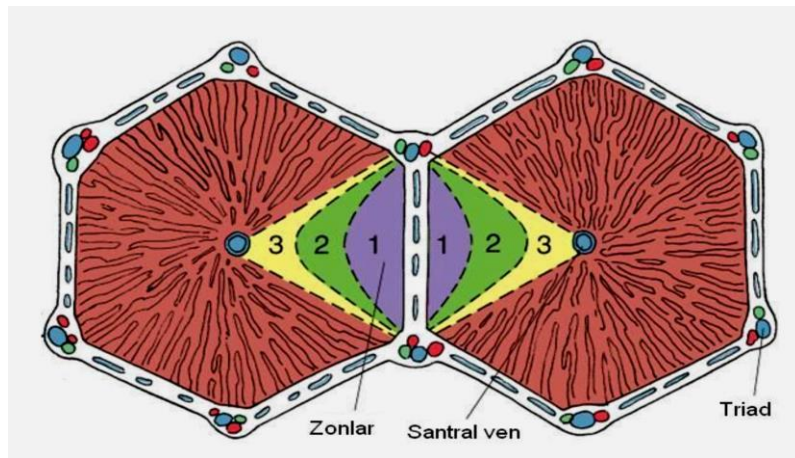


Şekil 3. Karaciğer lobülünün histolojik sınıflandırılması (3)

3.4.3. Karaciğer Asinüsünün Yapısı ve İşlevi

Karaciğer lobül yapısının bir diğer kavramı da, karaciğer parankiminin portal venin uç dallarından ve hepatik arterden beslenmesiyle bağlantılı olarak tanımlanan ve oval-elmas şekline sahip sahalar olan karaciğer asinüsleridir. Klasik karaciğer lobülüne göre daha küçüktürler ve daha zor görülürler fakat, işlevsel ve klinik yönlerden kullanışlılardır. Çünkü çoğu hastalıkta görülen metabolik ve patolojik değişiklikler, en iyi bu yapılar üzerinden açıklanmaktadır. Bir karaciğer asinüsünün kısa eksen, iki klasik karaciğer lobülünün sınırları arasında uzanırken, uzun eksen ise iki santral ven arasında kısa eksene en yakın sanal bir çizgidir. Asinüsteki hepatositler, kısa eksenin etrafında yer alan ve aynı merkezden dışa doğru yerleşime sahip (konsantrik) eliptik zonlardır. En içte yer alan zon 1 (birinci bölge), portal venülün ve hepatik arteriyolün uç dallarına en yakın yerleşime

sahiptir. Bu bölge kandaki oksijenin ve besin maddelerinin ilk alındığı yer olup, hepatositlerdeki glikojen ve plazma proteini üretiminin en fazla olduğu kısımdır (13). Ayrıca en önce rejenere olan ve en son ölen hücreler bu alanda bulunur. Safra kanalı tıkanıklıklarından en çabuk etkilenip morfolojik değişikliklere uğrayan hücreler de bu bölgedeki hücrelerdir (9). Zon 3 (üçüncü bölge) damar uçlarından en uzak pozisyonda olup, zon 2 (ikinci bölge) birinci ve üçüncü bölgelerin arasında yer alır (13). İkinci zon karaciğer asinüsünün santral bölgesidir. Santral vene, 1. zondaki hücrelere oranla daha yakındırlar. Üçüncü zon klasik karaciğer lobülünün santral bölgesine uyar. Bu zonun hücreleri santral vene komşudur (9). Bu üç bölgede yer alan çoğu karaciğer enzimi için, metabolik etkinlik derecesi vardır. Üçüncü bölge daha az oksijen almaktadır. Metabolizmanın değişmesi durumunda iskemik nekrozun ve yağ birikiminin ilk görülmeye başladığı yerdir. İlaç ve alkol detoksifikasyon alanıdır (13). Üçüncü zondaki hücreler iskemiden çabuk etkilenir. Bu hücrelerde yağ birikimi de erken ortaya çıkar. Toksik etkilerden ve safra kanal tıkanıklarından en geç etkilenen hücrelerdir. Farklı zonlar arasında hücrelerin organel, enzim aktivitesi ve glikojen biriktirme kapasiteleri açısından farklılıklar vardır (9).



Şekil 4. Karaciğer lobülünün fonksiyonel sınıflandırılması (14)

3.4.4. Karaciğer Hücresi (Hepatosit)

Hepatosit, bir hepatik lobülün fonksiyonel olan ekzokrin ve endokrin hücresidir (11). Hepatositler, santral venden periferine doğru ilerleyen ışınal hücre kordonları şeklinde dizilmiş poligonal şekilli ökromatik nükleuslu hücrelerdir (9). Genellikle merkezde yerleşik tek çekirdeğe sahiptirler fakat iki ve çok çekirdekli hücrelere de sıklıkla rastlanmaktadır ve hücrelerin yaklaşık % 20 kadarı iki çekirdekli. Çoğunlukla, ribozomal ribonükleik asit (RNA) yapımında görev alan bir veya daha fazla sayıda çekirdekçikleri vardır (13). Hematoksilen eozinle (H&E) boyanmış kesitlerde, çok sayıda mitokondri ve bir miktar düz endoplazmik retikulumun bulunması nedeniyle hepatositin sitoplazması eozinofiliktir. Portal triadlardan farklı uzaklıklarda bulunan hepatositler, yapısal, histokimyasal ve biyokimyasal farklılıklar gösterir (10).

Bir karaciğer epitel hücresinin üç işlevsel yüzeyi vardır: İki komşu hepatositin birbirine bakan yan yüzlerindeki oluklardan safra kanaliküllerinin meydana geldiği bir kanaliküler yüzey, Disse aralığına bakan mikrovilluslarla kaplı bir sinüzoidal (emilim işlevli) yüzey ve iki komşu hücrenin birbirlerine temas eden yüzeyinde yer alan tutunma işlevine sahip bir yüzey (13).

Hepatositler metabolik olarak son derece aktif hücrelerdir. Çeşitli patolojik durumlardan, toksik ajanlardan ve iskemiden kolay etkilenirler. Hücreye zarar veren ajanların en önemli hedeflerinden biri membran sistemi olduğundan dolayı membrandan zengin endoplazmik retikulum, mitokondriyon gibi organelleri çabuk zarar görür. Endoplazmik retikulum dilatasyonu, mitokondriyon ödemi, krista kaybı, miyelin figür oluşumu en sık rastlanan organel değişiklikleridir. Hepatositler etkene bağlı olarak apoptoz veya nekrozla ölüme gidebilirler.

Apopitozda membran parçalanması olmaksızın hücreler apopitotik cisim olarak bilinen parçalara bölünürken, nekrozda membranlar parçalanıp sitoplazmik organeller intersellüler alana dökülürler (9).

Bir hepatositin iki adet hücresel bölgesi bulunmaktadır: [1] bir bazolateral bölge ve [2] apikal bölge:

Bazolateral bölge çok sayıda mikrovillus içerir ve yüzü Disse aralığına doğrudur. Disse aralığındaki fazla sıvı, hepatik lobülün dış kısmında bulunan Mall aralığı tarafından toplanır. Birbirine komşu hepatositlerin yan yüzeylerinde bulunan gevşek bağlantı kompleksleri (neksuslar), fonksiyonel açıdan hücreler arası işbirliği sağlamaktadır.

Bazolateral bölge kandan kaynaklanan maddelerin emilimine ve plazma proteinlerinin (albümin, fibrinojen, protrombin ve koagülasyon faktörleri V, VII ve IX gibi) salgılanmasına katkıda bulunur. Hepatositlerin, kan pıhtılaşması için gerekli olan çok sayıda plazma proteinini sentezlediği unutulmamalıdır. Kan pıhtılaşma hastalıkları, karaciğer hastalığı ile ilişkilidir.

Apikal bölge mikrovilluslarla çevrelenmiş bir girinti şeklinde, hepatositin ekzokrin bir ürünü olan safranin dışarı kaçışını önlemek üzere kenarları tıkayıcı bağlantılarla sıkıca kapatılmış olan safra kanalikülünün kenarını çevrelemektedir.

Hepatosit, plazma proteinlerinin sentezinde yer alan kaba endoplazmik retikulumun yanı sıra, glikojen, lipid sentezi ve detoksifikasyon mekanizmaları ile ilişkili olan çok iyi gelişmiş bir yapı şeklinde düzgün yüzeyli endoplazmik retikulum içerir (15).

3.4.5. Hepatositlerin İnce Yapısı ve İşlevi

Hepatosit sitoplazması, işlevsel durumuna bağlı olarak ince yapı ve organel/inklüzyon içeriğine göre belirgin farklılıklar gösterir. Sitoplazmadaki yuvarlak, uzun şekilli, yassı veya tübüler kristaya sahip çok sayıda mitokondriyon, çeşitli hücre işlevlerinde kullanılmak üzere adenosin trifosfat (ATP) sentezler. Serbest ribozomlar ve bol granüllü endoplazmik retikulum yığınları, protein sentezinde görev alır. Çok sayıdaki Golgi kompleksi, tipik olarak safra kanaliküllerine veya çekirdeğe komşu olarak yerleşiktir. Tübüllerin ve sisternaların dallı bir ağı olan belirgin düz yüzlü endoplazmik retikulum (DER), sıklıkla düşük yoğunluklu lipoprotein kürecikleri içermektedir. DER, aynı zamanda ilaç detoksifikasyonu, glikojenin glikoza çevrilmesi ve kolesterol yapımı için de enzimler içermektedir. Sitoplazmada değişik miktarlarda depolanmış olan glikojen, sıklıkla DER'e yakındır. Çeşitli boyutlarda lipit damlacıkları ve sindirim enzimleriyle dolu lizozomlar boldur ve peroksizomlar golgi kompleksine yakındır (13).

Hepatositlerin sitoplazmalarında sıklıkla görülen peroksizomlar, morfolojik ve fonksiyonel olarak mitokondriyonlara benzerlik gösterirler. Mitokondriyonlar gibi oksijen kullanan organellerdir. Oksijen kullanımı oksidazlar aracılığı ile serbest radikal oluşumuna yol açtığından dolayı bu zararlı son ürünlerin de ortadan kaldırılması zorunludur (9). Peroksizomlar, membran ile sarılmış olup, hidrojen peroksit açığa çıkartan yüksek miktarda oksidazlar içermektedir. Hidrojen peroksitin toksik bir metabolit olması nedeni ile, katalaz (CAT) enzimi bu ürünü oksijen ve su açığa çıkartacak şekilde yıkıma uğratar. Bu katalitik olay, hepatositlerde ve böbrek hücrelerinde meydana gelmektedir (15).

Hepatositler, aktif sentez ve sekresyon yapan hücreler olduklarından dolayı organelden zengin olmaları doğaldır. Ökromatik nükleus yapısı da hücre aktivitesinin önemli bir göstergesidir. Agranüler endoplazmik retikulumlar sayesinde zararlı toksik maddelerin detoksifikasyonunu gerçekleştirebilirler. Toksik ürünler veya ilaçların yıkımı ve konjugasyonu için gerekli enzimler, agranüler endoplazmik retikulum membranlarında bulunmaktadır. Toksik ajanlara maruz kalındığında, alkol ve ilaç kullanımı sonrasında agranüler endoplazmik retikulum genişler. Agranüler endoplazmik retikulum, kolesterol ve lipid sentezinden sorumlu enzimleri de içerir.

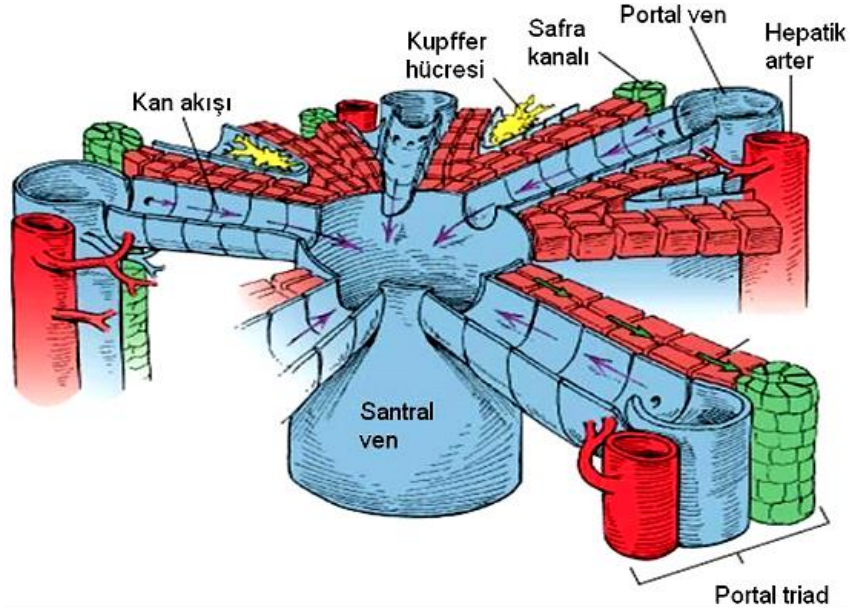
Hepatosit sitoplazmasında onlarca Golgi apparatusu bulunabilir. Bu organelin özellikle safra kanaliküllerine yakın yerleşmesi safra sekresyonunda rolü olduğunu akla getirmektedir. Yer yer granüler endoplazmik retikulum lümeninde görülen granüllere benzer yoğun granüller, Golgi keselerinde de görülmektedir. Bunların çok düşük dansiteli lipoproteinler (VLDL) ve diğer lipid prekürsörleri olduğu düşünülmektedir. VLDL'lerin yapım yeri başlıca karaciğerdir, az miktarda ince barsakta da sentezlenir. VLDL'ler trigliseridleri, karaciğerden diğer organlara taşırlar. Düşük dansiteli lipoproteinler (LDL) ve yüksek dansiteli lipoproteinler (HDL) ise başlıca plazmada üretilirler, az miktarda karaciğerde de sentezleri söz konusudur. LDL'ler kolesterol esterlerini karaciğerden diğer organlara taşırlar. HDL'ler ise aksine kolesterolü periferik organlardan karaciğere taşırlar. HDL oranının yüksek, LDL oranının düşük olması kardiyovasküler hastalık riskini azaltır (9).

3.4.6. Karaciğer Sinüzoidlerinin İnce Yapısı

Sindirim organlarından emilen besin molekülleri ve sıvılar öncelikle sinüzoid olarak adlandırılan karaciğer kapillerlerinden süzülürler (15). Hepatosit kordonları arasında izlenen sinüzoidler düzensiz lümenli kapillerlerdir. Sinüzoidler portal alanda seyreden intralobüler damarlardan kanlanırlar. Barsaklardan ve dalaktan gelen portal venöz kan ve aortadan gelen arteriyel kan sinüzoidlerde karışır (9).

Ortalama çapları 9-15 µm arasında olan karaciğer sinüzoidleri, kılcal damarlardan daha geniş ve düzensiz bir yapıya sahiptir. Son derece ince olan duvarlarında, aralarında Kupffer hücrelerinin yerleşik olduğu yassılaştırmış endotel hücreleri bulunur. Hücreler arasında, yaklaşık 2 µm boşluklar vardır. Endotel hücrelerinde, 100 µm çapında, diyaframsız ve geçirgen fenestralar (pencereler) bulunur. Dış yüzlerinde devam eden bir bazal membrana sahip olmayan bu hücreler, sinüzoid endotelinin toplam yüzey alanının % 6-8'ini meydana getirir. Endotel hücrelerinin lümene doğru uzanan oval şekilli ve koyu görümlü çekirdekleri vardır. Kupffer hücrelerinin çekirdekleriye, daha yuvarlak olup soluk boyanır. Elektron mikroskopisinde, Kupffer hücrelerinin lizozom yönünden zengin oldukları ve bu hücrelerin çok sayıda filopodia (yalancı ince ayaklar) ve endositik veziküle sahip oldukları görülür. Kandaki monositlerden köken alan makrofaj yapısındaki bu fagositik hücreler bakterileri, virüsleri, tümör hücrelerini ve parazitleri etkisizleştirme işlevine sahiptirler. Sitoplazmalarında bol miktarda lizozom, kırmızı kan hücresi parçacıkları ve sindirilen diğer maddeler bulunur. Sinüzoidler, hızlı madde değişiminin sağlanabilmesi için son derece geçirgen yapılardır. Hücreler arasında yer alan boşluklar ve endoteldeki pencereler plazma

proteinlerinin geçişine izin verirken, kan hücreleri ve trombositler bu aralıklardan geçemez. Dar Disse aralıkları, sinüzoidleri etraflarındaki hepatositlerden ayırır (13).



Şekil 5. Karaciğerdeki kan ve safra akış yönleri (16)

3.4.7. Disse Aralığının İnce Yapısı

Sinüzoid duvarının hücreleri ile hepatositlerin sinüzoidde bakan kısmında Disse mesafesi (perisinüzoidal mesafe) olarak bilinen bir aralık bulunur (9). Sinüzoid lümenindeki plazma, endotel hücrelerindeki pencereler ve hücreler arasındaki boşluklar yoluyla Disse aralığıyla iletişim kurar. Böylece, hepatositler plazmayla doğrudan temas sağlar. Hepatositlerle kan arasındaki madde değişim oranını ve yüzey alanını artıran mikrovilluslar, Disse aralığına doğru uzanır. Hepatosit sitoplazmasında, geniş salgılama ve emilim yüzeyine sahip çok sayıda vezikül ve vakuol vardır (13).

Perisinüzoidal alanda yerleşen bir başka hücre tipi liposit veya İto hücresi olarak (yağ depolayan hücre, stellat hücre) isimlendirilen hücrelerdir. Mezenkimal

orjinli olan bu hücreler sitoplazmik lipid damlalarında retinil esterleri şeklinde A vitamini depolarlar. Altın kloridle de belirlenebilen bu hücreler rutin yöntemlerle sitoplazmalarında yer alan lipid damlaları nedeniyle kolay tanınırlar. Bu hücrelerden retinol olarak salınan A vitamini proteinlere bağlanarak retinaya ulaşır. Burada içerdiği 11-cis retinal opsin proteini ile bağlanarak rodopsini oluşturur. Rodopsin görmeyi sağlayan bir retina pigmentidir. Bu hücrelerin ekstrasellüler matriks proteinlerini ve proteoglikanları, büyüme faktörleri ve sitokinleri salgılayabildikleri, prostoglandin ile tromboksan A2 gibi regülatör maddelere cevap olarak sinüzoid lümenin çapını ayarlayabildiği bilinmektedir. Karaciğer hasarını takiben İto hücreleri aktive olur, sitoplazmalarında lipid miktarı zamanla azalır. Hücrelerde proliferasyon, kontraktilite ve kemotaksis görülür. İçerdikleri desmin ve α aktin sayesinde kasılarak sinüzoidin vasküler rezistansını artırır. Bu durum portal hipertansiyonla sonuçlanır. İto hücreleri, kronik inflamasyon veya sirozda myofibroblastlara dönüşerek tip I ve tip III kollajen sentezler. Myofibroblastlardan farklı olarak reelin içermeleri iki hücrenin ayrılmasını sağlar. Reelin ekspresyonu karaciğer hasarını takiben artar. Parankima yerine bağ dokusunun yapımı, fonksiyonel olan bir dokunun yerini fonksiyonel olmayan bir dokunun alması anlamına gelir. Bu durum sirozun en önemli histopatolojik özelliğidir (9).

3.4.8. Karaciğer Parankiminin Histolojik Yerleşimi

Karaciğerin seri kesitlerinden hazırlanan üç boyutlu modelleri, karaciğer parankiminin yerleşimine ve bunun damar ve safra kanalı sistemleriyle olan ilişkisine ışık tutmaktadır. Parankim, birbirleriyle bağlantılı ve bir-iki hücre

kalınlığında olan ve bir binanın duvarlarını andıran tabakaların ağını içerir. Her bir tabakadaki hepatositler bu duvarın tuğlalarına ve karaciğer sinüzoidleri de duvardaki boşluklara benzetilebilir. İnsan karaciğerinde en fazla bir hücre kalınlığındaki tabakalar bulunmakta olup, iki hücre kalınlığındaki tabakalar embriyoda ve yetişkinlerdeki yenilenme sürecinde ortaya çıkmaktadır. Damarların etrafında bulunan ve sinüzoidlerin endotel tabakasını hepatositlerin yüzeyinden ayıran içleri sıvı dolu dar boşluklar – Disse aralığı (veya sinüzoidlerin etrafındaki boşluklar) – elektron mikroskopuyla veya özel ışık mikroskobu teknikleriyle görülebilir. Bu boşluklar, plazmanın sinüzoidlerle hepatosit yüzeyleri arasında çözünebilir madde alışverişine izin verecek şekilde akmasını sağlar. Ayrıca bu yapılar, fetusta ve kronik anemi durumunda ekstramedüller hematopoez (kan yapımı) yerleridir. Karaciğer lenfi bu boşluklardan köken alır ve portal yollardaki küçük lenf damarlarına boşalır (13).

3.4.9. Glisson Kapsülünün Histolojisi

Karaciğer, diyaframa tutunduğu yer hariç fibröz sıkı bağ dokusu yapısında ve 70-100 µm kalınlığında bir kapsülle çevrilidir. Kapsülü, peritona bakan yüzünden seröz mezotel örter. Mezotel, özellikle patojen bakterilerin ve diğer zararlı maddelerin girişine karşı bir kalkan vazifesi görür. Kapsülün yapısında, düzenli olarak sıralanmış kollajen ve elastik lifler vardır. Glisson kapsülü, karaciğere dışarıdan destek vermesinin ve organ şeklini korumasının yanı sıra, az sayıda küçük kan damarına da sahiptir ve karaciğer parankiminin içine uzantılar gönderme yoluyla, destek stromasına katkıda bulunur. Kapsülün devamı, porta hepatis bölgesinden içeriye geçerek kan ve lenf damarlarına, safra kanallarına ve

sinirlere desteklik sağlar. Jel kıvamına sahip olan karaciğer, kısmen kapsülün ince olmasından dolayı kolayca yaralanabilir. Karaciğer yoğun bir şekilde damarlandığı için, hasarlanması sonrasında ağır kanamalar meydana gelebilir. Kapsülün kalınlığı yaşıla birlikte artış gösterir ve bazı hastalıklara cevap olarak yaygın çoğalım geçirebilir. Aynı zamanda parankim zedelenmelerinden sonra stromada artış görülür (13).

3.4.10. Portal Triadlardaki Kan ve Safra Akımı

Karaciğerin bir diğer eşsiz ve mükemmel özelliğiyse, ikili kanlanma sistemidir. Portal ven, besin maddeleri yönünden zengin kanı sindirim kanalından getirir. Karaciğere gelen toplam kanın % 75'ini portal ven sağlar. Hepatik arterlerse, geriye kalan % 25'lik oksijenli kanı temin eder. Karaciğer, dakikada yaklaşık 1,5 lt kan alır ve hacminin en az % 20'sini kan oluşturur. Portal venlerin yaklaşık 300 µm çapında olan uç dalları, düzenli olarak hepatositlerle yakın temasta olan ince duvarlı ve pencereci karaciğer sinüzoidlerine boşalan iç venüllere ayrışır. Hepatik arterlerin portal ven dallarıyla birlikte seyreden uç dalları, venöz ve arteriyel kanların karışımını alan sinüzoid yapılarına dökülen arteriyoller şeklinde sonlanır. Sinüzoidler, uç terminal venül olarak da adlandırılan santral vene doğru uzanır ve her bir lobülün merkezinde buraya boşalır. Bir santral venin çapı 50 µm kadardır. Santral venler, daha geniş olan tekrarlayan şekilde dallanarak yol alan hepatik venlere dönüşen sublobüler venleri meydana getirecek şekilde bir araya gelir. Hepatik venler bir araya gelerek, kanın karaciğerden ana drenaj (akıntı) yolu olan inferior vena kavaya katılır. Kanın ve

safranin lobüller boyunca zıt yönlerde doğru akması, lobül organizasyonu ve hepatosit işlevinin anlaşılması için önemlidir (9).

3.4.11. Portal Yolun (Trakt) ve Santral Venin Histolojisi

Küçük lenfatik damarlar, portal triadın üç bileşenine en uç dallarına kadar eşlik eder. Portal yol olarak da bilinen bağ dokusu stroması, bunların etrafını kuşatır. Hepatik arteriyol, enine kesitte iki veya üç tabakalı düz kas hücrelerine ve göreceli olarak küçük bir lümenine sahiptir. Portal venülün daha geniş ve sıklıkla basık bir lümeni ve daha ince bir duvarı vardır. Safra kanalcıkları tek kanatlı, basit kübik veya prizmatik epitelle döşeli olup hepatositlerin arasındaki ince safra kanalikülleriyle başlar. Bunlar komşu hepatositler arasındaki oyuk benzeri girintilerden meydana gelen hücreler arası küçük kanallar olup, en iyi elektron mikroskopuyla görülür. Kanaliküller her bir lobülün çevresine ulaştıklarında, basit kübik epitelle döşeli olan ve Herring kanalları olarak bilinen küçük kanallara açılır. Bu kanallar, portal yolda yer alan daha büyük safra kanallarına boşalır. Kanallar genişledikçe, lümeni döşeyen prizmatik epitelyum uzamaya başlar. Tipik santral venler, zayıf bir endotel tabakasına sahip ince venüllerdir. Normalde, belirgin bir bağ dokusu stromasına sahip değildir. Her bir santral venin lümeni, birkaç karaciğer sinüzoidinin serbestçe açılabilirdiği çok sayıda girişe sahiptir (9).

3.4.12. Safra Kanaliküllerinin İnce Yapısı ve İşlevi

Safra kanalikülleri, yaklaşık 1 µm çapındaki ilk ve en küçük safra geçiş yollarıdır. Birbirine iki komşu hepatositin zarlarının arasındaki hücreler arası boşluk veya kanaldır. Bu hücreler, kanalikül lümenine safra salgılar. Işık

mikroskobu altında özel boyalarla, enzim histokimyasında ATPaz etkinliğinin tespit edilmesiyle veya elektron mikroskobuyla en iyi şekilde gösterilebilen kanaliküller, karaciğerden dışarıya doğru uzanan bir kesitte grntlendikleri zaman kafes teline benzer bir ađ şeklindedir (13). Hücrelerin arasında zonula okludens, adherens ve desmozomlar bulunur. Hepatosit yüzeyinden kanalikle doğru mikrovilluslar uzanır. Safra kanalikülleri lobülün periferinde yer alan tek katlı kübik epitelyumla döşeli Herring kanalları ile devam eder. Herring kanallarının epitelyum hücrelerinin yüzeyinde de mikrovilluslar bulunur. Bu hücreler de birbirlerine sıkı bağlantı kompleksleri ile bağlanmışlardır. Safra, intralobüler Herring kanalını takiben portal alanlarda yer alan interlobüler safra kanallarına akıtılır. Portal alandaki safra kanalları başlangıçta tek katlı kübik epitelyum ile döşelidir. Kanalın apı arttıkça epiteli tek katlı prizmatik epitele dönüşür. Bu hücreler de mikrovilluslu hücrelerdir. Sağ ve sol hepatik safra kanalının birleşmesi ile oluşan büyük safra kanalı, sistik kanal aracılığıyla safra kesesi ile bağlantı kurar (9).

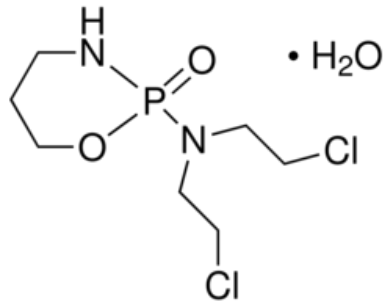
Karaciğeri içi safra kanallarının en küçüklerinin çapları 10 m kadar olup, bu kanallar tek tabakalı kübik epitele sahiptir. Sıkı bağlantılardan ve desmozomlardan meydana gelen bağlantı birimleri, lümen yüzeyine yakındır ve hücreleri birbirine bağlar. Kübik epitelyum hücreleri, olağan organel yapısına ve merkezde yerleşik yuvarlak çekirdeklere sahiptir. Sitoplazmada yer alan çok sayıdaki tonofilamanlardan bazıları desmozomlara, bazılarıysa lümen tarafında yer alan terminal ağa tutunmuş şekildedir. Bu yapılar kasılabilir özellikte olup, kanalikllerdeki peristaltik harekete yardım ederler. Kübik epitelin apikal yüzlerinde, lümene doğru uzanan düzenli ve kısa mikrovillusların yanı sıra seyrek

olarak yerleşik silyumlar vardır. Epitelin bazal yüzeyi, 20-30 µm kalınlığındaki bir bazal zar üzerine oturur. Safra kanalları genişledikçe kanalı döşeyen hücreler daha prizmatik hale gelir ve çekirdekleri bazale doğru kayar. Daha geniş kanallarda, müköz bezler lümen epiteliyle bağlantılıdır. Yoğun kollajen lif demetlerinden meydana gelen bağ dokusu, kanalları kuşatır. Safra kanalları daima portal yollarda bulunur ve damarlara eşlik eder (13).

Kanser terapisi ve bu terapinin ilerlemesi uygun antineoplastik ajanların kullanılmasını içerir. Bu ajanlar kanser hastalarında çok hızlı bir şekilde çoğalan hücrelerin yok edilmesinden ve bu hastalardaki neoplastik dokuların yıkımından sorumludurlar. Fakat bu ajanların tedavi edici özellikleri zayıf olduğu için sağlıklı dokular da zarar görmektedir. Bu nedenle bu ajanların kronik olarak kullanılması çok büyük hasarlar oluşturmakla beraber büyük bir merak konusu olmuştur. Mutajenik potansiyele sahip olan bu antikanser ajanların kontrol altına alınması, genetik materyale olan yıkıcı etkilerinin minimize edilmesine yardımcı olacaktır (17).

3.5. Siklofosfamid

3.5.1. Yapısı ve Özellikleri



Moleküler ağırlığı : 279.10 g/mol

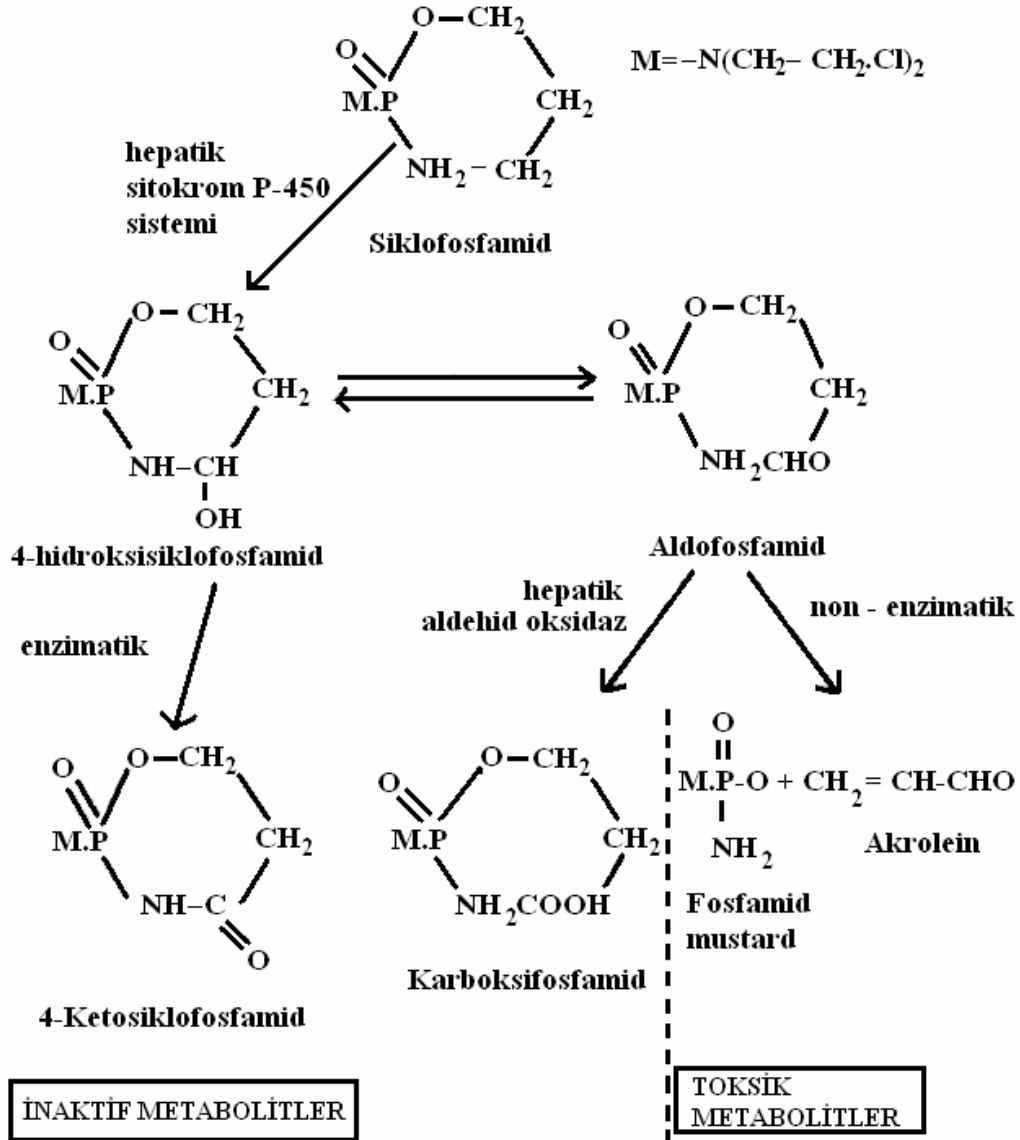
Moleküler formül : $C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P \cdot H_2O$ (18)

Siklofosfamid, nitrojen mustard sınıfında yer alan sitotoksik, bifonksiyonel alkilleyici bir ajan olup, çeşitli malign ve benign tümörlerin tedavisinde kullanılmaktadır (19). Aynı zamanda immünosupresif bir aktiviteye sahip olan siklofosfamid, bu özelliğinden dolayı organ transferleri ve romatoid artrit, multipl skleroz ile sistemik lupus eritematozus gibi otoimmün hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır. Kemoterapide ya tek başına ya da diğer antikanser ilaçlarla bir kombinasyon şeklinde aynı anda veya arka arkaya kullanılabilir (20-22). Siklofosfamid, klinikte geniş spektrumlu kullanılmasına karşın insanlarda ve deney hayvanlarındaki normal hücrelerde şiddetli bir sitotoksisiteye neden olmaktadır (23). Çeşitli tıbbi endikasyonun olduğu durumlarda siklofosfamid kullanılan hastalarda, siklofosfamidin sekonder bir kanseri tetikleme ihtimalinin çok yüksek olduğu belirtilmektedir (24). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı, siklofosfamidi insanlarda kansere zemin hazırlayan kanserojenler içinde sınıflandırmıştır (25). Birçok çalışma, sağlık koruma uzmanlarının siklofosfamide karşı mesleki bir savunmasızlık içinde olduğunu desteklemekte ve siklofosfamidin hızla çoğalan, dermal ve kanserojen etkileri içinde barındıran çeşitli toksisitelere neden olduğunu rapor etmektedir (26). Siklofosfamid miyelosupresyona neden olan kemoterapötik bir ajan olmasına karşın tedavi edici özellikleri de bulunmaktadır. Fakat toksisiteyi de beraberinde getirmektedir (27).

Bir antitümör ilacı olan siklofosfamid, deoksiribonükleik asit (DNA) üzerinde alkilleyici etkiler oluştururken organ transplantasyonları sırasında ise tolerasyon gelişimine yardımcı olur (28-30). Siklofosfamid kullanılması sonucu meydana gelen ürotoksik, nefrotoksik ve kardiyotoksik yan etkiler ile

siklofosfamidin metabolitlerinin oluşturduğu rahatsızlıklardan dolayı siklofosfamidin klinikte kullanımına ciddi bir limit getirilmiştir (31).

3.5.2. Siklofosfamid Metabolizması



Şekil 6. Siklofosfamid metabolizması (32)

Siklofosfamid, karaciğerde hepatik P450 enzimlerinden başlıca sitokrom P450-3A4 ve sitokrom P450-2B6 tarafından fosforamid mustard ve akroleine

metabolize olur. Fosforamid mustardın antikanser aktivitesi vardır fakat akrolein istenmeyen toksik etkiler meydana getirmektedir. Siklofosfamidin en büyük zararlı etkilerinden biri, bir tripeptit olan glutatyon (GSH) seviyesinde azalmaya neden olarak ürotoksisite oluşturmaktadır. Bu zararlı etkinin tedavisinde de kemoprotektif ajan olarak kullanılan çeşitli tiyol grubu elementler kullanılır (33). Akroleinin, doymamış α,β aldehitler gibi tehlikeli kimyasallarda bulunduğu bildirilmektedir. Bu kimyasallar arasında; tütün, otomobil egzozu ve lipid peroksidasyonu sonucu açığa çıkan yanmış hayvan yağları bulunmaktadır. Son zamanlarda yapılan araştırmalar, akroleinin proteinlerle kovalent bağ yaptığını göstermektedir (34, 35). Siklofosfamidin apoptozis, nekroz gibi toksik ve neoplastik etkileri, iki aktif metaboliti olan akrolein ve fosforamid ile bağlantılıdır (36). Bu kimyasal reaktif metabolik ürünler DNA’da ve DNA’nın çapraz bağlarını oluşturan proteinlerde alkilleyici etki oluşturarak sitotoksisite meydana getirmektedir (23, 37). Siklofosfamidin alkilleyici aktiviteleri tümör hücrelerinin DNA’larında terapötik etki yaparlar fakat akrolein oksidatif strese neden olarak normal hücrelerin DNA’larında hasara yol açar ve çeşitli organlarda toksisiteye neden olur. Akrolein hızlıca hücrelere girerek intrasellüler reaktif oksijen türevlerini ve nitrik oksit üretimini aktive eder ve peroksinitrit oluşumuna yol açarak hücrenin yapısında bulunan lipidlerde, proteinlerde ve DNA’da hasara yol açar (38).

Bunun yanı sıra siklofosfamid karbon iyonları üreterek, bu iyonların nükleik asit ve proteinlerin merkezlerindeki elektronlarla tepkimeye girmesine neden olur. Bu tepkimeler de mutasyonlara, DNA hasarlarına, mikronükleus indüklenmesine ve reaktif oksijen türevlerinin (ROS) açığa çıkmasına yol açarlar.

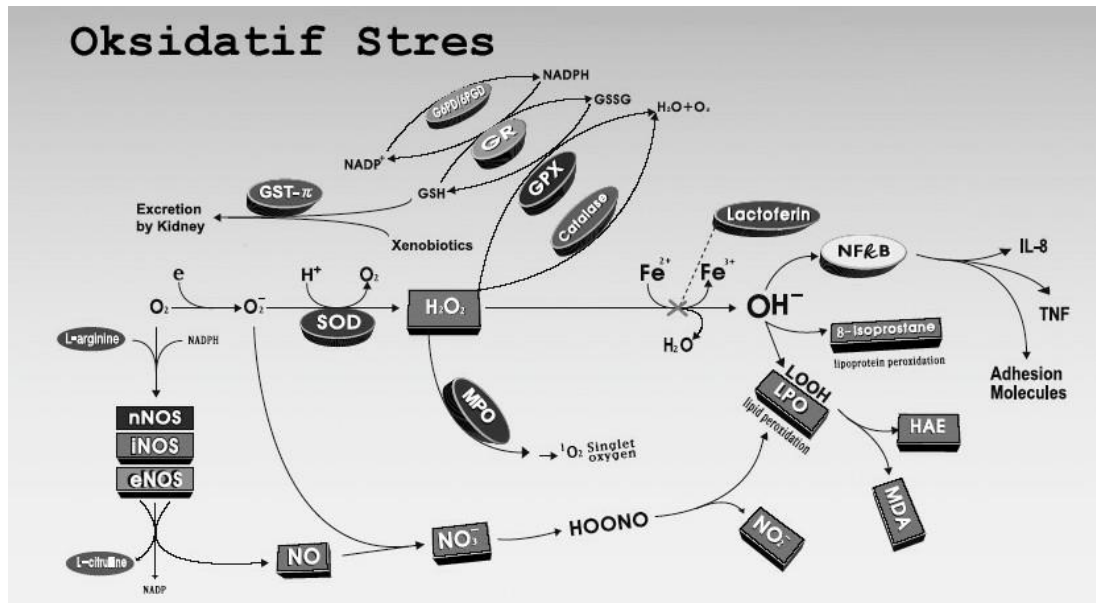
Yüksek reaksiyona sahip olan bu serbest radikaller çeşitli mekanizmalar aracılığıyla hücrel bozukluklara neden olurlar (39). Artmış ROS, DNA hasarına neden olurken aynı zamanda oksidan-antioksidan dengeyi de bozarak hücrel disfonksiyona sebep olurlar (40). ROS'un en zararlı etkisi DNA hasarı sonucu kansere neden olmasıdır (41). Siklofosfamid, malondialdehid (MDA) seviyesinde artışa neden olurken, glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz, CAT gibi enzimlerde ise azalmaya neden olarak hayati organlarda oksidatif hasarlar oluşturmaktadır (42).

Ayrıca inflamatuvar olaylar sırasında makrofaj, nötrofil ve monositlerce oluşturulan ROS, doku hasarının başlamasında ve ilerlemesinde önemli bir role sahiptir. İnflamatuvar hücreler tarafından üretilen ROS; proteinler, yağlar ve nükleik asitler gibi makromoleküllerle reaksiyona girer ve böylelikle oluşan yüksek reaktivitelerden dolayı doku hasarı meydana gelir (43). Siklofosfamid ve metabolitlerinin neden olduğu bu yan etkileri engellemek için vücut, doğal ve elzem antioksidanlarıyla antioksidatif savunmasını artırır. Bu nedenle kemoterapinin neden olduğu toksisiteden sağlıklı doku ve hücreleri korumak için güçlü ajanlara ihtiyaç vardır (44). Çeşitli araştırmalar, kemoterapi sırasında antioksidan girişinin kemoterapiye bağlı meydana gelen reaksiyonların kontrol altına alınabileceğini ve antineoplastik ilaçların yan etkilerinin minimize edilebileceğini göstermiştir (45).

Yapılan çalışmalar, siklofosfamidin antioksidatif aktiviteyi azalttığı ve buna karşın karaciğer hücrelerinde oksidatif stres oluşturduğunu göstermiştir (46).

3.6. Oksidatif Stres

Bir organizmada serbest radikallerin meydana gelme hızı ile ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde olup, bu durum oksidatif denge olarak adlandırılmaktadır. Oksidatif denge olduğu sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin meydana gelmesindeki bir hız artışı ya da ortadan kaldırılma hızında bir aksama olması bu dengenin bozulmasına neden olur. “Oksidatif stres” olarak adlandırılan bu durum özetle; serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasında ciddi anlamda bir dengesizlik olduğunu göstermekte olup sonuçta doku hasarı oluşumuna neden olmaktadır (47). (Şekil 7)



Şekil 7. Oksidatif Stres (48)

3.7. Antioksidan Mekanizmalar

ROS'un oluşumunu ve bunların neden olduğu hasarı engellemek için vücutta bazı savunma mekanizmaları geliştirilmiştir. Bunlar “Antioksidan Savunma Sistemleri” olarak adlandırılmaktadır (49). (Şekil 8)



Şekil 8. Antioksidan Savunma Sistemleri (49)

Oksidatif hasar oluşumunu engelleyen, belli bir noktada durduran ya da kısmen tamir eden moleküllere “antioksidanlar” adı verilir (50). Vücutta, oksidatif stres sonucu meydana gelebilecek hasarları önlemek için antioksidan vitaminler, GSH, antioksidan enzimler ve sülhidrillerden oluşan bir antioksidan savunma sistemi bulunur. Genel olarak antioksidan vitaminler (E vitamini, beta karoten gibi) serbest radikalleri ve tekli oksijeni direkt olarak yakalayarak etkisiz hale getirirler. GSH ve diğer tiyol kaynakları ise hücrel oksidasyon ve redüksiyon sırasında ortaya çıkarlar. Süperoksit dismutaz (SOD), CAT ve GPx gibi antioksidan enzimler serbest oksijen radikallerinin bir elektron redüksiyonunu katalizlerler. Antioksidanlar etkilerini; serbest radikal oluşumunun önlenmesi ya da ortamdan uzaklaştırılması, katalitik metal iyonlarının uzaklaştırılması, O_2^- ,

H₂O₂ gibi bazı serbest oksijen radikallerinin ortamdaki uzaklaştırılması, zincir reaksiyonunun kırılması ve tek oksijen üzerine çöpçü ya da söndürücü etkide bulunulması yolları ile gösterirler.

Antioksidanlar, etki mekanizmalarına veya organizmadaki lokalizasyonlarına göre sınıflandırılabilir (51).

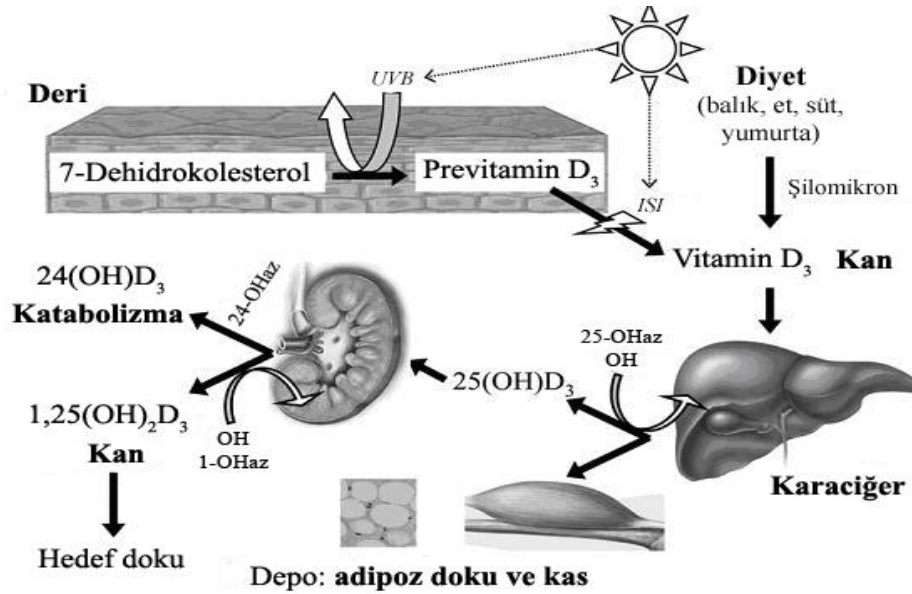
3.8. Vitamin D

Vitamin D ve metabolitlerinin hücre proliferasyonunu azaltarak apoptozisi düzenlediği, malign hücrelerin büyümesini ve çoğalmasını kontrol altında tuttuğu düşünülmektedir. Ayrıca kemik ve kalsiyum metabolizması üzerine etkili olup immün sistemin düzenlenmesinde de rol oynamaktadırlar (52). Vitamin D immünomodülatör etkisini, antijen sunan hücrelerdeki nükleer vitamin D reseptörü ve aktive edilmiş T hücreleri aracılığıyla yapmaktadır (53).

Vitamin D'nin etkileri yalnızca kemik ve mineral metabolizması üzerine olmayıp kardiyovasküler sistemde de etkilidir. Hatta aşırı miktarda vitamin D'nin vasküler kalsifikasyona neden olduğu bildirilmektedir (54). Yakın zamanda yapılan gözleme dayalı çalışmalar, vitamin D'nin damar sağlığı ile bağlantılı olduğunu göstermiştir (55, 56). Bu bulgular kalsemik ve koruyucu olmak üzere vitamin D'nin damarlarda çift yönlü bir etkisinin olduğunu göstermektedir. Fakat vitamin D'nin kardiyovasküler sistem üzerindeki koruyucu etkilerinin mekanizması hala belirsizliğini korumaktadır (57).

Vitamin D'nin 37 tane metaboliti bulunmaktadır ve bunlardan en iyi bilinen iki tanesi vitamin D₃ (kolekalsiferol-C₂₇H₄₄O) ve vitamin D₂'dir (ergokalsiferol-C₂₈H₄₄O) (58) Vitamin D₃ üç adet çift bağa sahip olup erime

noktası 84-85° C'dir. Ultraviyole (UV) absorpsiyonu ise 265 nm'de maksimum seviyededir, suda çözünmez (59). Vitamin D₂ ise dört adet çift bağa sahip olup kaynama noktası 121° C'dir ve UV absorpsiyon ve çözünübilirlik özellikleri vitamin D₃ ile aynıdır (58). Vitamin D ısıya, ışığa ve saklama koşullarına karşı duyarlıdır. Vitamin D₃ hayvansal kaynaklı olup, sentezi UV ışınları ile birlikte deride gerçekleşir. Vitamin D₂ ise bitki ve mantarlarda bulunmaktadır. Vitamin D yan zincirindeki farklılık nedeniyle değişik formlara sahip olmakla beraber biyolojik olarak inaktif haldedir. Vitamin D'nin 25 hidroksivitamin D (25(OH)D) ve 1,25 dihidroksi vitamin D (1 α ,25(OH)₂D) metabolitleri mevcut olup bu metabolitlerden 1 α ,25 dihidroksikolekalsiferol (Vitamin D₃) aktif formda bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar insan vücudunda vitamin D₃'ün vitamin D₂'ye göre daha fazla etkili olduğunu göstermiştir (60, 61).



Şekil 9. D vitamininin sentez ve metabolizması (62)

Streroid bir hormon olan 1,25-dihidroksivitamin D₃, vitamin D'nin biyolojik olarak aktif olan metabolitlerinden biri olup mineral dengesinde önemli

bir role sahiptir. Aynı zamanda immün yanıtın da güçlü modölatörlerindendir (63). Hayvanlarda insülin bağımlı diyabetes mellitus (DM), alerjik ensefalomyelit ile tiroid ve barsak inflamasyonu gibi otoimmün hastalıkların gelişmesini engellediği bir gerçektir (64, 65). Bazı çalışmalar, insanlarda vitamin D alımının, tip 1 diyabet ve romatoid artrit gibi hastalıklara yakalanma riskini azalttığını göstermektedir (66, 67)

Vitamin D₃ ya UV ışınlarının emilmesi ile epidermiste 7-dehidro-kolesterolden üretilir ya da yumurta, balık yağı ve süt gibi yiyeceklerin tüketilmesi ile elde edilir. Vitamin D₃ inaktif formda iken karaciğer ve böbrekte hidroksilasyona uğrayarak aktif hale gelir ve 1,25-dihidroksivitamin D₃ hormonu oluşur. Bu hormonun normal hücrelerin proliferasyonu ve farklılaşmasında güçlü etkileri olduğu gibi malign hücre tiplerinde de çeşitli etkileri bulunmaktadır. İmmün sistemin farklı hücrelerinde 1,25-dihidroksivitamin D₃ reseptörleri bulunmaktadır (68, 69).

Pankreas bezinin β hücreleri, 1,25-dihidroksivitamin D₃ hormonunu ve vitamin bağımlı kalsiyum bağlayan proteinleri aktive eden özel reseptörlere sahiptir (70). Bu sebeptendir ki vitamin D yetersizliğinde insülin salınımında bozukluklar meydana gelirken 1,25-dihidroksivitamin D₃ uygulaması sonucunda insülin salınımında düzelme olduğu rapor edilmektedir (71).

Kalsiyum homeostazının ve kemik metabolizmasının düzenlenmesinde, kalsitriol olarak da bilinen, vitamin D'nin hormonal bir formu olan 1,25-dihidroksivitamin D₃'ün büyük rolünün olduğu kabul edilmektedir. Bunun yanı sıra vitamin D₃'ün çeşitli kanser türlerinin önlenmesinde çok önemli bir yeri olduğu kanıtlarla gösterilmiştir (72, 73). Vitamin D₃'ün kanser önleyici ve

antitümör aktivitelerinin moleküler mekanizması son zamanlardaki yayınlarda kapsamlı bir biçimde ele alınmıştır (74, 75). Vitamin D₃'ün kanser engelleyici özelliklerinden biri, genotoksik ajanlar ile yapılan tedaviler sonucu oluşan DNA hasarına karşın, DNA tamirine yardımcı olmasıdır (76, 77). Bu mekanizma özellikle hücrelerin UV ışınlarına maruz kalması sonucu gözlenir (78). Son zamanlarda gen profilleri üzerinde yapılan çalışmalar, vitamin D₃'ün DNA tamir genlerini indüklediğini rapor etmektedir (79, 80). Vitamin D₃'ün diğer bir kanser engelleyici özelliği ise olası antioksidan aktivitesinden kaynaklanmaktadır. Endojen oksidanlar ve aerobik solunum sonucu oluşan yan ürünlerin meydana getirdiği kalıcı DNA hasarlarının, kanser oluşumuna ve yaşlanmaya neden olduğu düşünülmektedir (81).

3.8.1. 1,25(OH)2D'nin Etkisi

1,25(OH)2D biyolojik etkisini nükleer reseptör süper ailesinin bir üyesi olan vitamin D reseptörüne (VDR) bağlanarak gösterir. Bu reseptör tiroid hormon reseptörleri, retinoid reseptörler ve peroksizom proliferatör-aktif reseptörlerin de dahil olduğu bir alt aileye aittir. Bu alt ailenin diğer üyelerinin aksine, sadece bir VDR izoformu izole edilmiştir. VDR, retinoid X reseptörü ile birlikte bir heterodimer olarak hedef DNA sekansına bağlanır ve hedef gen ekspresyonunun indüksiyonu ile sonuçlanan koaktivatörler serisini harekete geçirir. VDR hedef gen ekspresyonuna neden olduğunda, ya aktive edici transkripsiyon faktörlerinin etkisini engeller ya da transkripsiyonal olarak baskılanmasına neden olan VDR kompleksi için yeni proteinleri toplar.

VDR'nin, 1,25(OH)2D için afinitesi, diğer vitamin D metabolitleri için olan afiniteden yaklaşık olarak 3 kat daha fazladır. Fizyolojik koşullar altında,

diğer metabolitler reseptör bağımlı etkiyi uyarmaz. Bununla birlikte vitamin D toksisitesinde 25(OH)D seviyesi belirgin olarak yükselerek VDR ile doğrudan etkileşir ya da serum vitamin-D-bağlayıcı proteinden 1,25(OH)2D'yi uzaklaştırır; sonuçta aktif hormon biyoyararlılığında artış olur.

VDR birçok hücre ve dokuda bulunur. 1,25(OH)2D'nin moleküler etkisi en çok mineral iyon homeostazında yer alan dokularda çalışılmıştır. Bu hormon, ince barsakta bulunan bir kalsiyum bağlayıcı protein olan ve kalsiyumun enterositlerden aktif transportunda önemli bir rol oynadığına inanılan calbindin 9K' nın majör indükleyicisidir. İntestinal epitelde eksprese edilen iki majör kalsiyum taşıyıcısı (ECaC ve ICaC) da vitamin D'ye duyarlıdır. 1,25(OH)2D ince barsaktaki ve bu diğer genlerin ekspresyonunu indükleyerek intestinal kalsiyum absorpsiyonunun etkinliğini artırır.

VDR, osteoblastlardaki bazı genlerin ekspresyonunu düzenler. Hedef genler; 1,25(OH)2D ve tip I kollajen tarafından regüle edilen kemik matriks proteinleri; osteokalsin ve osteopontindir. 1,25(OH)2D ve parathormon (PTH), osteoklast farklılaşmasına ve osteoklast aktivitesini artıran Receptor Activator of NF-kappaB (RANK) ligandının ekspresyonunu indüklerler.

Paratiroid bezinde VDR, paratiroid hücreler üzerinde antiproliferatif etki gösterir ve PTH geninin transkripsiyonunu baskılar. 1,25(OH)2D'nin paratiroid bezi üzerindeki bu etkileri renal yetersizlik ile ilişkili hiperparatiroidinin önlenmesi ve tedavisine yönelik güncel tedavilerin mantığını oluşturur (82).

VDR ayrıca mineral iyon homeostazında bir rolü olmayan doku ve organlarda da eksprese edilir. Bu konu ile ilgili dikkate değer bir husus, 1,25(OH)2D'nin keratinositler, meme kanser hücreleri ve prostat kanser hücreleri

gibi bazı hücre tipleri üzerinde antiproliferatif etkileri olduğunun gözlenmesidir. Mutant VDR'leri olan insan ve sıçanlarda alopesi görülür, ancak alopesinin vitamin D eksikliğinin bir özelliği olmaması reseptörün hormondan bağımsız etkileri olduğunu düşündürmektedir (82).

VDR knockout farelerde, olası endojen oksidanların uyarılması sonucu kolon epitellerinde DNA hasarında yükselme gözlenmiştir (83). Bunun aksine günde 800 I.U. vitamin D ile tedavi gören insanların kolon epitellerindeki DNA hasarında düşüş gözlenmiştir (84). Vitamin D₃ ile tedavi edilen çeşitli hücrelerde vitamin D₃'ün, hücreleri oksidatif hasara karşı koruyucu etkileri olan enzimleri uyardığı görülmüştür. Bunlardan biri tiyoredoksin redüktazdır. Bu enzim tiyoredoksinleri indirgeyerek intrasellüler redoks tepkimelerini azaltıp, intrasellüler oksidatif stresin sınırlanmasını sağlar (85, 86). Vitamin D₃ tarafından indüklenen diğer bir antioksidan protein ise SOD'dur (87, 88).

Birçok çalışma vitamin D'nin lipid peroksidasyonunu azalttığını (89) ve GSH seviyesini koruyarak güçlü bir intrasellüler antioksidan olduğunu göstermiştir (90). Vitamin D'nin aktif formu olan kalsitriol, serbest oksijen radikalleri üreten ve temizleyen enzimlerin ekspresyonunu ayarlayarak vasküler endotelial fonksiyonu düzenler. Böylece ROS'un aşırı üretimini engeller (91).

Biz de bu çalışmamızda siklofosfamid ile oluşacağını düşündüğümüz karaciğer hasarına karşı vitamin D₃'ün olası koruyucu etkilerini görmeyi amaçladık.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneysel çalışma, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 08.11.2012 tarih ve 2012/106 sayılı kararı ile etik onay alındıktan sonra Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (FÜDAM) biriminde ve Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı (AD) laboratuvarında yapıldı. Çalışma bütçesinin tamamı Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (FÜBAP)' nin TF. 13. 07 proje no' lu kararı gereğince karşılandı.

4.1. Deney Hayvanları

Deneylerde kullanılan 24 adet 9 haftalık erişkin Wistar-Albino cinsi erkek sıçanlar, FÜDAM biriminden temin edildi. Hayvanlar FÜDAM hayvan laboratuvarında bulundukları ortamın sıcaklığı 22–25 °C arasında sabit tutularak 12 saat ışık (07:00-19:00) ve 12 saat karanlıkta (19:00-07:00) takip edildi. Sıçanlar özel olarak yaptırılan kafeslerde beslendi ve her gün altları temizlendi. Tüm hayvanlara aynı standart sıçan yemi verilerek *ad libitum*, su ve yiyecek alımları sağlandı. Yemler; çelik kaplarda, su; cam biberonlarda normal çeşme suyu olarak verildi. Hayvan yemleri Elazığ Yem Sanayi A.Ş. Yem Fabrikası'nda hazırlandı. Yemlerin terkibi Tablo 1'de gösterildi.

Tablo 1. Deney hayvanlarına verilen sıçan yeminin terkihi

Buğday (%)	15
Mısır (%)	10
Arpa (%)	27
Kepek (%)	8
Soya (%)	29, 4
Balık Unu (%)	8
Tuz (%)	0, 6
Kavimix VM 23-Z (%) *	0, 2
Methionin (%)	0, 2
DCP (%)**	1, 6

*1 gramında: 4800 IU A, 960 IU D₃, 12 mg E, 0, 8 mg K₃, 0, 8 mg B₁, 2, 4 mg B₂, 1, 2 mg B₆, 0.006 mg B₁₂ vitaminleri, 16 mg Nicotin amid, 3, 2 mg Cal. D. Panth. 0.32 mg Folic acid, 0.02 mg D-Biotin, 50 mg Cholin Chloride, 20 mg Zinc Bacitracin, 32 mg Mn, 16 mg Fe, 24 mg Zn, 2 mg Cu, 0, 8 mg I, 0, 2 mg Co, 0.06 mg Se, 4 mg Antioksidan ve 200 mg Ca.

** % 18 fosfor, % 25 kalsiyum, % 0,2 flor'dan oluşur.

4.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneysel Uygulamalar

Çalışmada ortalama 220-230 gr ağırlığında 24 adet Wistar Albino erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar her grupta 6 adet olacak şekilde 4 gruba ayrıldı.

Grup I (Kontrol Grubu): Add libitum, su ve yem verilen grup. (n:6)

Grup II (Siklofosfamid Grubu): İntraperitoneal (i.p) olarak 200mg/kg tek doz siklofosfamid uygulanan grup. (n:6)

Grup III (Siklofosfamid + Vitamin D₃ Grubu): İ.p olarak 200 mg/kg tek doz siklofosfamid ile birlikte 7 gün boyunca oral gavajla 50 IU/kg/gün vitamin D₃ uygulanan grup. (n:6)

Grup IV (Vitamin D₃ Grubu): 7 gün boyunca oral gavajla 50 IU/kg/gün vitamin D₃ uygulanan grup. (n:6)

Tüm gruptaki sıçanlar i.p ketamin (75mg/kg) + xylazine (10mg/kg) anestezisi altında dekapite edildi. Dekapitasyonun ardından sıçanların karaciğer dokuları hızla çıkarılıp % 10'luk formaldehit solüsyonu ile tespit edildi.

4.3. Histolojik Çalışma

Her gruptan alınan karaciğer dokuları % 10'luk formaldehit solüsyonunda tespit edildikten sonra sırasıyla % 70'lik, % 80'lik, % 96'lık ve % 100'lük etil alkol serilerinden geçirildikten sonra ksilolde parlatılıp parafin bloklara (Sigma-paraplast embedding media, Stenheim, Germany) gömüldü (Tablo 2). Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler Hematoksilen & Eozin (H&E), Periodic Acit Schiff (PAS) ve Masson Trichrome boyama teknikleri ile boyandı. Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskopunda (Olympus BH-2) incelenip fotoğraflandı.

Tablo 2. Histolojik takip serileri

Sıra	İşlem	Süresi
1	% 70 Alkol	2 saat
2	% 80 Alkol	1.5 saat
3	% 96 Alkol I	30 dakika
4	% 96 Alkol II	30 dakika
5	% 100 Alkol I	30 dakika
6	% 100 Alkol II	30 dakika
7	Alkol + Xylol	15 dakika
8	Xylol I	25 dakika
9	Xylol II	25 dakika
10	Yumuşak parafin + Xylol	45 dakika
11	Yumuşak parafin	1 Saat
12	Yumuşak parafin + Sert parafin	1.5 saat
13	Sert parafin	3 saat
14	Gömme	

4.4. TUNEL Metodu

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

Xylene ile deparafinize edilen dokular, dereceli alkol serilerinden geçirilerek phosphate buffered saline (PBS) ile yıkandı. 0.05% 'lik proteinase K

ile 10 dakika inkübe edilen dokular, endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için % 3 hydrogen peroxide ile 5 dakika inkübe edildi. PBS ile dokular yıkandıktan sonra, 6 dakika Equilibration Buffer ile inkübe edilip, 37° C’ de nemli ortamda çalışma solüsyonu (%70 µl Reaction Buffer + %30 TdT Enzyme) ile 60 dakika inkübe edildi. Stop/Wash Buffer’da 10 dakika bekletilen dokular, Anti-Digoxigenin-Peroxidase ile 30 dakika muamele edildi. Diaminobenzidine (DAB) substratı ile apoptotik hücreler görüntülendi. Harris hematoxilen ile zıt boyası yapılan kesitler uygun kapatma solüsyonu ile kapatıldı. Pozitif kontrol için meme dokusu kullanıldı. Negatif kontrol dokusunda Tdt enzimi yerine Reaction Buffer kullanıldı. Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskopunda (Olympus-BH2) incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı. TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde Harris hematoxilen ile maviye boyanmış çekirdekler normal, kahverengi nükleer boyanma gösteren hücreler apoptotik olarak değerlendirildi. Boyama metodu tabloda ayrıntılı olarak verilmiştir (Tablo 3).

Tablo 3. TUNEL boyama prosedürü

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

TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde boyanmanın yaygınlığı esas alındı. TUNEL boyamanın yaygınlığı +1 (çok az), +2 (az), +3 (orta) dereceli olacak şekilde semi-kantitatif olarak skorlandı (Tablo 4).

5. BULGULAR

5.1. Histolojik Bulgular

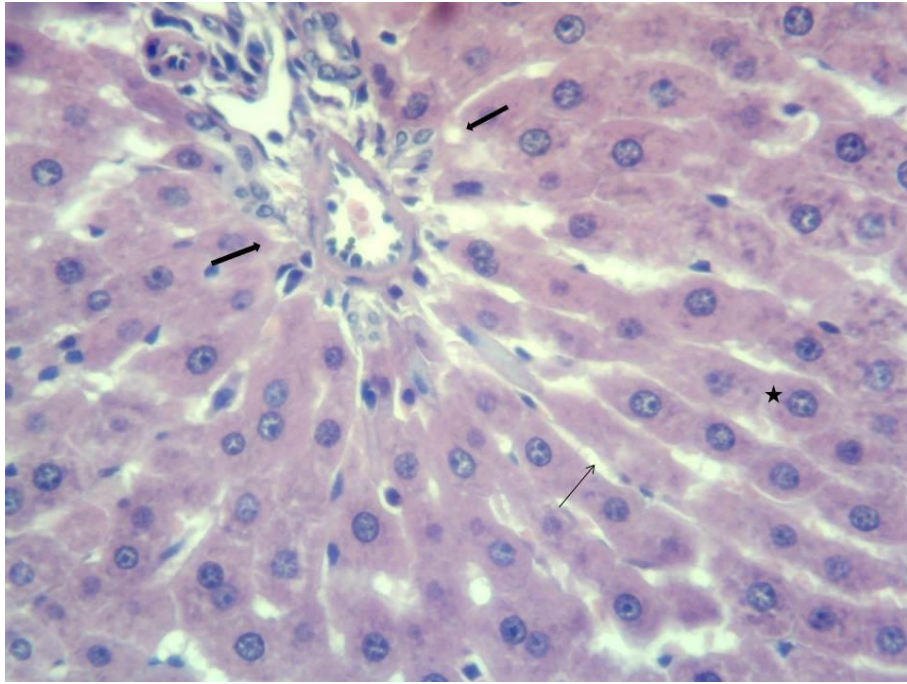
Kontrol grubuna ait karaciğer dokusunda portal alan, hepatositler, sinüzoidler ve sinüzoidlerde yer alan Kupffer ve endotel hücreleri normal yapıda gözlendi (Şekil 10). Hepatositlerin glikojen içeriği oldukça belirgindi (Şekil 11). TUNEL tekniği uygulanarak yapılan boyamada az sayıda Kupffer hücresinde TUNEL pozitiflik ayırt edildi (Şekil 12).

Siklofosfamid uygulanan gruba ait karaciğer dokularında yer yer mononükleer hücre infiltrasyonu, hepatositlerde inklüzyon cisimcikleri (Şekil 13), özellikle periportal alanda yer alan hepatositlerde makroveziküler yağlanma (Şekil 14) ve incelenen kesitlerin birinde bir alanda nekroz (Şekil 15) saptandı. Bu grupta ayrıca sıklıkla heterokromatik çekirdekli hepatositlere (Şekil 16), yer yer bağ dokusu artışına (Şekil 17) ve sinüzoidal konjesyona (Şekil 18) rastlandı. Siklofosfamid uygulanan deneklerin hepatositlerinde glikojen depolarının tükendiği dikkat çekiciydi (Şekil 19). TUNEL boyaması yapılan kesitlerde endotel hücrelerinde, hepatositlerde ve Kupffer hücrelerinde belirgin pozitiflik ayırt edildi (Şekil 20, 21, 22).

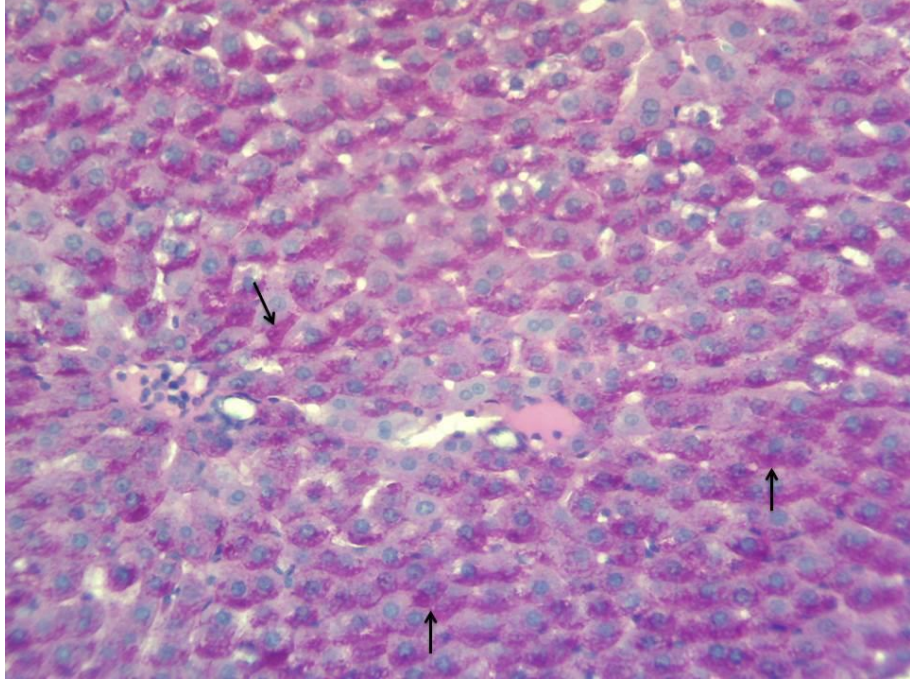
Siklofosfamid ile birlikte vitamin D₃ uygulanan grupta, vasküler konjesyonun devam ettiği (Şekil 23), hepatositlerin glikojen içeriğinin sadece siklofosfamid uygulanan gruba göre daha belirgin olduğu fakat kontrol grubuna göre azaldığı (Şekil 24) tespit edildi. Bu grupta da hepatosit, endotel ve Kupffer hücrelerinde TUNEL pozitiflik saptandı fakat grup II' ye göre daha az yaygınlıkta

idi (Şekil 25, 26). Grup III' te siklofosfamid toksikasyonuna karşı vitamin D₃ uygulamasının, karaciğeri yapısal anlamda nispeten koruduğu gözlemlendi.

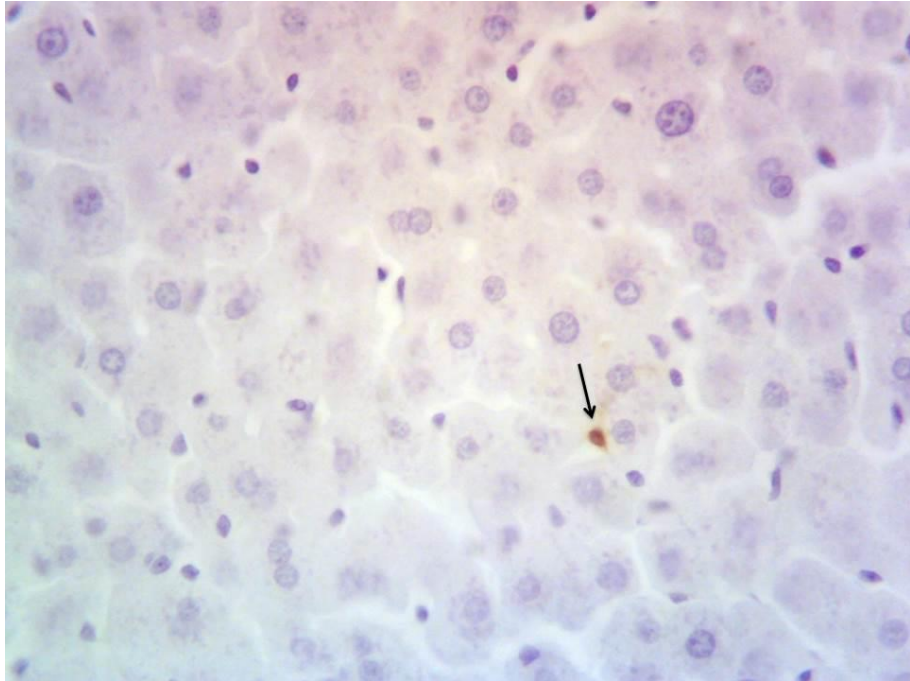
Sadece vitamin D₃'ün uygulandığı grup IV'te ise portal alan, periportal alan, hepatositler ve sinüzoidler kontrol grubuna benzer yapıda ayırt edildi (Şekil 27). TUNEL boyamada da kontrol grubunda olduğu gibi birkaç Kupffer hücresinde pozitiflik saptandı (Şekil 28).



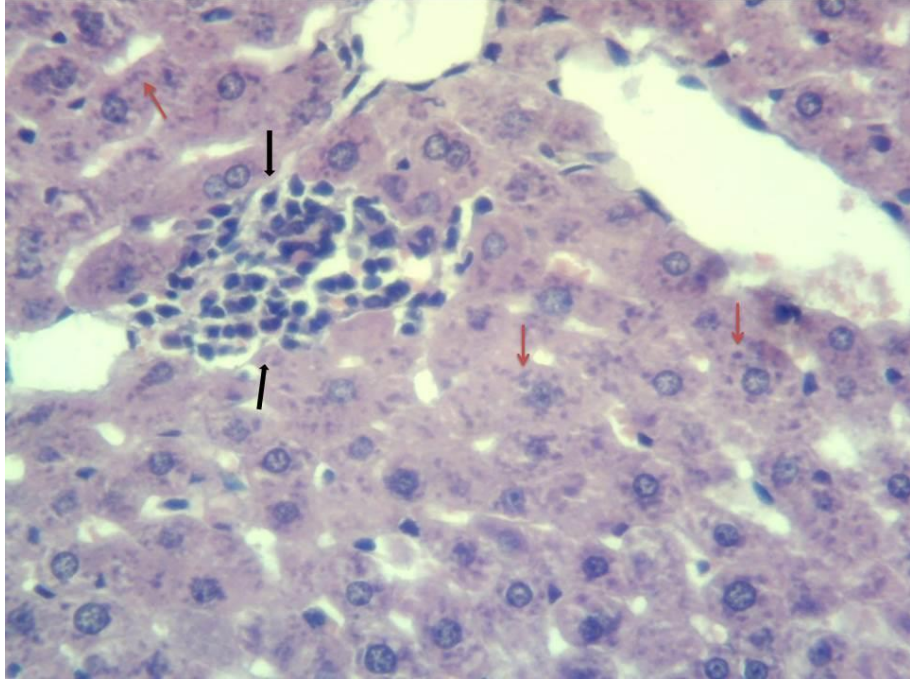
Şekil 10. Kontrol grubu. Portal alan (kalın ok), sinüzoidler (ince ok) ve hepatositler (yıldız) normal yapıda izlenmekte. H & E X 400



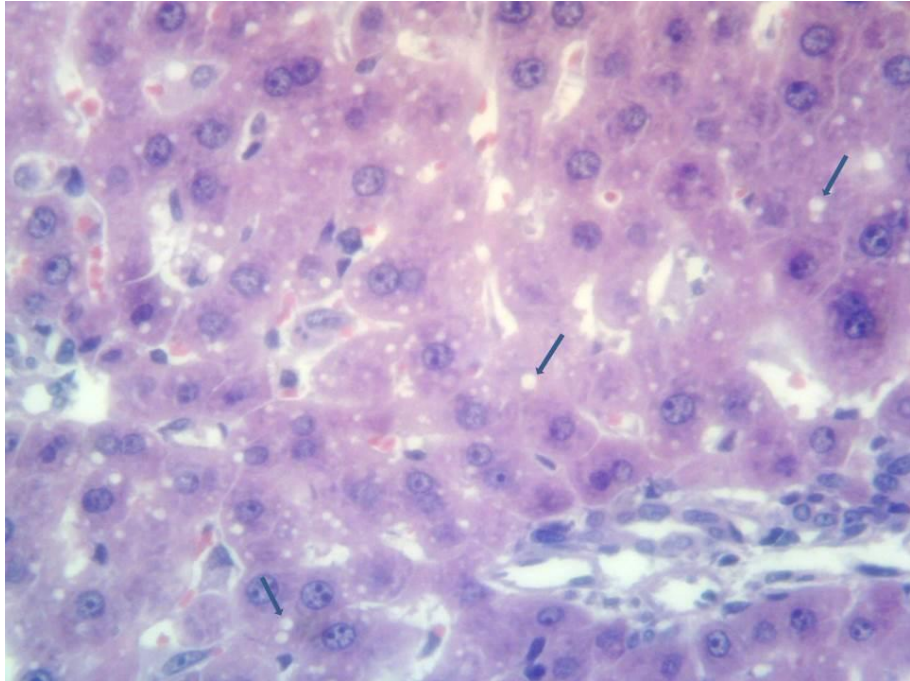
Şekil 11. Kontrol grubu. Periportal alandaki hepatositlerin glikojen içeriği (ok). Periodic Acid Schiff x 200



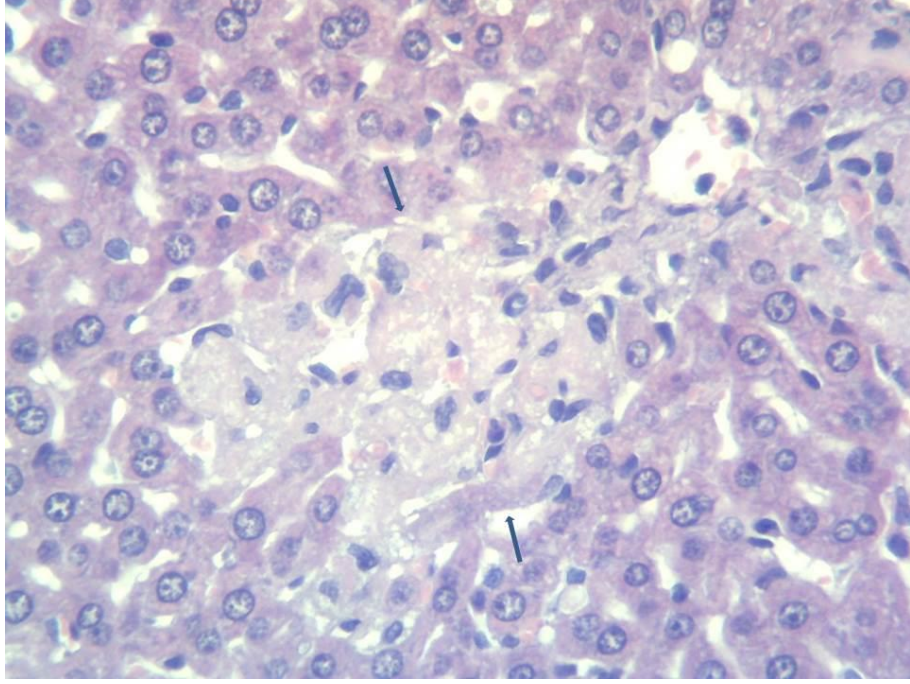
Şekil 12. Kontrol grubu. TUNEL pozitif Kupffer h  resi (ok). TUNEL X



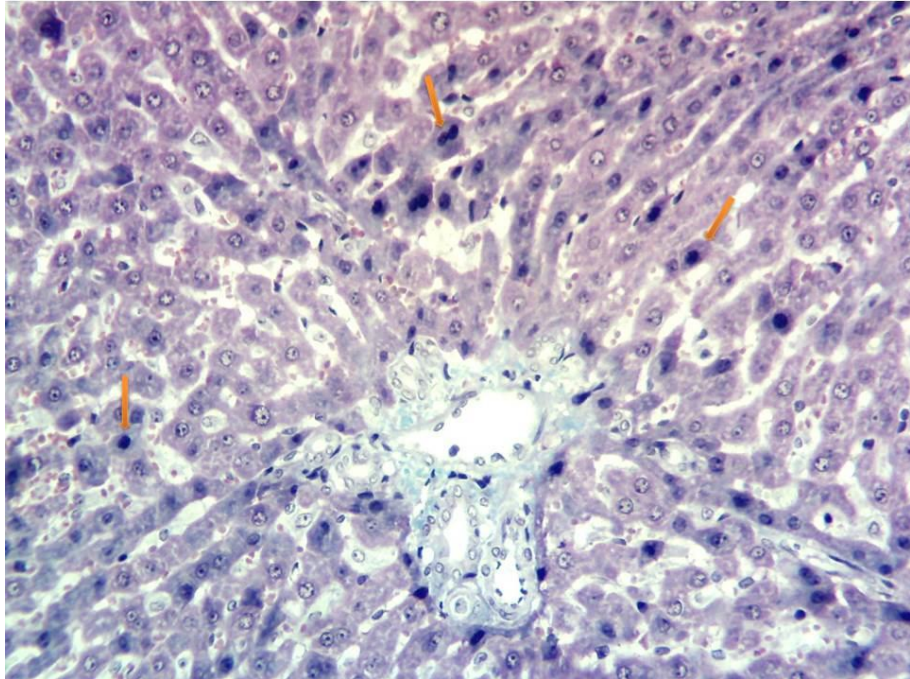
Şekil 13. Siklofosfamid grubu. Mononükleer hücre infiltrasyonu (siyah ok), hepatositlerdeki inklüzyon cisimcikleri (kırmızı ok). H & E X 400



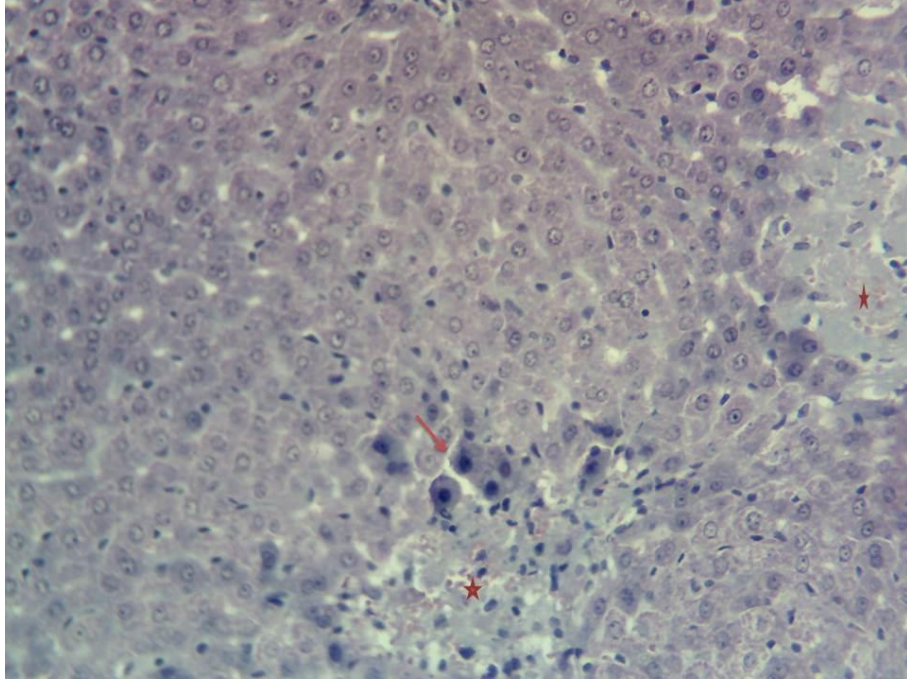
Şekil 14. Siklofosfamid grubu. Periportal alandaki hepatositlerde makroveziküler yağlanma (ok). H & E X 400



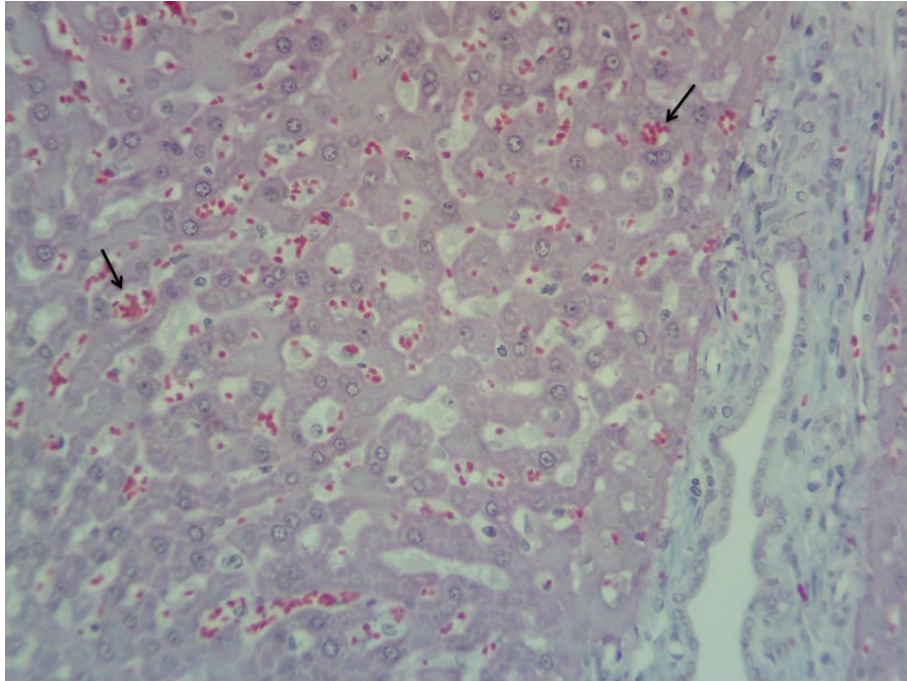
Şekil 15. Siklofosfamid grubu. Periportal alanda yer alan nekroze alan (ok). H & E X 400



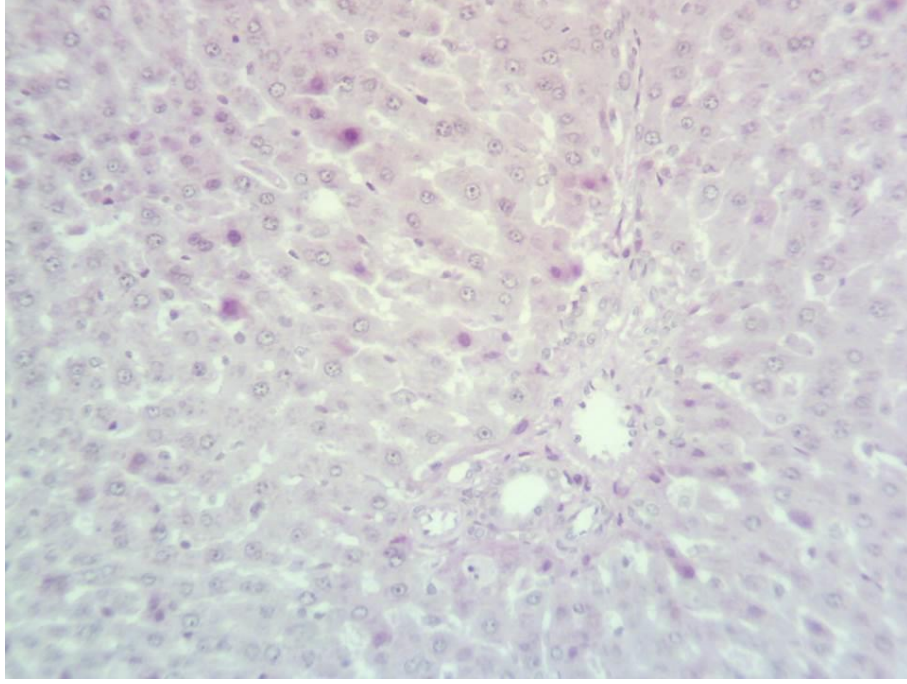
Şekil 16. Siklofosfamid grubu. Periportal alandaki heterokromatik çekirdekli hepatositler (ok). Masson Trichrome X 200



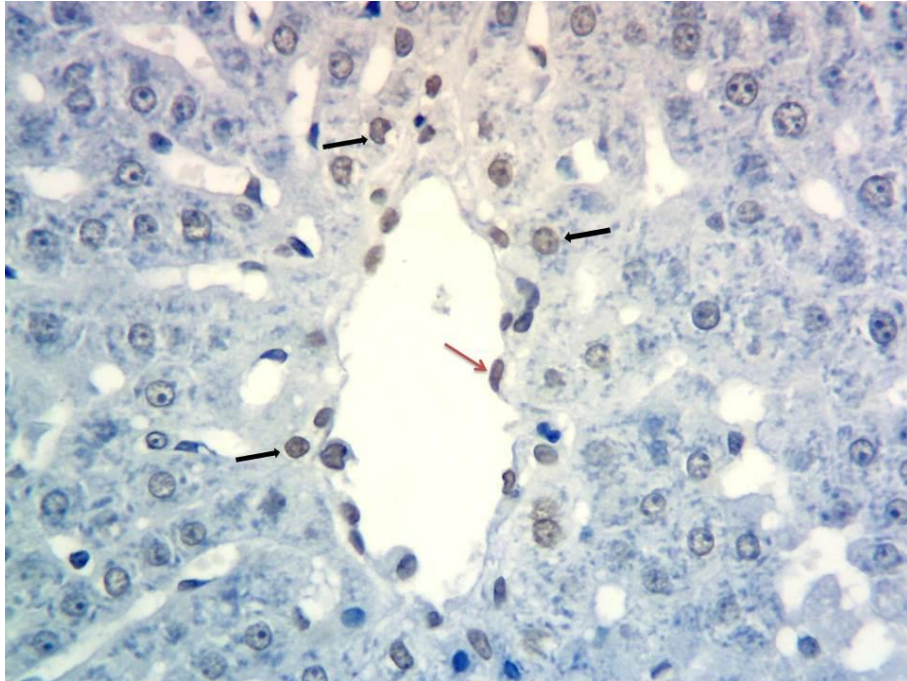
Şekil 17. Siklofosfamid grubu. Heterokromatik çekirdekli hepatositler (ok), bağ dokusu artışı ve hemoraji (yıldız). Masson Trichrome X 200



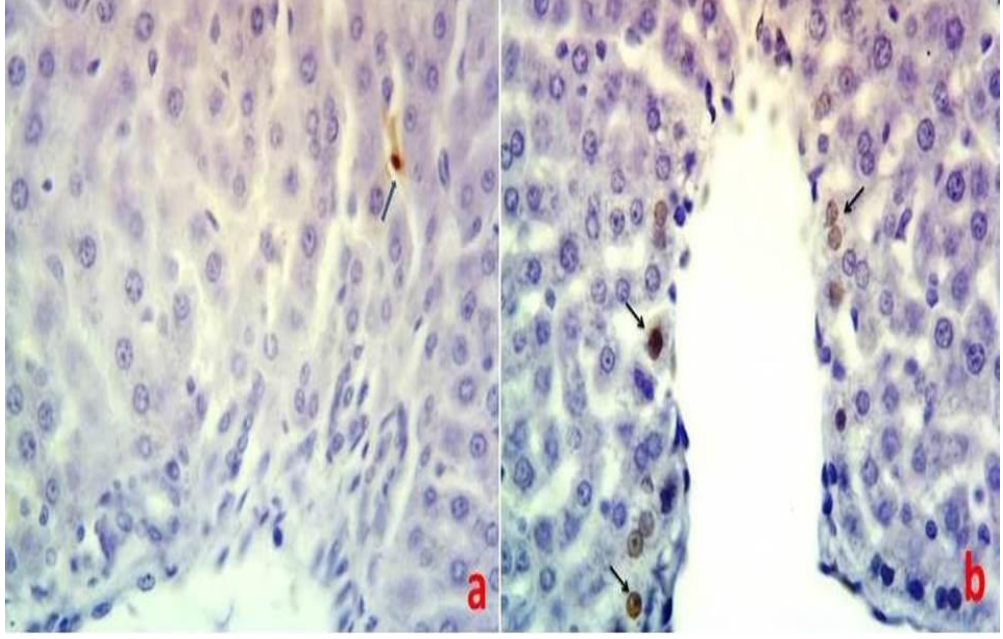
Şekil 18. Siklofosfamid grubu. Periportal alandaki sinüzoidal dilatasyon ve konjesyon (ok) ayırt edilmekte. Masson Trichrome X 200



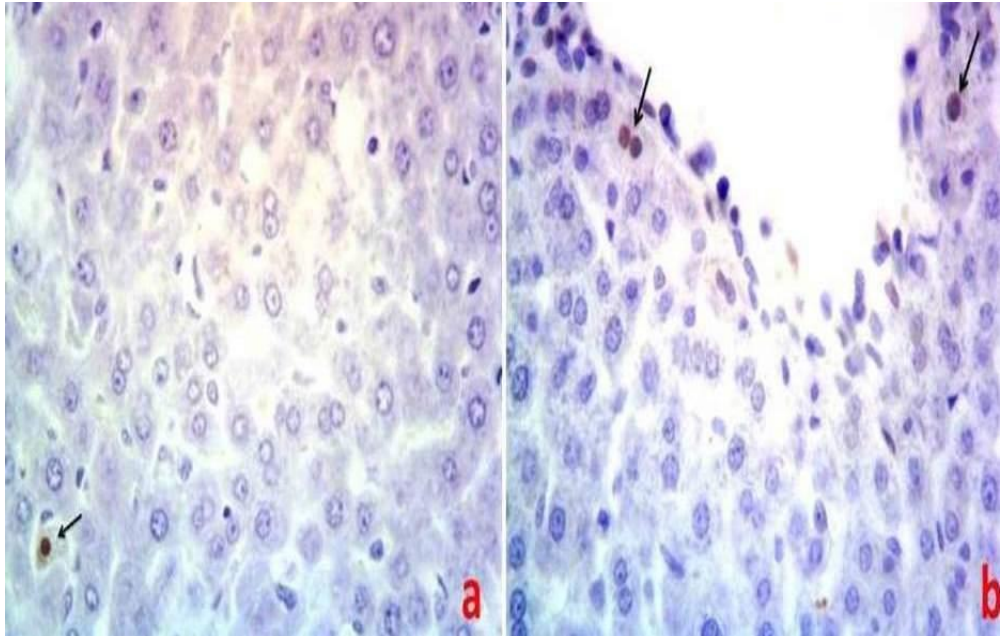
Şekil 19. Siklofosfamid grubu. Periportal alanda yer alan hepatositlerdeki glikojen depolarının tükendiği gözlenmekte. Periodic Acid Schiff X 200



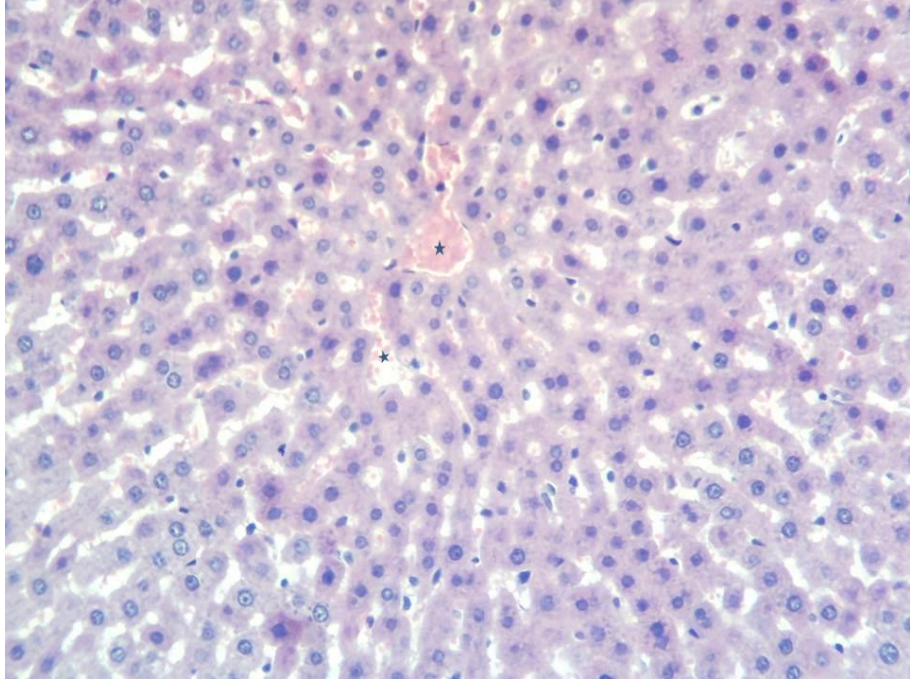
Şekil 20. Siklofosfamid grubu. TUNEL pozitif endotel hücresi (kırmızı ok) ve hepatositler (siyah ok). TUNEL X 400



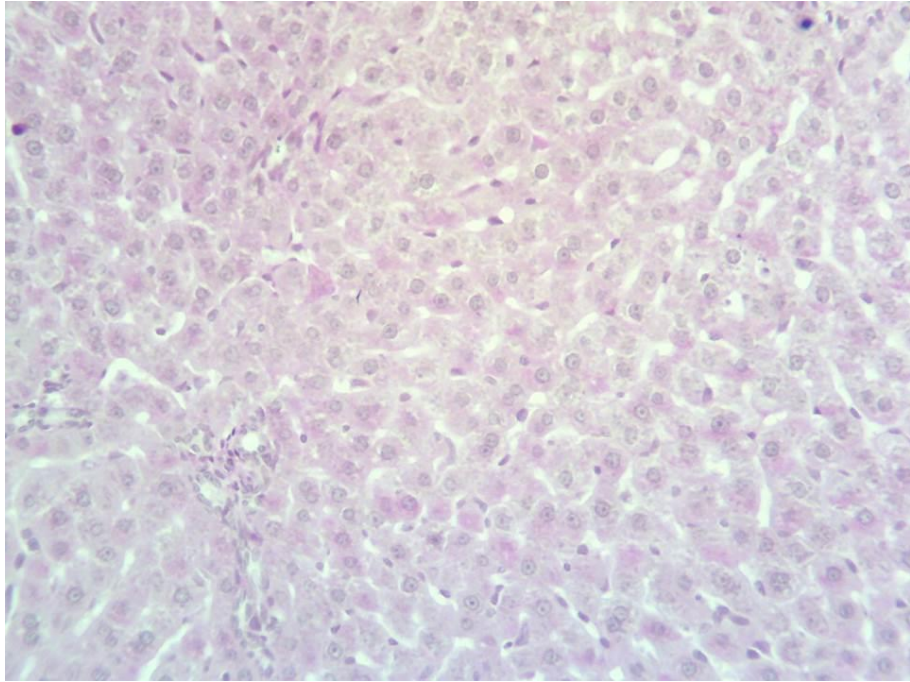
Şekil 21. Siklofosfamid grubu. Sinüzoidlerde yer alan Kupffer hücrelerinde (a) ve v. santralis etrafındaki hepatositlerdeki (b) TUNEL pozitiflik (ok) ayırt edilmekte. TUNEL X 400



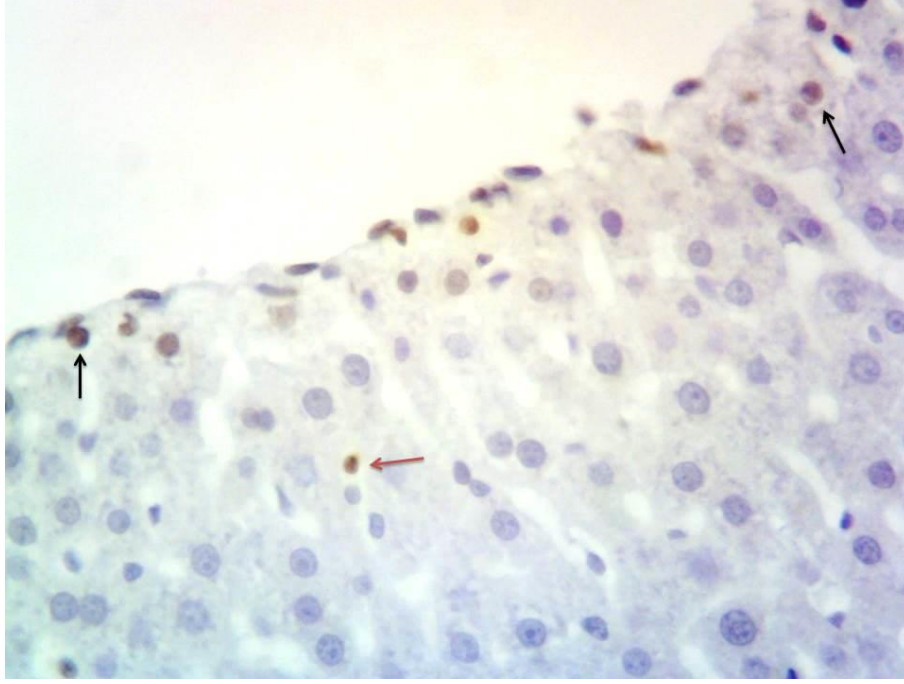
Şekil 22. Siklofosfamid grubu. Hepatositlerdeki (a,b) TUNEL pozitiflik (ok). TUNEL X 400



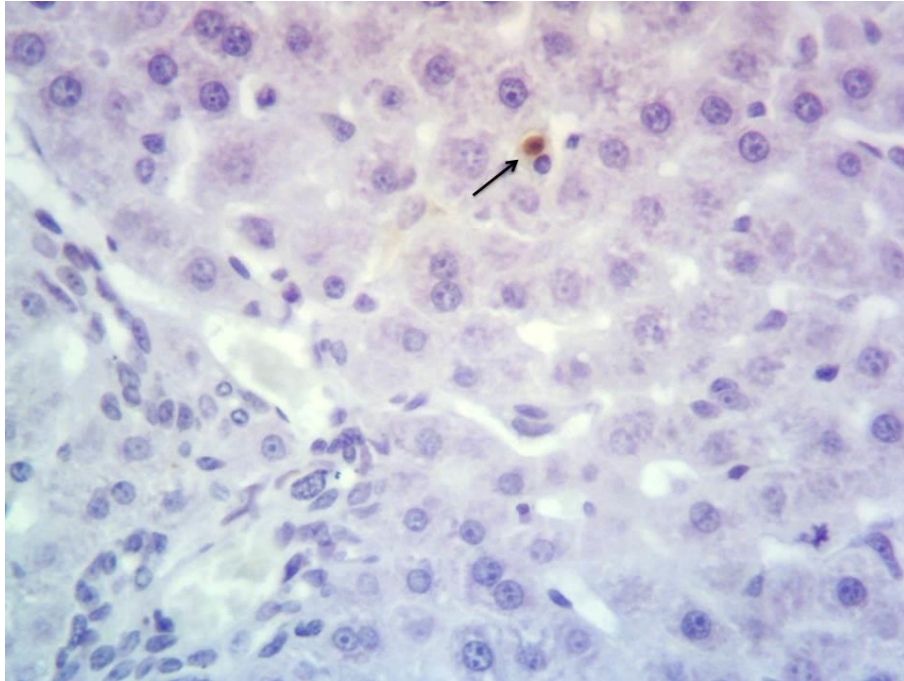
Şekil 23. Siklofosfamid grubu. Vasküler konjesyon (yıldız). H & E X 200



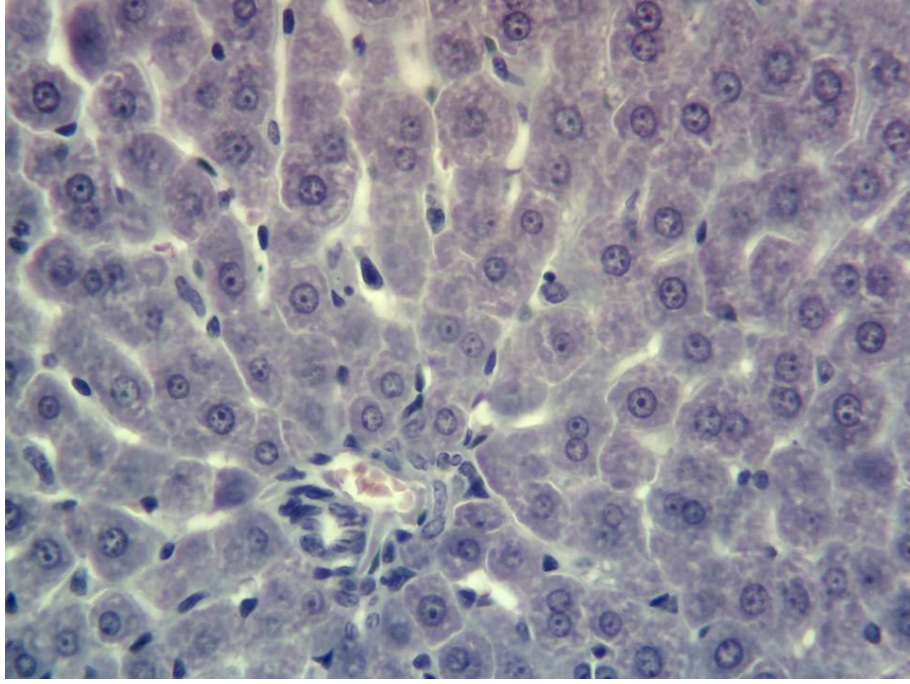
Şekil 24. Siklofosfamid + vitamin D₃ grubu. Hepatositlerdeki glikojen içeriği. Periodic Acid Schiff X 200



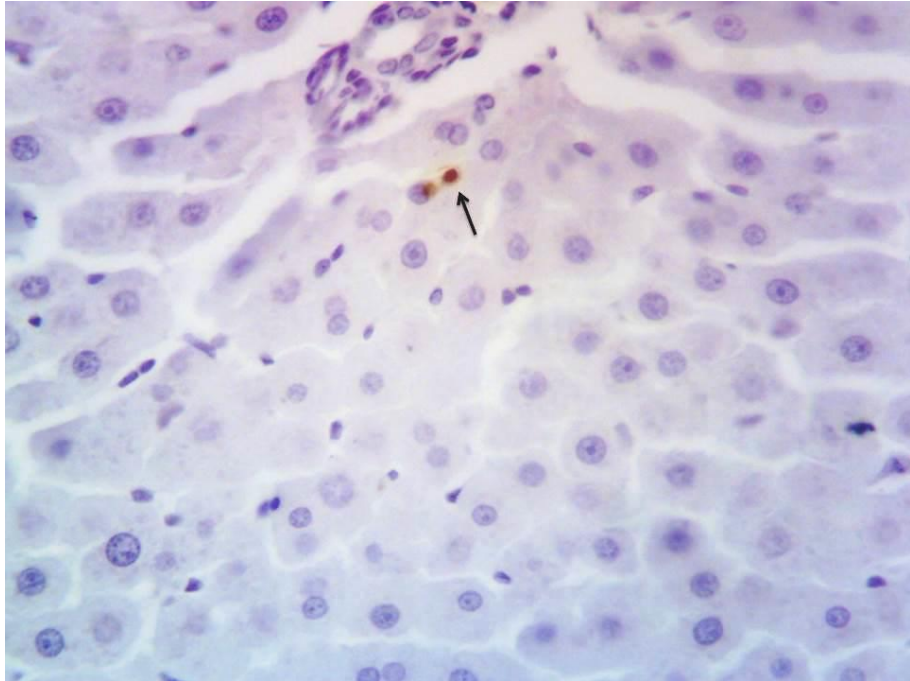
Şekil 25. Siklofosfamid + vitamin D₃ grubu. V. santralis etrafındaki hepatositlerde (siyah ok) ve sinüzoidlerde yer alan Kupffer hücreindeki (kırmızı ok) TUNEL pozitiflik. TUNEL X 400



Şekil 26. Siklofosfamid + vitamin D₃ grubu. TUNEL pozitif hücre (ok).
TUNEL X 400



Şekil 27. Vitamin D₃ grubu. Portal alan, hepatositler ve sinüzoidlerde yer alan Kupffer ve endotel hücreleri normal yapıda ayırt edilmekte. Masson Trichrome X 400



Şekil 28. Vitamin D₃ grubu. Periportal alanda yer alan sinüzoidlerdeki Kupffer hücresinin TUNEL pozitifliği (ok). TUNEL X 400

Tablo 4. TUNEL boyanma yaygınlığının derecesi

Grup	TUNEL Boyama Pozitifliği
Grup I	+1
Grup II	+3
Grup III	+2
Grup IV	+1

6. TARTIŞMA

Siklofosfamid, sitotoksik kemoterapötik bir ajandır. Kemoterapötik ajanlar genellikle lenfoma, solid tümör tedavisinde ve ayrıca romatoid artrit, multipl skleroz gibi otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılırlar (92). Siklofosfamid, karaciğerde metabolize olarak 4-hidroksi siklofosfamide ve izomeri olan aldofosfamide dönüşür. Daha sonra aldofosfamid de fosforamid ve akroleine metabolize olur (93).

Bir antikanser ilacı olan siklofosfamid aynı zamanda sentetik ve alkilleyici bir ajan olup kemik iliği transferlerinde de kullanılmaktadır. Siklofosfamid hepatik P450 enzimlerince fosforamid mustard ve akroleine metabolize olur. Oluşan bu metabolitlerin lösemi, mesane kanseri gibi hastalıkların tedavisinde etkili olduğu belirtilmektedir. Bu iki metabolitten akroleinin, kemoterapi sırasında kullanılan siklofosfamidin toksik yan etkilerinin ana sebebi olduğu ve siklofosfamid kullanılması sonucu hemorajik sistitin meydana gelmesinde rol oynadığı Cox (1979) tarafından rapor edilmiştir (94).

Siklofosfamid karaciğerde hidrosillenerek bir metaboliti olan akroleine dönüştükten sonra akroleinin böbrekten atılmasıyla yan etkiler ortaya çıkmaya başlar. Akrolein sadece siklofosfamidin metabolize olması ile meydana gelmeyip aynı zamanda sigarada, böcek ilaçlarında, bazı yiyeceklerde ve yanmış organik malzemelerde de bulunmaktadır. Akroleinin ürotelyumla direk temasıyla üroteliyal hasar başlamaktadır (95). Mesanede vasküler konjesyon, ödem, hemoraji, epitelial nekroz ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu ile karakterize ağır bir sistit tablosu meydana gelmektedir (96).

Akroleinin intrasellüler ROS ve nitrik oksit seviyesinde artış meydana getirmesi sonucu oksidatif strese neden olduğu bildirilmektedir (97, 98). Bu reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin, hücrel lipidlerde, proteinlerde ve DNA'da hasar oluşturarak hücrenin ölümüne neden olduğu görülmüştür (38, 99).

Souza-Filho ve ark. (1997); siklofosfamid uygulanan ratların mesane dokularında kalsiyum bağımlı nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitesinin düştüğünü ve kalsiyum bağımlı olmayan NOS aktivitesinin ise arttığını ayırt etmişlerdir (100). Alfieri ve ark. (2000) da siklofosfamid uygulanan ratların mesane dokusundaki epitelyal hasarlanma, aşırı lökosit birikimi, ödem, vasküler konjesyon ve plazma protein ekstrasvazasyonu gibi hemorajik sistit bulgularında, özellikle indüklenabilir NOS (iNOS) ve onun ürettiği nitrik oksidin rol oynadığını belirtmişlerdir (101).

GSH oksidatif strese karşı hücrelerin korunmasında hayati bir rol oynamaktadır. Siklofosfamid uygulanması sonucu oluşan metabolitlerin GSH ile konjugasyonu sonucu GSH'nin hücrel düzeyi azalarak oksidatif stresin indüklenmesi söz konusu olmaktadır (102, 103). GSH azalması ile serbest radikallere karşı hücrel savunmanın zayıflayacağı ve oluşan hücrel hasar sonucu nekrotik hücre ölümünün gerçekleşeceği bildirilmektedir (104).

Yapılan çalışmalarda, siklofosfamid uygulanmasına bağlı olarak, sitozolik enzimler olan aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), alkalen fosfataz (ALP) ve laktat dehidrojenaz (LDH) seviyelerinin kanda yükselerek hepatoksisiteye neden olduğu belirtilmiştir (44, 105, 106). Hepatik antioksidan enzimlerin (GPx, GR, kinon redüktaz, CAT, SOD) ve GSH

seviyesinin anlamlı oranda azaldığı, MDA değerlerinde ise artış meydana geldiği rapor edilmiştir (17, 33, 44, 106, 107).

Siklofosfamidin neden olduğu hepatotoksisite aynı zamanda oksidatif stres oluşmasını indükleyerek, ROS'un hücresel membranda lipid peroksidasyonu oluşturmaya yol açmaktadır (108, 109). Zarei ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada, lipid peroksidasyonunun markırlarından olan tiyobarbitürik asitin, siklofosfamid grubunda anlamlı olarak arttığını ve fare karaciğerlerinde artan lipid peroksidasyonunun beraberinde hepatik hasara da neden olduğunu belirtmişlerdir. Siklofosfamidin; karaciğerde SOD1, GPx1 ve CAT mRNA'larının transkripsiyon seviyelerinde anlamlı derecede düşüşe neden olduğunu ayırt etmişlerdir (106). Ayrıca siklofosfamid tedavisinin erkek sıçanların germ hücrelerinde antioksidan gen transkripsiyonunu azalttığı bildirilmektedir (110).

Siklofosfamid antineoplastik etkisini, kanserli hücrelerin DNA'sında hasar oluşturup, onların bölünüp çoğalmasını engelleyerek gerçekleştirmektedir. Fakat bunu yaparken kemik iliği, gastrointestinal sistem ve germ hücrelerindeki sağlıklı hücrelere de zarar verdiği ifade edilmiştir (33). Siklofosfamid, bu zararlı etkisini normal hücrelerde genotoksisite ve apoptozise yol açarak meydana getirmektedir (19). Siklofosfamid metabolitlerinden fosforamid mustardın, apoptoz ile kanser hücrelerini öldürdüğü, akroleinin ise apoptoz ve nekroz ile normal hücrelerin ölümüne neden olduğu rapor edilmektedir (36). Tripathi ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada, siklofosfamid uygulanan grupta hem kemik iliğinde hem de periferel kanda DNA hasarına rastlanıldığını belirtmişlerdir. Aynı zamanda kemik iliğinin yanı sıra periferel kanda da mikronükleus miktarında anlamlı oranda artış gözlemişlerdir (33).

Birçok çalışmada siklofosfamidin oksidatif strese neden olarak beyin, böbrek, kalp, karaciğer ve testiste biyokimyasal ve fizyolojik rahatsızlıklara yol açtığı belirtilmiştir (111). Ayrıca akroleinin, oksidatif strese neden olarak hedef dokularda hasar oluşturduğu da bildirilmektedir (23). Mc Donald ve ark. (2003) siklofosfamidin metabolik ürünleri olan akrolein ve fosforamidin, siklofosfamid tedavisi süresince karaciğer toksisitesi oluşturduğunu ifade etmişlerdir (112). Shaunak ve ark. (1988) yaptıkları çalışmada, öncesinde azatioprin verildikten sonra siklofosfamid uygulanan dört hastada karaciğer hasarı gözlemlenmiş ve hastaların karaciğer biyopsilerinde nekroz meydana geldiğini bildirmişlerdir (113).

Malhi ve ark. (2002) ratlara i.p olarak uyguladıkları siklofosfamid sonrasında, hepatik sinüzoidal endotelinde meydana gelen hasarın, karaciğere transfer edecekleri hepatosit kök hücrelerinin karaciğere uyum sağlamasında bir indüksiyon etkisinin olup olmayacağını saptamaya çalışmışlardır. Siklofosfamid uygulandıktan 6 saat sonra açık bir şekilde endotel hücrelerinde bozulmalar olduğunu belirtmişlerdir. Bunun yanı sıra endotel hücrelerinde, sitoplazmada az da olsa artış, az miktarda pinositik vezikül ile kromatin yoğunlaşması gibi nükleer anormallikler ayırt etmişlerdir. Siklofosfamid uygulanmasından 24 ve 48 saat sonrasında ise daha belirgin bir hücresel düzensizlikle birlikte endotel hasarları gözlemlenmiştir. Yapısal olarak bozulmuş endotel hücreleri sıklıkla sinüzoidlerin lümeninde saptamışlardır. Işık ve elektron mikroskopik incelemeler sonucunda ise Kupffer hücrelerinde herhangi bir morfolojik ve işlevsel bir değişikliğe rastlanmazken, hepatositlerin yapısında da bir değişiklik ayırt etmemişlerdir. Biyokimyasal incelemeler sonucunda ise siklofosfamidin AST,

ALT, LDH, ALP ya da albumin serum seviyelerinde de herhangi bir değişiklik meydana getirmediğini belirtmişlerdir (114).

Yaptığımız bu çalışmada, siklofosamid verilen grupta heterokromatik çekirdekli hepatositler gözlemlendi. Hepatositlerin ışınal diziliminde yer yer bozulmalar dikkat çekiciydi. Heterokromatik çekirdekli hepatositlerin özellikle periportal bölgede yoğunlaştığı görüldü. Apoptozisin belirteçlerinden biri olan TUNEL boyamasında siklofosamid uygulanan grupta hepatositlerde, Kupffer ve endotel hücrelerinde belirgin pozitiflik ayırt edildi.

Lushnikova ve ark. (2011), sıçanlarda yaptıkları siklofosamid çalışmasında, periportal ve perisantral hepatositlerde ultrastrüktürel düzeyde karakteristik özelliklere rastlamışlar ve hepatositlerin mitokondrilerinde orta şiddetli poliformizm ayırt edilmiştir. Bütün hepatositlerin mitokondri matrikslerinin oldukça elektron yoğun olduğu ve güçlükle ayırt edilebilen küçük ve dilate olmuş kristalara sahip oldukları belirtilmiştir. Granüllü endoplazmik retikulumların, mitokondrilerin etrafını adeta bir kılıf gibi sardığı görülmüştür. Çoğunlukla periportal bölgedeki hepatositlerde belirgin glikojen granüllerine rastlanmıştır. Perisantral bölgede ise glikojen granülleri nadiren görülmüştür. Bazı hepatositlerin granüllü endoplazmik retikulumlarına ait sisternalarının düzensiz bir şekilde dilate olduğu ve kısaldığı gözlenmiştir. Sinüzoidlerde küçük lipid damlacıkları ile sayısız rezidüel cisimcikler ayırt edilmiştir. Düz endoplazmik retikulumların ise hemen hemen hiç tanımlanamayacak derecede azaldığı gözlenmiştir. Siklofosamidin, hepatositlerin mitokondri ve granüllü endoplazmik retikulumlarında yapısal değişikliklere neden olduğu, düz endoplazmik retikulumlarında ise önemli miktarda azalmaya yol açtığı belirtilmiştir. Disse

aralığında genellikle daralma görülürken bu kısımda kollajen lif birikimi ve hücre kalıntıları görülmüştür. Perisantral hepatositlerin sitoplazmasının büyük bir bölümünü, mitokondrilerin ve granüllü endoplazmik retikulumların doldurduğu ayırt edilmiştir. Bazı hepatositlerin plazma membranlarının hemen altında küçük lipid inklüzyonları ve vakuol benzeri yapılar gözlenmiştir. Siklofosfamidin iki temel karaciğer hücresinde ultrastrüktürel düzeyde değişiklikler meydana getirdiği kanısına varmışlar ve bunların hepatosit ve sinüzoidal hücreler olduklarını belirtmişlerdir. Ayrıca Kupffer hücreleri, lenfosit ve plazma hücrelerinin, Disse aralığına göç etmesi sonucu bu hücrelerde reaktif değişiklikler ayırt etmişlerdir (115).

Tripathi ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada, siklofosfamid verilen grupta siklofosfamidin, hepatositlerde vaküolizasyon, sitoplazma dejenerasyonu, yer yer piknotik çekirdekli hücreler ve nötrofil infiltrasyonuna neden olduğunu mikroskopik incelemelerde saptamışlardır. Ayrıca TUNEL analizine göre apoptozda anlamlı bir artış olduğunu vurgulamışlardır (107).

Siklofosfamid ile toksisite oluşturduğumuz grupta, hepatositlerin glikojen depolarının tükendiği gözlenirken, siklofosfamid ile birlikte vitamin D₃ verilen grupta ise glikojen içeriğinin daha belirgin olduğu ayırt edildi. Ayrıca özellikle periportal alanda makroveziküler yağlanma da dikkat çekiciydi.

Siklofosfamidin, doku homojenatlarında serbest radikalleri anlamlı derecede artırdığı saptanmıştır. Bu bulgular, önceki çalışmalarda siklofosfamidin, ROS üretimini artırdığı; böbrek, kalp, beyin karaciğer, testis ve mesanedeki mitokondrial antioksidan sistemini zayıflattığı yönündeki sonuçlarla örtüşmektedir (116, 117). İn vivo ortamda açığa çıkan serbest radikallerin, çeşitli

mekanizmalarla mitokondrial disfonksiyona, solunum sistemi alevlenmesine neden olduğu ve çeşitli oksidazların aktivitesini artırdığı rapor edilmiştir (118).

Antioksidan/antiinflamatuvar özelliği olan yiyeceklerin tüketilmesinin, siklofosfamidin neden olduğu hücresel/organ toksisitesini engelleyebileceği belirtilmektedir (44).

Vitamin D₃, vitamin D'nin aktif bir metaboliti olup değişik biyolojik olaylarda rol oynamaktadır (119). Son on yılda yapılan çalışmalar, vitamin D₃'ün antioksidatif etkilere sahip olduğunu rapor etmektedir (120). Vitamin D₃'ün oksidatif stresi azaltarak koruyucu etkinliğini gösteren birçok bilimsel çalışma mevcuttur. Garcion ve ark. (1999) ile Sardar ve ark. (1996) yaptıkları çalışmalarda vitamin D₃'ün iNOS aktivitesini düşürerek primer rat astrositlerindeki serbest radikal oluşumunu azaltıp, peroksidaz ve SOD gibi antioksidatif savunma sistemlerini harekete geçirme yoluyla oksidatif stresi engellediğini bildirmişlerdir (120, 121). Wiseman ve ark. (1993) yaptıkları çalışmada vitamin D₃'ün bir membran antioksidanı olarak demirin neden olduğu lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini belirtmişlerdir (122). Lin ve ark. (2005) çinko ile oluşturdukları oksidatif stresle vitamin D₃'ün etkilerini, antioksidan etkileri iyi bilinen melatonin, beta östradiol ve vitamin E ile karşılaştırmışlardır. Vitamin D₃'ün diğer bahsedilen antioksidanlara göre daha etkili olduğunu ve bunu da vitamin D₃'ün lipid peroksidasyonunu ve otooksidasyonu azaltıcı etkilerine bağlı olabileceğini ifade etmişlerdir (123).

Oksidatif stres apoptozisin uyarılmasında güçlü bir mediatördür. Mitokondri organeli apoptoziste önemli bir role sahiptir. Oksidatif stres sonucu oluşan mitokondriyal hasar ile sitokrom C salınımı olmakta ve sonrasında oluşan

kaspaz aktivasyonu ile apoptotik hücre ölümü gerçekleşmektedir (124). Çetinkalp ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada, vitamin D₃'ün apoptoz mekanizmasının meydana gelmesini engellediğini belirtmişlerdir (125).

Daha önce yapılan çalışmalar, VDR knockout farelerde, VDR kaybı ile oksidatif stres oluşumu arasında anlamlı bir ilişkinin olduğunu kanıtlar niteliktedir (126). Vitamin D ve analoglarının otoimmün hastalıklar üzerinde immünomodülatör bir etkisinin olduğu ve bu hastalıkların tedavisinde büyük bir rol oynadığı rapor edilmiştir (127). İnvitro çalışmalarda, vitamin D'nin immünosupresif bir ajan gibi davranıp lenfositlerin çoğalmasını ve sitokin üretimini azalttığı belirtilmektedir (128). Vitamin D₃'ün malign melanoma, kolon, göğüs ve prostat kanseri gibi çeşitli solid tümör içeren hastalıklarda kötü hücrelerin çoğalmasını inhibe ettiği bildirilmekte olup (129), bazı hematolojik malign durumlarda bir antikanser ilacı gibi tedavi edici özelliğinin olduğu ifade edilmektedir (130-132).

Halicka ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada A549 ve TK6 tümör hücrelerinin DNA'ları hasar görürken oluşan oksidatif mekanizma ürünlerinin normal şekilde çoğalan lenfosit DNA'larına da hasar verdiklerini belirtip, vitamin D₃'ün bu durumu hafiflettiğini gözlemlemişlerdir (129). Bir başka çalışmada Bao ve ark. (2008) malign olmayan prostat hücrelerinde, vitamin D₃'ün dokularda, redüktan bir madde olduğu bilinen ve oksidatif strese karşı koruyucu özelliği olan glikoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) ekspresyonunda artışa neden olarak antioksidan bir özellik gösterdiğini belirtmişlerdir (133).

Hamden ve ark. (2009) diyabetik ratlarda yaptıkları çalışmada; vitamin D'nin pankreas, karaciğer ve böbrekteki hiperglisemi, oksidatif stres ve hücre

hasarını inhibe ettiğini ifade etmişlerdir. Vitamin D'nin, antioksidan sistemde anahtar rol alan G6PD enziminin gen ekspresyonunu artırdığını belirtmişlerdir (89).

Salum ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada, ilaç verilmeyen diyabetik ratlarda vitamin D'nin aortik dokularda N-Karboksimetil Lizini (CML) ve karaciğerdeki oksidatif stres indeks düzeyini azalttığını belirtmektedirler (134).

Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, siklofosfamid organizma üzerine olan etkilerini oksidan/antioksidan dengesini bozup, ROS artışı üzerinden yapmaktadır. Biz bu çalışmada vitamin D₃ uygulaması ile siklofosfamidin yan etkilerini azaltmayı/önlemeyi amaçladık. Gerçekten de yaptığımız bu deneysel araştırmada siklofosfamid ile oluşan karaciğer hasarının, vitamin D₃ uygulaması ile belirgin şekilde azaldığını ayırt ettik.

Sonuç olarak tıp alanında siklofosfamid kullanılmasını gerektiren hastalıkların tedavisinde, komplikasyonların önlenmesi için profilaktik olarak vitamin D₃ kullanımının faydalı olabileceğini düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Arıncı K, Elhan A. Anatomi 1. Cilt: Kemikler, eklemler, kaslar, iç organlar. 4. Baskı, Ankara: Güneş, 2006.
2. Drake RL, Vogl W, Mitchell AWM. Yıldırım M (Çeviren). Gray's Tıp Fakültesi Öğrencileri İçin Anatomi. 1. Baskı, Ankara: Güneş, 2007.
3. <http://www.meddean.luc.edu/lumen/MedEd/Histo/frames/hfram19.html>. 10.03.2013.
4. Barrett KE, Barman SM, Boitano S, Brooks HL. Ganong'un Tıbbi Fizyolojisi. Gökbel H (Çeviren). 23. Baskı, İstanbul: Nobel, 2011.
5. Guyton AC, Hall JE. Tıbbi Fizyoloji. Çavuşoğlu H, Yeğen BÇ (Çeviren). 11. Baskı, İstanbul: Nobel, 2007.
6. Preston RR, Wilson TE. Lippincott Görsel Anlatımlı Çalışma Kitapları: Fizyoloji. Alkaç Üİ (Çeviren). 1. Baskı, İstanbul: Nobel, 2013.
7. Moore KL, Persaud TVN. Embriyoloji ve Doğum Defektlerinin Temelleri. Müftüoğlu S, Atilla P, Kaymaz F (Çeviren). 7. Baskı, Ankara: Güneş, 2009.
8. Sadler TW. Langman's Medikal Embriyoloji. Başaklar AC (Çeviren). 6. Baskı, Ankara: Palme, 1993.
9. Eşrefoğlu M. Özel Histoloji. 1. Baskı, Malatya: Medipres, 2009.
10. Junqueira LC, Carneiro J. Temel Histoloji. Solakoğlu S, Aytekin Y (Çeviren). 11. Baskı, İstanbul: Nobel, 2009.
11. Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Patolojiye Giriş. Demir R (Çeviren). 5. Baskı, Ankara: Palme, 2006.
12. Cowley AW Jr, Mori T, Mattson D, Zou AP. Role of renal NO production in the regulation of medullary blood flow. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2003; 284: 1355-1369.
13. Ovalle WK, Nahirney PC. Netter's Essential Histology. Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P (Çeviren). 1. Baskı, Ankara: Güneş, 2009.
14. www.octc.kctcs.edu/gcaplan/anat2/notes8%20digestive 20.03.2013.
15. Eroschenko VP. Histoloji Atlası. Demir R (Çeviren). 10. Baskı, Ankara: Palme, 2008.
16. Ge ZD, Zhang DX, Chen YF, et al. Cyclic ADP-ribose contributes to contraction and Ca²⁺ release by M1 muscarinic receptor activation in coronary arterial smooth muscle. J Vasc Res 2003; 40: 28-36.
17. Nafees S, Ahmad ST, Arjumand W, et al. Modulatory effects of gentisic acid against genotoxicity and hepatotoxicity induced by cyclophosphamide in Swiss albino mice. J Pharm and Pharmacol 2011; 64: 259-267.
18. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c7397?lang=en®ion=TR> 12.04.2013.
19. Tripathi DN, Jena GB. Astaxanthin inhibits cytotoxic and genotoxic effects of cyclophosphamide in mice germ cells. Toxicology 2008; 248: 96-103.

20. Fiorucci E, Lucantoni G, Paone G, et al. Cyclophosphamide and prednisone in the treatment of mild-moderate idiopathic pulmonary fibrosis: comparison of three currently available therapeutic regimens. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2008; 12: 105-111.
21. Starzl TE, Putnam CW, Halgrimson CG, et al. Cyclophosphamide and whole organ transplantation in human beings. *Surg Gynecol Obstet* 1971; 133: 981-991.
22. Uber WE, Self SE, Van Bakel AB, Pereira NL. Acute antibody-mediated rejection following heart transplantation. *Am J Transplant* 2007; 7: 2064-2074.
23. Fraiser LH, Kanekal S, Kehrler JP. Cyclophosphamide toxicity. Characterising and avoiding the problem. *Drugs* 1991; 42: 781-795.
24. Borgmann A, Zinn C, Hartmann R, et al. Secondary malignant neoplasms after intensive treatment of relapsed acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Eur J Cancer* 2008; 44: 257-268.
25. Tripathi DN, Jena GB. Intervention of astaxanthin against cyclophosphamide-induced oxidative stress and DNA damage: A study in mice. *Chemico-Biological Interactions* 2009; 180: 398-406.
26. Rekhadevi PV, Sailaja N, Chandrasekhar M, et al. Genotoxicity assessment in oncology nurses handling anti-neoplastic drugs. *Mutagenesis* 2007; 22: 395-401.
27. Ahmad S, Mika D, Guruvayoorappan C. Chemoprotective and immunomodulatory effect of *Acacia nilotica* during cyclophosphamide induced toxicity. *J Exp Ther Oncol* 2012; 10: 83-90.
28. Andion M, Molina B, Gonzales-Vicent M, et al. High-dose busulfan and cyclophosphamide as a conditioning regimen for autologous peripheral blood stem cell transplantation in childhood non-Hodgkin lymphoma patients: a long-term follow-up study. *Pediatr J Hematol Oncol* 2011; 33: 89-91.
29. Okano S, Eto M, Yoshizumi T, et al. Cyclophosphamide-induced tolerance in rat orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 2001; 71: 447-456.
30. Swystun LL, Shin LY, Beaudin S, and Liaw PC. Chemotherapeutic agents doxorubicin and epirubicin induce a procoagulant phenotype on endothelial cells and blood monocytes. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 619-626.
31. Nepomnyashchikh LM, Molodykh OP, Lushnikova EL, and Sorokina YA. Morphogenesis and histostereological analysis of hepatopathy induced by cyclophosphamide. *Bull Eksp Biol Med* 2010; 150: 104-120.
32. Bayramoğlu G. Sıçanlarda Siklofosfamid İle Oluşturulmuş Oksidatif Strese Karşı Silimarinin Olası Koruyucu Etkileri. Doktora Tezi, Eskişehir: Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2007.
33. Tripathi DN, Jena GB. Ebselen attenuates cyclophosphamide-induced oxidative stress and DNA damage in mice. *Free Rad Res* 2008; 967-977.

34. Pal A, Hu X, Zimniak P, Singh SV. Catalytic efficiencies of allelic variants of human glutathione-S-transferase Pi in the glutathione conjugation of α,β unsaturated aldehydes. *Cancer Lett* 2000; 154: 39-43.
35. Uchida K, Kanematsu M, Morimitsu Y, et al. Acrolein is a product of lipid peroxidation reaction. *J Biol Chem* 1998; 273: 16058-16066.
36. Kern JC, Kehrer JP. Acrolein-induced cell death: a caspase-influenced decision between apoptosis and oncosis/necrosis. *Chem Biol Interact* 2002; 139: 79-95.
37. Hales BE. Comparison of the mutagenicity and teratogenicity of cyclophosphamide and its active metabolites, 4-hydroxycyclophosphamide, phosphoramidate mustard and acrolein. *Cancer Res* 1982; 42: 3016-3021.
38. Korkmaz A, Topal T, Oter S. Pathophysiological aspects of cyclophosphamide and ifosfamide induced hemorrhagic cystitis; implication of reactive oxygen and nitrogen species as well as PARP activation. *Cell Biol Toxicol* 2007; 23: 303-3012.
39. Bendich A. Antioxidant nutrients and immune functions – introduction. *Adv Exp Med Biol* 1990; 262: 1-12.
40. Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 323-333.
41. Richter C, Park JW, Ames BN. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 6465-6467.
42. Wei XJ, Hu TJ, Chen JR, Wei YY. Inhibitory effect of carboxymethylpachymaran on cyclophosphamide-induced oxidative stress in mice. *Int J Biol Macromol* 2011; 49: 801-805.
43. Motawi TM, Sadik NA, Refaat A. Cytoprotective effects of DL-alpha-lipoic acid or squalene on cyclophosphamide-induced oxidative injury: an experimental study on rat myocardium, testicles and urinary bladder. *Food Chem Toxicol* 2010; 48: 2326-2336.
44. Jnaneshwari S, Hemshekhar M, Santhosh MS, Sunitha K, et al. Crocin, a dietary colorant mitigates cyclophosphamide-induced organ toxicity by modulating antioxidant status and inflammatory cytokines. *J Pharm and Pharmacol* 2012; 604-614.
45. Weijl NI, Cleton FJ, Osanto S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. *Cancer Treat Rev* 1997; 23: 209–240.
46. Stankiewicz A, Skrzydlewska E. Protection against cyclophosphamide-induced renal oxidative stress by amifostine: the role of antioxidative mechanisms. *Toxicol Mech Methods* 2003; 13: 301-308.
47. Serafini M, Del Rio D. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool? *Redox Report* 2004; 9: 145-152.
48. Altan N, Dinçel AS, Koca C. Diabetes mellitus ve oxidative stress. *Turk J Biochem* 2006; 31: 51-56.

49. Halliwell B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochem Pharmacol* 1995; 49: 1341-1348.
50. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 1998; 78: 547-581.
51. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41: 1819-1828.
52. Bouillon R, Moody T, Sporn M, Barrett JC, Norman AW. NIH deltanoids meeting on vitamin D and cancer conclusion and strategic options. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 97: 3-5.
53. Van Etten E, Mathieu C. Immunoregulation by 1, 25-dihydroxyvitamin D₃: basic concepts. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 97: 93-101.
54. Mizobuchi M, Ogata H, Koiwa F, Kinugasa E, Akizawa T. Vitamin D and vascular calcification in chronic kidney disease. *Bone* 2009; 45: 26-29.
55. Dobnig H, Pilz S, Scharnagl H, et al. Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D levels with allcause and cardiovascular mortality. *Arch Intern Med* 2008; 168: 1340–1349.
56. Grandi NC, Breitling LP, Brenner H. Vitamin D and cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Prev Med* 2010; 51: 228-233.
57. Kono K, Fujii H, Nakai K. Anti-oxidative effect of vitamin D analog on incipient vascular lesion in non-obese type 2 diabetic rats. *Am J Nephrol* 2013; 37: 167-174.
58. Zempleni J, Rucker RB. *Handbook of vitamins*. 4th ed. CRC Press 2008.
59. Rucker RB. *Handbook of vitamins*. Marcel Dekker, Inc 2001.
60. Armas LA, Hollis BW, Heaney RP. Vitamin D₂ is much less effective than Vitamin D₃ in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 5387-5391.
61. Lips P. Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol* 2006; 92: 4-8.
62. Palomer X, Gonzalez-Clemente JM, Blanco-Vaca F, Mauricio D. Role of vitamin D in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab* 2008; 10: 185-197.
63. Muller K, Diamant M, Bendtzen K. Inhibition of production and function of interleukin-6 by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Immunology Letters* 1991; 28: 115-120.
64. Bouillon R, Garmyn M, Verstuyf A, Segaeert S, Casteels K, Mathieu C. Paracrine role for calcitriol in the immune system and skin creates new therapeutic possibilities for vitamin D analogs. *Eur J Endocrinol* 1995; 133: 7-16.
65. Deluca HF, Cantorna MT. Vitamin D: Its role and uses in immunology. *FASEB J* 2001; 15: 2579-2585.
66. Hypponen E, Laara E, Reunanen A, Jarvelin MR, Virtanen SM. Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: A birth-cohort study. *Lancet* 2001; 358: 1500-1503.
67. Merlino L, Curtis J, Mikuls TR, et al. Vitamin D intake is inversely associated with rheumatoid arthritis. Results from the Iowa Women's Health Study. *Arthritis and Rheum* 2004; 50: 72-77.

68. Zella JB, McCary LC, DeLuca HF. Oral administration of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ completely protects NOD mice from insulin-dependent diabetes mellitus. *Arch Biochem Biophys* 2003; 417: 77-80.
69. Mathieu C, Van Etten E, Decallonne B, et al. Vitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ as modulators in the immune system. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004; 89–90: 449-452.
70. Aksoy H, Akçay F, Kurtul N, et al. Serum 1,25-dihydroxy vitamin D (1,25(OH)₂D₃), 25 hydroxy vitamin D (25(OH)D) and parathormone levels in diabetic retinopathy. *Clin Biochem* 2000; 33: 47-51.
71. Kadowski S, Norman AW. Dietary vitamin D is essential for normal insulin secretion from the perfused rat pancreas. *J Clin Invest* 1984; 73: 759-766.
72. Trump DL, Deeb KK, Johnson CS. Vitamin D: considerations in the continued development as an agent for cancer prevention and therapy. *Cancer J* 2010; 16: 1-9.
73. Fleet JC, Desmet M, Johnson R, Li Y. Vitamin D and cancer: a review of molecular mechanisms. *Biochem J* 2012; 221: 61-76.
74. Krishnan AV, Trump DL, Johnson CS, Feldman D. The role of vitamin D in cancer prevention and treatment. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2010; 39: 401-418.
75. Ting HJ, Yasmin-Karim S, Hsu JW, et al. A positive feedback signaling loop between ATM and the vitamin D receptor is critical for cancer chemoprevention by vitamin D. *Cancer Res* 2012; 72: 958-968.
76. Wong G, Gupta R, Dixon KM, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D and three low-calcemic analogs decrease UV-induced DNA damage via the rapid response pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004; 89-90: 567-570.
77. De Haes P, Garmyn M, Verstuyf A, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and analogues protect primary human keratinocytes against UVB-induced DNA damage. *J Photochem Photobiol B* 2005; 78: 141-148.
78. Chatterjee M. Vitamin D and genomic stability. *Mutat Res* 2001; 475: 69-87.
79. Wu-Wong JR, Nakane M, Ma J, et al. Effects of Vitamin D analogs on gene expression profiling in human coronary artery smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2006; 186: 20-28.
80. Haussler MR, Haussler CA, Whitfield GK, et al. The nuclear vitamin D receptor controls the expression of genes encoding factors which feed the “Fountain of Youth” to mediate healthful aging. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010; 121: 88-97.
81. Marnett LJ, Riggins JN, West JD. Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *J Clin Invest* 2003; 111: 583-593.
82. Jameson JL. Harrison Endokrinoloji. Bereket A, Akçay T (Çeviren). 2. Baskı, İstanbul: Nobel, 2013.
83. Kallay E, Pietschmann P, Toyokuni S, et al. Characterization of a vitamin D receptor knockout mouse as a model of colorectal hyperproliferation and DNA damage. *Carcinogenesis* 2001; 22: 1429-1435.

84. Fedirko V, Bostick RM, Long Q, et al. Effects of supplemental vitamin D and calcium on oxidative DNA damage marker in normal colorectal mucosa: a randomized clinical trial. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 2010; 19: 280-291.
85. Peehl DM, Shinghal R, Nonn L, et al. Molecular activity of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in primary cultures of human prostatic epithelial cells revealed by cDNA microarray analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004; 92: 131-141.
86. Palmer HG, Sanchez-Carbayo M, Ordonez-Moran P, et al. Genetic signatures of differentiation induced by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 in human colon cancer cells. *Cancer Res* 2003; 63: 7799-7806.
87. Swami S, Raghavachari N, Muller UR, Bao YP, Feldman D. Vitamin D growth inhibition of breast cancer cells: gene expression patterns assessed by cDNA microarray. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 80: 49-62.
88. Lambert JR, Kelly JA, Shim M, et al. Prostate derived factor in human prostate cancer cells: gene induction by vitamin D via a p53-dependent mechanism and inhibition of prostate cancer cell growth. *J Cell Physiol* 2006; 208: 566-574.
89. Hamden K, Carreau S, Jamoussi K, et al. 1 α ,25 dihydroxyvitamin D3: therapeutic and preventive effects against oxidative stress, hepatic, pancreatic and renal injury in alloxan-induced diabetes in rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 2009; 55: 215-222.
90. Sardar S, Chakraborty A, Chatterjee M. Comparative effectiveness of vitamin D3 and dietary vitamin E on peroxidation of lipids and enzymes of the hepatic antioxidant system in Sprague–Dawley rats. *Int J Vitam Nutr Res* 1996; 66: 39-45.
91. Dong J, Wong SL, Lau CW, et al. Calcitriol protects renovascular function in hypertension by down-regulating angiotensin II type 1 receptors and reducing oxidative stress. *Eur Heart J* 2012; 33: 2980-2990.
92. Perini P, Calabrese M, Rinaldi L, Gallo P. The safety profile of cyclophosphamide in multiple sclerosis therapy. *Expert Opin Drug Saf* 2007; 6: 183-190.
93. Low JE, Borch RF, Sladek NE. Conversion of 4-hydroperoxycyclophosphamide and 4-hydroxycyclophosphamide to phosphoramidate mustard and acrolein mediated by bifunctional catalysis. *Cancer Res* 1982; 42: 830-837.
94. Cox PJ. Cyclophosphamide cystitis-identification of acrolein as the causative agent. *Biochem Pharmacol* 1979; 28: 2045-2049.
95. Masuda H, Chancellor MB, Kihara K, Yoshimura N. 15-deoxy-Delta12,14- prostaglandin J2 attenuates development of cyclophosphamide-induced cystitis in rats. *Urology* 2006; 67: 435-439.
96. Ribeiro RA, Freitas HC, Campos MC, et al. Tumor necrosis factor and interleukin-1 mediate the production of nitric oxide involved in the pathogenesis of ifosfamide induced hemorrhagic cystitis in mice. *J Urol* 2002; 167: 2229-2234.
97. Adams JD Jr, Klaidman LK. Acrolein-induced oxygen radical formation. *Free Radic Biol Med* 1993; 15: 187-193.

98. Misonou Y, Asahi M, Yokoe S, Miyoshi E, Taniguchi N. Acrolein produces nitric oxide through the elevation of intracellular calcium levels to induce apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: implications for smoke angiopathy. *Nitric Oxide* 2006; 14: 180-187.
99. Korkmaz A, Oter S, Sadir S, et al. Peroxynitrite may be involved in bladder damage caused by cyclophosphamide in rats. *J Urol* 2005; 173: 1793-1796.
100. Souza- Fiho MV, Lima MV, Pompeu MM, Ballejo G, Cunha FQ, Riberio RA. Involvement of nitric oxide in the pathogenesis of cyclophosphamide induced hemorrhagic cystitis. *Am J Pathol* 1997; 150: 247–256.
101. Alfieri AB, Cubeddu LX. Nitric oxide and NK(1) tachykinin receptors in cyclophosphamide-induced cystitis in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 295: 824-829.
102. Yuan M, Smith PB, Brundrett RB, Colvin M, Fenselau C. Glutathione conjugation with phosphoramidate mustard and cyclophosphamide. A mechanistic study using tandem mass spectrometry. *Drug Metab Dispos* 1991; 19: 625–629.
103. Yousefipour Z, Ranganna K, Newaz MA, Milton SG. Mechanism of acrolein-induced vascular toxicity. *J Physiol Pharmacol* 2005; 56: 337-353.
104. Srivastava A, Shivanandappa T. Hepatoprotective effect of the root extract of *Decalepis hamiltonii* against carbon tetrachloride-induced oxidative stress in rats. *Food Chem* 2010; 118: 411-417.
105. Senthilkumar S, Devaki T, Manohar MB, Babu MS. Effect of squalene on cyclophosphamide-induced toxicity. *Clin Chim Acta* 2006; 364: 335-342.
106. Zarei M, Shivanandappa T. Amelioration of cyclophosphamide-induced hepatotoxicity by the root extract of *Decalapis hamiltonii* in mice. *Food and Chem Toxicol* 2013; 57: 179-184.
107. Tripathi DN, Jena GB. Astaxanthin intervention ameliorates cyclophosphamide-induced oxidative stress, DNA damage and early hepatocarcinogenesis in rat: Role of Nrf2, p53, p38 and phase-II enzymes. *Mutat Res* 2010; 69-80.
108. Bhatia K, Kaur M, Atif F, Ali M, Rehman H, Rahman S, Raisuddin S. Aqueous extract of *Trigonella foenum-graecum* L. ameliorates additive urotoxicity of buthionine sulfoximine and cyclophosphamide in mice. 2006; *Food Chem Toxicol* 44: 1744-1750.
109. Kouidhi S, Rouissi K, Hamrita B, Ouerhani S, Cherif M, Elgaaied AB. Therapeutic effects of aloe Vera plant extract against cyclophosphamide and buthionine sulfoximine induced toxicities in the bladder. *Biochem Pharmacol* 2012; 1: 1-7.
110. Aguilar-Mahecha A, Hales BF, Robaire B. Chronic cyclophosphamide treatment alters the expression of stress response genes in rat male germ cells. *Biol Reprod* 2002; 66: 1024-1032.
111. Ghosh D, Das UB, Ghosh S, et al. Testicular gametogenic and steroidogenic activities in cyclophosphamide treated rat: a correlative study with testicular oxidative stress. *Drug Chem Toxicol* 2002; 25: 281-292.

112. McDonald GB, Slattery JT, Bouvier ME, et al. Cyclophosphamide metabolism, liver toxicity, and mortality following hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2003; 101: 2043-2048.
113. Shaunak S, Munro JM, Weinbren K, Walport MJ, Cox TM. Cyclophosphamide-induced liver necrosis: a possible interaction with azathioprine. *Q J Med* 1988; 67: 309-317.
114. Malhi H, Annamaneni P, Slehria S, et al. Cyclophosphamide disrupts hepatic sinusoidal endothelium and improves transplanted cell engraftment in rat liver. *Hepatology* 2002; 112-115.
115. Lushnikova EL, Molodykh OP, Nepomnyashchikh LM, Bakulina AA, Sorokina YA. Ultrastructural picture of cyclophosphamide-induced damage to the liver. *Bull Exp Biol Med* 2011; 151: 751-756.
116. Lameire N, Kruse V, Rottey S, et al. Nephrotoxicity of anticancer drugs – an underestimated problem? *Acta Clin Belg* 2011; 66: 337–345.
117. Newton HB. Neurological complications of chemotherapy to the central nervous system. *Handb Clin Neurol* 2012; 105: 903–916.
118. Pessayre D, Fromenty B, Berson A, et al. Central role of mitochondria in drug-induced liver injury. *Drug Metab Rev* 2012; 44: 34–87.
119. Norman AW, Nemere I, Zhou LX, Bishop JE, Lowe KE, Maiyar AC, et al. 1,25(OH)₂-vitamin D₃, a steroid hormone that produces biologic effects via both genomic and nongenomic pathways. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992; 41: 231-240.
120. Garcion E, Sindji L, Leblondel G, Brachet P, Darcy F. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ regulates the synthesis of gamma-glutamyl transpeptidase and glutathione levels in rat primary astrocytes. *J Neurochem* 1999; 73: 859-866.
121. Sardar S, Chakraborty A, Chatterjee M. Comparative effectiveness of vitamin D₃ and dietary vitamin E on peroxidation of lipids and enzymes of the hepatic antioxidant system in Sprague-Dawley rats. *Int J Vitam Nutr Res* 1996; 66: 39-45.
122. Wiseman H. Vitamin D is a membrane antioxidant. Ability to inhibit iron-dependent lipid peroxidation in liposomes compared to cholesterol, ergosterol and tamoxifen and relevance to anticancer action. *FEBS Lett* 1993; 326: 285-288.
123. Lin AM, Chen KB, Chao PL. Antioxidative effect of vitamin D₃ on zinc-induced oxidative stress in CNS. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1053: 319-329.
124. Leon J, Acuna-Castroviejo D, Escames G, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *J Pineal Res* 2005; 38: 1-9.
125. Çetinkalp Ş, Delen Y, Karadeniz M, et al. The effect of 1 α ,25(OH)₂ D₃ vitamin over oxidative stress and biochemical parameters in rats where Type 1 diabetes is formed by streptozotocin. *Journal of Diabetes and Its Complications* 2009; 23: 401-408.
126. Kono K, Fujii H, Nakai K, et al. Antioxidative effect of vitamin D analog on incipient vascular lesion in non-obese type 2 diabetic rats. *Am j Nephrol* 2013; 37: 167-174.

127. Mauricio D, Mandrup-Poulsen T, Nerup J. Vitamin D analogues in insulin-dependent diabetes mellitus and other autoimmune diseases: A therapeutic perspective. *Diabetes/Metabolism Reviews* 1996; 12: 57-68.
128. Noyan T, Baharoğlu R, Kömüroğlu U. The oxidant and antioxidant effects of 25-hydroxyvitamin D3 in liver, kidney and heart tissues of diabetic rats. *Clin Exp Med* 2005; 5: 31-36.
129. Halicka HD, Zhao H, Li J, et al. Attenuation of constitutive DNA damage signaling by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Aging* 2012; 4: 270-278.
130. Krishnan AV, Trump DL, Johnson CS, Feldman D. The role of vitamin D in cancer prevention and treatment. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2010; 39: 401-418.
131. Giardina C, Madigan JP, Godman Tierney CA, Brenner BM, Rosenberg DW. Vitamin D resistance and colon cancer prevention. *Carcinogenesis* 2012; 33: 475-482.
132. Fleet JC, Desmet M, Johnson R, Li Y. Vitamin D and cancer: a review of molecular mechanisms. *Biochem J* 2012; 221: 61-76.
133. Bao BY, Ting HJ, Hsu JW, Lee YF. Protective role of 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 against oxidative stress in nonmalignant human prostate epithelial cells. *Int J Cancer* 2008; 122: 2699-2706.
134. Salum E, Kals J, Kampus P, et al. Vitamin D reduces deposition of advanced glycation end-products in the aortic wall and systemic oxidative stress in diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract* 2013; 100: 243-249.

8. ÖZGEÇMİŞ

12.08.1985 yılında Çorum'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Çorum'da tamamladım. 2004 yılında Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon bölümünü kazandım ve 2008 yılında aynı fakülteden mezun oldum. 2010 yılında Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji programında yüksek lisans eğitimime başladım. 2008 yılından beri fizik tedavi ve rehabilitasyon dal merkezleri ile özel eğitim okullarında fizyoterapist olarak görev yapmaktayım.