

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

DOXORUBİSİN UYGULANMIŞ SIÇANLARDA
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN SIÇAN
KARACİĞERİNE ETKİSİ

TUĞBA ÇELİK SAMANCI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 18008 proje numarası ve 15004 numaralı ÖYP projesi ile desteklenmiştir.

AYDIN-2020

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji (Tıp) Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde Tuğba ÇELİK SAMANCI tarafından hazırlanan “Doxorubisin Uygulanmış Sıçanlarda Mezenkimal Kök Hücrelerin Karaciğere Etkisi” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 10/06/2020

Üye (T.D.) : Prof. Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN Aydın Adnan Menderes Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Mehtap KILIÇ EREN Aydın Adnan Menderes Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi K. Murat GÜRSES Aydın Adnan Menderes Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE Pamukkale Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Levent TÜMKAYA Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün tarih ve sayılı oturumunda alınan nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Süleyman AYPAK
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince bilimsel tecrübe ve desteklerini esirgemeyen, bilgi ve katkılarıyla tez çalışmamı yöneten değerli danışman hocam **Prof. Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN**'e,

Özellikle mezenkimal kök hücre izolasyonu, karakterizasyonu ve Western Blot yöntemindeki destek ve tecrübelerinden dolayı değerli hocam **Doç. Dr. Mehtap KILIÇ EREN**'e ve değerli arkadaşım **Hatice Pilevneli**'ye

Elektron mikroskopik incelemelerim sırasındaki desteklerinden dolayı kıymetli hocalarım **Prof. Dr. Sait Polat**'a, **Dr. Öğr. Üyesi Yurdun Kuyucu**'ya

Çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen ve beni her daim yüreklendiren değerli hocalarım **Dr. Öğr. Üyesi Kadri Murat GÜRSES**'e, **Dr. Öğr. Üyesi Nezihe Tülün Boylu**'ya, **Doç. Dr. Levent Tümkiye**'ya ve **Doç. Dr. Tolga Mercantepe**'ye

Deneysel çalışmalarım sırasındaki yardımlarından ve desteklerinden dolayı kıymetli hocalarım **Doç. Dr. Murat Boyacıoğlu**'na, **Arş. Gör. Dr. Erhan Bayrak** ve **Arş. Gör. Dr. Hande Sultan Şahiner**'e

Tüm eğitim hayatım boyunca bana inanan, her zaman yanımda olan ve hiçbir koşulda desteğini esirgemeyen eşim **Yasin SAMANCI**'ya, annem **Hacer Çelik** ve babam **Habil Çelik**'e

Bu süreçte en büyük motivasyonum olan, her daim bana güç veren biricik kızım **Asya**'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
RESİMLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ.....	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Karaciğer Gelişimi.....	3
2.2. Karaciğer Dokusunun Anatomisi	5
2.3. Karaciğer Dokusunun Histolojik Yapısı.....	7
2.3.1. Karaciğer Dokusunun Yapısal Organizasyonu.....	7
2.3.2. Karaciğer Lobülleri	9
2.3.2.1. Klasik Lobül (Hepatik Lobül)	9
2.3.2.2. Portal Lobül	10
2.3.2.3. Hepatik Asinüs (Karaciğer Asinüsü).....	10
2.3.3. Karaciğer Hücreleri (Hepatositler)	11
2.3.4. Kupffer Hücreleri	12
2.3.5. Ito hücreleri (Hepatik Yıldız Hücreler)	12
2.3.6. Karaciğer Dokusu Kan Desteği	13
2.4. Karaciğer Dokusunun Fizyolojisi	14
2.5. Doxorubisin	16
2.5.1. Doxorubisinin Kimyasal Yapısı	16
2.5.2. Doxorubisinin Tarihçesi	16
2.5.3. Doxorubisin Farmakinetiği.....	17
2.5.4. Doxorubisin Etki Mekanizması	18
2.5.5. Doxorubisin ve Karaciğer Hasarı	19
2.5.5.1. Doxorubisin ve Oksidatif Stres.....	19

2.5.5.2. Doxorubisin ve Mitokondriyal Hasar	20
2.5.5.3. Doxorubisin ve Apoptozis	21
2.6. Mezenkimal Kök Hücreler	22
2.6.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Keşfi.....	22
2.6.2. Mezenkimal Kök Hücre Kaynakları.....	23
2.6.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Özellikleri	24
2.6.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karaciğer Hasarına Etkileri	25
3. GEREÇ ve YÖNTEM	27
3.1. Deney Hayvanları	27
3.2. Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Eldesi ve Hücre Kültürü İşlemleri... 27	
3.3. Akım Sitometrik Analiz.....	28
3.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin Kırmızı Floresan Protein İle İşaretlenmesi	29
3.5. Karaciğer Hasarının Oluşturulması ve Mezenkimal Kök hücrelerin Sıçanlara Verilmesi 30	
3.6. Kırmızı Floresan Protein ile İşaretlenen Mezenkimal Kök Hücrelerin Floresan Mikroskopta İncelenmesi	30
3.7. Işık Mikroskopik İnceleme	31
3.7.1. Hematoksilen-Eozin Boyama Yöntemi	32
3.7.2. Hepatik Hasar Skorunun Oluşturulması	33
3.7.3. TUNEL Yöntemi	34
3.8. Karaciğer Dokusunun Elektron Mikroskopik Takip Yöntemi	35
3.9. Serum Örneklerinin Biyokimyasal Analizi	37
3.10. Karaciğer Doku Örneklerinin Biyokimyasal Analizi	37
3.10.1. Karaciğer Dokularının Homojenizasyonu	37
3.10.2. Total Protein Miktarının Ölçümü	37
3.10.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Analizi	38
3.10.4. Katalaz (CAT) Analizi.....	38
3.10.5. Glutasyon (GSH) Analizi.....	39
3.10.6. Malondialdehit (MDA) Analizi	39
3.11. Western Blot Yöntemi	41
3.11.1. Protein İzolasyonu ve Protein Miktar Tayini	41
3.11.2. Poliakrilamid jelin (SDS-PAGE) hazırlanması ve proteinlerin jele yüklenmesi	43
3.11.3. Blotlama İşlemi	44
3.11.4. Membranın Antikorlar ile Muamalesi ve Görüntüleme	44
3.12. İstatistiksel Analiz	45

4. BULGULAR	46
4.1. Sıçanların Vücut Ağırlıklarının ve Rölatif Karaciğer Ağırlıklarının Ölçümü.....	46
4.2. Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu.....	47
4.2.1. Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Mikroskopik Görünümü	47
4.2.2. Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerinin Hücre Yüzey Belirteçlerini Ekspresyonu	48
4.3. Kırmızı Floresan Protein İle İşaretlenmiş Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Floresan Mikroskop İle Görüntülenmesi.....	49
4.4. Histopatolojik Bulgular	50
4.4.1. Karaciğer Kesitlerinin Hematoksilen-Eozin Boyaması.....	50
4.4.1.1. Kontrol Grubuna Ait Bulgular.....	50
4.4.1.2. Doxorubisin Uygulama Grubuna Ait Bulgular	52
4.4.1.3. Doxorubisin+Mezenkimal Kök Hücre Grubuna Ait Bulgular	54
4.4.2 TUNEL Boyama.....	56
4.5. Elektron Mikroskopik İncelemelere Ait Bulgular	59
4.5.1. Kontrol Grubuna Ait Bulgular.....	59
4.5.2. Doxorubisin Grubuna Ait Bulgular	61
4.5.3. Doxorubisin+Mezenkimal Hücre Grubuna Ait Bulgular	63
4.6. Serum Örneklerinin Biyokimyasal Analizi	65
4.7. Karaciğer Dokusu Antioksidan Parametrelerinin Ölçümü.....	66
4.8. Western Blot Analizi	67
5. TARTIŞMA.....	70
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	80
KAYNAKLAR.....	81
EKLER	105
ÖZGEÇMİŞ.....	106

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

APS	: Amonyum persülfat
Å	: Angstrom
AI	: Apoptotik indeks
ALT	: Alanin aminotransferaz
AST	: Aspartat amino transferaz
AST	: Aspartat aminotransferaz
ATP	: Adenozin tri fosfat
Bax	: Bcl-2 ilişkili x protein
BSA	: Bovin serum albümin
CAT	: Katalaz
DAB	: 3,3'-diamino benzidin
DAPI	: 4',6-diamino-2-pheyindole
DER	: Düz endoplazmik retikulum
dH₂O	: Distile su
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DOX	: Doxorubisin
DTNB	: 5,5'-ditiyobis, 2-nitrobenzoik asit
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
ER	: Endoplazmik retikulum
ETC	: Elektonik taşıma zinciri
FasL	: Fas ligandı
FBS	: Fetal bovin serum
Fe⁺²	: Demirin ferro formu
Fe⁺³	: Demirin ferrik formu
G	: Gram
g/l	: Gram/litre
GAPDH	: Gliseraldehit-3- fosfat dehidrogenaz
GER	: Granüllü endoplazmik retikulum
GH	: Büyüme hormonu

GHRH	: Büyüme hormonu serbestleştirici hormon
GSH	: Glutasyon
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HCl	: Hidroklorik asit
H-E	: Hematoksilen-eozin
HGF	: Hepatosit büyüme faktörü
IL-6	: İnterlökin-6
k/mg	: Katal/miligram
KCl	: Potasyum klorür
KH₂PO₄	: Potasyum fosfat monobazik
MDA	: Malondialdehit
MEM	: Minimum essentia medium
mg/kg	: Miligram/kilogram
MHC II	: Majör histokompatibilite kompleks II
MKH	: Mezenkimal kök hücre
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
Mm	: Milimolar
μ	: Mikron
μg/ml	: Mikrogram/mililitre
Na₂CO₃	: Sodyum karbonat
Na₃VO₄	: Sodyum ortovanadat
NaCl	: Sodyum klorür
NaOH	: Sodyum hidroksit
NBT	: Nitrotetrazolium blue chloride
Nm	: Nanometre
nmol/mg	: Nanomol/miligram
PBS	: Phosphate buffer saline
PVDF	: Polivinilidin difluorid
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SDS-PAGE	: Sodyumdodesilsülfat - Poliakrilamid Jel
SOD	: Süperoksit dismutaz

TUNEL	: Terminal deoksinükleotidil transferaz (Tdt) aracılı dUTP-biotin çentik uç etiketleme
T3	: Triiyodotironine
T4	: Tetraiyodotironin
TCA	: Trikloroasetik asit
TEM	: Geçirimli elektron mikroskobu
TNF-α	: Tümör nekroz faktör-alfa
TRAIL	: Tümör nekroz faktör ilişkili apoptozis indükleyen ligand
U/mg	: Ünite / miligram
V	: Hacim
μl	: Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Karaciğerin embriyonik gelişiminin kökeni	3
Şekil 2. Karaciğer dokusunun embriyonik gelişim aşamaları.	5
Şekil 3. Karaciğer dokusunun diyagramatik yüzünün gösterimi.....	6
Şekil 4. Karaciğer dokusunun visseral yüzünün gösterimi	6
Şekil 5. Klasik karaciğer lobülünün histolojik yapısı.....	7
Şekil 6. Karaciğer dokusuna ait hücreler ve hepatik sinüzoidlerin yerleşimi.	8
Şekil 7. Karaciğer lobüllerinin yapısı.	9
Şekil 8. Karaciğer asinüsü ve karaciğer dokusunda zonlaşma.	11
Şekil 9. Doxorubisinin kimyasal yapısı.....	16
Şekil 10. Doxorubisin-DNA etkileşimi	18
Şekil 11. Doksorubisin ve oksidatif stres	20
Şekil 12. Apoptoz mekanizması.....	21
Şekil 13. Kemik iliği kaynaklı MKH'lerin akım sitometri analiziyle karakterizasyonu.....	48
Şekil 14. Karaciğer dokularında Bax ve Bcl-2 protein ekspresyonlarının Western blot analizi sonrası jel görüntüleri	68
Şekil 15. Deney gruplarına ait Bax/GAPDH oranlarının densitometrik analizi.....	21
Şekil 16. Deney gruplarına ait Bcl-2/GAPDH oranlarının densitometrik analizi.	69
Şekil 17. Deney gruplarına ait Bax/Bcl-2 oranlarının densitometrik analizi.	69

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. In vitro ortamda mezenkimal kök hücrelerin morfolojik özellikleri	47
Resim 2. Karaciğer dokusunda kırmızı floresan protein ile işaretlenmiş MKH'lerin floresan mikroskop görüntüsü	49
Resim 3. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü.....	50
Resim 4. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü.....	51
Resim 5. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü.....	51
Resim 6. DOX grubuna ait karaciğer dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü	52
Resim 7. DOX grubuna ait karaciğer dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü	53
Resim 8. DOX grubuna ait karaciğer dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü	53
Resim 9. DOX+MKH grubuna ait karaciğer dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü.....	54
Resim 10. DOX+MKH grubuna ait karaciğer dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü.....	55
Resim 11. DOX+MKH grubuna ait karaciğer dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü.....	55
Resim 12. Kontrol grubuna ait TUNEL yöntemiyle boyanmış kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü	58
Resim 13. DOX grubuna ait TUNEL yöntemiyle boyanmış kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü	58
Resim 14. DOX+MKH grubuna ait TUNEL yöntemiyle boyanmış kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü	59
Resim 15. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusunun TEM görüntüsü	60
Resim 16. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusunun TEM görüntüsü	60
Resim 17. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusunun TEM görüntüsü	61
Resim 18. DOX grubuna ait karaciğer dokusunun TEM görüntüsü.....	62
Resim 19. DOX grubuna ait karaciğer dokusunun TEM görüntüsü.....	62
Resim 20. DOX grubuna ait karaciğer dokusunun TEM görüntüsü.....	63
Resim 21. DOX+MKH grubuna ait karaciğer dokusunun TEM görüntüsü	64
Resim 22. DOX+MKH grubuna ait karaciğer dokusunun TEM görüntüsü	64
Resim 23. DOX+MKH grubuna ait karaciğer dokusunun TEM görüntüsü	65

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1 . Karaciğer dokuları takip aşamaları.....	31
Tablo 2. Hematoksilen-Eozin boyama aşamaları	32
Tablo 3. Hepatik hasar skoru (HDS).	33
Tablo 4. TUNEL boyama yöntemi aşamaları	34
Tablo 5. Apoptotik indeks skorlaması	35
Tablo 6. Elektron mikroskopik takip yöntemi	36
Tablo 7. Biyokimyasal analizlerde kullanılan kimyasal ve solüsyonlar.....	40
Tablo 8. Western blot analizinde kullanılan tamponların ve solüsyonların içerikleri	42
Tablo 9. Poliakrilamid jelin (SDS-PAGE) hazırlanışı.....	43
Tablo 10. Deneysel gruplara ait sıçanların vücut ağırlıkları ve rölatif karaciğer ağırlıkları....	46
Tablo 11. Hepatik hasar skoru (HDS) analiz sonuçları	56
Tablo 12. TUNEL boyama yöntemi apoptotik indeks tablosu	57
Tablo 13. Serum örneklerinde ALT ve AST analizi.....	66
Tablo 14. Karaciğer Dokularında MDA ,SOD, CAT, GSH parametrelerinin analizi.....	67

ÖZET

DOXORUBİSİN UYGULANMIŞ SIÇANLARDA MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN SIÇAN KARACİĞERİNE ETKİSİ

Çelik Samancı T. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji- Embriyoloji (Tıp) Programı, Doktora Tezi, Aydın, 2020.

Doxorubisin (DOX) çeşitli kanser türlerinin tedavisinde yaygın olarak kullanılan antrasiklin grubu bir antibiyotiktir. Ancak hepatotoksisite DOX tedavisinin en ciddi komplikasyonlarından biridir ve DOX uygulanan hastaların %40'ında karaciğer hasarı saptanmıştır. Çalışmamızda DOX ile oluşturulmuş hepatotoksisite üzerine kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (MKH) etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla Wistar albino cinsi 24 adet erkek sıçan Kontrol, DOX ve DOX+MKH olmak üzere rasgele 3 gruba ayrıldı. DOX grubu ve DOX+MKH grubundaki sıçanlara 20 mg/kg DOX intraperitoneal olarak verildi. DOX uygulamasının 96. saatinde DOX+MKH grubundaki sıçanlara kemik iliği kaynaklı MKH kuyruk veninden verildi. MKH uygulamasından 48 saat sonra sıçanların vücut ağırlıkları ve rölatif karaciğer ağırlıkları ölçüldü. Karaciğer dokuları ışık mikroskop ve geçirimli elektron mikroskopta incelendi. TUNEL metoduyla apoptotik hücreler saptanarak Western blot yöntemiyle karaciğer dokularında Bax ve Bcl-2 protein ekspresyonları gösterildi. ALT ve AST seviyeleri serum örneklerinde ölçülürken karaciğer dokusunda antioksidan enzim aktiviteleri ölçüldü. DOX uygulanan rat grubunda yapısal olarak sinüzoidal dilatasyonlar, intrasitoplazmik vakuolizasyon içeriğine sahip hepatositler ve nekrozis izlendi. DOX+MKH grubunda ise yapısal hasarda iyileşmeler izlendi. MKH uygulaması apoptotik hücre sayısında ve Bax/Bcl-2 oranında düşüğe sebep oldu. Ayrıca DOX+MKH grubunda ALT, AST ve MDA aktivitelerinde azalma, CAT ve GSH aktivitelerinde ise artış izlendi.

Sonuç olarak, yapılan bu tez çalışmasında kemik iliği kaynaklı MKH tedavisinin DOX uygulamasının sebep olduğu morfolojik değişimleri geriletebildiği, biyokimyasal parametreleri düzenleyebildiği, antioksidan sistem ve apoptoz üzerinden DOX ile indüklenmiş hepatotoksisiteye etki ettiği gösterildi.

Anahtar kelimeler:Doxorubisin, kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre, hepatotoksisite

ABSTRACT

THE EFFECT OF MESENCHYMAL STEM CELLS ON TO THE LIVER OF DOXORUBICIN ADMINISTERED RATS

Çelik Samancı T. Aydın Adnan Menderes University Health Sciences Institute of Histology-Embryology (Medicine) Program, PHD Thesis, Aydın, 2020.

Doxorubicin (DOX) is an anthracycline group antibiotic commonly used in the treatment of various cancer types. However, hepatotoxicity is one of the most serious complications of DOX treatment and liver damage was detected in 40% of patients treated with DOX. In the present study, it was aimed to investigate the effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSC) on DOX-induced hepatotoxicity. For this purpose, 24 Wistar albino male rats were randomly divided into 3 groups as Control, DOX and DOX+MSC. Rats in the DOX group and the DOX +MSC group were given 20 mg/kg DOX intraperitoneally. At the 96th hour of DOX administration, bone marrow-derived MSC was given via tail vein injection to the DOX+MSC group rats. The body weights and relative liver weights of rats were measured 48 hours after MSC injection. The liver tissues were examined under light microscope and transmission electron microscope. Apoptotic cells were detected by using the TUNNEL method and Bax and Bcl-2 protein expressions in liver tissues were analyzed by Western blotting. While ALT and AST levels were measured in serum samples, antioxidant enzyme activities were measured in liver tissue. In the DOX administered rat group sinusoidal dilatations, hepatocytes with intracytoplasmic vacuolization content and necrosis were observed. Whereas structural partial improvements were observed in the DOX+MSC group. MSC injection caused decrease in apoptotic cell count and Bax/Bcl-2 ratio. In addition to, ALT, AST and MDA activities decreased and CAT and GSH activities increased in the DOX+MSC group.

In conclusion, bone marrow-derived MSC therapy may regress morphological changes, regulate biochemical parameters caused by DOX and affect DOX-induced hepatotoxicity through antioxidant system and apoptosis.

Keywords: Doxorubicin, bone-marrow derived mesenchymal stem cell, hepatotoxicity.

1. GİRİŞ

Doxorubisin (DOX), antarasiklin grubuna ait antitümör özellikte kemoteropatik bir antibiyotiktir. DOX tedavisi, uzun yıllardır meme kanseri, yemek borusu kanserleri, çocukluk çağı solid tümörleri, osteosarkomalar ve yumuşak doku sarkomaları başta olmak üzere çeşitli kanser türlerinin tedavisinde antineoplastik ajan olarak kullanılmaktadır (Hortobagyi, 1997; Bonadonna ve ark, 1998; Minotti ve ark, 2004; Hong ve ark, 2016; Damiani ve ark, 2017; Li ve ark, 2018). Ülkemiz hastanelerinde temini zorunlu “kemoteropatik ilaçlar” listesinde yer alması da yaygın şekilde kullanımını vurgulamaktadır. Ancak bu yaygın kullanımı çeşitli dokularda sebep olduğu toksik etkilerinden dolayı sınırlı kalmaktadır (Steinherz ve ark, 1991; Bagchi ve ark, 1995; Bulucu ve ark, 2008; Pugazhendhi ve ark, 2018).

Uygulanan DOX sistematik olarak dokulara dağılır ve değişik oranlarda dokularda birikir. Karaciğer dokusu sahip olduğu detoksifikasyon yeteneğinden dolayı DOX’u bünyesine alarak biriktirir ve bir kısmını metabolize eder (Camaggi ve ark, 1988; Santos ve ark, 2002; Kalender ve ark, 2005; Lal ve ark, 2010). Ancak karaciğer dokusu DOX’un yüksek konsantrasyonlarına maruz kaldığında işlevselliğini yerini getiremeyerek ciddi oranda hasar görmektedir (Kalender ve ark, 2005; Niu ve ark, 2015; Omobowale ve ark, 2018; Song ve ark, 2019). DOX tedavisi uygulanan hastaların %40’nda karaciğer hasarı meydana geldiği bilinmektedir (Wang ve ark, 2015).

DOX toksisitesi oluşum mekanizması tam olarak anlaşılmasına rağmen DOX’un sebep olduğu toksisitenin bir dizi biyokimyasal süreç ile etkileşim içerisinde olduğu bilinmektedir. Ayrıca DOX ilişkili karaciğer toksisite oluşumunun en önemli nedenlerinden biri de reaktif oksijen türlerindeki (ROS) artış olarak kabul edilmektedir (Kalender ve ark, 2005; Ferreira ve ark, 2008; Songbo ve ark, 2019). DOX sahip olduğu “kinon grubunun” varlığından dolayı *in vivo* ve *in vitro* ortamda “superoksit anyonları”, “hidroksil radikalleri” ve “hidrojen peroksit” gibi serbest radikallerin üretimini uyarabilir (Kwok ve Richardson, 2003; Canzoneri ve Oyelere, 2008; Cappetta ve ark, 2017). Karaciğer epitel hücrelerinin hücre zarındaki lipitler DOX ile oluşturulan serbest radikal hasarına duyarlıdır ve bu duyarlılık hücrelerde lipit peroksidasyonunu başlatabilir (Wang ve ark, 2015; Jacevic ve ark, 2017; Barakat ve ark, 2018). DOX bir yandan deoksiribonükleik asit (DNA) yapısındaki bozukluklara sebep olup, DNA duplikasyonunu ve transkripsiyonunu güçlü bir şekilde

baskılamaktadır (Thorn ve ark, 2011; Airoidi ve ark, 2014). Diğer yandan ise, oluşan serbest radikaller oksidatif hasar ve lipid peroksidasyonuna bağlı inflamasyon süreçlerini ve apoptozu tetikleyerek DOX'un sebep olduğu karaciğer toksisitesinin olası mekanizmasını şekillendirmektedir (Ferreira ve ark, 2008; Nagai ve ark, 2015; Edlich ve Martinou, 2016; Liu ve ark, 2017).

Mezenkimal kök hücreler (MKH) *in vitro* ortamda kolayca çoğalabilen, çeşitli hücre hatlarına farklılaşma yeteneğindeki multipotent kök hücrelerdir (Caplan, 1991). Kemik iliği, umbilikal kord, plasenta, yağ doku ve diş pulpası gibi birçok dokudan kolaylıkla izole edilebilirler (Gronthos ve ark, 2000; Campagnoli ve ark, 2001; Zuk ve ark, 2001; Zhang ve ark, 2003; Wagner ve ark, 2005; Friedman ve ark, 2007). Vücuda verildiğinde hasarlı bölgeye yönelebilir ve bu bölgedeki onarımı tetikleyici sinyaller oluşturarak parakrin etkiler gösterebilirler (Rüster ve ark, 2006; Segers ve ark, 2006; Can, 2014). Bu özelliklerinden dolayı MKH'lerin çeşitli hastalıkların tedavisindeki etkileri araştırılmaya devam etmektedir. Yapılan çalışmalar da MKH uygulamasının çeşitli hastalıklarda iyileştirici etkilerini göstermiştir (Eom ve ark, 2015; Mao ve ark, 2017; Moreira ve ark, 2017; Poltavtseva ve ark, 2019).

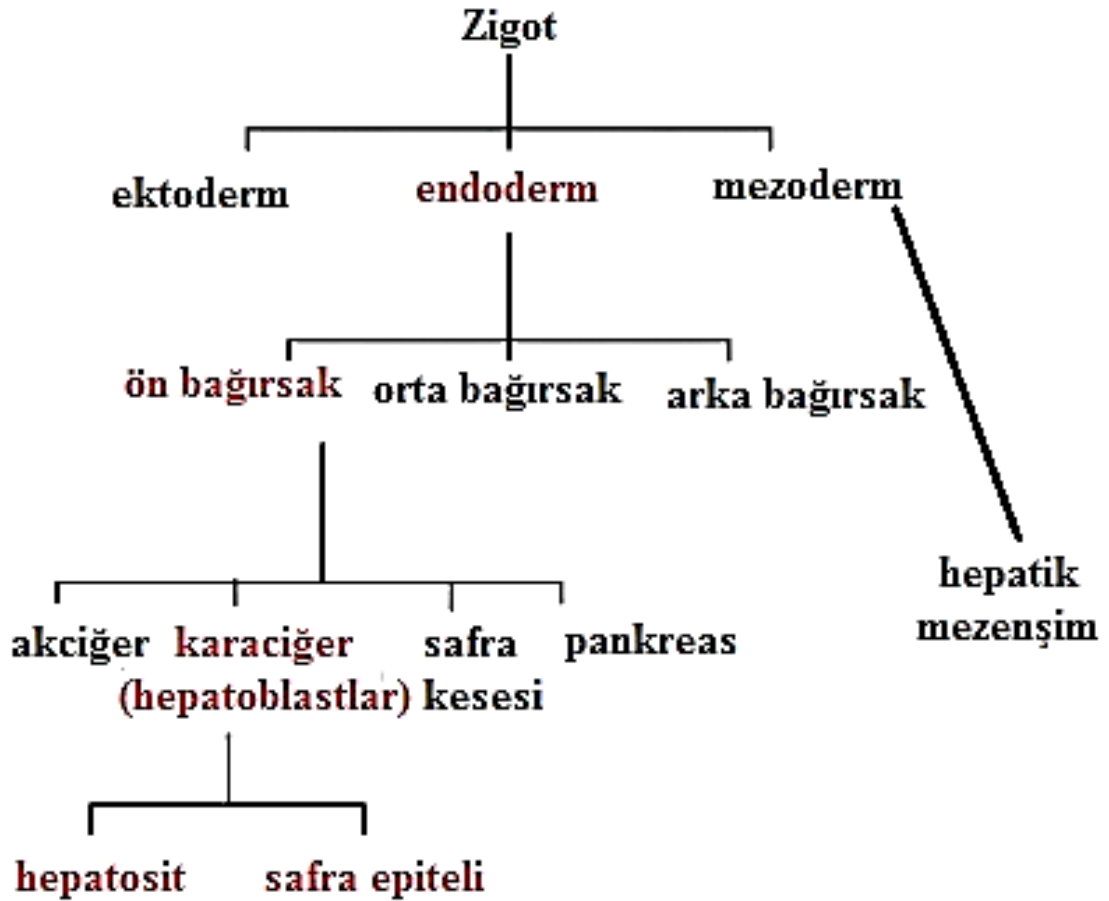
MKH'ler özellikle sahip oldukları farklılaşma yetenekleri ve parakrin etkiler sayesinde hem hayvan çalışmaları hem de klinik uygulamalar da karaciğer hastalıklarının tedavisinde de iyileşme sürecini etkileyebilmektedirler (Alison ve ark, 2009; Banas ve ark, 2009; Cho ve ark, 2009; Kisseleva ve ark, 2010; Muraca, 2011; Eom ve ark, 2015). MKH'ler hasarlı karaciğer dokularına uygulandığında endovasküler yaklaşım aracılığıyla karaciğer dokusuna göç edebilmekte ve karaciğer epitel hücrelerine farklılaşabilmektedirler. Sonraki aşamada karaciğer epitel hücreleriyle kaynaşarak karaciğer dokusunun onarımı ve yenilenmesinde önemli kaynak oluşturabilmektedirler. Ayrıca parakrin etkileri sayesinde karaciğer işlevleri tekrar yerine gelebilmekte, apoptoz baskılanabilmekte ve organizmanın hayatta kalma oranı artabilmektedir (Parekkadan ve ark, 2007; Banas ve ark, 2009; Carvalho ve ark, 2009; Pan ve ark, 2011; Sun ve ark, 2014; Liu ve ark, 2015).

Son yıllarda karaciğer hastalıklarının tedavisinde MKH'lerin iyileştirici etkilerinin ortaya çıkması, MKH uygulamasının ilaç bağımlı toksisitelerin etkisini azaltabileceğini düşündürmektedir. Bu bağlamda çalışmamızda çeşitli kanser türlerinin tedavisinde yaygın kullanıma sahip kemoteropik ajan olmasına rağmen toksik etkilerinden dolayı kullanımı kısıtlanan DOX'un sebep olduğu karaciğer toksisitesine kemik iliği kaynaklı MKH'lerin etkisinin araştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğer Gelişimi

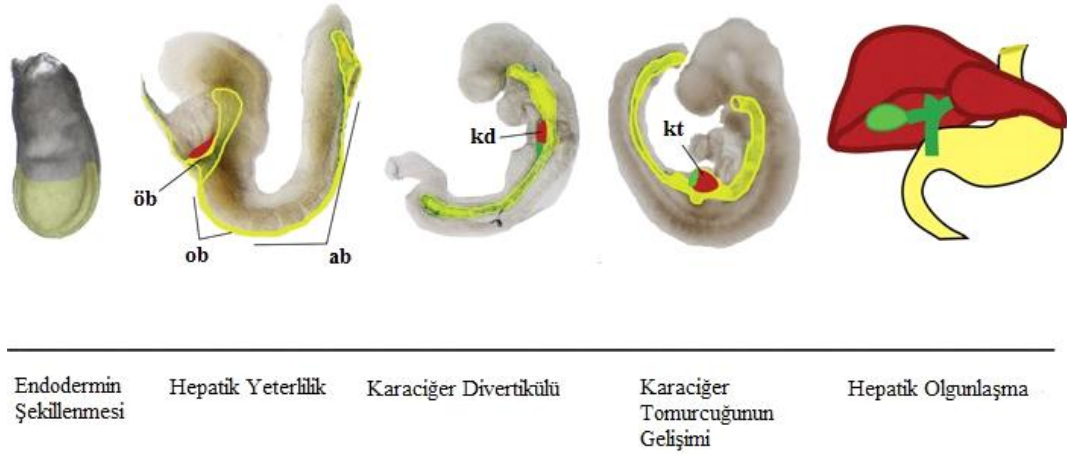
Embriyonik gelişimin ikinci haftasında embriyoblastta meydana gelen farklılaşmayla epiblast ve hipoblastı içeren “bilaminer embriyonik disk” oluşur. Gelişimin üçüncü haftasında bilaminer embriyonik disk “trilaminer embriyonik diske” dönüşür ve bu süreç “**gastrulasyon**” olarak adlandırılır. Gastrulasyon süreci ile embriyonun doku ve organlarının gelişeceği endoderm, mezoderm ve ektodermi içeren üç germ yaprağı oluşmaktadır (Sadler, 2011). Karaciğer dokusu parankimi endoderm tabakasından gelişirken, karaciğer dokusu stroması mezoderm tabakasından gelişmektedir (Şekil 1) (Wells ve Melton, 2000).



Şekil 1. Karaciğerin embriyonik gelişiminin kökeni (Zorn ve Wells, 2007).

Gelişimin üçüncü haftasında çeşitli transkripsiyon faktörleri ve sinyal yollarının aktivasyonu ile endoderm tabakası şekillenir. Endodermin mezoderm ile çevrenmesiyle ilkel bağırsak tüpü oluşur (Shen, 2007; Zorn ve Wells, 2007). Mezoderm tarafından salınan çeşitli transkripsiyon faktörlerinin” etkisiyle primitif bağırsak tüpü anterior-posterior yönde uzar. Uzayan primitif bağırsak tüpü “ön bağırsak”, “orta bağırsak” ve “arka bağırsak” olmak üzere üç bölüme ayrılır. Karaciğer dokusu primitif bağırsak tüpünün ilk kısmı olan ön bağırsaktan gelişir (Şekil 1) (Tremblay ve Zaret, 2005; Moore-Scott ve ark, 2007). Ön bağırsağın gelişim sürecinin ardından endoderimde “hepatik yeterlilik” olarak adlandırılan süreç başlar. “Hepatik yeterlilik”, karaciğer gelişim sürecini uyarıcı etkiye sahip sinyallere cevap verebilme özelliğidir. Sadece bu özelliğe sahip yani hepatik yeterliliğe ulaşmış endodermal hücreler öncül karaciğer hücrelerine farklılaşabilir. Hepatik yeterliliğe ulaşan endodermal hücreler gelişimin ilerleyen aşamalarında “hepatoblast” olarak adlandırılan hücrelere dönüşme yeteneğine erişmiş olur (Zaret, 2000; North ve Goessling, 2011). Karaciğerin çeşitli transkripsiyon faktörleriyle uyarılmasıyla hepatik farklılaşma süreci gelişir ve kübik yapıdaki hepatik epitel hücreleri yalancı çok katlı epitele dönüşür. Hücre katmanındaki bu artış sonucu dördüncü haftada ön bağırsağın kaudal kısmından ventral yönde seyreden “hepatik divertikül” oluşur (Bort ve ark, 2006). Hepatik divertikül içerisinde hızla büyüyen hepatoblast olarak adlandırılan hepatik epitel hücreleri “karaciğer tomurcuğunu” oluşturmak üzere göç etmeye başlar. Oluşan karaciğer tomurcuğu içerisinde hepatoblastlar, hematopoetik elementler, gelişmekte olan stellat hücreler ve hepatositlerin göçü esnasında kemotaktik faktörler salgılayan endotelial hücreler yer alır (Shiojiri ve Sugiyama, 2004; Bort ve ark, 2006; Tatsumi ve ark, 2007). Karaciğer dokusu gelişimi sırasında multipotent özelliğe sahip öncü hepatik hücreler (hepatositler) çoğalarak hepatositlere ve ileriki evrelerde intrahepatik kanalları oluşturacak kolanjiositlere farklılaşırlar (Şekil 2) (Lemaigre ve Zaret, 2004).

Hepatositler arasında yer alan kan damarları olan karaciğer sinüzoidleri anjiogenezis ile oluşurlar (Collardeau-Frachon ve Scoazec, 2008; Elvevold ve ark, 2008). Karaciğer dokusunda hepatositler dışında “stellat hücreler” ve “kupffer hücreleri” de yer almaktadır. Perisinüzoidal aralıkta yer alan hepatik stellat hücrelerin (Ito hücreleri) kökenleriyle ilgili tartışmalar mevcut olmakla birlikte yapılan son çalışmalar mezotelial orjinli olduklarını desteklemektedir (Friedman, 2008; Loo ve Wu, 2008; Asahina ve ark, 2009). Karaciğer makrofajları olarak bilinen kupffer hücreleri ise mezenşimden köken alan hücreler olarak bilinmektedir (Schulz ve ark, 2012; Yona ve ark, 2013).



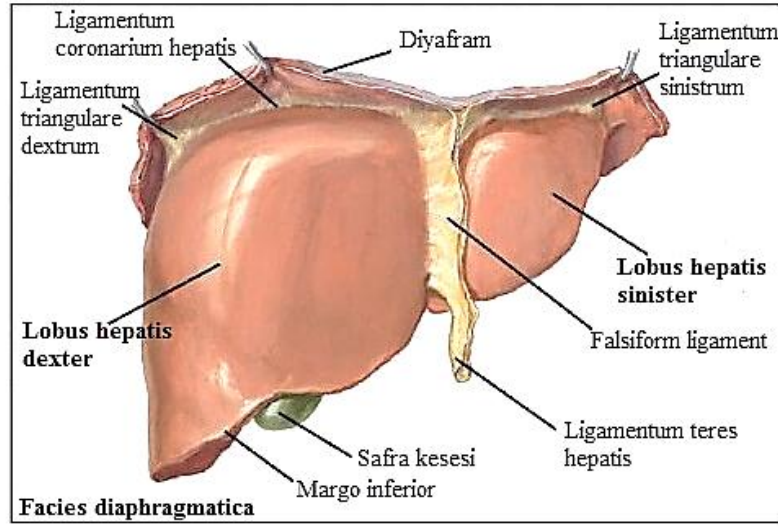
Şekil 2. Karaciğer dokusunun embriyonik gelişim aşamaları (Zorn ve Wells, 2007).

2.2. Karaciğer Dokusunun Anatomisi

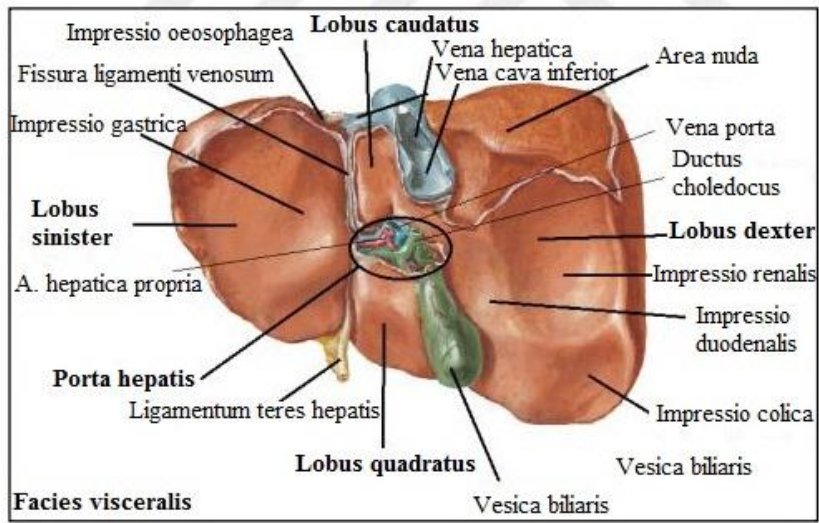
Vücudun en büyük bezi ve iç organı olan karaciğer diyaframın alt kısmında, abdomenin sağ üst kısmında, mide ve bağırsakların üzerinde yer alır. Karaciğer 1400-1600 gram ağırlığa sahiptir. Çocuklarda karaciğer ağırlığı vücut ağırlığının % 5'ini, yetişkinlerde ise % 2'sini oluşturmaktadır. Karaciğer diğer organlarla temas ettiği bölgeler ve area nuda olarak adlandırılan bölgesi dışında periton ile çevrenmiştir. Karaciğer dokusu kollajen ve elastik liflerden oluşmuş fibröz yapıda bir kılıf olan **Glisson kapsülü** ile çevrenmiştir. Glisson kapsülü karaciğer dokusunun bütünlüğünün ve şeklinin korunmasına ek olarak organ içerisine yaptığı girintiler ile organı lob ve lobüllere ayırmaktadır. Karaciğer diyaframın alt kısmına gevşek bağ dokusu ile tutunarak, karın içerisinde yer alan organların üst kısmında yer alır. Karaciğer diyaframa komşu olan diyafragmatik yüz (facies diaphragmatica) ve iç organlara komşu olan visseral yüz (facies visceralis) olmak üzere iki yüze sahiptir. Diafragmatik yüz konveks şekillidir ve düzgün yüzeye sahiptir (Şekil 3) (Sancak ve Cumhuriyet, 2004; Ross ve Pawlina, 2014; Arıncı ve Elhan, 2016). Diyafragmatik yüz visseral yüzden daha büyüktür ve pars superior, pars anterior, pars dextra ve pars posterior olmak üzere dört bölüme ayrılır.

Visseral yüz karaciğerin arkaya ve hafif sola bakan karın içi organlara komşu olan kısmıdır ve konkav şekle sahiptir. Visseral yüzün tam ortasında porta hepatis yer alır. Porta hepatis, arteria hepatica propria'nın dallarının girdiği, lenf damarları ve safra kanallarının

çıkıldığı bölümdür. Glisson kapsülünün damarlar etrafında karaciğer dokusu içerisine doğru yaptığı girintiler karaciğeri loblara, lobüllere ve segmentlere ayırır. Karaciğer dokusu lobus hepatis dexter ve lobus hepatis sinister olmak üzere iki büyük loba ayrılır. Bu loblar karaciğerin ön ve üst yüzeyinde falsiform ligament (ligamentum falciforme hepatis) ile birbirinden ayrılır (Şekil 3). Karaciğerin visseral yüzü ise lobus hepatis dexter, lobus hepatis sinister, lobus quadratus ve lobus caudatus olarak dört loba ayrılır (Şekil 4) (Sancak ve Cumhuriyet, 2004; Ross ve Pawlina, 2014; Arıncı ve Elhan, 2016;).



Şekil 3. Karaciğer dokusunun diyagramatik yüzünün gösterimi (Netter, 2011).

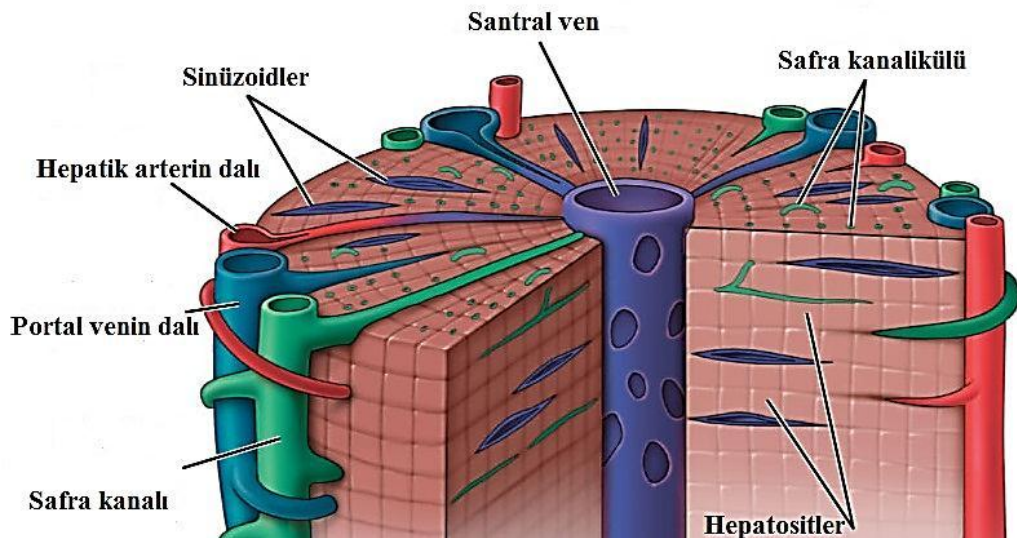


Şekil 4. Karaciğer dokusunun visseral yüzünün gösterimi (Netter, 2011).

2.3. Karaciğer Dokusunun Histolojik Yapısı

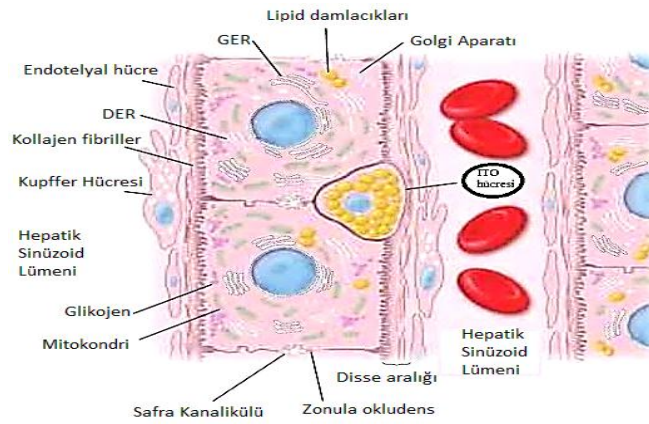
2.3.1. Karaciğer Dokusunun Yapısal Organizasyonu

Karaciğer dokusu diyaframla bağlantılı olduğu bölge dışında sıkı bağ dokusundan oluşmuş fibröz yapıda bir kapsül ile çevrilidir. Yaklaşık 70-100 μ kalınlığındaki kapsülün peritonla ilişkili kısmı seröz mezotel ile örtülüdür. Kollajen ve elastik lifler açısından zengin olan bu kapsül **Glisson kapsülü** olarak adlandırılır. Glisson kapsülü karaciğer dokusuna yaptığı destek görevinin yanı sıra karaciğerin şeklinin korunmasını da sağlar. Kapsül karaciğerin alt kısmındaki hilumda (porta hepatis) kalınlaşır ve porta hepatis bölgesinden içeriye doğru ilerleyerek kan damarları, lenf damarları, sinirler ve safra kanallarına desteklik sağlar. Hilum bölgesinden hepatik portal ven ve hepatik arter karaciğere giriş yaparken hepatik ven, lenf damarları ve safra kanalları bu bölgeden karaciğeri terk ederler (Ovale ve Nahirney, 2009; Ross ve Pawlina, 2014; Mescher, 2019). Glisson kapsülü, karaciğer içerisine doğru ilerleyip dallanarak hepatik arter, portal ven ve safra kanallarının etrafında yer alan bağ dokusu şeklinde devam eder. Hepatik arter, portal ven ve safra kanallarından oluşan yapı **portal alan (portal triad)** olarak adlandırılır. Karaciğer dokusunun % 80'lik kısmını karaciğer parankimi % 20'lik kısmını ise karaciğer stroması oluşturur (Ovale ve Nahirney, 2009). Karaciğer parankimini santral ven etrafına ışınal olarak yerleşmiş karaciğer epitel hücreleri olan hepatositler oluşturmaktadır. Hepatositlerin yan yana dizilmesiyle hepatosit plakları olarak adlandırılan yapılar oluşmaktadır (Şekil 5).



Şekil 5. Klasik karaciğer lobülünün histolojik yapısı (Herlihy, 2007).

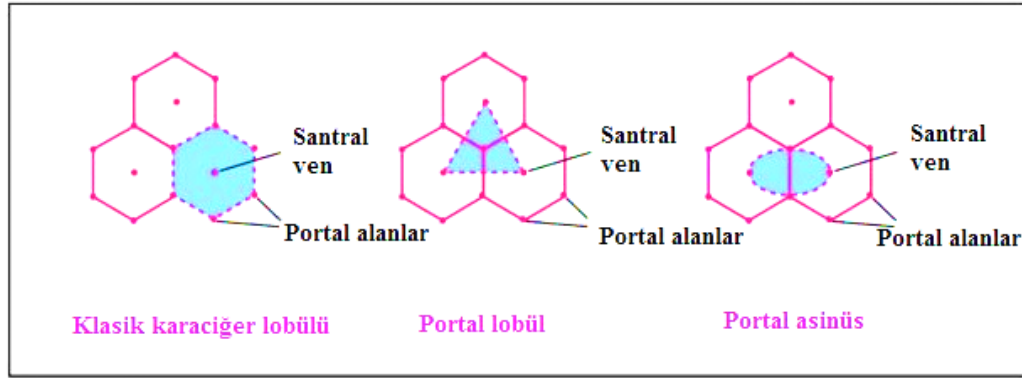
İnsan karaciğerinde çoğunlukla tek hücre kalınlığında bulunan hepatosit plakları embriyoda ve yetişkinlerde yenilenme evresinde iki hücre kalınlığında bulunurlar (Ovale ve Nahirney, 2009; Ross ve Pawlina, 2014). Karaciğer stroması ise hepatosit plaklarını destekleyen retiküler liflerden oluşmuştur ve içerisinde sinirleri, kan damarlarını, lenf damarlarını ve safra kanallarını içermektedir (Ross ve Pawlina, 2014; Mescher, 2019). Karaciğer parankimini oluşturan hepatosit plakları birbirinden **sinüzoidler** adı verilen boşluklar aracılığıyla ayrılır (Şekil 5). Sinüzoidler kesintili pencereci endotel hücreleri ve etrafında gevşek bir bazal laminadan oluşan retiküler liflerle çevrelenmiş, 9-15 µ kalınlığında yapılardır (Ovale ve Nahirney, 2009; Mescher, 2019). Endotel hücreleri arasında karaciğerin makrofajları olarak bilinen Kupffer hücreleri yer almaktadır. Sinüzoidlerin sahip olduğu bu kesintili ve pencereci kapiller plazmanın sinüzoidler çevresinde yer alan perisinüzoidal aralık olan Disse aralığına geçişinde önemli role sahiptir (Mescher, 2019). **Disse aralığı** sinüzoidleri döşeyen endotel hücre tabakasını hepatositlerin yüzeyinden ayıran içleri sıvı dolu dar boşluklardır. Plazmanın içerisine aktığı bu boşluklar sinüzoidler ve hepatositler arasında madde alışverişinde rol alırlar (Ovale ve Nahirney, 2009; Mescher, 2019). Hepatositlerin bazal yüzeylerinde bulunan düzensiz küçük mikrovilluslar Disse aralığına doğru uzanarak hepatositler ve plazma arasındaki madde alışverişi sırasında hepatosit yüzey alanını yaklaşık altı kat arttırmaktadır. Ayrıca disse aralığı kronik anemi durumundaki işlevinden ve fetusta medulla dışı hematopoez bölgesi olmasından dolayı önemli fonksiyonlara sahiptir. Ito hücreleri olarak bilinen A vitamini depolama özelliğine sahip yıldız hücrelerde disse aralığında yer almaktadır (Ovale ve Nahirney, 2009) (Şekil 6).



Şekil 6. Karaciğer dokusuna ait hücreler ve hepatik sinüzoidlerin yerleşimi (Ross ve Pawlina, 2014).

2.3.2. Karaciğer Lobülleri

Karaciğer yapısının daha iyi anlaşılabilmesi için karaciğerin işlevleri göz önüne alınarak karaciğer dokusu **karaciğer asinüsü**, **klasik lobül (hepatik lobül)** ve **portal lobül** olmak üzere üç lobül şeklinde incelenmektedir (Şekil 7).



Şekil 7. Karaciğer lobüllerinin yapısı (Ross ve Pawlina, 2014).

2.3.2.1. Klasik Lobül (Hepatik Lobül)

Karaciğer preparatlarında nispeten kolayca görülebilen ve karaciğer parankiminin daha iyi anlaşılmasını sağlayan karaciğer lobülüdür. Klasik lobül yapısı karaciğere giriş yapan portal ven ve hepatik arterin getirdiği kanın periferden merkeze ilerlerken izlediği yolu temel almaktadır. Klasik lobülün düzenlenişinde karaciğerin sahip olduğu endokrin fonksiyonu ön plandadır. Klasik lobülün yapısında ışımsal dizilmiş hepatosit plakları sinüzoidler ile birbirinden ayrılmıştır ve lobülün merkezinde santral ven olarak adlandırılan bir venül yer almaktadır. Altıgen şekilli klasik lobül yaklaşık 2,0 x 0,7 mm ölçülerine sahiptir ve altıgenin köşe kısımlarında gevşek bağ dokusu içerisinde portal triadların yer aldığı portal alanlar bulunmaktadır. Portal alanda portal venül, hepatik arterden dallanan arteriyol ve bir veya iki adet kübik epitel ile döşeli safra kanalı bulunur. Portal alanlarda yer alan stromal bağ doku karaciğer dışında glisson kapsülü şeklinde devam eder. Portal alanda bağ dokusu ve hepatositleri birbirinden ayıran aralık **periportal aralık (Mall aralığı)** olarak adlandırılır ve bu aralığın lenfin kaynak yerlerinden olduğu düşünülmektedir (Ross ve Pawlina, 2014).

2.3.2.2. Portal Lobül

Portal lobülün düzenlenişinde karaciğerin sahip olduğu safra salgılama gibi ekzokrin işlevi ön plandadır. Portal lobül yapısını oluşturan üçgen şeklinin dış kenarlarını bir portal vene en yakın konumda olan üç adet santral ven oluşturur. Safra akımı kan akımına ters yönde olacak şekilde hepatositlerden portal alana doğru akar. Portal lobülün bu düzenlenişi karaciğerin ekzokrin özelliğinin diğer ekzokrin bezlerle benzer düzenlenişinin anlaşılmasına olanak sağlamaktadır (Ross ve Pawlina, 2014).

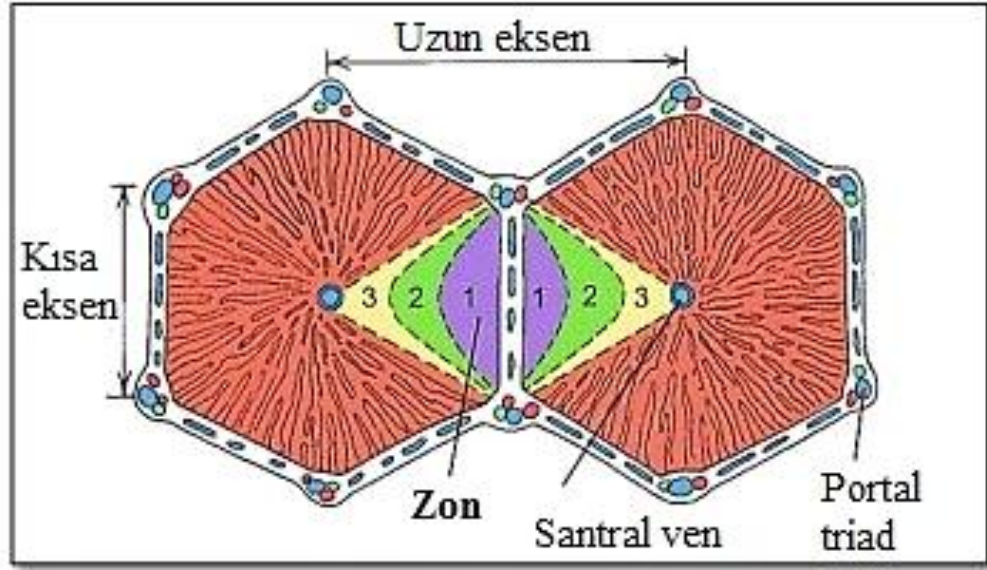
2.3.2.3. Hepatik Asinüs (Karaciğer Asinüsü)

Portal lobülün düzenlenişi karaciğerin sahip olduğu metabolik aktivitenin değerlendirilmesi, hepatositlere kan sağlanması ve karaciğer patolojisinin anlaşılmasını sağlayan lobül yapısıdır. Karaciğer asinüsü iki portal alana en yakın konumdaki santral venlere uzanan hepatositlerin oluşturduğu oval yapıdır. Hepatositler bu lobül yapısında üç zon halinde düzenlenirler.

Hepatik arteriyole en yakın konumdaki hepatositleri içeren bölge **Zon 1** olarak adlandırılır. Bu zon hepatik arteriyole olan yakınlığından dolayı besin ve oksijen açısından en zengin kanın ulaştığı alandır. Bu sebepten dolayı bu zondaki hepatositler protein sentezi gibi fonksiyonları yerine getirir (Mescher, 2019). Zon 1'de yer alan hepatositler dolaşım bozukluğu gibi durumlarda en son ölen ve ilk yenilenme özelliğine sahip hücrelerdir (Ross ve Pawlina, 2014).

Santral venin yakınında yer alan hepatositlerin oluşturduğu alan **Zon 3** olarak adlandırılır. Bu zondaki hepatositler yağ metabolizmasında ve ilaçların biyotransformasyonunda görev alır. Bununla birlikte bu zondaki hepatositler en az oksijen ve en az besin içeren kana maruz kaldıklarından dolayı Zon 3 yağlanmanın ve iskemik nekrozun ilk gözleneceği zondur.

Zon 3 ve Zon 1 arasında kalan alan ise sınırları tam belirli olmayan **Zon 2** olarak adlandırılır (Mescher, 2019) (Şekil 8).



Şekil 8. Karaciğer asinüsü ve karaciğer dokusunda zonlaşma (Ross ve Pawlina, 2014).

2.3.3. Karaciğer Hücreleri (Hepatositler)

Karaciğerin majör hücre popülasyonunu oluşturan hepatositler yaklaşık 20-30 µm çapında, çok yüzlü (polihedral) ya da kübik epitelyal hücrelerdir. Hepatositler karaciğer hücrelerinin %80'lik kısmını oluşturan hücrelerdir (Ovale ve Nahirney, 2009; Ross ve Pawlina, 2014; Mescher, 2019). Karaciğer sinüzoidleri arasında ard arda dizilmiş hücre tabakaları şeklinde bulunan hepatositler genellikle merkezde bulunan tek çekirdeğe sahiptirler. Bazı hepatositler ise iki ya da daha fazla sayıda çekirdek içerebilirler (Ovale ve Nahirney, 2009; Mescher, 2019). Hepatositlerin yaklaşık %20'si iki çekirdeklidir (Ovale ve Nahirney, 2009). Eozinofilik sitoplazmaya sahip hepatositlerin sitoplazmaları işlevselliğine bağlı olarak organel içeriğinde farklılıklar göstermektedir. Hepatosit sitoplazmasında bulunan bol mitokondriyonlar çeşitli hücresel işlevlerin gerçekleştirilmesinde gerekli adenozintrifosfat (ATP) sentezinden sorumlu organellerdir. Hepatositler protein sentezinde görevli, hepatosit sitoplazmasında bazofilik alanlar şeklinde bulunan çok sayıda granüllü endoplazmik retikulum (GER) ve ribozom içerirler (Ross ve Pawlina, 2014; Mescher, 2019). Safra kanaliküllerine ve çekirdeğe yakın konumda bulunan golgi kompleksleri, golgi komplekslerine yakın peroksizomları, belirgin düz endoplazmik retikulumları (dER) ve lizozomları sitoplazmalarında yer alır (Ovale ve Nahirney, 2009; Mescher, 2019). Polihedral

şekle sahip hepatositler üç işlevsel yüzeye sahiptir. Birbirine komşu iki hepatositin bitişik yüzeylerinde yer alan safra kanaliküllerinin oluşturduğu olukların bulunduğu kanaliküler yüzey, disse aralığına açılan kısımda yer alan mikrovillus bulunduran hepatosit yüzeyi emilim ile ilişkili sinüzoidal yüzey ve komşu iki hepatositin temas bölgelerinde tutunmadan sorumlu yüzeydir (Ovale ve Nahirney, 2009). Sinüzoidler ile birbirinden ayrılan hepatosit plakları yan yana dizilmiş hepatositlerin desmozomlar ve sıkı bağlantılarla sıkıca tutunmalarıyla oluşmaktadır. Sıkı bağlantılarla birbirine bağlanmış iki hepatositin apikal yüzeyleri, safra kanaliküllerini oluşturmak üzere oluklar oluşmasına sebep olmaktadır. Birbirleriyle birleşerek kanallar oluşturan safra kanalikülleri portal alanlanlarda bulunan safra kanallarında sonlanırlar ve sağ ve sol hepatik kanallar aracılığıyla karaciğeri terk ederler. Hepatositler safra kanalikülleri içerisine safra tuzları, safra asitleri, yağ asitleri, elektrolitler, fosfolipitler, kolestrol ve bilirubin karışımından oluşan safranın salgılanmasından sorumludurlar (Mescher, 2019).

2.3.4. Kupffer Hücreleri

Sinüzoidlerin endotel hücreleri arasında yer alan karaciğer makrofajları olarak adlandırılan Kupffer hücreleri yuvarlak şekilli soluk boyanan hücrelerdir. Elektron mikroskopik incelemelerde Kupffer hücrelerinin bol lizozomlara, filopoda olarak adlandırılan yalancı ince ayakçıklara ve endositik veziküllere sahip oldukları gözlenir. Kökeni kandaki monositler olan Kupffer hücreleri fagositik özelliğe sahiptir. Dalaktan karaciğer dokusuna ulaşan yaşlanmış eritrositleri tanıma özelliğindeki bu hücreler fagositozla eritrositleri parçalarlar. Parçalama işlemi sonucu açığa çıkan hem ve demir yeniden kullanılırken ferritinin depolanmasında görevlidirler. Bu özelliğinin yanı sıra Kupffer hücreleri antijen sunan hücreler olarak da görev yapmaktadırlar (Ovale ve Nahirney, 2009; Ross ve Pawlina, 2014; Mescher, 2019).

2.3.5. Ito hücreleri (Hepatik Yıldız Hücreler)

Disse aralığında yerleşim gösteren Ito hücreleri hepatik yıldız hücreler ve hepatik stellat hücreler olarak da adlandırılmaktadırlar. Büyüme faktörleri, ekstraselüler matriks proteinleri ve çeşitli sitokinlerin salgılanmasında görevli bu hücreler özellikle

sitoplazmalarında bulunan yağ damlacıklarında A vitamininin depolanmasında görev alırlar. Bu hücreler A vitaminini retinil ester şeklinde depolarlar (Ross ve Pawlina, 2014; Mescher, 2019). Bu hücrelerden retinol formunda salınan A vitamini retinol bağlayıcı proteinle bağlanarak retinaya ulaşır ve görme ile ilişkili pigment olan rodopsinin oluşumunu sağlar (Ross ve Pawlina, 2014). İto hücreleri alkolik karaciğer hastalığı gibi patolojik durumlar geliştiğinde miyofibroblastlara farklılaşma yetenekleriyle kollajen sentezleyerek fibrozis gelişimine sebep olmaktadır (Ovale ve Nahirney, 2009; Ross ve Pawlina, 2014).

2.3.6. Karaciğer Dokusu Kan Desteği

Hepatik portal ven besin açısından zengin oksijenden yoksun kanı taşıyarak karaciğer kan desteğinin %75'lik kısmını oluşturur. Hepatik portal ven tarafından karaciğere taşınan kan sindirim kanalından, dalak ve pankreas gibi organlardan geçtikten sonra karaciğere ulaştığından bağırsaklar tarafından absorbe edilen toksinleri, dalaktan gelen kan parçalanma ürünlerini ve enteroendokrin hücrelerin salgı ürünlerini içermektedir. Dolayısıyla karaciğer bu kanlanma sisteminden dolayı toksinlere ilk maruz kalan organdır (Ovale ve Nahirney, 2009; Ross ve Pawlina, 2014; Mescher, 2019).

Hepatik arter ise karaciğer kan desteğinin %25'lik kısmını oluşturan oksijenden zengin kanı karaciğere taşımaktadır. Hepatik arter ve portal venden karaciğere ulaşan venöz ve arteriyel kan hepatosit plakları arasında yer alan sinüzoidlerde karışarak santral venlere iletilir. Dolayısıyla hepatositler hiçbir zaman tam oksijenli kana maruz kalmaz. Santral venler birleşerek sublobüler venüllere açılır. Sublobüler venlerden gelen kan da hepatic venlere aktarılarak vena kava inferiora boşalır (Ovale ve Nahirney, 2009; Ross ve Pawlina, 2014; Mescher, 2019). Karaciğerde kan akım yönü periferden merkeze doğru gerçekleşir. Dolayısıyla karışık kan öncelikle periferdeki hücrelere ardından da santral ven çevresindeki hücrelere ulaşır. Bu durum santral venin çevresindeki hücrelerin daha düşük oranda besin ve oksijen içeren kana maruz kalmasına sebep olur. Bu yüzden santral ven çevresindeki hücreler daha çok karaciğerin glikojen metabolizması ve detoksifikasyon fonksiyonundan sorumluyken, periferdeki hücreler çoğunlukla protein sentezi gibi fonksiyonlarından sorumludur (Ross ve Pawlina, 2014).

2.4. Karaciğer Dokusunun Fizyolojisi

Karaciğer dokusu kendisine özgü histolojik yapısı ve damarlanma özelliği sayesinde endokrin, ekzokrin ve metabolik olmak üzere vücut için oldukça önemli işlevleri yerine getirmektedir (Mescher, 2019). Karaciğer dokusu safra oluşumu ve salgılanması, besin ve vitamin metabolizması (glikoz, aminoasitler, lipitler, yağda ve suda çözünen vitaminler), toksin, steroid ve bazı hormonlar gibi çeşitli bileşiklerin etkisiz hale getirilmesi, plazma proteinlerinin sentezi ve sahip olduğu Kupffer hücreleri sayesinde bağışıklıktaki görevlerini içeren çeşitli işlevlere sahiptir.

Karaciğerin ekzokrin işlevlerinden en önemlisi duodenumda yağların hidrolizi ve emilimi için gerekli safranın üretimidir (Ross ve Pawlina 2014; Mescher, 2019). Safra, emilim özelliğine ek olarak yağda çözülebilen atıkların vücuttan atılımında da rol oynamaktadır (Barrett ve ark, 2018; Mescher, 2019). Safra kanalları aracılığıyla karaciğer parankiminden duktus hepaticusa açılan safra içeriği duktus sistikus aracılığıyla safra kesesine taşınır. Burada yoğunlaştırılmış hale getirilen safra duktus communis aracılığıyla duodenuma aktarılır (Ross ve Pawlina, 2014).

Plazma proteinlerinin büyük çoğunluğu da karaciğerde sentezlenmektedir. Karaciğer tarafından sentezlenen plazma proteinleri; albümin, fibrinojen ve globülinlerdir. Plazma proteinlerinden en önemlisi olan albümin plazma kolloid ozmotik basıncını koruyarak plazma ve doku sıvısı arasındaki dengeden sorumludur. Fibrinojen kanın pıhtılaşma mekanizmasında rol oynar. Globülinlerden ise non-immun alfa globülin ve beta globülinler plazmanın kolloid ozmotik basıncını dengelerler ve taşıyıcı protein olarak da görev alırlar (Ross ve Pawlina, 2014). Büyük plazma proteinlerinden sadece immunglobulinler karaciğer tarafından sentezlenmezler (Barrett ve ark, 2018). Plazma proteinleri sentezine ek olarak karaciğer esansiyel olmayan aminoasitlerin sentezinden de sorumludur (Ross ve Pawlina, 2014).

Karaciğer aminoasitlerin glikoza dönüşüm süreci olan glikoneogenez aracılığıyla glikozun glikojen formuna dönüşümü sonucu elde edilen glikojenin glikolitik yollarla parçalanmasında da rol almaktadır (Ross ve Pawlina, 2014; Mescher, 2019).

Glikoz metabolizmasının yanı sıra karaciğer lipid metabolizmasında da önemli role sahiptir. Karaciğere ulaşan yağ asitleri hepatositler tarafından oksidasyona uğratarak enerji metabolizmasında kullanılır. Ayrıca çeşitli organlarca yakıt olarak kullanılan keton cisimcikleri de yine karaciğer tarafından üretilmektedir. Karaciğer lipid metabolizmasıyla

ilişkili olarak safra tuzlarının şekillenmesinden ve kolesterolün alımı ve sentezinden de sorumludur (Ross ve Pawlina, 2014).

Proteinlerin ve nükleik asitlerin yıkımıyla açığa çıkan amonyum iyonları karaciğerde üre yapımında kullanılmaktadır. Karaciğerde üretilen üre karaciğer hücreleri tarafından difüzyon aracılığıyla vücut sıvılarına aktararak böbreklerden atılır (Ross ve Pawlina, 2014; Hall, 2017).

Aynı zamanda karaciğer kan yoluyla karaciğere ulaşan ilaçlar ve toksinleri detoksifiye etme özelliğine sahiptir. Bu amaçla kan yoluyla gelen yabancı maddelerin Kupffer hücrelerince yakalanıp fagosite edilmesiyle gelişen fiziksel saldırı ilerleyen evrelerde biyokimyasal olarak devam eder (Barrett ve ark, 2018). Hidrofilik özellikte olmadıkları için böbrekler tarafından atılamayan bu maddeler Faz I ve Faz II olarak ayrılan detoksifikasyon mekanizması ile karaciğer tarafından çözünebilir hale getirilir. Oksidasyon, hidroksilasyon ve karboksilasyonu içeren Faz I aşaması hepatositlerin granülsüz endoplazmik retikulumunda ve mitokondriyonlarında sitokrom p 450 proteinleri aracılığıyla gerçekleşir. Faz II aşamasında suda çözünürlüğü artırılan ürün böbrekler tarafından atılabilir hale getirilir (Ross ve Pawlina, 2014).

Karaciğer glikojen, trigliserit, A vitamini ve diğer yağda çözünen vitaminlerin depolanmasında da görevlidir. Demir metabolizması ve taşınımından sorumlu proteinler transferrin, haptoglobin ve hemopeksin gibi proteinler de karaciğer tarafından sentezlenir (Ross ve Pawlina, 2014).

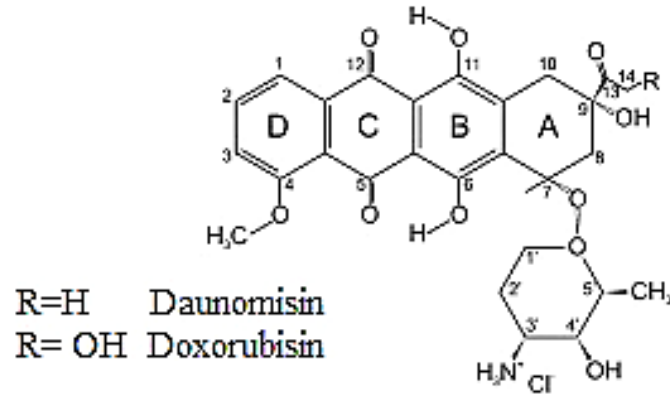
Karaciğerin sahip olduğu endokrin benzeri fonksiyonları ise dolaşımdaki D vitamini 25-hidroksikolekalsiferole dönüştürmek, tiroid bezinin salgıladığı tetraiyodotironin (T4) hormonunu triiyodotironine (T3)'e dönüştürmek, pitüiter bez tarafından salgılanan büyüme hormonunu (GH) ürettiği büyüme hormonu serbestleştirici hormon (GHRH) tarafından modifiye etmektir (Ross ve Pawlina, 2014).

Tüm bu fonksiyonlarına ek olarak karaciğer yaşlanmış eritrositlerin ortadan kaldırılmasında da rol almaktadır (Ross ve Pawlina, 2014).

2.5. Doxorubisin

2.5.1. Doxorubisinin Kimyasal Yapısı

Tetrasiklin bir halka ve bu halkaya glikozidik bağ ile bağlı daunomizin şekeri içeren kimyasal yapıya sahiptir (Şekil 9) (Frederick ve ark, 1990).



Şekil 9. Doxorubisinin kimyasal yapısı (Frederick ve ark, 1990).

2.5.2. Doxorubisinin Tarihçesi

Günümüzde çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılan antarasiklin grubuna ait antineoplastik bir antibiyotik olan DOX'un keşfi 1950'li yıllarda antikanser bileşiklerinin mikroorganizmalardan elde edilmeye çalışılmasıyla gerçekleşmiştir (Brockmann ve Bauer, 1950; Ettliger ve ark, 1959). 1963 yılında *Streptomyces peucetius* bakterisinin mutant bir suşundan izole edilen ilk antrasiklin daunomisin olarak isimlendirilmiştir. Daunomisinin güçlü sitotoksik etkilerinin olduğu, virüsleri inhibe edebildiği, Ehrlich asit tümörleri ve solid tümörlerde etkili olduğu, akut myeloblastik ve lenfoblastik lösemilerin tedavisinde de kullanılabileceği ve hayvanlarda tedavi edici olarak kullanıldığında hayatta kalma oranını arttırdığı gözlemlenmiştir (Di Marco ve ark, 1964; Bernard ve ark, 1969). Daunomisinin akut myeloblastik ve lenfoblastik lösemilerin tedavisinde de kullanılabileceği gösterilmiştir. Ancak ciddi aplazi, immunodepresyon ve ciddi kardiyotoksisite durumları daunomisinin kullanımını sınırlandırmıştır. 1969 yılında *Streptomyces peucetius* suşundan daunomisinden daha etkili olduğu ortaya koyulan adriamisin isimli antibiyotik Arcamone ve ekibi tarafından

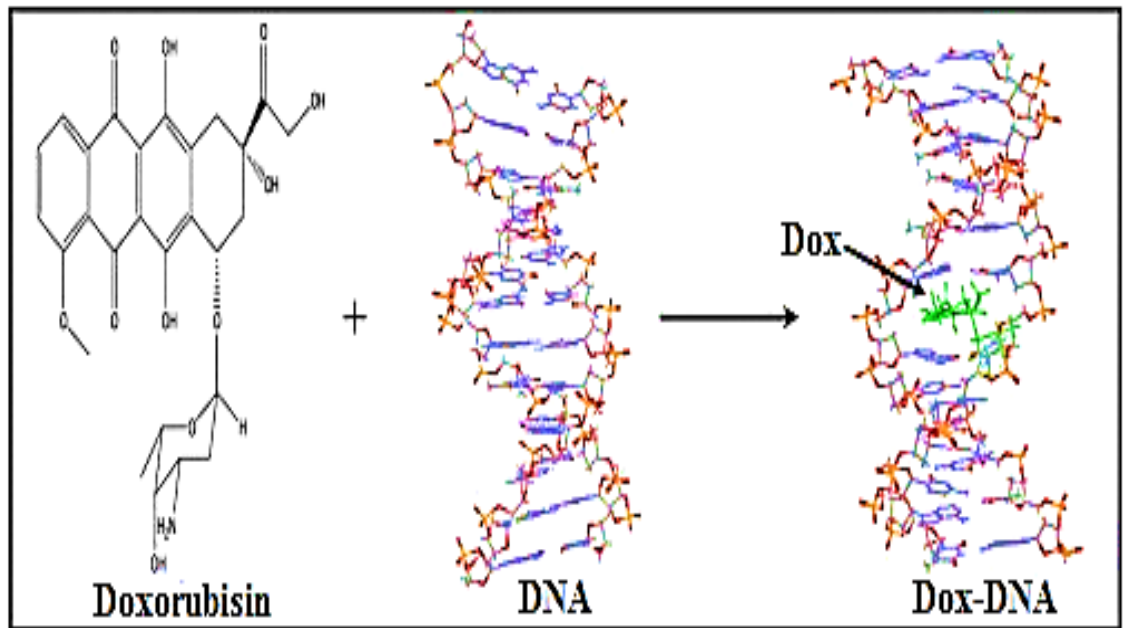
izole edildi. Adriamisin molekülünün daunomisin molekülünden kimyasal yapı olarak farklı adriamisinin 14. karbonunda hidroksil grubunun bulunmasıdır (Aubel-Sadron ve Londos-Gagliardi, 1984) (Şekil 8). Daha sonraları DOX olarak adlandırılan adriamisin günümüzde de bu adla kullanılmaya devam edilmektedir. DOX'un daunomisinden daha az toksik oluşu ve daha geniş bir tümör tiplerine karşı aktif oluşu DOX'un klinikte daunomisinin yerine geçmesine sebep olmuştur (Arcamone, 1981). 1969 yılındaki keşfinden bu yana DOX meme kanseri, özefageal kanserler, çocukluk dönemi solid tümörleri, osteosarkomalar, yumuşak doku sarkomalarında ve çeşitli tümörlerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Di Marco ve ark, 1969; Arcamone, 1981; Bonadonna ve ark, 1998; Minotti ve ark, 2004; Granados-Principal ve ark, 2010; Hong ve ark, 2016; Damiani ve ark, 2017; Li ve ark, 2018). Günümüzde DOX Gıda ve İlaç İdaresi tarafından (Food and Drug Administration) onaylanmış kemoterapik ilaçların en güçlülerinden biri kabul edilmektedir (Carvalho ve ark, 2009). Ancak DOX'un çeşitli kanser türlerindeki yaygın kullanımına rağmen çeşitli dokularda sahip olduğu toksik etkilerinden dolayı kullanımı sınırlanmaktadır (Steinherz ve ark, 1991; Bagchi ve ark, 1995; Bulucu ve ark, 2008; Pugazhendhi ve ark, 2018).

2.5.3. Doxorubisin Farmakinetiği

DOX gastrointestinal sistem tarafından absorbe edilemediğinden ve asit ortamda stabil olmamasından dolayı parenteral olarak uygulanmaktadır (BB cancer agency). Doku hasarı yapıcı özelliği ise intramusküler ve subkutan kullanımına izin vermemektedir (Muggia ve Green, 1991; Hideg ve Kálai, 2007). Uygulandıktan sonra DOX hızla parçalanarak doksorubisinol ve daunorubisinol oluşur ve kalp, karaciğer, dalak gibi dokularda birikir (Lipshultz ve ark, 2006). Plazmadan 5-10 kat daha yüksek konsantrasyonlara ulaşır (Robert ve Gianni, 1993). Yüksek oranda dokuya bağlanma fakat yavaş salınım özelliğindedir. Metabolizasyonu karaciğerde hızlı gerçekleşmesine rağmen vücutta kalış süresi ve etki süresi oldukça uzundur. Doxorubisin büyük olarında safra ile uzaklaştırılır. Fizyolojik pH'da pozitif yüklü olmaları ve planar (orto pozisyonuna bağlı klor atomu içermeyen) yapıda olmaları sayesinde DNA'nın sarmal yapısı arasına girebilme özelliğindedir (Pizzo ve Poplack, 2006).

2.5.4. Doxorubisin Etki Mekanizması

Kompleks bir yapıya sahip olan DOX, DNA ile etkileşime girebilme ve bu etkileşim sonucu çeşitli makromoleküllerin sentezini inhibe edebilme özeliğine sahiptir (Fornari ve ark, 1994; Thorn ve ark, 2011; Carter ve ark, 2012). DOX-DNA etkileşiminde DOX'a maruz kalan hücrelerde hücre döngüsünde DNA sentezinin olduğu S fazında DOX, DNA baz çiftleri arasına girerek DNA'nın iki ipliğinin birbirinden ayrılmasını tetikler ve DNA çift sarmal yapısında bozulmaya yol açar (Airoldi ve ark, 2014) (Şekil 10).



Şekil 10. Doxorubisin-DNA etkileşimi (Agudelo ve ark, 2014).

Bunun yanı sıra DOX, DNA replikasyonu ve transkripsiyonda önemli fonksiyonlara sahip bir enzim olan topoizomerez II enzimini inhibe edebilme özelliğindedir (Nitiss, 2009; Airoldi ve ark, 2014). Bu inhibisyon DNA ipliklerinin bir araya gelmesini engelleyerek DNA replikasyonunu durdurur (Fornari ve ark, 1994; Airoldi ve ark, 2014). Ayrıca DOX oksijen kaynaklı serbest radikallerin oluşumunu da indükleyebilmektedir (Kwok ve Richardson, 2003; Canzoneri ve Oyelere, 2008; Cappetta ve ark, 2017).

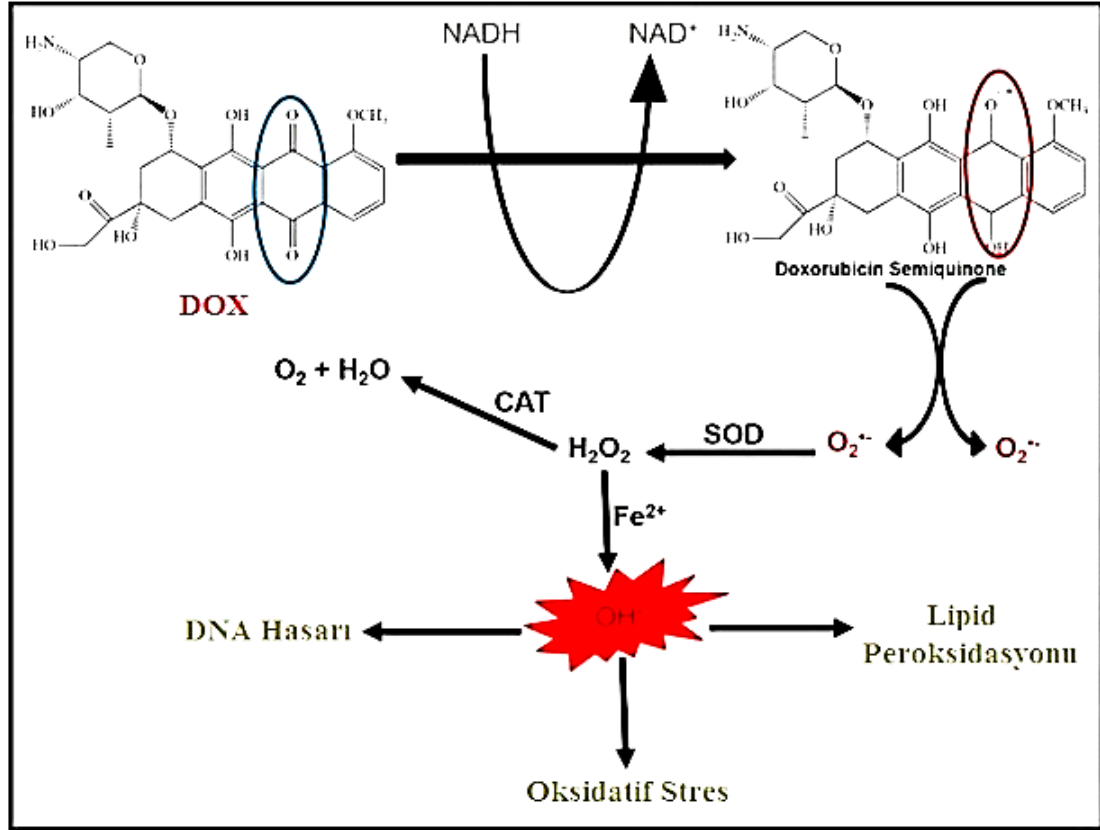
2.5.5. Doxorubisin ve Karaciğer Hasarı

Karaciğer detoksifikasyon gibi önemli işlevlerinden dolayı organizma için hayati bir organ özelliği taşımaktadır. DOX tedavisi esnasında da karaciğer DOX'un yüksek konsantrasyonunu bünyesine alarak onu biriktirir ve karaciğer mikrozomal enzimleri ve sitoplazmik redüktaz tarafından DOX'u metabolize eder. (Camaggi ve ark, 1988; Santos ve ark, 2002; Kalender ve ark, 2005; Lal ve ark, 2010). Ancak DOX'un yüksek konsantrasyonlarına maruz kalan karaciğer durumu tolere edemeyerek toksisite oluşumuyla ciddi oranda hasar görmektedir. Karaciğer dokusunun DOX uygulamasından en çok etkilenen organlardan birisi olduğu bilinmektedir (Greupink ve ark, 2006). DOX ile muamele edilen hastaların % 40'ında karaciğer hasarı gözlenmektedir (Wang ve ark, 2015). Karaciğer hasarı durumunda karaciğer dokusu hepatositlerin hücre döngüsüne yeniden girmesini sağlayarak rejenerasyona sebep olmaktadır. Ancak karaciğer tarafından alınan DOX hücrelerin kendilerini yenileme mekanizmasını engelleyerek hücre döngüsünü durdurabilir ve hepatotoksitenin ilerlemesine sebep olabilir (Airoldi ve ark, 2014). DOX'un hepatositler üzerindeki bu etkisinin yanında hepatotoksite oluşumunda en önemli faktör reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışı olarak görülmektedir.

2.5.5.1. Doxorubisin ve Oksidatif Stres

DOX ilişkili toksisitede en kabul edilebilir hipotez ROS artışı olarak görülmektedir (Kwok ve Richardson, 2003; Canzoneri ve Oyelere, 2008; Ferreira ve ark, 2008; Wang ve ark, 2015; Cappetta ve ark, 2017; Jacevic ve ark, 2017; Barakat ve ark, 2018). DOX, sahip olduğu kinon ve hidrokinon kısımları sayesinde elektron yakalama özelliğindedir. Bu özellik DOX'un sitokrom p-450 aracılığıyla elektronunu kaybederek semikinon forma dönüşmesine sebep olur. Bu dönüşüm sırasında DOX'un sahip olduğu oksijen molekülünden eksilen elektron sebebiyle bir süperoksit radikali oluşur. Süperoksit radikali organizma için potansiyel bir zararlı etkiye sahip değildir. Ancak süperoksit radikalleri süperoksit dismutaz tarafından Fenton ya da Haber-Weiss reaksiyonuyla hidrojen peroksite (H_2O_2) dönüştürüldüğünde oluşan H_2O_2 'den katalaz aktivitesiyle toksik hidrojen radikali üretilebilir (Conklin, 2005) (Şekil 11). DOX sadece bu yolla değil demir varlığında ferro formundan (Fe^{+2}) direk glutasyon redüktaz aracılığıyla ferrik forma (Fe^{+3}) dönüşerek ROS üretiminde rol oynamaktadır (Varga ve ark, 2015). Her iki yolla da oluşan ROS üretimi oksidatif stres

sürecini, DNA hasarını, mitokondriyal hasarı, lipid peroksidasyonunu tetikler ve nekrozis ve apoptozise sebep olabilir (Koleini ve Kardami, 2017).



Şekil 11. Doxorubisin ve oksidatif stres (Shabalala ve ark, 2017).

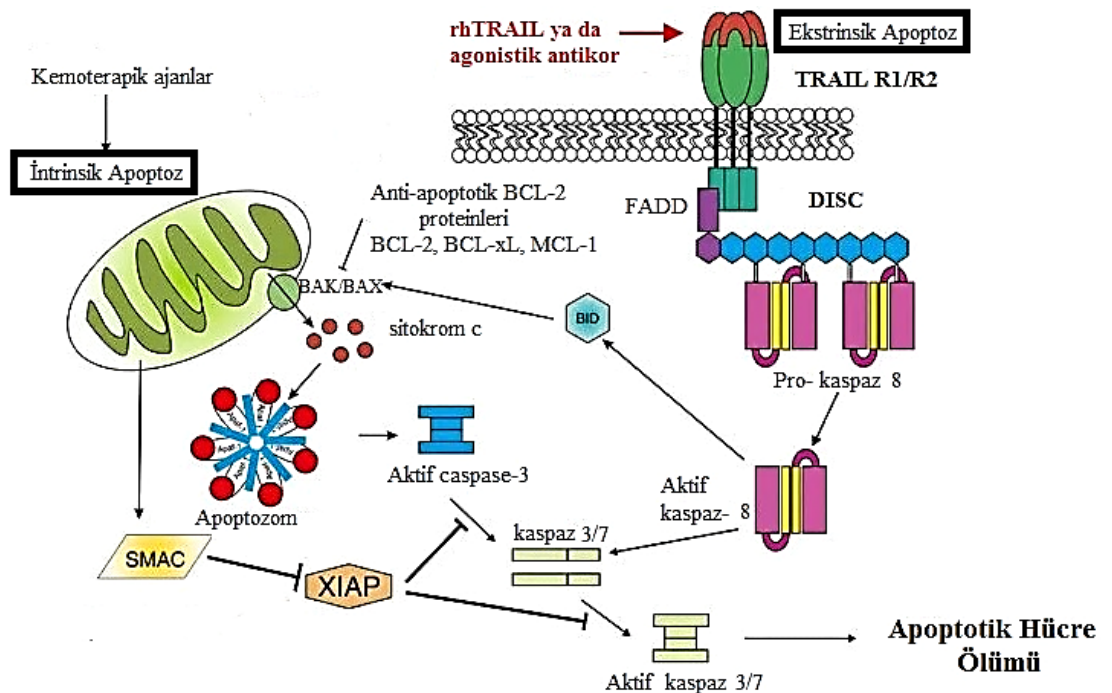
2.5.5.2. Doxorubisin ve Mitokondriyal Hasar

Mitokondri hücrenin stres ve hasar şartlarında hücrelerin ölüm ya da hayatta kalmasını düzenleyici role sahiptir. DOX'un elektronik taşıma zincirinin (ETC) yıkımıyla mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna sebep olduğu bilinmektedir (Bartlett ve ark, 2017). Mitokondriyal biyo enerji mekanizmasındaki bozulmanın ilaç toksisitesinin gelişiminde önemli rol oynadığı tanımlanmıştır. Dahası DOX'un mitokondriyal etkisi ince yapısında değişiklikler ve oksidatif kapasitede değişiklikler şeklinde görülmektedir. Dahası DOX plazmada olduğu gibi nukleusta ve mitokondride de birikme eğilimindedir (Tokarska-Schlattner ve ark, 2006).

2.5.5.3. Doxorubisin ve Apoptoz

Apoptoz, hücresel yaralanma ve inflamasyon olmaksızın, genler tarafından düzenlenen, ribonükleik asit (RNA), enerjiye ihtiyaç duyan, organizmanın homeostazını sürdürülmesini sağlayan, programlı hücre ölüm şeklidir (Arola ve ark, 2000; Beere ve ark, 2000; Lin ve ark, 2014). İlk olarak 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından fizyolojik hücre ölümü olarak tanımlanmıştır (Kerr ve ark, 1972). Keşfinden itibaren uzun yıllar boyunca embriyonik gelişimin temel mekanizmasında rol aldığı düşünülen apoptoz, gelişimini tamamlamış hayvan hücrelerinde de tanımlanmasıyla ilgi çekici hale gelerek apoptoz mekanizması üzerine çalışmaların başlamasını sağlamıştır. Apoptoz sürecinde hücrede büzüşmeler meydana gelerek hücre hacminin yaklaşık % 30'u kaybedilir, çekirdekte kromatin yoğunlaşır ve parçalanmış DNA hücre membranıyla çevrelenerek apoptotik cisimcikler oluşur. Oluşan bu apoptotik cisimcikler fagositoz aracılığıyla uzaklaştırılır (Cummings ve ark, 1997).

Apoptoz indüksiyonu kaspaz enzimlerinin aktivasyonunu gerektiren mekanizma üzerinden gerçekleşmektedir. Hücre içi yolak ve hücre dışı yolak olarak adlandırılan 2 yol kaspaz enzimlerini aktifleyerek apoptoza neden olmaktadır (Green ve Kroemer, 1998) (Şekil 12).



Şekil 12. Apoptoz mekanizması (Fox ve MacFarlane, 2016).

Hücre dışı yolda Fas ligandı (FasL), Tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α), Tümör nekroz faktör ilişkili apoptozis indükleyen ligand (TRAIL) gibi ölüm ligandları reseptörlerine bağlanarak kaspaz-8'in aktifleşmesine neden olur. Aktifleşen caspase-8 de caspase-3 'ü aktive ederek hücre ölümünü gerçekleştirir. İntrensek yolak ise mitokondriyal sitokrom c salınımı aracılığıyla gerçekleşen yolaktır. Özellikle besin eksikliği, sitotoksik kemoteropatik ajanlarla indüklenen hasar ve radyasyon gibi etkenler aracılığıyla intrinsik apoptotik yolak tetiklenmektedir (Sarosiek ve ark, 2017). Bu süreç Bcl-2 ailesinin üyesi olan üç grup protein tarafından gerçekleşmektedir. Bunlardan birinci grup Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1'i içeren antiapoptotik üyeleri, ikinci grup Bax ve Bak'ı içeren proapoptotik proteinleri, üçüncü grup ise Bad, Nix, BNip3 gibi BH3 proteinlerini içermektedir. BH 3 proteinlerinin aktive edilmesi sitozolden mitokondri dışı zarına Bax/Bak translokasyonunu artırır. Bu durum mitokondrinin dış zarının geçirgenliğini artırarak sitokrom c gibi proteinlerin zarlar arası aralıktan sitoplazmaya salınımına sebep olur. Sitolde artan sitokrom c caspase 9 'u aktive eder. Caspase-9 procaspase-3 'ü aktif caspase- 3'e dönüştürerek hücre ölümünü gerçekleştirir (Şekil 12) (Li ve ark, 1997).

Doxorubisinin önemli sitotoksik mekanizmalarından biri de ROS artışına bağlı olarak apoptoz sürecini tetiklemesidir. Doxorubisinin apoptoz sürecinde hangi yolak üzerinden hücre ölümünü tetiklediği üzerine araştırmalara devam edilmekle birlikte normal ve tümör hücrelerinde bu sürecin farklı yollar üzerinden geliştiği görülmektedir (Wang ve ark, 2004). Doxorubisinin sebep olduğu toksisite üzerine yapılan çalışmalarda DOX uygulamasının Bax ekspresyonunu artırarak ve Bcl-2 ekspresyonu azaltarak apoptozun intrinsik yolağı üzerinden hücre ölümünü tetikleyebildiği gösterilmiştir (Nagai ve ark, 2015; Edlich ve Martinou, 2016). Apoptoz ile ilgili yapılan çalışmalar Bax/Bcl-2 oranının da doğrudan hücrenin apoptoz oranını yansıtabileceğini göstermiştir (Liu ve ark, 2017).

2.6. Mezenkimal Kök Hücreler

2.6.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Keşfi

1961 yılında hematopoetik kök hücrelerin keşfinden kısa bir süre sonra fare kemik iliği stroması başka bir dokuya nakledildiğinde hücre popülasyonunda kemik hücrelerine dönüşebilme özelliğinde hücrelerin varlığı dikkat çekmiştir (Till ve McCulloch, 1961; Friendstein ve ark, 1966). Bu hücrelerin varlığı kemik iliğinde hematopoetik hücreler

dışında başka bir hücre grubunun da bulunduğunu göstermiş ve yapılan incelemeler sonucu kemik iliğinde gözlenen bu hücre tipinin fibroblast öncüsü hücreler olabileceği fikri ortaya atılmıştır (Friedenstein ve ark, 1970). Bu farklı hücre tipinin keşfinden kısa bir süre sonra bu hücrelerin işlevsel ve fenotipik özellikleri incelenmeye başlanmıştır (Owen ve Friedenstein, 1988). Yapılan çalışmalarda bu hücre tipinin plastik yüzeylere yapışabilme özelliğinde olduğu ve *in vitro* ortamda çoğaltılabileceği gösterilmiştir (Piersma ve ark, 1985; Owen ve Friedenstein 1988). 1999 yılında Pittinger ve ekibi tarafından bu hücreler *in vitro* ortamda osteoblastlar, adipositler ve kondrosite farklılaştırılmışlarıdır (Pittenger ve ark, 1999). Farklı hücre serilerine farklılaşabilmeleri (multipotensi) ve *in vitro* ortamda çoğalarak kendini yenilemeleri gibi özelliklerinde dolayı mezenkimal kök hücreler (MKH) olarak adlandırmaktadırlar (Caplan, 1991; Prockop, 1997; Morikawa ve ark, 2009). MKH'lerin keşfi hematopoetik hücrelerden sonra olsa da MKH'ler embriyoda birçok hematopoetik dokudan hematopoetik kök hücre oluşturulmadan elde edilebilmektedirler (Campagnoli ve ark, 2001; Mendes, 2005).

2.6.2. Mezenkimal Kök Hücre Kaynakları

Vücutta farklı kaynaklara sahip MKH'ler kemik iliğinden, adipoz dokudan, plasental dokudan, umbilikal korddan, kan dokusundan, amniyotik sıvıdan, periosteumdan, intervertebral disklerden, dental pulpadan, karaciğerden, dalaktan ve daha birçok farklı dokudan izole edilebilirler (Nakahara ve ark, 1991; Gronthos ve ark, 2000; Campagnoli ve ark, 2001; Zuk ve ark, 2001; In't Anker ve ark, 2003; Zhang ve ark, 2003; Wang ve ark, 2004; Krampera ve ark, 2007; Risbud ve ark, 2007). Ancak kemik iliği MKH'lerin en zengin kaynaklarından birisidir. Farklı kaynaklardan izole edilen MKH'lerin büyüme, çoğalma ve farklılaşma özellikleri, genetik yapıları, sitokin, kemokin gibi farklı kimyasalları salgılama özellikleri ve fenotipik karakteristikleri farklılıklar göstermektedir (Wagner ve ark, 2005; Friedman ve ark, 2007). Örneğin kemik iliğinde izole edilen MKH'ler yağ hücrelerinden izole edilen MKH'lere göre daha fazla kıkırdak hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahiptirler (Huang ve ark, 2005). Yaş ile birlikte insanlardaki MKH'lerin sayısında düşüş gözlenmektedir. Örneğin yeni doğanın kemik iliğinde MKH oranı 1/1000 iken 50 yaşındaki bir bireyde 1/400.000, 80 yaşındaki bir bireyde ise 1/2.000.000 oranına kadar düşebilmektedir (Caplan, 1994). Klinikte MKH kaynağı olarak genellikle iliak kemik

ve sternum tercih edilirken hayvan çalışmalarında uzun kemiklerin metafizleri tercih edilmektedir (Can, 2014).

2.6.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Özellikleri

Multipotent kök hücreler olan MKH'ler sahip oldukları farklılaşma yeteneği sayesinde mezoderm, endoderm ve ektoderm kökenli hücelere farklılaşabilme özelliğindedirler. Yapılan çalışmalar MKH'lerin uygun büyüme faktörleri içeren kültürlerde endotel hücreleri, kardiyomisetler, hepatositler, nöron benzeri hücreler, astrositler, kas, kıkırdak, kemik hücreleri, düz kas hücreleri ve yağ hücreleri gibi çok sayıda hücre çeşitlerine farklılaşabildiklerini göstermiştir (Sanchez-Ramos ve ark, 2000; Oswald ve ark, 2004; Phinney ve Isakova, 2005; Phinney ve Prockop, 2007; Arthur ve ark, 2008; Chen ve ark, 2009; Li ve ark, 2010; Gupta ve ark, 2011, Harris ve ark, 2011).

Dokularda oldukça düşük orana sahip olan MKH'ler sahip oldukları yüzey belirteçleri sayesinde diğer hücrelerden ayrılarak tanımlanmaktadırlar. Bu amaçla yapılan akım sitometrik analizde kolondan geçen hücreler arasında daha önceden belirlenmiş hücre yüzey belirtecine sahip hücrelerin oranı belirlenir. Uluslararası hücresel tedavi derneği (International Society for Cellular Therapy, ISCT) 2008 yılında CD 73, CD 90, CD 105 moleküllerine bu hücreler için temel belirteçler olarak tanımlamıştır. Buna göre kemik iliği kaynaklı MKH belirteçleri CD 73, CD 90 ve CD 105 olup endotel ve hematopoetik belirteçler olan CD31, CD 34 ve CD 45 belirteçlerinden yoksundurlar (Deans ve Moseley, 2000; Dominici ve ark, 2006; Chamberlain ve ark, 2007). Yapılan çalışmalar da kemik iliği kaynaklı MKH'ler için CD 105, CD 73, CD 29 ve CD 90 yüzey belirteçlerini pozitif kabul ederken CD 45, CD 34, CD 14 ya da CD 11 b, CD 79 a ve CD 19 yüzey belirteçlerini negatif kabul etmiştir (de Ugarte ve ark, 2003; Dominici ve ark, 2006; Kassis ve ark, 2006; Schäffler ve Büchler, 2007). Aranılan hücre yüzey belirtecine sahip hücre oranı % 85'in üzerinde olanlar kuvvetli pozitif kabul edilmektedir (Can, 2014).

Çalışmalar MKH'lerin immun sistem tarafından tanınmadığını ve immun yanıtları engelleyici etkiye sahip olduğunu göstermektedir (Niemeyer ve ark, 2004; Chamberlain ve ark, 2007; Noël ve ark, 2007). Tam olarak immun sistem üzerindeki mekanizması bilinemesi de yapılan çalışmalar MKH'lerin majör histokompatibilite kompleks II (MHC II) proteinlerini bulundurmadıklarını ya da çok az oranda bulundurduklarını ve MKH'lerin T hücreleri, dendritik hücreler ve B hücrelerinin fonksiyonlarını düzenleyerek immun sistemi

baskılayıcı özelliğe sahip olduğunu göstermektedir (Majumdar ve ark, 2003; Götherström ve ark, 2004; Aggarwal ve Pittenger, 2005; Beyth ve ark, 2005; Jiang ve ark, 2005; Corcione ve ark, 2006). Bu hücrelerin immün sistem üzerinde sahip olduğu bu özellikler MKH'lerin alıcıda red tepkimesine yol açmadan çeşitli tedavilerde kullanımının önünü açmaktadır.

Ayrıca yapılan çalışmalarda MKH'lerin vücuda verildiğinde hedef bölgeye yöneldiği gösterilmiştir (Devine ve ark, 2003; Rüster ve ark, 2006; Segers ve ark, 2006). Özellikle inflamasyon durumunda inflamasyon bölgesinde gözlenen inflamatuvar kemokin konsantrasyonundaki artış MKH'lerin bu bölgeye göçünü tetiklemektedir (Forte ve ark, 2006; Ozaki ve ark, 2007; Salem ve Thiemermann, 2010). MKH'lerin taşıdıkları birçok kemokin ve hücre dışı matriks reseptörleri bu hücrelerin hasar bölgesine yönelmesini sağlamaktadır (Rüster ve ark, 2006; Segers ve ark, 2006; Myers ve ark, 2010).

Uygulama sonrası hedef bölgeye ulaşan MKH'ler burada onarımı sağlayıcı sinyalleri oluşturmaktadır (Myers ve ark, 2010). MKH'ler kollajen, fibronektin, laminin, proteoglikan gibi birkaç hücre dışı matriks proteinlerini, sitokinleri ve çeşitli büyüme faktörlerini salgırlar (Parekkadan ve ark, 2007). MKH'lerin tedavi edici amaçlı kullanımını sağlayan en önemli özellik salgıladıkları bu etken maddeler sayesinde çevre dokularda oluşturduğu parakrin etkilerdir (Manuguerra-Gagne ve ark, 2013). MKH'lerin bu etkilerinin revaskulasyonu uyarma ve hücrel proliferasyon sürecini hızlandırma gibi çeşitli süreçler üzerinden iyileştirici etkilere sahip olduğu hayvan çalışmalarında gösterilmiştir (Gnecchi ve ark, 2005; Tang ve ark, 2005; da Silva Meirelles ve ark, 2008; Liu ve ark, 2015).

2.6.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karaciğer Hasarına Etkileri

İn vitro ortamda hızlı çoğalabilme, çeşitli hücre hatlarına farklılaşabilme ve birçok dokudan kolaylıkla izole edilebilme ve önemlisi immün sistemi baskılayıcı özellikteki MKH'lerin parakrin etkilerinin de ortaya çıkmasıyla birlikte çeşitli hastalık modellerindeki etkileri son zamanların yaygın araştırmalarını oluşturmaktadır. MKH'lerin miyokardiyal enfarktüs, nörolojik hastalıklar, diyabetik nefropati, osteogenezis imperfekta gibi çeşitli hastalıklarda iyileştirici etkileri gösterilmiştir (Horwitz ve ark, 2002; Ortiz ve ark, 2003; Kunter ve ark, 2006; Lee ve ark, 2006; Minguell ve Erices, 2006; Ringdén ve ark, 2006; Ortiz ve ark, 2007; Guhathakurtave ark, 2009). Bununla birlikte çeşitli kaynaklardan izole edilen MKH'lerin karaciğer hasarının tedavisindeki etkinliği de araştırılmaya devam edilmektedir.

MKH'ler özellikle sahip oldukları farklılaşma yetenekleri ve parakrin etkiler sayesinde hem hayvan çalışmaları hem de klinik uygulamalarda karaciğer hastalıklarının tedavisinde iyileşme sürecini tetikleyebilmektedir (Banas ve ark, 2009; Parekkadan ve ark, 2007). Hasarlı karaciğer dokularına uygulandığında endovasküler yaklaşım aracılığıyla karaciğer dokusuna göç edebilmekte, hepatosilere farklılaşabilmekte ve hepatositlerle kaynaşarak karaciğer dokusunun onarımı ve rejenerasyonunda önemli kaynak oluşturabilmektedir. Ayrıca hepatosit büyüme faktörü (HGF), epidermal büyüme faktör, interlökin-6 (IL-6), Tnf- α gibi sitokinler aracılığıyla karaciğerin fonksiyonunu ve çeşitli semptomları iyileştirebilmekte ve hayatta kalma oranını arttırabilmektedir (Banas ve ark, 2009; Parekkadan ve ark, 2007; Sun ve ark, 2014; Liu ve ark, 2015; Leuning ve ark, 2018). Aynı şekilde MKH uygulamasının hepatosit apoptozisine karşı karaciğeri koruduğu ve karaciğer rejenerasyonunu arttırdığı ve karaciğer fibrozisinde iyileştirici etkiye sahip olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Kanazawa ve ark, 2011; Pan ve ark, 2011).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Sıçan kemik iliğinden izole edilen MKH'lerin DOX uygulaması sonrası karaciğer dokusuna etkisini araştırmak amacıyla, 200 ± 40 gram ağırlığında yaklaşık 8-10 haftalık 29 adet Wistar albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Adnan Menderes Üniversitesi Etik kurulunca onaylanan (64583101.2017.129) çalışmamızda sıçanlar Kobay firmasından (Ankara, Türkiye) temin edildi. Sıçanlara adaptasyon sürecinde ve deney sürecince optimum şartlar sağlanan (12 saat aydınlık, 12 saat karanlık, $21 \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklık ve % 45-65 nem) Adnan Menderes Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarında bakıldı. Sıçanların sıçan yemi ve çeşme suyuna sınırsız erişimleri sağlandı. Rastgele seçilen 5 sıçan kemik iliğinden MKH eldesinde kullanılmak üzere ayrı bir kafese alındı. Kalan sıçanlar her grupta 8 adet olmak üzere rastgele 3 gruba ayrıldı. 1. grup kontrol (K) grubunu, 2. grup Doxorubisin (DOX) grubunu ve 3. grup da Doxorubisin ve Mezenkimal kök hücre (DOX+MKH) grubunu oluşturdu.

3.2. Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Eldesi ve Hücre Kültürü İşlemleri

Sıçanlardan kemik iliği kaynaklı MKH'lerin elde edilmesi amacıyla 5 adet Wistar albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Ketamin 50 mg/kg (Ketasol %10, Richter Pharma Ag, Avusturya) ve 5 mg/kg ksilazin (Xylazinbio % 2, Bioveta, Çek Cumhuriyeti) içeren anestezi karışımının intraperitoneal olarak verilmesinin ardından sıçanlar anestezi edildi. Steril koşullar altında çıkarılan femur ve tibia kemikleri etrafındaki kas ve bağ dokularından temizlenerek fosfat tampon solüsyonu (PBS, pH: 7.2, P4417, Sigma-Aldrich) içeren falkon tüpler içerisine alındı. Orta kısımlarından pens yardımıyla tutulan kemiklerin iki ucu makasla kesildi. İki ucundan kesilen kemikler 5 ml minimum temel medyum (MEM, 11095-080, Gibco) içeren tüplere alındı. İnsülin enjektörü yardımıyla MEM kanaldan akıtılarak kemik iliği içeriğinin tüpe alınması sağlandı. Kemik iliği içeriği içeren tüpler 1100 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminin ardından süpernatant atılarak pellet üzerine

yeniden MEM eklendi ve tekrar santrifüj yapıldı. Ardından pellet üzerine %89 MEM, %10 Fetal bovin serum (FBS, 10270-106, Thermo Fisher Scientific) ve % 1 penisilin-streptomisin (15140-122, Gibco) içeren tam besiyeri eklenerek pipetaj yapıldı. Pipetaj işleminin ardından elde edilen homojenat T 75 flasklara (SCF-11-250, BioSorfa) dağıtılarak hücrelerin kültür ortamına ekimi gerçekleştirildi. Flasklar, hücrelerin büyümeleri için uygun şartlar içeren 37°C sıcaklık ve % 5 CO₂ oranına sahip inkübatöre kaldırıldı. Hücreler invert mikroskop (Oxion Inverso Range, Euromex, Hollanda) ile incelenerek gerekli zamanlarda besiyeri değişiklikleri yapıldı. Pasajlama işlemi için % 80 - % 90 dağılıma sahip hücreler iki kez PBS ile yıkandı. Ardından % 0,05 tripsin-etilendiamin tetraasetik asit (EDTA, 25300054, Thermo Fisher Scientific) ile muamele edilen hücreler 37°C'de 2 dakika inkübe edilerek kaldırıldı. Uygulanan tripsin-EDTA'nın yaklaşık 5 katı tam besiyeri tripsini baskılamak amacıyla hücreler üzerine eklendi. Elde edilen homojenatlar falkonlara alındı ve 1100 rpm'de +4°C'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj işleminin ardından pellet üzerine 13 ml tam besiyeri eklenip flasklara aktararak pasajlama tamamlandı. 3. pasajın sonunda kültür ortamı içerisindeki canlı ve ölü hücre miktarını belirlemek amacıyla hücre süspansiyonu ve % 0,4 tripan mavisi (T8154, Sigma-Aldrich) 1:1 (v:v) oranında karıştırıldı. Elde edilen homojenattan 10 µl Neubauer lamına alınarak lam içerisindeki hücreler ışık mikroskopunda sayıldı. Hücre sayım işleminde Neubauer lamında dört büyük kare içerisinde şeffaf gözlenen canlı hücre sayısının ortalaması alındı. Elde edilen sayı dilüsyon oranı ve sabit 10⁴ sayısı ile çarpılarak 1 ml'deki canlı hücre sayısı elde edildi. Sayım işleminin ardından sıçan kemik iliğinden izole edilen hücreler dondurma medyumunu (%80 MEM, %10 dimetil sülfoksit (DMSO, C6164, Sigma-Aldrich), %1 FBS) içeren dondurma tüplerine aktarıldı ve sıçanlara transfer işlemine kadar -196°C'lik sıvı nitrojen içeren azot tanklarında saklandı.

3.3. Akım Sitometrik Analiz

MKH'lerin yüzey işaretçilerinin ekspresyonunu analiz etmek amacıyla CD 11 b (554982, BD Pharmingen), CD 29 (555005, BD Pharmingen), CD 45 (551402, BD Pharmingen) ve CD 90 (557266, BD Pharmingen) antikorları akım sitometri analizinde kullanıldı. Bu amaçla 3. pasajın sonunda sıvı azotta saklanan hücreler su banyosunda (37°C'de) çözdürüldü. Falkon tüplere aktarılan hücreler 1100 rpm'de 5 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Ardından yıkama işlemi amacıyla pellet üzerine PBS (AM9624, Thermo

Fisher Scientific) eklenerek yeniden santrifüj yapıldı. Santrifüj işleminin ardından elde edilen pellet % 3'lük Bovin Serum Albumin (BSA, B14, Thermo Fisher Scientific) içeren PBS içerisinde çözdürüldü. Ependorflara ayrılan homojenatlar üzerine CD90, CD29, CD45 ve CD11b antikorları (1 µg/ml olacak şekilde) eklendi. Antikorlarla muamele edilen hücreler karanlık ortamda, oda sıcaklığında, 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon işleminin ardından 1100 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Pellet üzerine 200 µl PBS eklenerek hazırlanan hücre süspansiyonu akım sitometri cihazında (Navios 3L10C, Beckman Coulter, Amerika) okutuldu ve Kaluza flow sitometri analiz programıyla (Kaluza 1.3, Beckman Coulter, Amerika) analiz edildi.

3.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin Kırmızı Floresan Protein İle İşaretlenmesi

Kemik iliğinden izole edilen MKH'lerin karaciğer dokusuna ulaşıp ulaşmadıklarını belirlemek amacıyla hücreler floresan mikroskopta görüntülenmek için kırmızı floresan protein kit (Mini 26 Red Fluorescent Cell Linker Kits for General Cell Membrane Labelling, PKH 26, Sigma-Aldrich) ile işaretlendi. Bu amaçla kök hücrelerin sıçanlara transplantasyonundan hemen önce yeniden sayımları yapılmış hücreler tam besiyeri ile 2 kez yıkandı ve santrifüj edildi. Pellet üzerine serum içermeyen MEM'den (11095-080, Gibco) aktarılarak santrifüj yapıldı. Süpernatanın tamamına yakını çekildi ve pellet süspanse edildi. Hücre süspansiyonu üzerine kit içerisinde bulunan diluent c'den 1 ml eklendi. Ayrı bir ependorf içerisine kit içerisinde bulunan 1 ml diluent c ve 4 µl boya eklenerek karıştırıldı. Boya karışımı diluent c içeren hücre süspansiyonu üzerine eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında ve karanlık ortamda bekletildi. Ardından 2 ml FBS karışım üzerine eklenerek 1 dakika bekletildi ve santrifüj edildi. Süpernatantın atılmasının ardından elde edilen pellet 2 kez MEM (11095-080, Gibco) ile yıkandı. Kök hücre uygulaması yapılacak her bir sıçan için 2×10^6 hücre olacak şekilde MEM içerisinde çözülen hücreler sıçanlara verilmek üzere soğuk zincir üzerinde Adnan Menderes Üniversitesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'na transfer edildi.

3.5. Karaciğer Hasarının Oluşturulması ve Mezenkimal Kök hücrelerin Sıçanlara Verilmesi

Karaciğer hasarı çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılan ancak toksik etkilerinden dolayı kullanımını sınırlandıran bir kemoteropik ilaç olan DOX aracılığıyla oluşturuldu. Bu amaçla DOX grubu ve DOX+MKH grubundaki sıçanlara 20 mg/kg olacak şekilde serum fizyolojik içerisinde çözülen Doxorubisin (Koçak Farma, Tekirdağ, Türkiye) intraperitonel olarak verildi. Kontrol grubuna (K) ise sadece serum fizyolojik intraperitonel olarak uygulandı. İlaç uygulamasının 96. saatinde DOX+MKH grubundaki sıçanlara MEM içerisinde çözülen 2×10^6 kemik iliği kaynaklı MKH kuyruk veninden sarı bronül (24G, Plusneo, İzmir, Türkiye) yardımıyla verildi. DOX grubuna ise sadece MEM kuyruk veninden sarı bronül yardımıyla verildi. MKH uygulamasından 48 saat sonra 50 mg/kg ketamin (Ketasol %10, Richter Pharma Ag, Avusturya) ve 5 mg/kg ksilazin (Xylazinbio %2, Bioveta, Çek Cumhuriyeti) karışımının intraperitonel olarak verilmesinin ardından batin açıldı. Kalp dokusundan kan alınarak karaciğer örnekleri morfolojik ve biyokimyasal olarak incelenmek amacıyla çıkarıldı. Sıçanların vücut ağırlıkları deney başlangıç ve sonunda ölçülerek vücut ağırlıklarındaki değişimin yüzdesi hesaplandı. Deney sonunda karaciğer ağırlıkları ölçülerek rölatif karaciğer ağırlıkları hesaplandı.

3.6. Kırmızı Floresan Protein ile İşaretlenen Mezenkimal Kök Hücrelerin Floresan Mikroskopta İncelenmesi

Sıçanlardan alınan karaciğer dokuları sıvı azot içerisinde dondurulduktan sonra MKH'lerin sıçan karaciğerine gidip gitmediğini gözlemlemek amacıyla kriyostat (CM1510, Leica, Almanya) cihazında 10 µm'lik dondurulmuş kesitler alındı. Dokuların üzerine, yüzeylerini örtecek şekilde metanol (24229, Sigma-Aldrich) damlatılarak 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Lam yüzeyinden metanol çekilerek dokular PBS (AM9624, Thermo Fisher Scientific) ile 3 kez yıkandı. PBS içerisinde 1/1000 olacak şekilde hazırlanan DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole, D21490, Thermo Fisher Scientific) dokuların üzerine örtecek şekilde damlatılarak 5 dakika karanlıkta hücre çekirdeklerinin boyanması için bekletildi. Ardından dokular PBS ile 2 kez yıkandı. Yıkama işleminin ardından lamlar kapatma medyumunu ile (5259, Bright Slide, İstanbul, Türkiye) kapatılarak karanlık ortamda floresan mikroskopta incelemeye götürüldü. Red floresan protein ile boyanmış MKH'ler ve DAPI ile

boyanmış hücre çekirdekleri immunfloresan mikroskopta (BX51, Olympus, Tokyo, Japonya) incelenerek DP 70 kamera (Olympus, Tokyo, Japonya) ile fotoğraflandı.

3.7. Işık Mikroskopik İnceleme

Işık mikroskopik inceleme amacıyla sıçanlardan alınan karaciğer dokuları % 10'luk formalin (15512, Sigma-Aldrich) ile 48 saat fikse edildi. Formalini uzaklaştırmak amacıyla dokular su ile yıkandı ve otomatik doku takip cihazında (TP1020, Leica, Germany) rutin takip yöntemleri kullanılarak tabloda belirtilen şekilde takip edildi (Tablo 1). Parafin içerisine gömülen karaciğer dokularından mikrotomla (RM2235, Leica, Germany) 5 µm'lik kesitler alınarak ışık mikroskopik incelemeler için hematoksilin-eozin (Harris hematoksilin, 1.09253, Merck, Eosin G, 1.02439 Merck, H-E) ile boyandı. Apoptotik hücrelerin belirlenmesi amacıyla parafin bloklardan alınan kesitler TUNEL Apoptoz kiti (ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, 2470976, Millipore) ile boyandı.

Tablo 1 . Karaciğer dokuları takip aşamaları

Uygulanan İşlem	Kullanılan Kimyasal	Süre
Tespit	%10'luk Formalin	48 saat
Yıkama	Çeşme suyu	12 saat
Dehidrasyon	Alkol (% 50'lik)	60 dakika
Dehidrasyon	Alkol (% 70'lik)	60 dakika
Dehidrasyon	Alkol (% 80'lik)	60 dakika
Dehidrasyon	Alkol (% 90'lık)	90 dakika
Dehidrasyon	Alkol (% 100'lük)	60 dakika
Şeffaflaştırma	Alkol (% 100'lük)	60 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilol	60 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilol	90 dakika
Emdirme	Parafin	60 dakika
Emdirme	Parafin	90 dakika
Kapatma		

3.7.1. Hematoksilen-Eozin Boyama Yöntemi

Parafin bloklardan lam üzerine alınan 5 µm kalınlığındaki kesitler deparafinizasyon işlemi için bir gece etüvde bekletildikten sonra ksilol (1330-20-07, Sigma-Aldrich) uygulanarak parafini uzaklaştırıldı. Dokular azalan alkol (920.026, Isolab) serilerinden geçirilerek distile su ile yıkandı. Sırasıyla “Harris hematoksilen (1.09253, Merck)” ve “eozin G (1.02439, Merck)” boyalarıyla boyanan dokular artan alkol serilerinden geçirildi. Ksilole batırılan dokular entellan (1.07961, Merck) damlatılarak kapatıldı. H-E boyama aşamaları aşağıdaki çizelgede verildi (Tablo 2). Hematoksilen-eozin ile boyanan doku örnekleri Olympus marka BX51 TF model (Tokyo, Japonya) ışık mikroskopunda incelendi ve DP72 kamera (Olympus, Tokyo, Japonya) ile fotoğraflandı.

Tablo 2. Hematoksilen-Eozin boyama aşamaları

İşlem	Süre
Etüv (60°C)	1 gece
Ksilol	10 dakika (x 2)
Alkol (% 100'lük)	2 dakika
Alkol (% 96'lık)	2 dakika
Alkol (% 90'lık)	2 dakika
Alkol (% 80'lik)	2 dakika
Alkol (% 70'lik)	2 dakika
Distile Su	5 dakika
Harris Hematoksilen	5 dakika
Akarsu	5 dakika
Eozin	5 dakika
Alkol (% 70'lik)	2 dakika
Alkol (% 80'lik)	2 dakika
Alkol (% 96'lık)	2 dakika
Alkol (% 100'lük)	2 dakika
Ksilol	5 dakika (x 2)
Entellan ile kapatma	

3.7.2. Hepatik Hasar Skorunun Oluşturulması

Tüm sıçanlardan alınan karaciğer doku örneklerinin H-E ile boyaması sonrası elde edilen preparatlar gruplar bakımından körleştirildi. Her bir karaciğer dokusundan seçilen 4 farklı alanın iki histolog tarafından bağımsız olarak değerlendirilmesiyle Jacevic ve arkadaşlarının çalışmalarında oluşturduğu hepatik hasar skoru (HDS) kullanılarak ışık mikroskopik gözlemler nicel verilere dönüştürüldü (Jacevic ve ark, 2017). HDS hesaplanmasında kullanılan kriterler aşağıdaki tabloda verildi (Tablo 3).

Tablo 3. Hepatik hasar skoru (HDS) (Jacevic ve ark, 2017).

Hepatik Hasar Skoru	Yapısal Hasarın Şiddeti	Yapısal Değişiklikler
0	Normal histolojik yapı	<ul style="list-style-type: none">• Normal histolojik yapı
1	Hafif yapısal değişiklikler	<ul style="list-style-type: none">• Hücre içi ödem ve normal çekirdeği olan küçük hepatosit grupları• Kan damarlarının hafif dilatasyonu• Polimorfonükleer hücrelerin perivasküler görünümü.
2	Orta derecede yapısal hasar	<ul style="list-style-type: none">• Hepatositlerin mikronodüler vakuolizasyonu ve normal çekirdekler.• Sinüzoidal boşluklarda fokal ödem, hiperemi ve kanama.• Polimorfonükleer hücrelerin perivasküler birikimi.
3	Güçlü Fokal hasar	<ul style="list-style-type: none">• Hepatositlerin makronodüler vakuolizasyonu ve piknotik çekirdekler.• Polimorfonükleer hücrelerin fokal doku birikimi.
4	Güçlü yaygın hasar	<ul style="list-style-type: none">• Hepatositlerin sentrolobüler nekrozu• Polimorfonükleer hücrelerin yaygın perivasküler ve doku birikimi.
5	Masif nekrotik alanlar	<ul style="list-style-type: none">• Masif nekrotik alanlar.

3.7.3. TUNEL Yöntemi

Parafin bloklardan polilizinli lamlara alınan 5 µm kalınlığındaki karaciğer kesitleri apoptotik hücrelerin varlığını saptanması amacıyla TUNEL yöntemiyle boyandı (ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, 2470976, Millipore) (Tablo 4).

Tablo 4. TUNEL boyama yöntemi aşamaları

İşlem	Süre
Etüv (60°C)	1 gece
Ksilol	5 dakika (x 3)
Alkol (% 100'lük, % 96'lık, % 80'lik, % 70'lik)	3 dakika
PBS	5 dakika
Proteinaz K (20 mikrog/ml)	15 dakika
dH ₂ O	2 dakika (x 2)
%3'lük H ₂ O ₂	5 dakika
PBS	5 dakika (x 2)
Dengeleme tamponu	6 dakika
Tdt Enzim solüsyonu (37°C)	1 saat
Yıkama tamponu	10 dakika
PBS	1 dakika (x 3)
Antidigoksinin konjugat	30 dakika
PBS	2 dakika (x 4)
DAB	5-10 dakika
PBS	3 dakika
Hematoksilen (Harris)	1-5 dakika
Akarsu	5 dakika
Alkol (% 70'lik)	2 dakika
Alkol (% 80'lik)	2 dakika
Alkol (% 96'lık)	2 dakika
Alkol (% 100'lük)	2 dakika
Ksilol	5 dakika (x 2)
Entellan ile kapatma	

Bu amaçla alınan kesitler bir gece etüvde 60°C sıcaklıkta deparafinize edildi. Kalan parafini dokulardan tamamen uzaklaştırmak amacıyla preparatlar ksilolden geçirildi. Ardından preparatlar sırasıyla % 100'lük, % 96'lık, % 80'lik, % 70'lik alkol serilerinde bekletildi. PBS ile yıkama işleminin ardından etrafı sınırlayıcı hidrofilik kalem (PAP pen) ile çizilen dokular üzerine Proteinaz K (20 mikrog/ml) damlatılarak oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. PBS ile yıkama işleminin ardından endojen peroksijaz blokajı amacıyla PBS ile dilue edilen %3'lük H₂O₂ preparatlar üzerine damlatılarak bekletildi. Ardından dengeleme solüsyonunda bekletilen dokular Tdt enzim solüsyonunda 1 saat 37°C'de nemli ortamda bekletildi. Yıkama solüsyonuyla 10 dakika yıkanan dokular PBS'ten geçirilip antidigoksinin konjugatta 30 dakika bekletildi. PBS ile yıkanan dokular 3,3'-diamino benzidin (DAB) ile muamelenin ardından zıt boyamayla boyandı. Işık mikroskobunda 20'lik büyütmede rastgele seçilmiş alanlarda apoptotik hücrelerin dağılım oranına göre apoptotik indeks skorlaması yapılarak elde edilen veriler istatistiksel olarak analiz edildi. Apoptotik indeks skorlaması (TUNEL pozitivite skoru) Tablo 5 'te verildi.

Tablo 5. Apoptotik indeks skorlaması

Apoptotik Hücre Oranı (%)	Apoptotik İndeks Skoru (TUNEL Pozitivite Skoru)
Yok	0
%5'ten daha az	1
Orta derece (%5-%25)	2
Ciddi (%25'ten fazla)	3

3.8. Karaciğer Dokusunun Elektron Mikroskobik Takip Yöntemi

Elektron mikroskobik inceleme amacıyla alınan karaciğer dokusuna ait örnekler, "Millonig fosfat tampon" kullanılarak hazırlanan % 5'lik gluteraldehit solüsyonu (104239, Merck) içerisine alındı. 1 saat gluteraldehit solüsyonu içerisinde bekletilen dokular 1 mm³'lük parçalara ayrıldı. Trimlenen karaciğer parçaları yeniden gluteraldehit solüsyonu içerisine aktararak 3 saat daha fikse edildi. Millonig fosfat tamponu kullanılarak yıkanan doku parçaları elektron mikroskobunun ikinci tespit maddesi olan %1'lik osmiyum tetraoksit (191110, Electrone Microscopy Science) ile 2 saat tespit edildi. Millonig fosfat tamponuyla yıkama

işleminin ardından doku parçaları artan alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. 20 ml araldit CY 212 (R1040, Agar Scientific), 20 ml sertleştirici (Dodosenil Suksinik Anhidrit, DDSA, R1053, Agar Scientific), 0.6 ml hızlandırıcı (Benzil Dimetil Amin, BDMA, R1062, Agar Scientific) ve 1 ml plastikleştirici (Dibütil Fitalat, R1071, Agar Scientific) karıştırılarak rezin solüsyonu hazırlandı. Dehidrasyon işleminin ardından propilen oksitle (807027.1000, Merck) muamale edilen dokular propilen oksit ve rezinden oluşan karışım içerisinde 1 gece rotatorda karıştırıldı. Ardından doku parçaları polietilen kapsüller (00 size, Agar Scientific) kullanılarak taze olarak hazırlanmış rezine gömüldü. 60° C’de 48 saat bekletilen doku örnekleri sertleşerek gömme işlemi tamamlandı. Elde edilen bloklardan ultramikrotom (Reichert Ultracut S, Leica) ile yarı ince kesitler alındı ve toluidin mavisıyla boyandı. Işık mikroskopunda (BH2, Olympus) incelenen yarı ince kesitler değerlendirilerek ince kesit için işaretlendi. Resin bloklardan ultramikrotom ile 50 nm (0,05 µm) kalınlığında ince kesitler alınarak, elde edilen kesitler bakır gridlere aktarıldı. Gridler üzerindeki kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat boyaları ile boyanarak Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) (Japonya) ile incelendi ve fotoğraflandı. Elektron mikroskobu takip aşamaları aşağıdaki tabloda verildi (Tablo 6).

Tablo 6. Elektron mikroskobik takip yöntemi

İşlem	Uygulama Sıcaklığı	Süre
Gluteraldehit	+4°C	4 saat
Millonig fosfat tampon	+4°C	2x10 dakika
Ozmik asit	+4°C	2 saat
Millonig fosfat tampon	+4°C	2x10 dakika
Alkol (% 50’lik, % 70’lik, % 86’lık)	+4°C	15 dakika
Alkol (% 96’lk)	+4°C	15 dakika
Alkol (% 100’lük)	+4°C	2x15 dakika
Alkol (% 100’lük)	Oda sıcaklığı	15 dakika
Propilen oksit	Oda sıcaklığı	2x15 dakika
Karışım (Propilen oksit + Resin)	Oda sıcaklığı	2x30 dakika
Emdirme (Resin)	Oda sıcaklığı	1 gece
Gömme (Resin)	60°C	48 saat

3.9. Serum Örneklerinin Biyokimyasal Analizi

Anestezi işleminin ardından abdominal aortadan toplanan kan örnekleri biyokimya tüplerine aktarıldı. Tüplerin 15 dakika 4100 rpm'de santrifüj işleminin ardından ayrılan serum örneklerinde alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) seviyeleri ölçüldü.

3.10. Karaciğer Doku Örneklerinin Biyokimyasal Analizi

Sıçanlardan alınan karaciğer doku örneklerinde homojenizasyon işleminin ardından malondialdehit (MDA), katalaz (CAT), glutatyon (GSH) ve süperoksit dismutaz (SOD) biyokimyasal analizleri gerçekleştirildi.

3.10.1. Karaciğer Dokularının Homojenizasyonu

Biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere alınan 0,5 g ağırlığında karaciğer doku örnekleri distile suyla hafifçe yıkandı ve kurulandı. Ardından dokular üzerine 5 ml % 10'luk 150 mM PBS (pH 7. 4) solüsyonundan eklenerek homojenizatörde (IKA Yellowline Overhead Stirrer, Almanya) 2000 devirde 1 dakika homojenizasyon yapıldı. (Tablo 7). Homojenizasyon işleminin ardından elde edilen homojenatlar 12000 rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüj (Hettich Zentrifugen, Mikro 200 R, Almanya) edildi. Santrifüj sonrası süpernatant kısımları ependorflara alınarak total protein miktar tayini, MDA, SOD, CAT, GSH analizlerinde kullanılmak üzere -80°C'de (NU 9668E, Nuaire, Japonya) stoklandı.

3.10.2. Total Protein Miktarının Ölçümü

Total protein miktarının ölçümü malondialdehit (MDA), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon (GSH) analizlerinin hesaplanmasında kullanılan bir parametredir. Örneklerin total protein miktarı total protein biyokimyasal kiti kullanılarak (A2300, Archem diagnostic Ind. Co. Türkiye) yapıldı. Bu amaçla her bir ependorf içerisine total protein kiti içerisinde bulunan solüsyondan 1 ml koyuldu. Spektrofotometrede körü

oluşturacak ependorf içerisine 10 µl distile su, standardı oluşturacak ependorf içerisine 10 µl standart ve numune içerecek ependorf içerisine 10 µl örnek koyularak vortekslendi. 10 dakikalık 27-30°C’de inkübasyon işleminin ardından quartz küvetlere (Hellma Analytics, 10 mm) alınarak spektrofotometrede (Shimadzu UV-1601, Kyoto, Japonya) 546 nm dalga boyunda okutuldu. [(Örneğin absorbansı /standartın absorbansı) x Standart konsantrasyon) x 10] formülü kullanılarak total protein miktarı g/l olarak hesaplandı.

3.10.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Analizi

Süperoksit dismutaz aktivitesi ksantin ve ksantin oksidaz aracılığıyla meydana getirilen süperoksit radikallerinin “nitroblue tetrazolium” ile birleştiğinde açığa çıkan kırmızı formazon boyasının optik yoğunluğunun okunması temeline dayanan analiz Sun ve arkadaşlarının yöntemi ile ölçüldü (Sun ve ark, 1988). Bu amaçla vortekslenen süpernatanlardan 0.5 ml’lik ependorflar içerisine aktarılarak, sırasıyla 250 µl etanol (111727, Merck) ve 150 µl kloroform (24216, Sigma-Aldrich) üzerine eklendi ve karıştırıldı. Ardından 1200 rpm’de +4 °C’de 10 dakika santrifüj edildi. 5 ml’lik cam tüpler içerisine tabloda belirtildiği şekilde hazırlanan reaktif karışımından 1225 µl, örnekten 250 µl eklendi (Tablo 7). Kör için örnek yerine aynı miktarda distile su koyuldu. Vorteks işleminin ardından karışıma 25 µl ksantin oksidaz (x1875-25UN, Sigma- Aldrich) enzimi eklenerek 25°C’de 20 dakika süreyle inkübasyonu gerçekleştirildi. Inkübasyon süresinin sonunda karışım üzerine 0,5 ml bakır klorür (CuCl₂, 222011, Sigma-Aldrich) ilave edilerek spektrofotometrede (Shimadzu UV-1601, Kyoto, Japonya) 560 nm dalga boyunda okutuldu. Elde edilen verilerden yapılan hesaplamalar sonucu SOD değerleri U/mg doku protein olarak verildi.

3.10.4. Katalaz (CAT) Analizi

Spektrofotometrede 240 nm dalga boyunda okutulduğunda hidrojen peroksidin (H₂O₂) suya dönüşümü esnasında absorbansındaki düşüşün ölçülmesine dayanan analiz Aebi’nin yöntemine göre yapılarak katalaz aktivitesi ölçüldü (Aebi, 1984). Bu amaçla tabloda belirtilen şekilde hazırlanan 2,95 ml fosfat tamponu ve 50 µl örnek içeren quartz küvet (Hellma Analytics, 10 mm) içerisine H₂O₂ (H1009, Sigma-Aldrich) eklenerek

spektrofotometrede (Shimadzu UV-1601, Kyoto, Japonya) 240 nm dalga boyunda H₂O₂'de gerçekleşen yıkım 1 dakika süreyle 15 saniyede bir kaydedildi (Tablo 8). Katalaz aktivitesi k/mg doku protein olarak verildi.

3.10.5. Glutasyon (GSH) Analizi

İndüklenmiş glutasyon olarak da bilinen GSH'ın ortamda bulunan 5,5'-ditiyobis, 2-nitrobenzoik asit (DTNB) ve sülfhidril gruplu bileşikler tarafından indirgenmesine dayanan analiz Tietze ve arkadaşlarının yöntemine göre yapıldı (Tietze ve ark, 1969). Örnek içerecek tüpe 100 µl örnekten koyularak üzerlerine 0,9 ml distile su ve 1,5 ml tabloda belirtilen şekilde hazırlanan presipitasyon solüsyonu eklendi (Tablo 8). Körü oluşturacak tüpe 1 ml dH₂O ve 1,5 ml presipitasyon solüsyonu eklendi. Vorteks işleminin ardından karışım cam tüplere süzüldü. 1 ml süzüntü içerisine 4 ml fosfat tampon ve 0,5 ml DTNB (S4641, Sigma-Aldrich) eklendi. Vorteks işleminin ardından spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda okutuldu ve GSH aktivitesi mg/kg doku olarak verildi.

3.10.6. Malondialdehit (MDA) Analizi

pH değerinin 3 ya da 4 olduğu aerobik ortamda 95°C'de homojenatın tiobarbitürik asit (TBA) ile etkileşimi sonucu açığa çıkan pembe rengin yoğunluğunun spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda ölçümüne dayanan analiz Ohakawa ve arkadaşlarının metoduna göre yapıldı (Ohakawa ve ark, 1979). 300 µl örnek üzerine 600 µl tabloda belirtilen şekilde hazırlanan stok çözeltisi eklenerek karıştırıldı (Tablo 7). Ardından karışım beg alevi üzerinde 20 dakika kaynatıldı. Buzlu suda soğutularak 10 dakika 3000 rpm'de santrifüj edildi ve spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda okutuldu. MDA konsantrasyonu absorbans katsayısı ($\epsilon=1.56 \times 10^5$ /M/cm) ile hesaplanarak nmol/mg doku protein şeklinde verildi.

Tablo 7. Biyokimyasal analizlerde kullanılan kimyasallar ve solüsyonlar

Analiz	Solüsyon	İçerik
Homojenizasyon	150 mM PBS solüsyonu	A solüsyonu: 21,29 g Sodyum fosfat dibazik (Na_2HPO_4 , 255793 Sigma-Aldrich), 8,76 g Sodyum klorür (NaCl , S7653, Sigma-Aldrich) ve 1 L dH_2O B Solüsyonu: 20,41 g Potasyum fosfat monobazik (KH_2PO_4 , 04243, Sigma-Aldrich) ile 8,75 g NaCl (S7653, Sigma-Aldrich) ve 1 L dH_2O A solüsyonuna B solüsyonundan pH: 7.4 olana kadar aktarılarak 150 mM PBS solüsyonu hazırlandı.
SOD analizi	Ksantin stok çözeltisi (10x)	0,0036 g Xanthine % 99-100 (X0626, Sigma-Aldrich), 0,8 ml 0,1 N sodyum hidroksit (NaOH , 06203, Sigma-Aldrich) ve 7,2 ml dH_2O
SOD analizi	EDTA Solüsyonu	0,01245 g EDTA (E5134, Sigma-Aldrich) ve 50 ml dH_2O
SOD analizi	Nitrotetrazolium blue chloride (NBT) solüsyonu	0,0061 g NBT (N6876, Sigma-Aldrich) ve 50 ml dH_2O
SOD analizi	Reaktif karışımı	80 ml Ksantin stok çözeltisi (1x), 40 ml EDTA solüsyonu, 40 ml NBT solüsyonu, 24 ml Sodyum karbonat (Na_2CO_3 , S7795, Sigma-Aldrich) ve 12 ml BSA (A7906, Sigma-Aldrich)
CAT analizi	Fosfat tamponu	7,26 g Sodyum fosfat dibazik ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 7163, Sigma-Aldrich) ile 3,52 g Potasyum fosfat monobazik (KH_2PO_4 , 04243, Sigma-Aldrich) ve 1 L dH_2O Hidroklorik asit (HCl , 100317, Merck) ile pH ayarlandı (pH: 7.0).
GSH analizi	Presipitasyon solüsyonu	1,67 g Glasiyal metafosforik asit (K42930746, Merck), 0,2 g EDTA (E5134, Sigma-Aldrich) ve 30 g NaCl (S9625, Sigma-Aldrich)
GSH analizi	Fosfat tamponu	42,59 g Na_2HPO_4 (S9763, Sigma-Aldrich) ve 1 L dH_2O
MDA analizi	Stok çözeltisi	3,35 ml HCl (7647, Carloerba), 0,74 g tiobarbiturikasit (TBA, T550, Sigma-Aldrich), 30 g trikloroasetikasit (TCA, S7242, Sigma-Aldrich) ve 200 ml dH_2O

3.11. Western Blot Yöntemi

Sıçanlardan alınan karaciğer dokularından izole edilen protein örnekleri jelde SDS-PAGE (Sodyumdodesilsülfat-Poliakrilamid Gel) elektroforez yöntemiyle moleküler ağırlıklarına göre ayrıldı. Elektroforez işleminin ardından jel polivinilidin difluorid (PVDF) membrana transfer edilerek Bax (SC-7480, Santa Cruz) ve Bcl-2 (SC-7382, Santa Cruz) primer antikorlarıyla muamale edildi. Böylelikle karaciğer dokularındaki bu proteinlerin kalitatif ve kantitatif olarak analizi yapıldı.

3.11.1. Protein İzolasyonu ve Protein Miktar Tayini

Sıçanlardan alınan 0,1 g karaciğer doku örnekleri üzerine tabloda belirtilen şekilde hazırlanan Ripa liziz tamponundan 0,5 ml eklenerek Ultra-Turnax T8 (IKA-Werke) homojenizatör ile karaciğer dokularının homojenizasyonu gerçekleştirildi (Tablo 8). Elde edilen homejenat +4°C'de 13200 rpm'de 50 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminin ardından süpernatantlar ependorflara alınarak protein izolasyonu tamamlandı.

Protein izolasyonunun ardından örnekler BCA protein analizi (BCA protein assay kit, 23225, Thermo Fisher Scientific) yapılarak total protein konsantrasyonları belirlendi. Bu amaçla kit içerisinde bulunan BSA standart olarak kullanıldı. Ependorflar içerisine BSA'nın 2000 µg/ml- 0 µg/ml aralığında distile suyla seyreltilmesiyle hazırlanan standartlar 20 µl 96'lı plak kuyucuklarına eklendi. Distile suyla 1:50 oranında seyreltilen protein örneklerinden 20'şer µl kuyucuklara koyuldu. Proteinlerin izolasyonu ripa tamponuyla gerçekleştirildiğinden kör olarak kullanılmak üzere 20 µl ripa tampon kuyucuklara aktarıldı. Standartlar, protein örnekleri ve kör iki tekrarlı olarak kuyucuklara koyuldu. BCA protein assay kit içerisinde bulunan 50:1 oranında A solüsyonu ve B solüsyonu karıştırılarak standart, protein örnekleri ve kör içeren kuyucukların üzerine 200 µl eklendi ve 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin ardından 96'lı plak spektrofotometrede (NanoDrop 2000 Spektrofotometre, Thermo Fisher Scientific) 562 nm dalga boyunda okutuldu. Elde edilen absorbans değerleriyle oluşturulan R² grafiğinden edinilen standart eğri yardımıyla örneklerin konsantrasyonları hesaplandı. Protein miktar tayini yapıldıktan sonra her örnek 100 µg protein içerek şekilde hesaplanarak protein miktarları tüm örneklerde eşitlendi.

Tablo 8. Western blot analizinde kullanılan tamponların ve solüsyonların içerikleri

Tampon ve Solüsyonlar	İçerik
Ripa Buffer (10ml)	10ml 5M Tris-HCl (A1379, Applichem), 3ml 5M NaCl (13423, Sigma-Aldrich), 0,5g Sodyum deoksikolat (D6750, Sigma- Aldrich), 0,5ml 0,5 M EDTA (E5134, Sigma-Aldrich), 0,1g SDS (SDS001, Bioshop), 1ml %10 nonidet P40 substitute (NP40) (74385, Sigma-Aldrich) Homojenizasyondan hemen önce 10ml Ripa karışımı içerisine 100 mikrolitre 100mM sodyum ortovanadat (Na_3VO_4) (450243, Sigma-Aldrich) ve yarım tablet proteaz inhibitör kokteyl (sc-29131, Santa Cruz) eklenir.
Towbin Transfer Buffer (1L)	3.03 g Tris-base (A1379, Applichem), 14,4 g Glycin (sc29096, Santa Cruz), 5 ml %10'luk SDS (SDS001, Bioshop), dH ₂ O (pH: 8,1-8,5). Blotlama işleminden önce %20 metanol (106009, Merck) ilave edildi.
10X TBS (1L)	30,2 g Tris-base (A1379, Applichem), 43,8 g NaCl (13423, Sigma-Aldrich), 932 mg potasyum klorür (KCl, 12636, Sigma-Aldrich), dH ₂ O
1X TBS-t (1L)	100 ml 10X TBS, 900 ml dH ₂ O, 1 ml Tween 20 (P7949, Sigma-Aldrich)
10X Running Buffer (1L)	30 g Tris-base (A1379, Applichem), 144 g Glycin (sc-29096B, Chemcruz), 15 g SDS (SDS001, Bioshop), dH ₂ O (pH: 8,6)
1X Running Buffer (1L)	100 ml 10X Running Buffer, 900 ml dH ₂ O (pH: 8,6)
Upper Buffer (500ml)	30,5 g Tris-base (A1379, Applichem), 20 ml %10'luk SDS (SDS001, Bioshop), 30 ml HCl (6N), dH ₂ O (pH: 6,7)
Lower Buffer (500ml)	91 g Tris-base (A1379, Applichem), 20 ml %10'luk SDS (SDS001, Bioshop), 14 ml HCl (6N) (100317, Merck), dH ₂ O (pH: 8,8)
6X Loading Dye (10ml)	3,75 ml 1M Tris-HCl (A1379, Applichem, 100317, Merck) (pH: 6,8), 5 ml Gliserol (sc-29095 chemcruz)+H ₂ O (4:1), 1 g SDS (SDS001, Bioshop), 900 µl Merkaptotanol (M3148, Sigma-Aldrich), % 0,06 Bromfenol blue (B8026, Sigma- Aldrich), dH ₂ O

3.11.2. Poliakrilamid jelin (SDS-PAGE) hazırlanması ve proteinlerin jele yüklenmesi

SDS-PAGE tekniği ile proteinlerin jelde yürütülmesi için hazırlanan % 8'lik alt jel (ayırıcı jel, separating gel) elektroforez standındaki iki cam arasına mikropipet aracılığıyla aktarıldı. Alt jelin yüzeyinin bozulmaması ve üst jelle düzgün bir katman oluşturabilmesi için üzerine izopropanol eklenerek polimerleşmek üzere oda sıcaklığında bekletildi. Polimerleşen alt jelin üzerindeki izopropanol uzaklaştırılarak üzerine aşağıdaki tabloda belirtilen şekilde hazırlanan %3'lük üst jel (yükleme jeli, stacking gel) aktarıldı. Proteinlerin yükleneceği kuyucukları oluşturacak tarak jel üzerine yerleştirildi ve oda sıcaklığında polimerleşti.

Tablo 9. Poliakrilamid jelin (SDS-PAGE) hazırlanışı

Bileşenler	Yükleme Jeli (2x)	Ayırıcı jel (2x)
	%3	%8
Distile su	3,15 ml	4,55 ml
Upper Buffer	1,25 ml	-
Lower Buffer	-	3,8 ml
%30 Akrilamid+ 0,8 bisakrilamid	0,5 ml	4 ml
%10 SDS	50 µl	150 µl
Gliserol	-	2,5 ml
TEMED	6 µl	12 µl
%40 amonyum persülfat (APS) (A9164, Sigma-Aldrich)	12 µl	18 µl

Üst jelinde polimerleşmesinin ardından jelin bulunduğu stand SDS-PAGE dikey konumlu elektroforez tankı (Mini-Protean Tatra System, BIO-RAD) içerisine yerleştirildi. Üzerine 1x running buffer eklenerek taraklar dikkatlice jelden çıkarıldı. İlk kuyucuğa hedeflenen proteinin tespitini düzgün yapabilmek amacıyla 6 µl marker (PM007- 0500, BLUeye Prestained Protein ladder, Genedirex) yüklendi. 100 µg protein içeren şekilde hesaplanan örnekler üzerine tabloda belirtilen şekilde hazırlanan 6x loading dye (6 µl) eklendi ve 90°C'de 5 dakika inkübe edildi (Tablo 8). İnkübasyon sonunda örnekler diğer kuyucuklara 37 µl yüklendi. Running buffer ile dolu olan tankın kapağı kapatıldı. Örnekler

üst jeli geçene kadar 90 voltta alt jele geldiğinde de 120 voltta 100 dakika yürütüldü (Elektroforez güç kaynağı, EC25090, Thermo Fisher Scientific).

3.11.3. Blotlama İşlemi

Proteinlerin blotlanmasında yarı kuru transfer (semi-dry blotting) metodu kullanıldı. 12 adet blotlama kağıdı 11 cm en 15 cm boya sahip olacak şekilde kesildi. Blotma kağıtlarından 6 tanesi % 20 metanol (106009, Merck) içeren towbin transfer buffer da ıslatılarak blotlama cihazına yerleştirildi (Tablo 8). Proteinlerin transferinin gerçekleşeceği PVDF membran (162-0177, BIO-RAD, United States) 7 cm en ve 9 cm boy olacak şekilde kesildi ve aktifleşmesi için 5 dakika metanolde bekletildi. Ardından towbin transfer buffer ile muamele edilen PVDF membran blotlama kağıtları (MN 218 B, Macherey-Nagel, Düre, Almanya) üzerine yerleştirildi. Elektroforez tankından çıkartılıp ayrılan jel membran üzerine yerleştirildi. Kalan 6 adet blotlama kağıdı %20 metanol içeren towbin transfer buffer ile ıslatılarak jelin üzerine koyuldu ve transfer cihazı (Trans-Blot Turbo, BIO-RAD) içerisinde 0,4 Å akım, 25 V ve 37 dakikada jel üzerindeki proteinlerin membrana transferi sağlandı.

Transfer işleminin ardından spesifik olmayan bağlanmaları önlemek amacıyla membran üzerine % 6'lık skim milk (20 ml 1X TBS-t, 1,2 g Skim Milk (70166, Merck)) eklenerek oda sıcaklığında açılı çalkalayıcı üzerinde 1 saat çalkalama işlemi yapıldı. Ardından sütü uzaklaştırmak amacıyla membran iki kez yıkama solüsyonu 1x TBS-t ile yıkandı (Tablo 8).

3.11.4. Membranın Antikorlar ile Muamesesi ve Görüntüleme

Membran üzerine aktarılan proteinler, Bax (SC-7480, Santa Cruz), Bcl-2 (SC-7382, Santa Cruz) ve internal kontrol olarak GAPDH (60004, Proteintech) antikorları ile muamale edildi. 1 µg/ml olacak şekilde hesaplanarak % 5'lik BSA (10 ml 1X TBS-t, 0,5 g BSA (sc-2323, ChemCruz)) ile dilüe edilen antikorlar membran üzerine eklenerek +4°C' de 16 saat orbital çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Ardından 1x TBS-t ile yıkandı. Ardından 1:2000 oranında % 6'lık skim milk içerisinde hazırlanan 1/2000 dilüe edilmiş sekonder antikor (Anti- Mouse IgG- HRP, sc 516102, Santa Cruz,) ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi ve ardından 1x TBS-t ile 3 kez yıkandı. Protein ağırlıklarının yerini görünür hale getirebilmek

için marker Western Sure Pen (C60222,LI-COR, Lincoln, USA) kalem ile işaretlendi. Görüntüleme kimyasal ışımaya yöntemine dayanan ECL solüsyonu kullanıldı. Membran üzerine ECL solüsyonu (1705060, BIO-RAD, United States) eklenerek karanlık ortamda 5 dakika inkübe edildi ve Chemi DOC- ItR2 imager (UVP) cihazı ile görüntülenip VisionWorks LS (UVP) programıyla fotoğraflandı. Image J programı kullanılarak elde edilen fotoğraflar üzerinden bant yoğunlukları ölçüldü. Bax ve Bcl-2 bant yoğunluklarının GAPDH'e oranlanmasıyla elde edilen veriler ve hücre sağ kalım göstergesi kabul edilen Bax/Bcl-2 oranı istatistiksel olarak analiz edildi.

3.12. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme SPSS 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programı kullanılarak yapıldı. Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uygunlukları Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Normal dağılım gösteren sürekli değişkenler için tanımlayıcı istatistikler aritmetik ortalama±standart sapma; normal dağılım göstermeyenler için ise ortanca (minimum-maksimum) şeklinde ifade edildi. Normal dağılım gösteren sürekli değişkenlerin karşılaştırılması için Student's t testi, normal dağılım göstermeyenler için ise Mann-Whitney U ve Kruskal Wallis/Tamhane T2 testleri kullanıldı. Tüm değerlendirmeler için $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi

4. BULGULAR

4.1. Sıçanların Vücut Ağırlıklarının ve Rölatif Karaciğer Ağırlıklarının Ölçümü

Vücut ağırlıkları deney başlangıç ve deney sonunda ölçülen sıçanların ilk ağırlıkları arasında anlamlı fark görülmezken ($p>0.05$), son ağırlıklarında gruplar arasında anlamlı fark izlendi ($p<0.05$). Buna göre Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında DOX grubu ve DOX+MKH grubunda vücut ağırlıklarında ve vücut ağırlıklarındaki değişimin yüzdesinde düşüş meydana geldi. Karaciğer ağırlıkları ve son vücut ağırlıklarının ölçülmesiyle hesaplanan rölatif karaciğer ağırlıkları arasında gruplar arasında anlamlı fark gözlenmedi ($p>0.05$). Vücut ağırlıkları ve rölatif karaciğer ağırlıklarına ilişkin veriler Tablo 10'da verildi.

Tablo 10. Deneysel gruplara ait sıçanların vücut ağırlıkları ve rölatif karaciğer ağırlıkları

Gruplar	Vücut Ağırlığı (g)		Vücut Ağırlığındaki Değişimin Yüzdesi (%)	Rölatif Karaciğer Ağırlığı (g)
	İlk Ağırlık (Ortalama±ss)	Son Ağırlık (Ortalama±ss)	Medyan (25-75)	(Ortalama±ss)
Kontrol	283.25±12.62	309.25±15.53	0,075 (0.03-0.12)	3.81±0.24
DOX	279.45±19.71	248.75±16.73 ^a	-0.011[(-0.07)-(-0.16)] ^a	3.56±0.50
DOX+MKH	278.00±10.85	271.63±36.68 ^b	-0.04[(-0.15) (0.18)] ^c	3.94±0.64

^a $p<0.001$; kontrol grubuna kıyasla

^b $p=0.018$; kontrol grubuna kıyasla

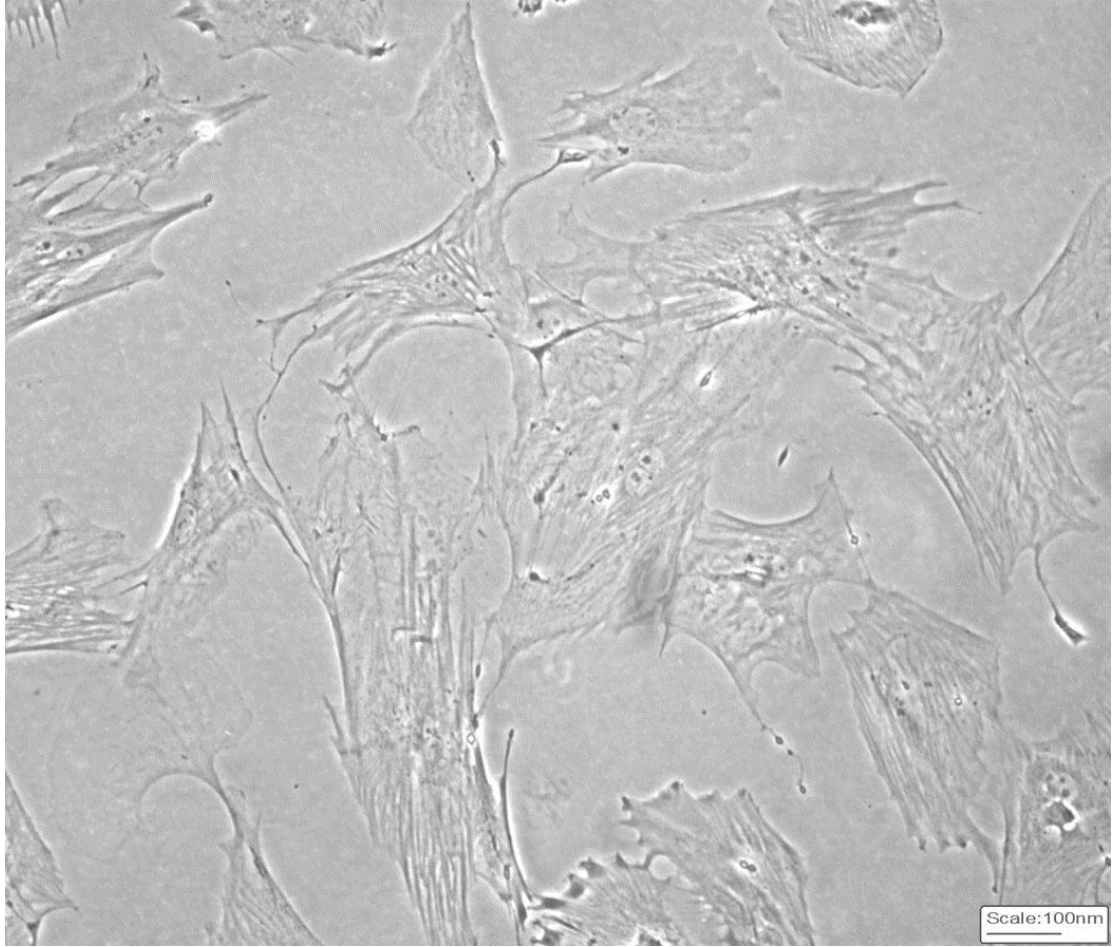
^c $p=0.028$; kontrol grubuna kıyasla

Student's T Test ve Mann Whitney U Testi

4.2. Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

4.2.1. Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Mikroskopik Görünümü

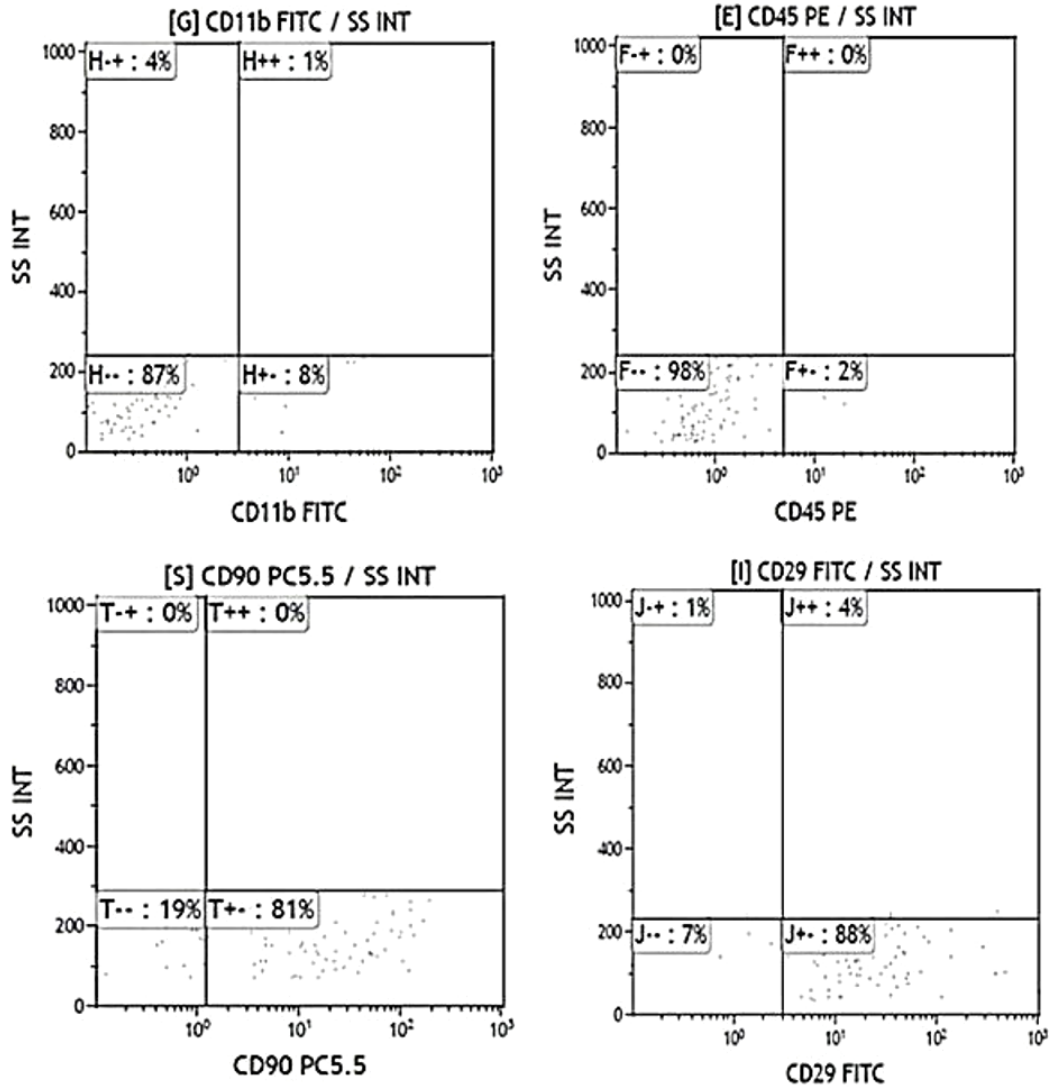
Sıçanların femur ve tibia kemiklerinden izole edilen kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler kültürün ilerleyen evrelerinde invert mikroskopta incelendiğinde *in vitro* ortamda yzeyeye yapışmış, büyük, genişlemiş, iğsi, fibroblast benzeri hücreler olarak gözlendi (Resim 1).



Resim 1. *İn vitro* ortamda mezenkimal kök hücrelerin morfolojik zellikleri. Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler büyük, iğsi şekilli, büyük, fibroblast benzeri hücreler olarak izlenmektedir (x10).

4.2.2. Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerinin Hücre Yüzey Belirteçlerini Ekspresyonu

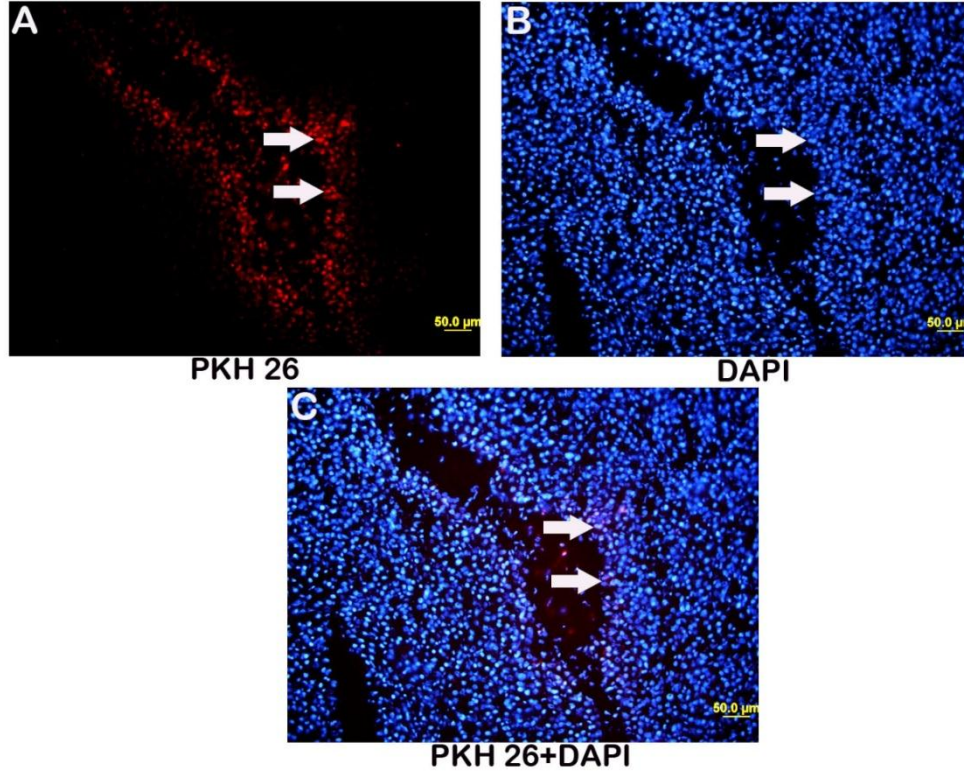
Kemik iliği kaynaklı MKH'lerin immunofenotipik analizi amacıyla CD45, CD29, CD90 ve CD11b hücre yüzey belirteçlerinin varlığı akım sitometri analiziyle gösterildi (Şekil 13). Kemik iliği kaynaklı MKH'lerin hematopoetik belirteçler olan CD45 (% 2) ve CD11b'yi (% 9) çok düşük düzeyde eksprese ettiği, MKH stromal belirteçleri olan CD90 (% 81) ve CD29'u (% 92) ise yüksek düzeyde eksprese ettiği görüldü (Şekil 13).



Şekil 13. Kemik iliği kaynaklı MKH'lerin akım sitometri analiziyle karakterizasyonu. İzole edilen MKH'ler CD 90 (% 81) ve CD 29 (% 92) yüzey belirteçlerine pozitif ekspresyon, CD 45 (% 2) ve CD 11 b (% 9) yüzey belirteçlerine ise negatif ekspresyon gösterdi.

4.3.Kırmızı Floresan Protein İle İşaretlenmiş Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Floresan Mikroskop İle Görüntülenmesi

MKH'lerin karaciğer dokusundaki varlığını belirlemek amacıyla sıçanlara verilmeden önce kırmızı floresan protein (PKH) ile işaretlendi. Deney sonunda sıçanlardan alınarak dondurulan karaciğer dokularından alınan kesitler öncelikle DAPI ile boyanarak hücrelerin çekirdeklerinin görünür olması sağlandı. Bu kesitler farklı filtreler kullanılarak floresan mikroskopta incelendiğinde kırmızı floresan protein ile işaretlenmiş MKH'ler karaciğer dokusunda kırmızı renkte, DAPI ile boyanan karaciğer dokusuna ait tüm hücre çekirdekleri mavi renkte görüntülendi. Görüntüler birleştirilerek hücrelerin çakıştığı yerlerde kemik iliği kaynaklı MKH'lerin varlığı gösterildi ve sıçanlara verilen kök hücrelerin karaciğer dokusuna ulaştığı doğrulandı (Resim 2).



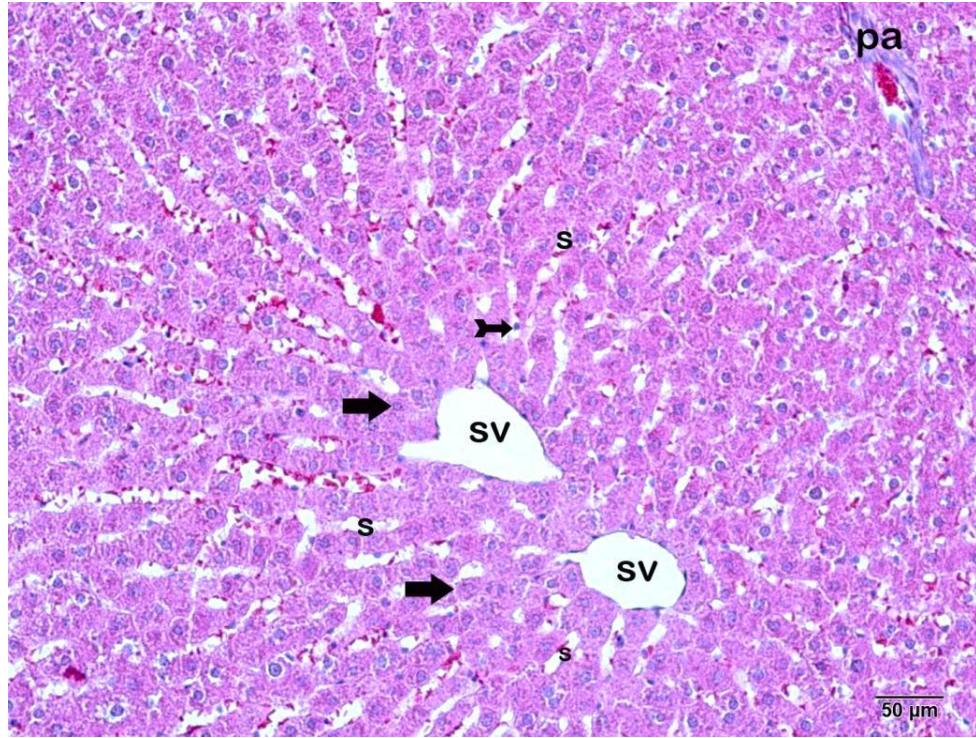
Resim 2. Karaciğer dokusunda kırmızı floresan protein (PKH 26) ile işaretlenmiş MKH'lerin floresan mikroskop görüntüsü. **A:** Kırmızı floresan protein ile işaretlenmiş MKH'ler (ok), **B:** DAPI ile boyanmış hücre çekirdekleri, **C:** Birleştirilmiş (Merge) görüntüsü. Oklar; karaciğer dokusunda bulunan kırmızı floresan protein ile işaretlenmiş MKH çekirdeklerini göstermektedir (Scala bar: 50µm).

4.4. Histopatolojik Bulgular

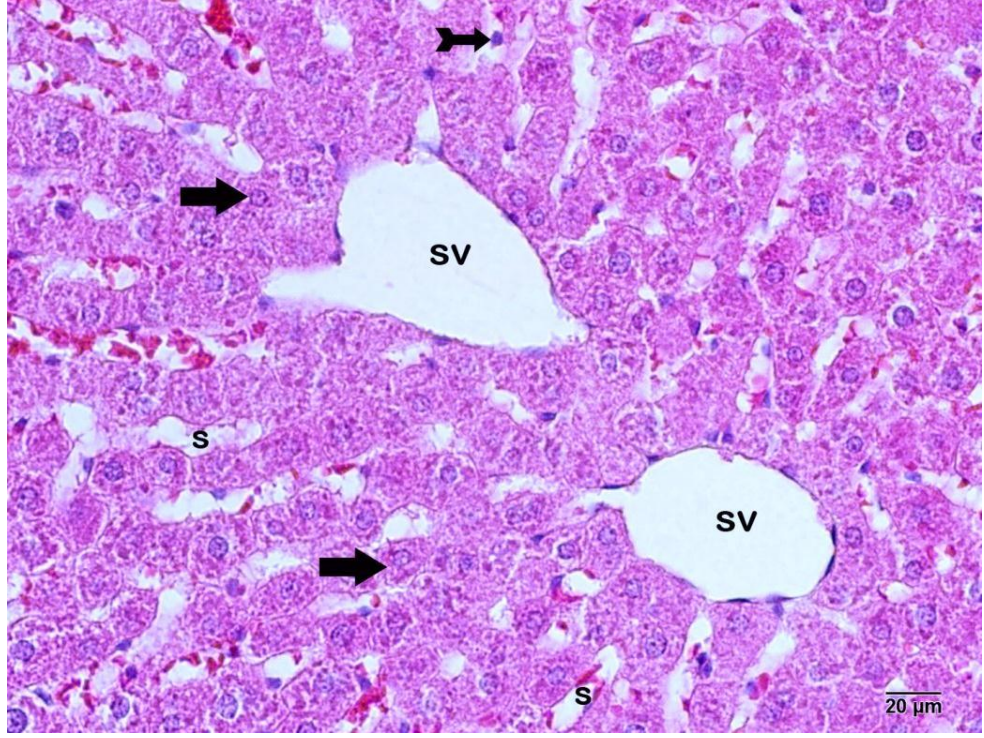
4.4.1. Karaciğer Kesitlerinin Hematoksilen-Eozin Boyaması

4.4.1.1. Kontrol Grubuna Ait Bulgular

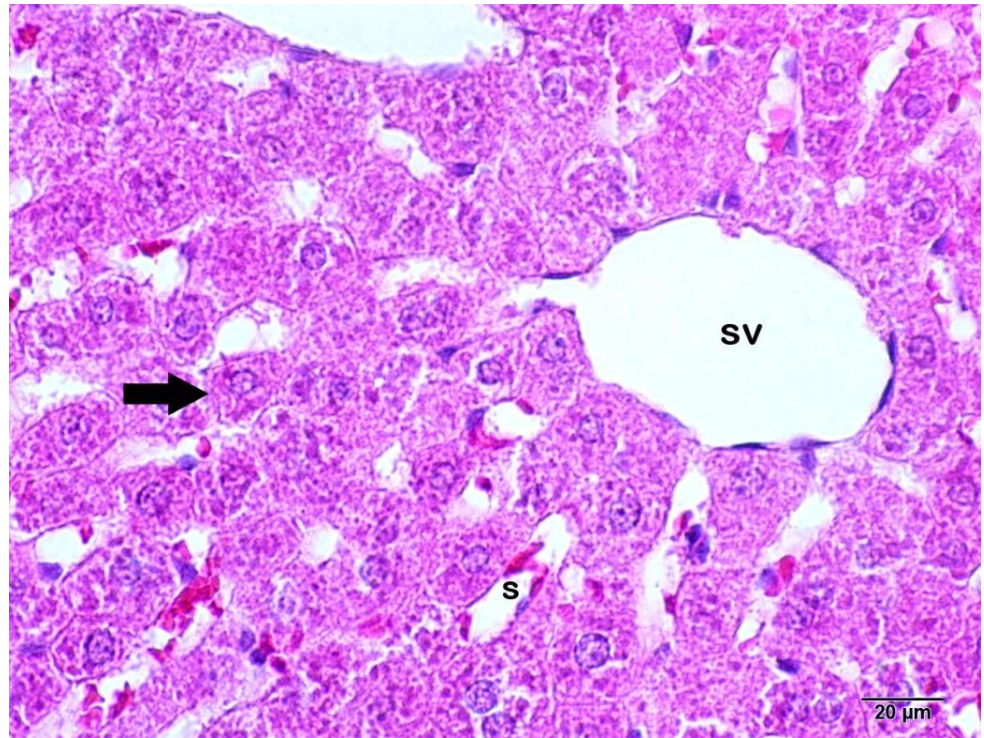
Kontrol grubuna ait karaciğer kesitleri H-E boyaması sonrası ışık mikroskopunda incelendiğinde çoğunlukla normal yapıda hepatositlerden (ok) oluşan karaciğer parankim yapısı gözlemlendi. Santral venden (sv) ışınsal seyreden hepatosit plakları düzenli yerleşim göstermekteydi (Resim 3-5). Hepatosit plakları arasında düzgün sınırlar içeren normal yapıda sinüzoidler (s) ve yer yer Kupffer hücreleri (kuyruklu ok) izlendi.



Resim 3. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü (H-E, 20x).
pa: portal alan **s:** sinüzoid, **sv:** santral ven, **ok:** hepatosit, **kuyruklu ok:** Kupffer hücresi.



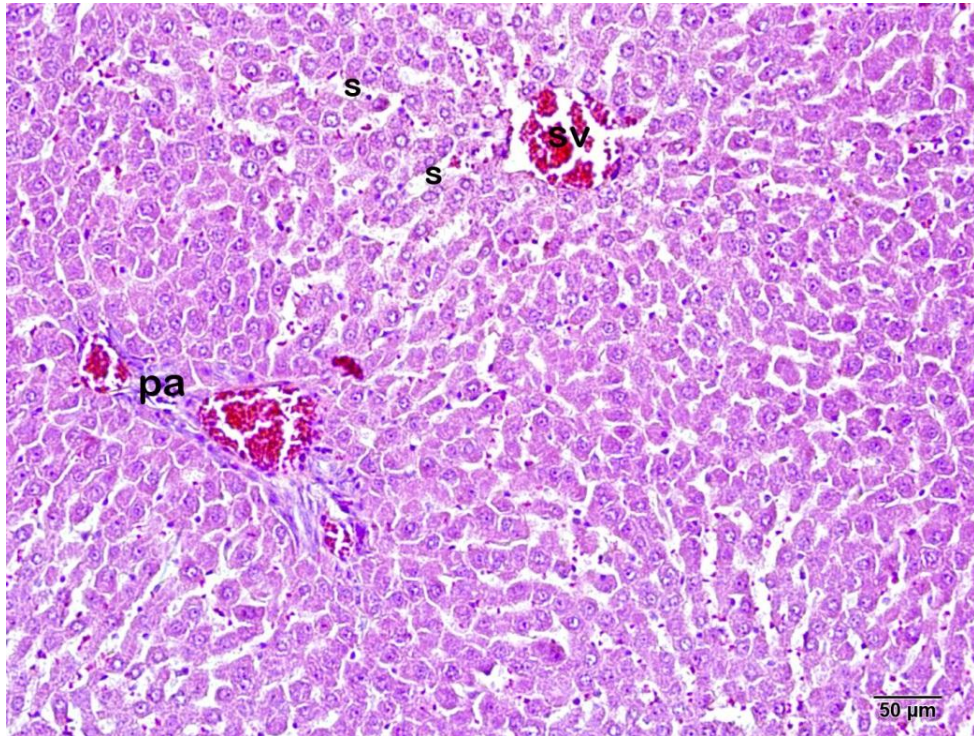
Resim 4. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü (H-E, 40x).
s: sinüzoid, sv: santral ven, ok: hepatosit, kuyruklu ok: Kupffer hücresi.



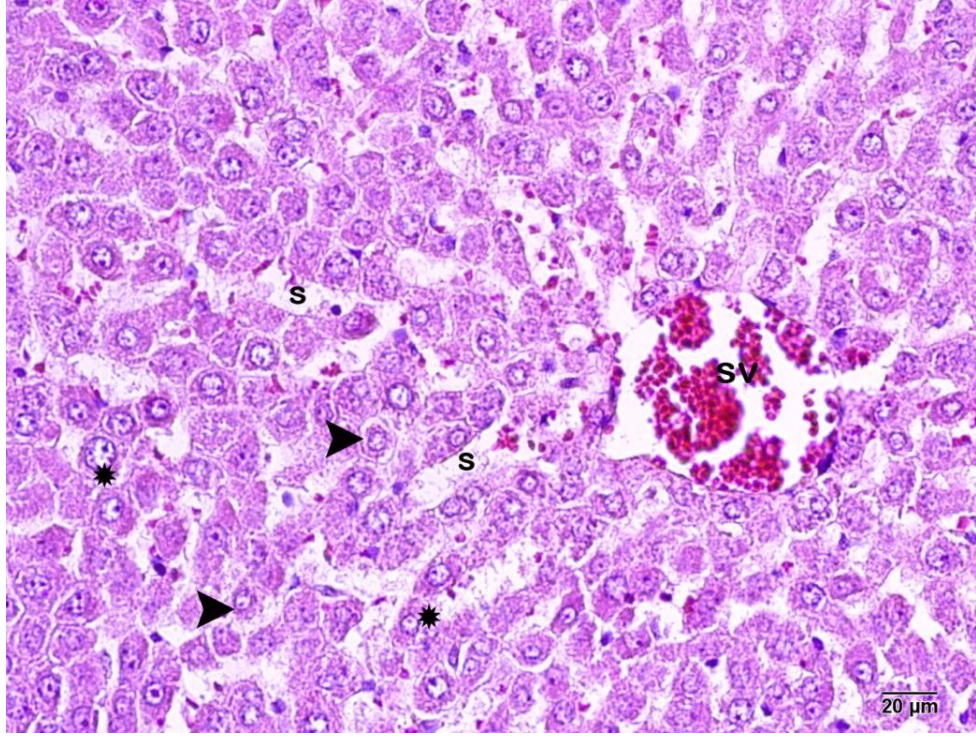
Resim 5. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü (H-E, 60x).
s: sinüzoid, sv: santral ven, ok: hepatosit.

4.4.1.2. Doxorubisin Uygulama Grubuna Ait Bulgular

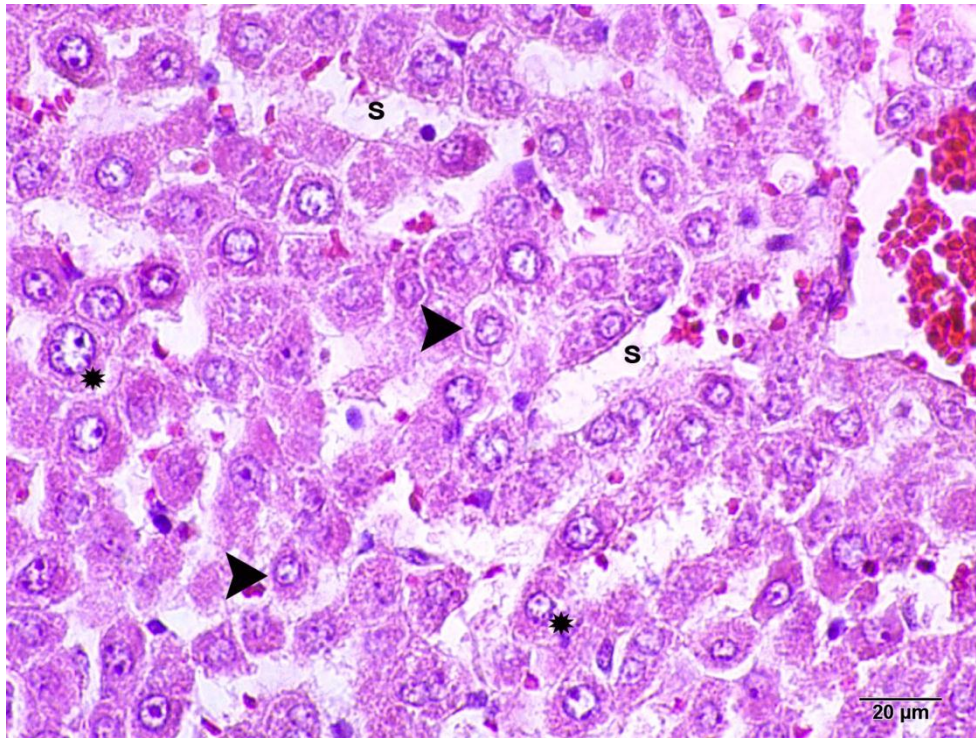
Doxorubisin uygulama grubu karaciğer dokusuna ait kesitler H-E boyaması sonrası ışık mikroskobu altında incelendiğinde karaciğer parankim yapısında ciddi bozulmalar gözlemlendi. Sitoplazmalarında yaygın vakuol içeriğine sahip hepatositler, hepatositlerin bir kısmında nekrozis, hepatik plak yapılarında bozulmalar ve belirgin sinüzoidal dilatasyonlar izlendi. Bunlara ek olarak portal alanda monükleer hücre infiltrasyon artışı görülmekteydi (Resim 6-8).



Resim 6. Doxorubisin grubuna ait karaciğer dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü (H-E, 20x). **pa:** portal alan, **s:** sinüzoid, **sv:** santral ven.



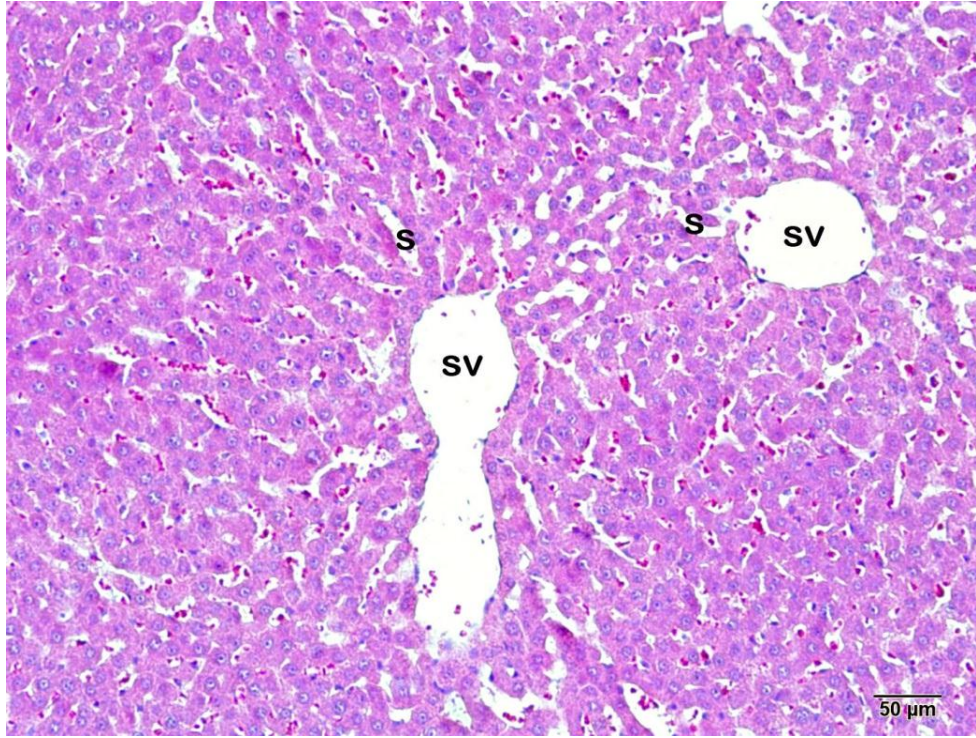
Resim 7. Doxorubisin grubuna ait karaciğer dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü (H-E, 40x). **s:** sinüzoid, **sv:** santral ven, **ok başı:** nekrotik hücreler, **yıldız:** vakuolizasyon.



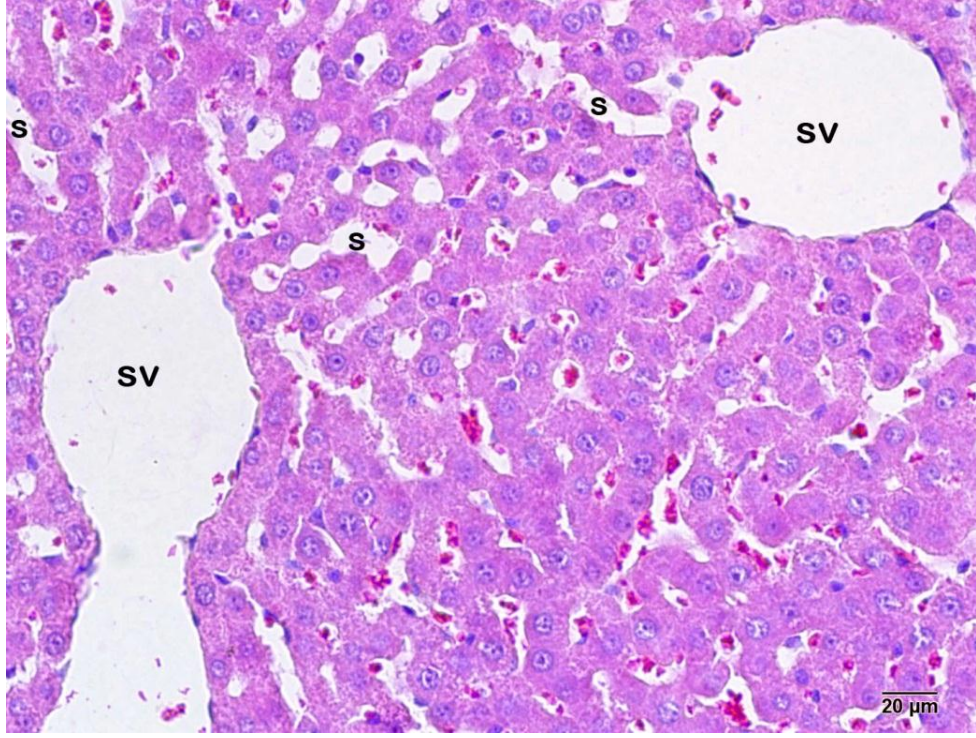
Resim 8. Doxorubisin grubuna ait karaciğer dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü (H-E, 60x). **s:** sinüzoid, **ok başı:** nekrotik hücreler, **yıldız:** vakuolizasyon.

4.4.1.3. Doxorubisin +Mezenkimal Kök Hücre Grubuna Ait Bulgular

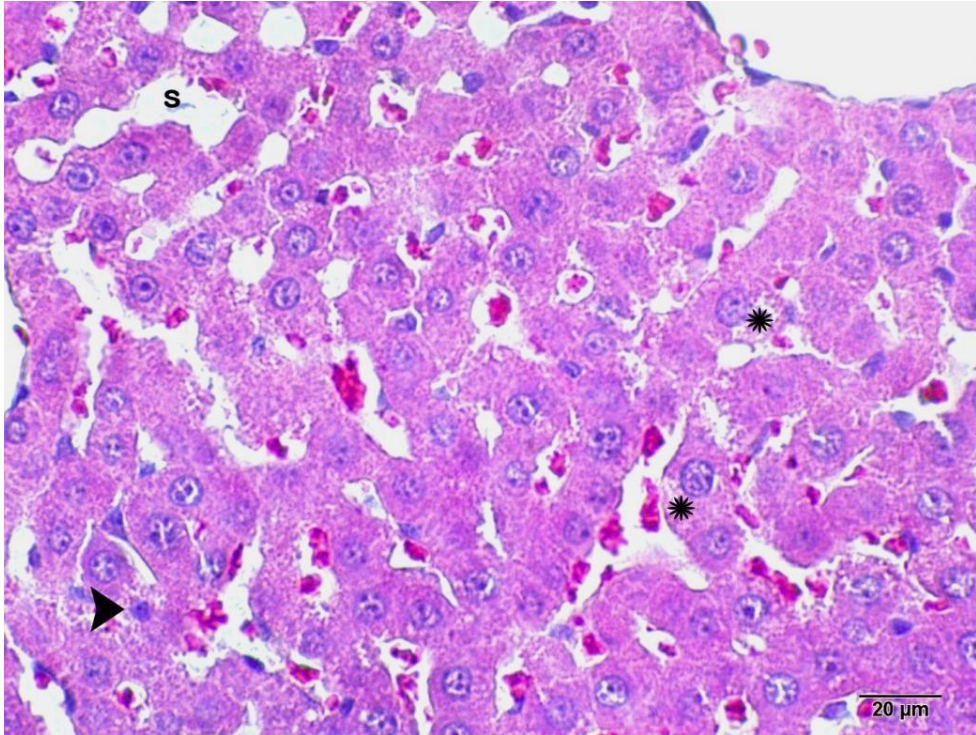
Doxorubisin uygulaması sonrası MKH verilen gruba ait karaciğer kesitleri H-E boyaması sonrası ışık mikroskobunda incelendiğinde Doxorubisin uygulama grubuna kıyasla sitoplazmik vakuolizasyon içeren hepatositlerde ve nekrotik karaciğer hücrelerinde azalma gözlendi. Ayrıca DOX grubunda gözlenen sinüzoidal dilatasyonlar azalmıştı ve hepatic kordonlar daha düzenli görünümdeydi (Resim 9-11).



Resim 9. Doxorubisin+MKH uygulama grubuna ait karaciğer dokusunun ışık mikroskobik görüntüsü (H-E, 20x). **s:** sinüzoid, **sv:** santral ven.



Resim 10. Doxorubisin+MKH uygulama grubuna ait karaciğer dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü (H-E, 40x). **s:** sinüzoid, **sv:** santral ven.



Resim 11. Doxorubisin+MKH uygulama grubuna ait karaciğer dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü (H-E, 60x). **s:** sinüzoid, **sv:** santral ven, **ok:** nekrotik hepatosit, **yıldız:** vakuolizasyon.

Her bir karaciğer dokusundan seçilen 4 farklı alanın iki histolog tarafından bağımsız olarak değerlendirilmesiyle Jacevic ve arkadaşlarının çalışmalarında oluşturduğu hepatik hasar skoru (HDS) kullanılarak ışık mikroskopik gözlemler nicel verilere dönüştürüldü (Jacevic ve ark, 2017). DOX uygulanan grup [HDS: 2.00(1.00-4.00)] ile Kontrol grubu [HDS :0.00 (0.00-1.00)] arasında anlamlı fark vardı ve HDS, DOX grubunda daha yüksekti. DOX grubuyla karşılaştırıldığında MKH grubunda ise HDS’de [2.00 (1.00-3.00)] azalma gözlemlendi. HDS verileri Tablo 11’de verildi.

Tablo 11. Hepatik hasar skoru (HDS) analiz sonuçları

Gruplar	Hepatik Hasar Derecesi						Hepatik Hasar Skoru (HDS) Medyan(%25-%75)
	0	1	2	3	4	5	
Kontrol	22	10					0.00 (0.00-1.00)
Doxorubisin			18	11	3		2.00 (1.00-4.00) ^a
Doxorubisin + MKH		12	16	4			2.00 (1.00-3.00) ^{a,b}

8 karaciğer /grup x 4 alan/karaciğer

^a $p < 0.001$; Kontrol grubuna kıyasla

^b $p < 0.001$; Doxorubisin grubuna kıyasla

Mann Whitney U Testi.

4.4.2 TUNEL Boyama

Tüm gruplara ait karaciğer dokularında apoptotik hücrelerin saptanabilmesi amacıyla “Apoptag In Situ Apoptozis” saptama kiti kullanılarak yapılan TUNEL boyama yönteminde apoptotik hücreler koyu nükleus içerikleriyle saptanmıştır. Buna göre kontrol grubunda oldukça az sayıda gözlenen apoptotik hücrelerin doxorubisin uygulanan grupta arttığı,

DOX+MKH grubuna ise apoptotik hücre yaygınlığının azaldığı izlenmiştir (Resim 12-14). Oluşturulan apoptotik indeks skoru (TUNEL pozitivite skoru) ile ışık mikroskopik görüntüler nicel verilere dönüştürülerek istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Buna göre; Kontrol grubuyla (TUNEL pozitivite skoru:1,5 (1-2)) karşılaştırıldığında DOX grubunda (TUNEL pozitivite skoru:3(2-4)) TUNEL pozitivite skorunda artış meydana gelirken, DOX grubuyla karşılaştırıldığında DOX+MKH grubunda (TUNEL pozitivite skoru:1,5 (1-2)) TUNEL pozitivite skorunda düşüş gözlenmiştir (Tablo 12-14).

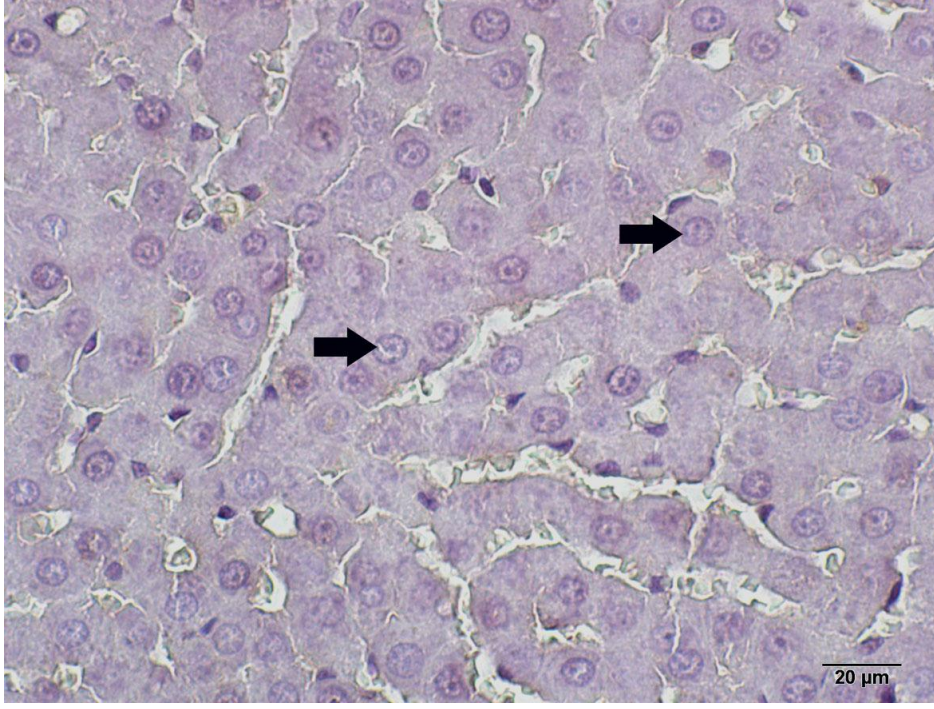
Tablo 12. TUNEL boyama yöntemi apoptotik indeks tablosu

Grup	Apoptotik İndeks Skoru (TUNEL Pozitivite Skoru)
	Medyan (25-75)
Kontrol	1,5(1-2)
Doxorubisin	3(2-4) ^a
Doxorubisin + MKH	1,5(1-2) ^b

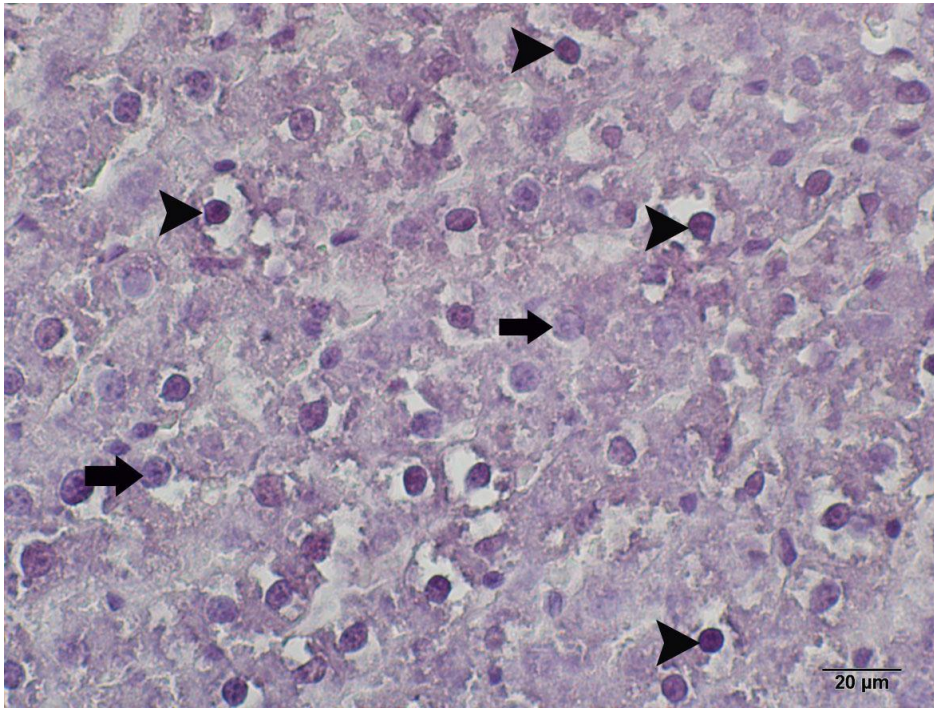
^a**p=0.01; Kontrol grubuna kıyasla**

^b**p=0.01; Doxorubisin grubuna kıyasla**

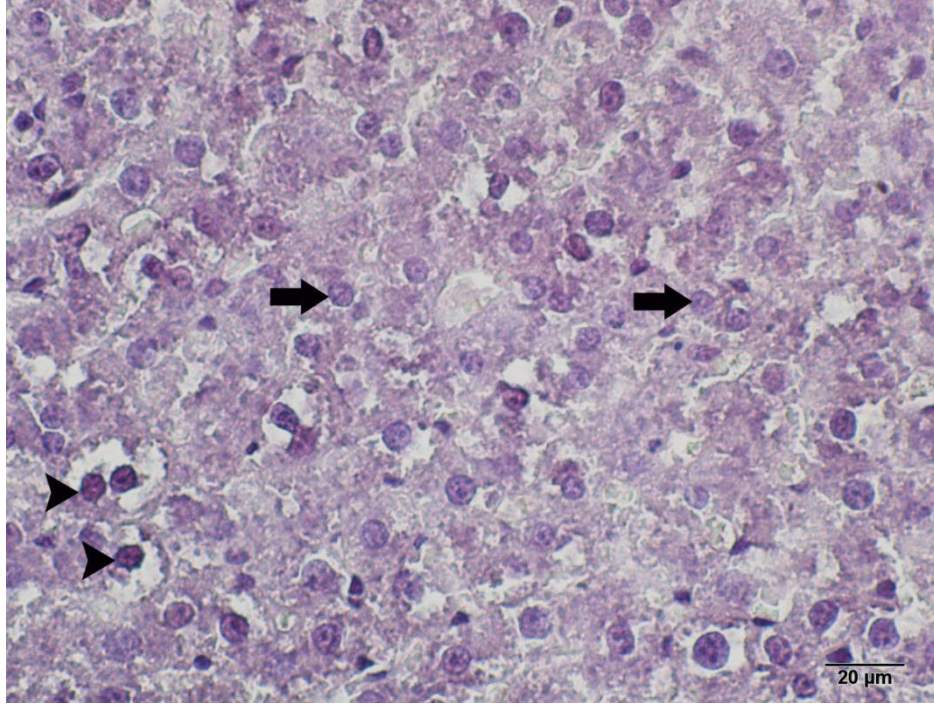
Kruskal Wallis/Tamhane T2 Testi



Resim 12. TUNEL yöntemiyle boyanmış kontrol grubuna ait karaciğer kesitlerinin ışık mikroskopik görünümü (60x). **ok:** normal yapıdaki hepatositler.



Resim 13. TUNEL yöntemiyle boyanmış DOX grubuna ait karaciğer kesitlerinin ışık mikroskopik görünümü (60x). **ok:** normal yapıdaki hepatositler, **ok başı:** apoptotik hepatositler.

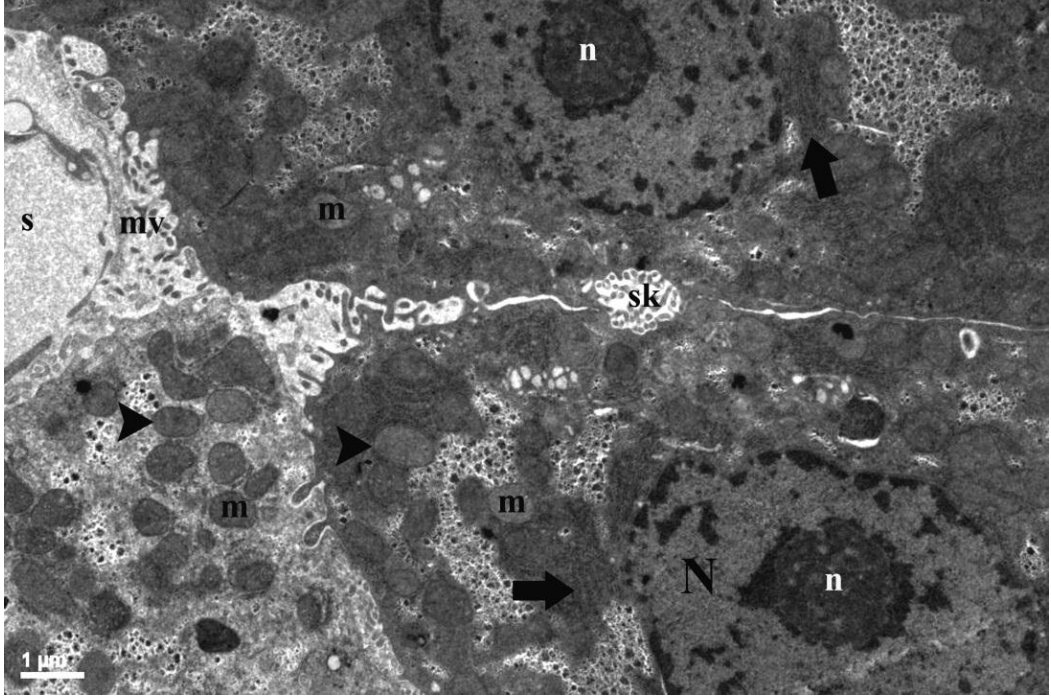


Resim 14. TUNEL yöntemiyle boyanmış DOX+MKH grubuna ait karaciğer kesitlerinin ışık mikroskopik görünümü (60x). **ok:** normal yapıdaki hepatositle, **ok başı:** apoptotik hepatositler.

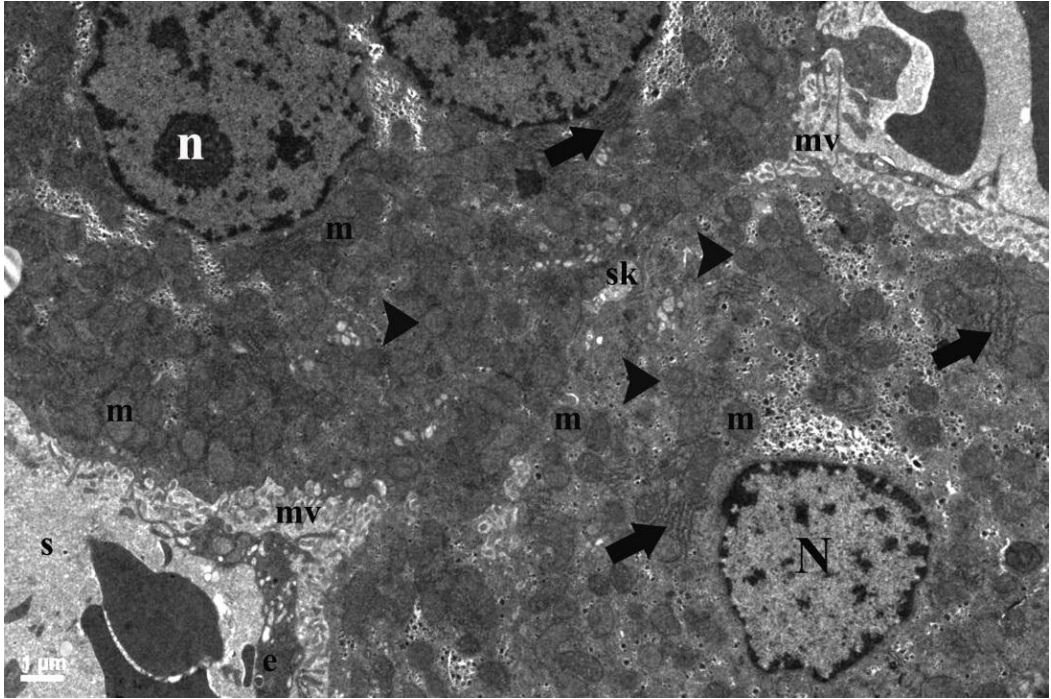
4.5. Elektron Mikroskopik İncelemelere Ait Bulgular

4.5.1. Kontrol Grubuna Ait Bulgular

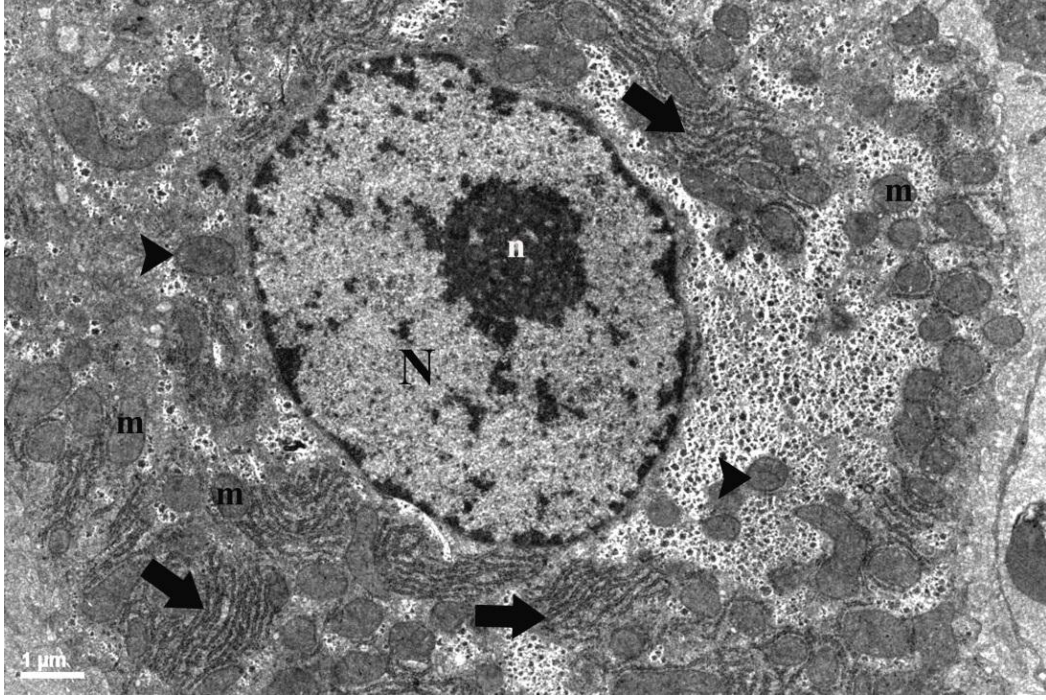
Kontrol grubu karaciğer dokusuna ait kesitler geçirimli elektron mikroskobu altında incelendiğinde normal hepatosit ince yapısına sahip hepatositler ve hepatositler arasında normal yapıda endotel hücresiyle döşeli sinüzoidler izlendi (Resim 15). Bu gruba ait hepatositler ince granüler ökromatin ile birlikte iç çekirdek zarına bağlanmış heterokromatin yapısından oluşmuş sağlam çekirdek zarıyla sarılı yuvarlak çekirdek yapısına sahiptiler (Resim15-17). Normal yapıdaki çekirdek ve çekirdekçik içeriğine sahip hepatositlerin sitoplazmalarında çift zar yapısına ve yoğun krista içeriğine sahip mitokondriyonlar ve yaygın olarak GER'lerin bulunduğu gözlemlendi (Resim 15-17). Bununla beraber hepatositlerin lateral yüzeylerinde düzgün sınırlı safra kanalikülleri ve apikal yüzeylerinde ise çok sayıda mikrovillusların bulunduğunu görüldü (Resim 15,16).



Resim 15. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusunun TEM görüntüsü. **e:** endotel, **m:** mitokondriyon, **mv:** mikrovullus, **N:** çekirdek, **n:**çekirdekçik **s:** sinüzoid, **ok başı:** normal krista yapısı içeren mitokondriyon, **ok:** GER.



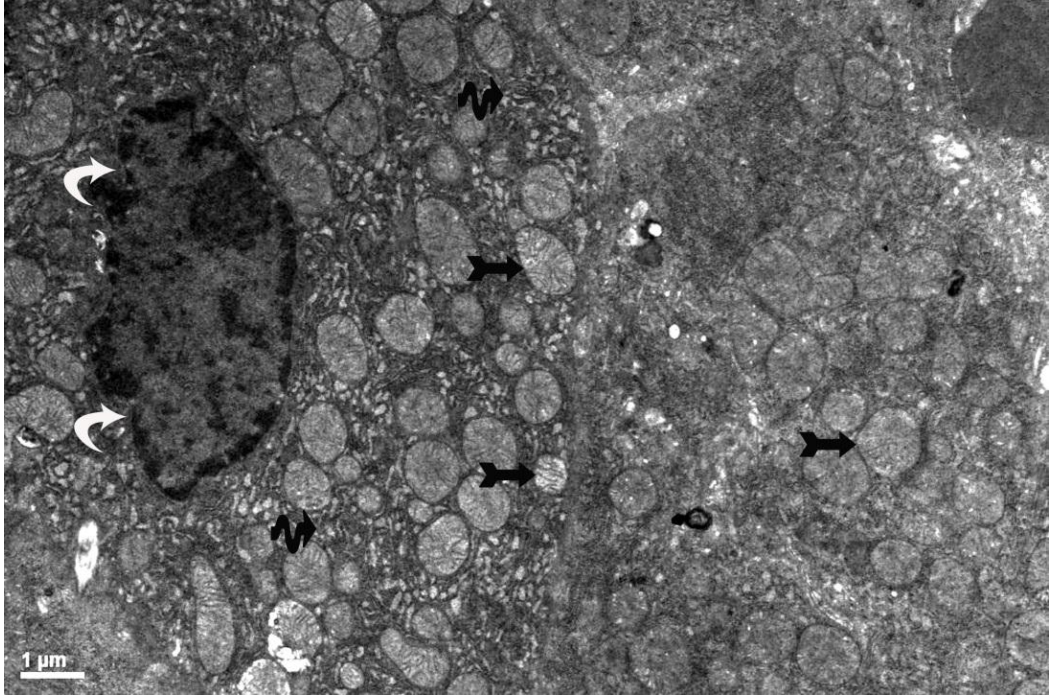
Resim 16. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusunun TEM görüntüsü. **e:** endotel, **m:** mitokondriyon, **mv:** mikrovullus, **N:** çekirdek, **ok başı:** normal krista yapısı içeren mitokondriyon, **ok:** GER.



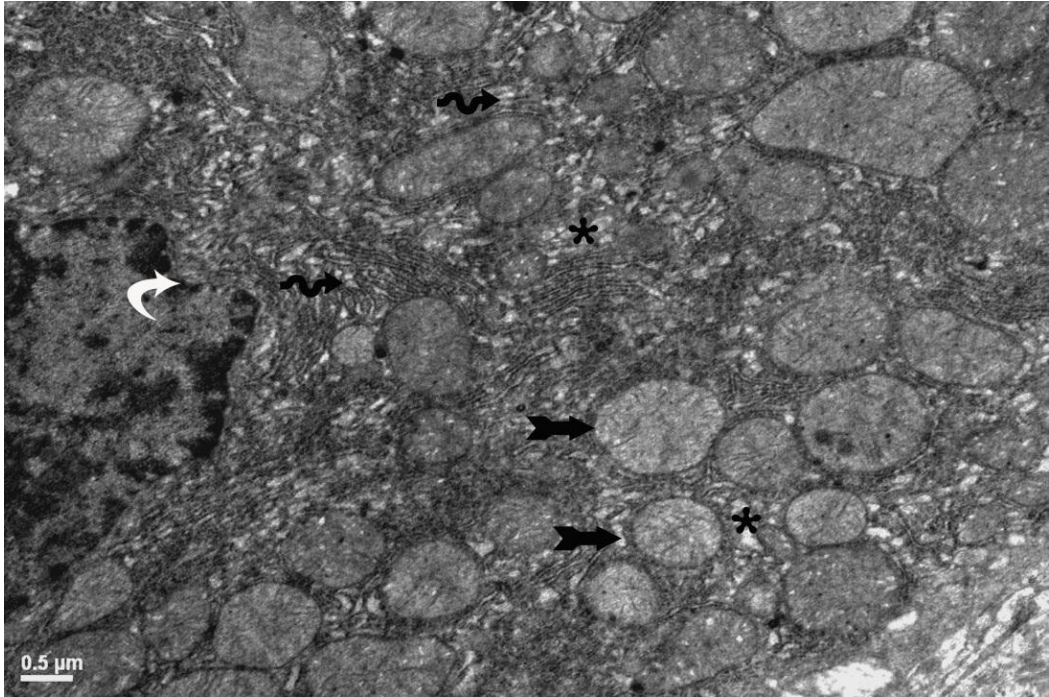
Resim 17. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusunun TEM görüntüsü. **m:** mitokondriyon, **N:** çekirdek, **n:** çekirdekçik, **ok başı:** mitokondriyon normal krista yapısı, **ok:** GER .

4.5.2. Doxorubisin Grubuna Ait Bulgular

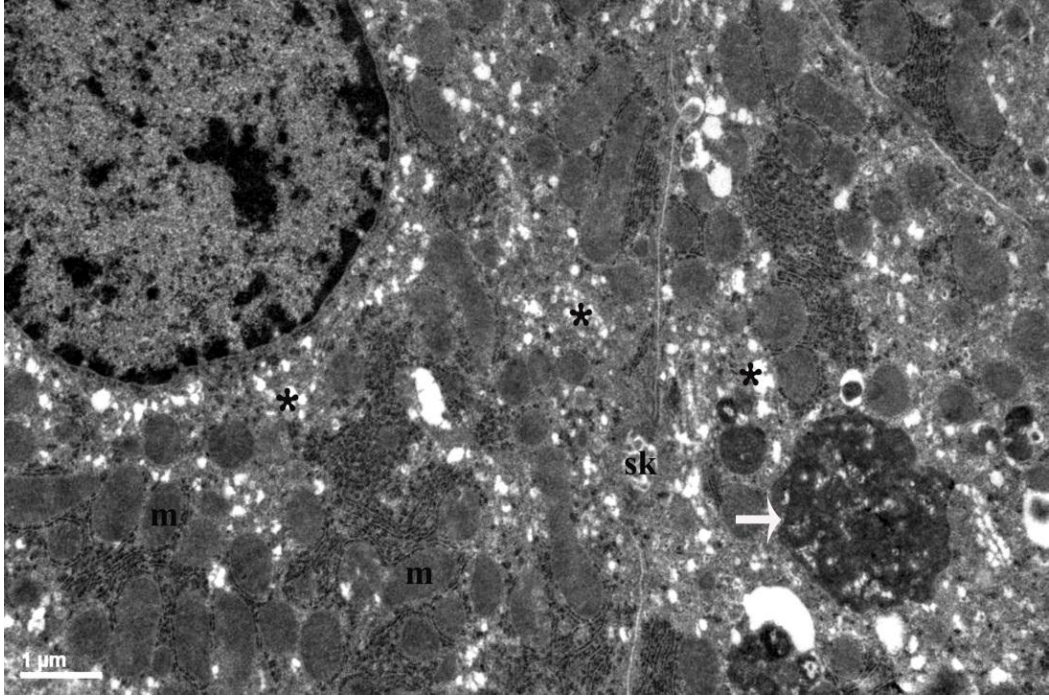
Doxorubisin uygulama grubuna ait karaciğer dokusunun ince yapısı geçirmeli elektron mikroskobu altında incelediğinde kontrol grubuna kıyasla DOX uygulamasına maruz kalan karaciğer dokularında hepatositlerin çekirdek ve sitoplazmasında ince yapı düzeyinde değişiklikler gözlemlendi. Hepatositlerin bir kısmında periferik heterokromatin yapısında artış meydana gelmiş girintiler içeren düzensiz çekirdek zarı yapısına sahip çekirdek yapısı izlendi (Resim 18,19). Bazı hepatositlerde elektron dens mikroveziküler cisimcikler gözlemlendi (Resim 20). Hepatosit sitoplazmalarında mitokondriyon yapılarında genişlemeler, şişmeler, mitokondriyal krista yapısında ve mitokondriyal matrikste bozulmalar izlendi. Bunlara ek olarak hepatosit sitoplazmalarında ER yapılarında düzensiz lamellar düzenlemeler ve yaygın dilatasyonlar izlendi. Hepatosit sitoplazmalarında yer alan organellerin DOX grubunda Kontrol grubuna kıyasla yığılmış şekilde düzenlendiği gözlemlendi (Resim 18,19). Ayrıca bazı hepatositlerde sitoplazma içerisinde litik alanlar şeklinde vakuolizasyon görüldü (Resim 20). DOX grubuna ait hepatositlerin sitoplazmasında özellikle GER miktarı azalırken DER miktarında artış izlendi (Resim 18,19).



Resim 18. Doxorubisin grubuna ait karaciğer dokusunun TEM görüntüsü. **kuyruklu ok:** Krista yapısı bozulmuş mitokodriyon, **spiral ok:** ER diltasyonları, **Beyaz ok:** Girintili çekirdek zarı.



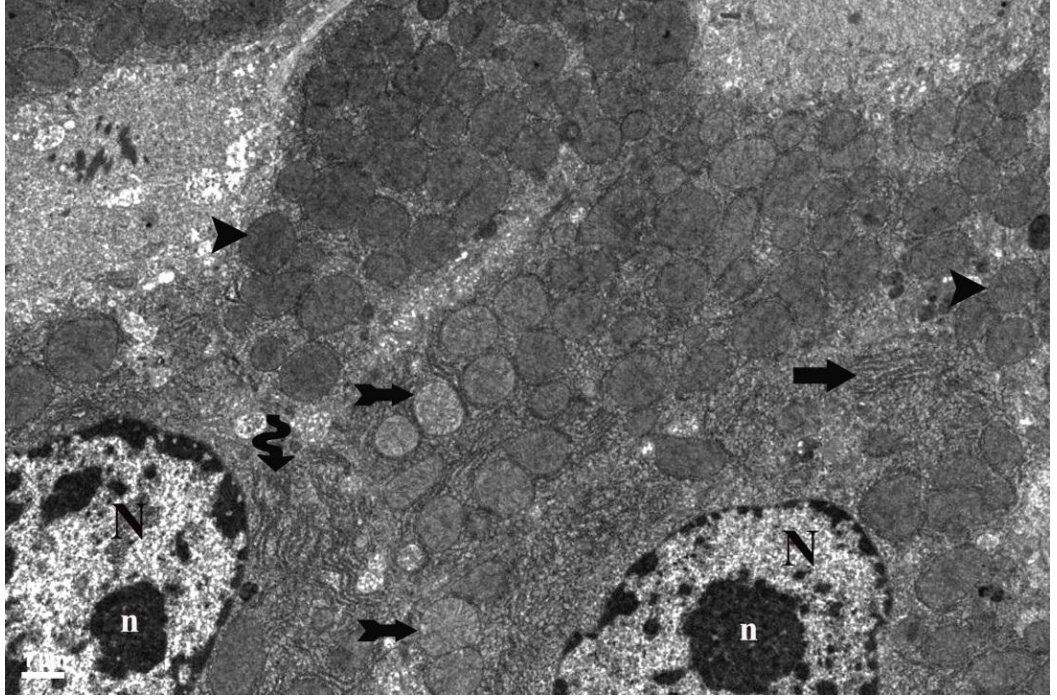
Resim 19. Doxorubisin grubuna ait karaciğer dokusunun TEM görüntüsü. **kuyruklu ok:** Krista yapısı bozulmuş mitokodriyon, **spiral ok:** ER diltasyonları, **beyaz kıvrımlı ok:** Girintili çekirdek zarı, **yıldız:** sitoplazmik vakuolizasyon.



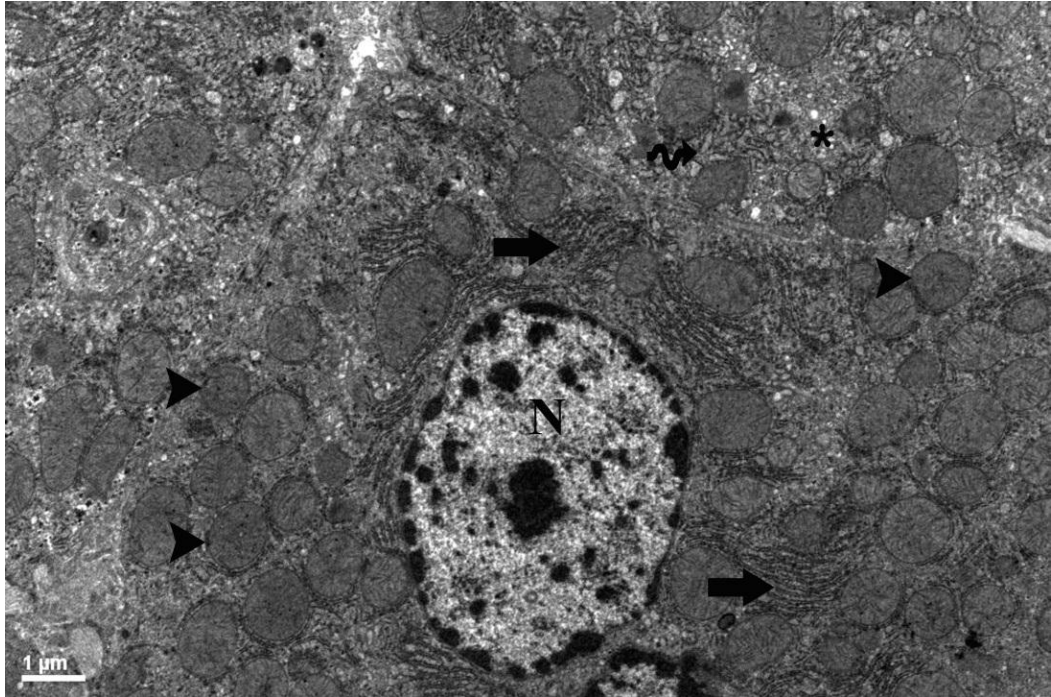
Resim 20. Doxorubisin grubuna ait karaciğer dokusunun TEM görüntüsü. **m:** mitokondriyon, **Beyaz ok:** elektron dens mikroveziküler cisimcik, **yıldız:** sitoplazmik vakuolizasyon, **sk:** safra kanalikülü.

4.5.3. Mezenkimal Hücre Tedavi Grubuna ait Bulgular

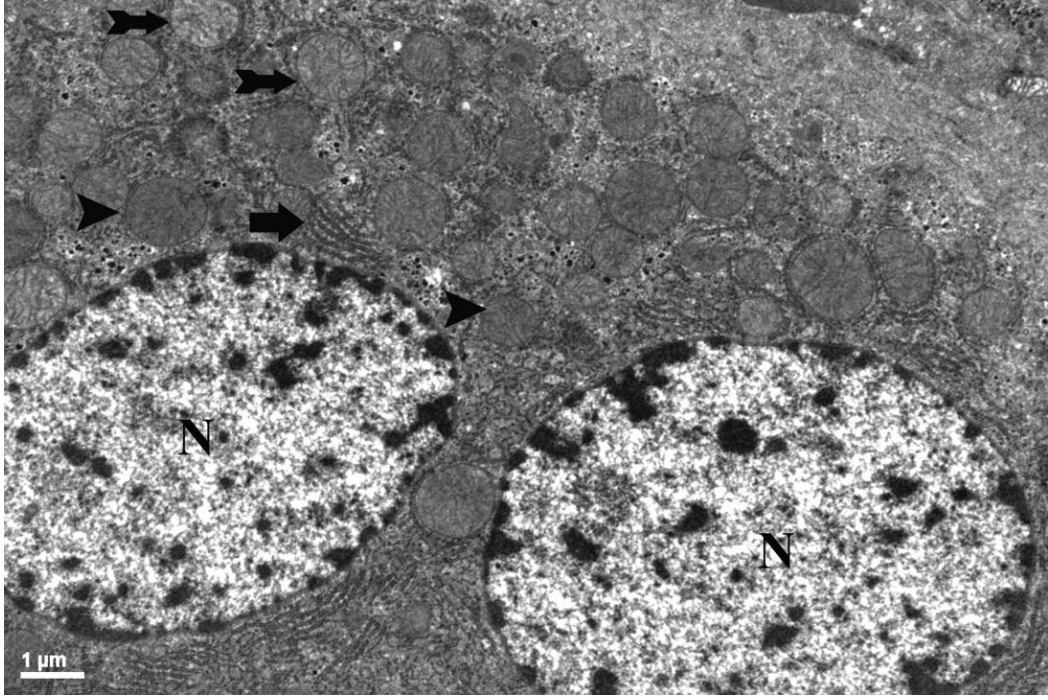
Doxorubisin uygulaması sonrası mezenkimal kök hücre verilen gruba ait karaciğer dokusunun ince yapısı geçirmeli elektron mikroskobu altında incelediğinde DOX grubuna kıyasla hepatositlerin çekirdek ve sitoplazmalarında yapısal iyileşmelerin olduğu gözlemlendi. Buna göre normal çekirdek ve çekirdekçik içeriğine sahip hepatositler çoğunlukta idi. DOX uygulanan grupta mitokondriyonlarda gözlenen genişlemeler, şişmeler, krista yapısında ve matriksteki bozulmaları içeren hepatositlerin sayısında azalma izlendi. Ayrıca DOX uygulanan grupta ER yapılarında gözlenen dilatasyonlar ve düzensiz lamellar görüntülerde azalmalar görüldü. Hepatositlerin sitoplazmalarında sitoplazmik vakuolizasyonda da azalma vardı (Resim 21-23).



Resim 21. DOX+MKH grubuna ait karaciğer dokusunun TEM görüntüsü. **kuyruklu ok:** krista yapısı bozulmuş mitokondriyon, **spiral ok:** ER dilatasyonları, **yıldız:** sitoplazmik vakuolizasyon, **ok:** ER, **ok başı:** normal krista yapısı içeren mitokondriyon, **n:** çekirdekçik .



Resim 22. DOX+MKH grubuna ait karaciğer dokusunun TEM görüntüsü. **kuyruklu ok:** krista yapısı bozulmuş mitokondriyon, **spiral ok:** ER dilatasyonları, **ok:** ER, **ok başı:** normal krista yapısı içeren mitokondriyon, **N:** çekirdek, **yıldız:** sitoplazmik vakuolizasyon.



Resim 23. DOX+MKH grubuna ait karaciğer dokusunun TEM görüntüsü. **kuyruklu ok:** krista yapısı bozulmuş mitokondriyon, **ok:** ER, **ok başı:** normal krista yapısı içeren mitokondriyon, **N:** çekirdek.

4.6. Serum Örneklerinin Biyokimyasal Analizi

Tablo 13'te görüldüğü gibi Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında DOX grubuna ait sıçanların serum örneklerinde ALT ve AST seviyelerinde artış meydana geldi ($p < 0.05$). Dox grubuyla karşılaştırıldığında DOX+MKH grubunda MKH uygulamasının ALT ve AST seviyelerinde azalmaya sebep olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$).

Tablo 13. Serum örneklerinde ALT ve AST analizi

Gruplar	ALT (IU/L)	AST (IU/L)
Kontrol	44.50 (17.00-56.00)	105.50 (34.00-142.00)
DOX	69.00 (51.00-96.00) ^a	175.50 (89.00-278.00) ^c
DOX+MKH	31.00 (20.00-46.00) ^b	95.00 (48.00-132.00) ^d

^a**p=0.001; Kontrol grubuna kıyasla,**

^b**p=0.001; DOX grubuna kıyasla,**

^c**p=0.040; Kontrol grubuna kıyasla,**

^d**p=0.035; DOX grubuna kıyasla**

Mann Whitney U Testi

Medyan (25-75)

4.7. Karaciğer Dokusu Antioksidan Parametrelerinin Ölçümü

DOX grubuyla karşılaştırıldığında MDA değerleri kontrol grubunda ve DOX+MKH grubunda anlamlı derecede azaldı ($p<0.05$).

Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında DOX grubunda SOD aktivitesinde anlamlı derecede azalma gözlemlendi ($p<0.05$).

DOX grubuyla karşılaştırıldığında kontrol grubunda ve DOX +MKH grubunda CAT aktivitesinde anlamlı derecede artış gözlemlendi ($p<0.05$).

DOX grubuyla karşılaştırıldığında kontrol grubunda ve DOX +MKH grubunda GSH aktivitesinde anlamlı derecede artış gözlemlendi ($p<0.05$) (Tablo 14).

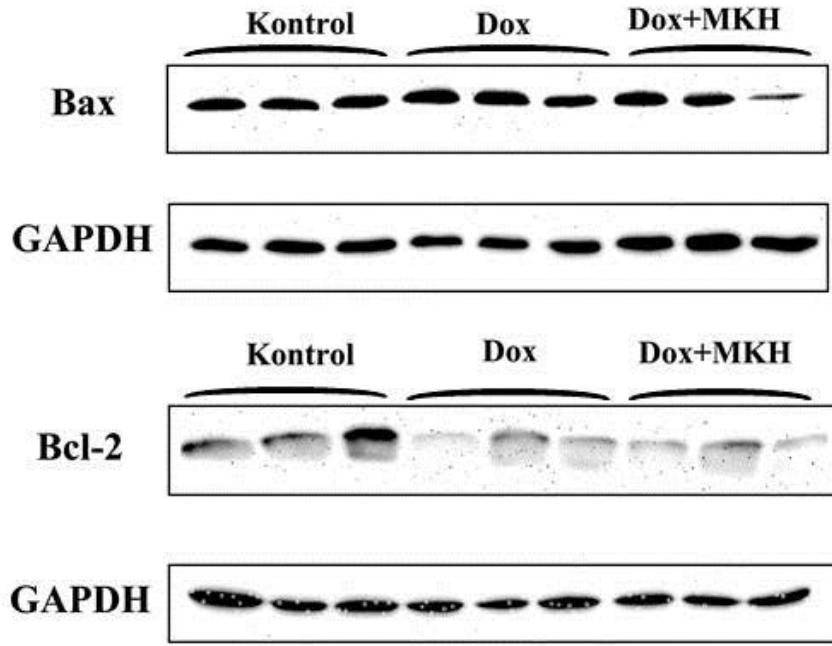
Tablo 14. Karaciğer Dokularında MDA ,SOD, CAT, GSH parametrelerinin analizi

Gruplar	Parametreler			
	MDA	SOD	CAT	GSH
	nmol/mg	U/mg	k/mg	mg/kg
Kontrol	25.48 (21.06-30.69)	4.01 (3.84-4.83)	15.80 (11.63-29.27)	46.25 (31.75-57.92)
DOX	31.92 (22.64-41.66) ^a	3.68 (2.95-4.12) ^c	10.68 (7.96-15.19) ^d	30.51 (22.11-38.38) ^f
DOX+MKH	26.19 (20.06-27.06) ^b	4.14 (3.44-4.33)	18.90 (13.70-23.26) ^e	39.35 (31.24-46.01) ^g

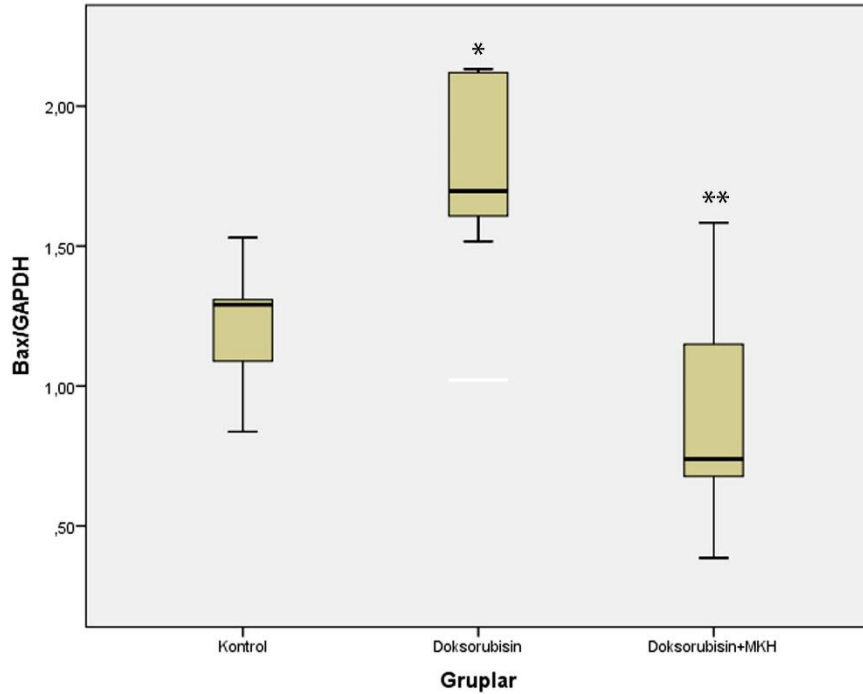
^a**p=0.005; Kontrol grubuna kıyasla**
^b**p=0.015; Dox grubuna kıyasla**
^c**p=0.021; Kontrol grubuna kıyasla**
^d**p=0.015; Kontrol grubuna kıyasla**
^e**p=0.016; Dox grubuna kıyasla**
^f**p=0.002; Kontrol grubuna kıyasla**
^g**p=0.040; Dox grubuna kıyasla**
MannWhitney U Testi

4.8. Western Blot Analizi

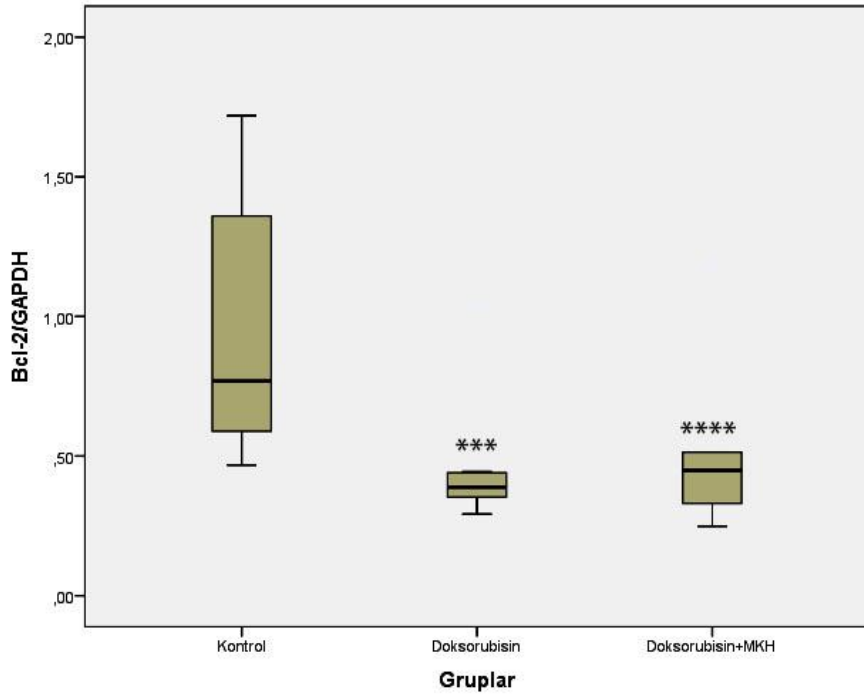
Doxorubisin uygulaması sonrası kemik iliği kaynaklı MKH transplantasyonunun apoptozisin intrinsik yolağı üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla karaciğer dokularında Bax ve Bcl-2 proteinlerinin ekspresyonları Western blot yöntemiyle belirlendi. Western blot bant görüntüleri Şekil 14 'te gösterildi. Deney gruplarındaki tüm sıçanların karaciğer dokularında Bax ve Bcl-2 Western blot bant görüntülerinin Image J programında yoğunluklarının hesaplanması sonucu Bax/GAPDH oranı, Bcl-2/GAPDH oranı ve Bax/Bcl2 oranları Şekil 15-17'de verildi. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında DOX grubunda Bax ekspresyonu artarken, Bcl-2 ekspresyonunda azalma izlendi. DOX grubuyla karşılaştırıldığında DOX+MKH grubunda Bax ekspresyonu azalırken, Bcl-2 ekspresyonunda fark gözlenmedi. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında DOX grubunda Bax/Bcl-2 oranında artış izlenirken MKH uygulamasının Bax/Bcl2 oranını düşürdüğü izlendi.



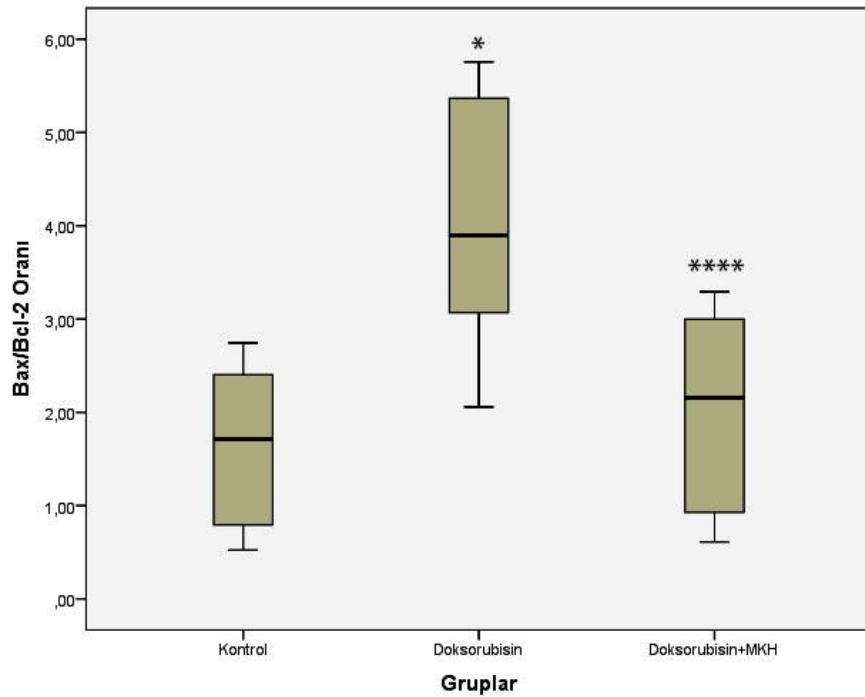
Şekil 14: Karaciğer dokularında Bax ve Bcl-2 protein ekspresyonlarının Western blot analizi sonrası jel görüntüleri.



Şekil 15: Deney gruplarına ait Bax/GAPDH oranlarının densitometrik analizi *: Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p=0.017$, **: DOX grubuyla karşılaştırıldığında $p=0.008$.



Şekil 16: Deney gruplarına ait Bcl-2/GAPDH oranlarının densitometrik analizi ***: Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p= 0.007$, ****: Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p= 0.035$.



Şekil 17: Deney gruplarına ait Bax/Bcl-2 oranlarının densitometrik analizi *: Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p= 0.017$, ****: DOX grubuyla karşılaştırıldığında $p= 0.035$.

5. TARTIŞMA

En güçlü kemoterapik ajanlardan biri kabul edilen DOX, çeşitli kanser türlerinin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Hortobagyi, 1997; Bonadonna ve ark, 1998; Minotti ve ark, 2004; Hong ve ark, 2016; Damiani ve ark, 2017; Li ve ark, 2018). Ancak dokularda oluşturduğu toksisiteden dolayı tedavi edici etkileri kısıtlanmaktadır (Dubbelboer ve ark, 2014; Wang ve ark, 2015; Pugazhendhi ve ark, 2018). Tedavi sırasında uygulanan DOX sistematik olarak dokulara dağılır ve değişen kapasitelerde dokularda birikir. Karaciğer dokusu, DOX'u bünyesine alarak biriktirebilme ve metabolize edebilme özelliğine sahiptir (Santos ve ark, 2002; Lal ve ark, 2010). Ancak karaciğer dokusu, DOX'un yüksek konsantrasyonlarına maruz kaldığında durumu tolere edemeyerek toksisite oluşumuyla ciddi oranda hasar görmektedir (Santos ve ark, 2002; Kalender ve ark, 2005; Meredith ve Dass, 2016). Hepatotoksisite antikanser ilaçlarının en sık yan etkilerinden biri olarak bilinmektedir ve yapılan çalışmalarda DOX uygulanan hastaların %40'ında karaciğer hasarı meydana geldiği bildirilmiştir (King ve Perry, 2001; Tacar ve ark, 2013; Wang ve ark, 2015).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar MKH'lerin rejenerasyon, immunmodulasyon, antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Bu özellikler çeşitli hastalıklarda MKH uygulamasının iyileştirici etkilere sahip olabileceğine dair görüşleri desteklemektedir (Nauta ve Fibbe, 2007; Prockop ve Oh, 2012; Murphy ve ark, 2013; Milosavljevic ve ark, 2017; Idriss ve ark, 2018; Mansour ve ark, 2019). Bu özelliklere ek olarak MKH uygulamasının endovasküler yolla karaciğere ulaşabildiği, MKH'lerin dokularda hasarlı bölgeye yönelebildiği, hepatositlere farklılaşabildiği ve sahip olduğu parakrin etkiler sayesinde çeşitli hastalık modellerinde onarım ve rejenerasyonu tetikleyebildiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Parekkadan ve ark, 2007; Crisostomo ve ark, 2008; Banas ve ark, 2009; Carvalho ve ark, 2009; Pan ve ark, 2011; Sun ve ark, 2014; Liu ve ark, 2015, Zhou ve ark, 2014). MKH'lerin sahip olduğu bu özellikler MKH uygulamalarının ilaç bağımlı toksisitelerin etkilerini azaltabileceğini düşündürmektedir.

Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda sıçanlarda DOX uygulamasıyla oluşturulmuş hepatotoksite üzerine kemik iliği kaynaklı MKH'lerin etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu bağlamda sıçanların vücut ağırlıkları ve rölatif karaciğer ağırlıkları ölçülmüş, karaciğer dokuları ışık mikroskobu ve elektron mikroskobu altında incelenmiştir.

Karaciğer dokularında antioksidan enzim aktiviteleri (SOD,CAT, GSH) ve MDA düzeyleri ile serum örneklerinde karaciğer fonksiyon testleri (ALT, AST) ölçülmüştür. TUNEL yöntemiyle apoptotik hücreler saptanarak Western blot yöntemiyle Bax ve Bcl-2 protein ekspresyonları araştırılmıştır.

DOX tedavisinde kemik iliği kaynaklı MKH'lerin etkisini araştırmak amacıyla uygulanan kök hücrelerin kemik iliği kaynaklı MKH'ler olduğunun doğrulanması çalışmanın en önemli noktalarından birini oluşturmaktadır. Bu amaçla CD29, CD45, CD11b ve CD90 yüzey belirteçleriyle yapılan akım sitometrik analiz sonucu izole edilen hücrelerin CD45 (% 2) ve CD11b'yi (% 9) çok düşük düzeyde eksprese ettiği, MKH stromal belirteçleri olan CD90 (% 81) ve CD29'u (% 92) ise yüksek düzeyde eksprese ettiği görülmüştür. Ayrıca *in vitro* ortamda hücrelerin sahip olduğu morfolojik özellikler de bu hücrelerin kemik iliği kaynaklı MKH olduğunu doğrulamaktadır. Çalışmamızla uyumlu olarak önceki çalışmalarda da CD11b ve CD45'in negatif CD29 ve CD90'ı pozitif eksprese eden hücrelerin kemik iliği kaynaklı MKH'ler olduğu doğrulanmıştır (Majumdar ve ark, 1998; Pittenger ve ark, 1999; Hung ve ark, 2002; Dominici ve ark, 2006; Sun ve ark, 2014; Ammar ve ark, 2015; Cai ve ark, 2015; Hadwa ve ark, 2017; Fitzsimmons ve ark, 2018).

DOX'a bağlı hepatotoksite oluşumunda uygulama dozu ve süresi değişkenlik göstermektedir (Henninger ve ark, 2012; Wang ve ark, 2015; Barakat ve ark, 2018). Ancak çalışmamızda kullandığımız doz (20 mg/kg) DOX'a bağlı toksisite çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır ve yapılan çalışmalar bu dozun akut hepatotoksisite oluşumunu tetiklediğini kanıtlamıştır (Gokcimen ve ark, 2007; Wang ve ark, 2014; Nagai ve ark, 2015; Hinkley ve ark, 2019). Bu veriler doğrultusunda sıçanlara tek doz 20 mg/kg DOX intraperitoneal olarak uygulanarak sıçanlarda DOX'a bağlı hepatotoksisite oluşumunun tetiklenmesi amaçlanmıştır. Kemik iliği kaynaklı MKH olduğu doğrulanan hücreler (2×10^6 /1 ml) DOX uygulaması sonrası literatüre uygun şekilde kuyruk veninden sıçanlara verilmiştir (Ammar ve ark, 2015; Hadwa ve ark, 2017).

Sıçanların kemik iliğinden izole edilip *in vitro* ortamda çoğaltılan hücrelerin kemik iliği kaynaklı MKH'ler olduğu doğrulandıktan sonra kuyruk veninden verilen kök hücrelerin karaciğer dokusuna gidip gitmediğinin belirlenmesi çalışmanın bir diğer önemli noktasını oluşturmaktaydı. Bu amaçla çeşitli araştırmacıların da kemik iliği kaynaklı MKH'lerin dokudaki varlığının gösterilmesinde kullandığı kırmızı floresan protein (PKH 26) ile işaretleme yöntemi kullanıldı (Yang ve ark, 2008; Anan ve ark, 2016). Sıçanlara verilmeden önce kırmızı floresan protein ile işaretlenen hücreler, immunfloresan mikroskopta

görüntülendi. Bu yöntemle kuyruk veninden uygulanan kök hücrelerin karaciğer dokusuna ulaştığı doğrulandı.

Sıçanların ilk ağırlıkları ve son ağırlıklarından ölçülmesiyle elde edilen verilerin istatistiksel analizi sonucu Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında DOX grubu ve DOX+MKH gruplarında son vücut ağırlıklarında ve vücut ağırlıklarının değişiminin yüzdesinde azalma gözlemlendi. DOX uygulamasının vücut ağırlığında düşüşe sebep olduğu hem klinik hem de hayvan çalışmalarında tespit edilmiştir. (Rephaeli ve ark, 2007, Tozer ve ark, 2008, Ferreira ve ark, 2008; Roomi ve ark, 2014; Jacevic ve ark, 2017). Ferreira ve ark (2008) yaptıkları çalışmada DOX uygulanan grupta besin ve su tüketiminde de azalma meydana geldiğini gözlemlemiştir (Ferreira ve ark, 2008). Bu veriler vücut ağırlıklarındaki düşüşün DOX uygulaması sonrası besin ve su tüketimindeki azalmaya bağlı oluşmuş olabileceğini düşündürmektedir.

Sıçanların son ağırlık ve karaciğer ağırlıklarının kullanılmasıyla hesaplanan rölatif karaciğer ağırlıkları arasında anlamlı fark görülmemiştir. Çalışmamızdan farklı olarak DOX maruziyetinin daha uzun süre uygulandığı çalışmalarda karaciğer ve rölatif karaciğer ağırlıklarında düşüş izlenmiştir (Jalali ve Hasanzadeh, 2013; Jacevic ve ark, 2017). Roomi ve ark (2014) yaptıkları çalışmada karaciğer ağırlıklarında fark gözlemlememişlerdir (Roomi ve ark, 2014). Dolayısıyla çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar literatürde yer alan çalışmalarla uyum içerisindedir. Literatürde yer alan diğer çalışmalarda DOX uygulanan gruplarda karaciğer ağırlıklarında gözlenen düşüşün DOX uygulama süresindeki farklılıktan kaynaklanıyor olabileceğini düşünmekteyiz.

Sıçanlardan alınan karaciğer doku örneklerinden elde edilen kesitlerin H-E boyamalarının ışık mikroskopunda incelenmesi sonucu Kontrol grubu normal histolojik yapıya sahip iken DOX grubunda karaciğer parankim yapısında bozulmalar izlendi. Dox uygulanan gruptaki hepatositlerde sitoplazmik vakuolizasyonlar, nekrozis, sinüoidal dilatasyonlar, mononükleer hücre infiltrasyonlarını içeren yapısal değişiklikler gözlemlendi.

Deepa ve ark (2003; 2014) DOX toksisitesi ile ilgili yaptıkları çalışmalarda DOX uygulanan grupta hepatik dokuda interselüler dejenerasyonlar ve ödematöz karaciğer doku hasarı tespit etmişlerdir. Hemen hemen tüm hepatositlerin intrastoplazmik vakuoller ve genişlemelere ek hiperkromatik çekirdek içerdiği gözlenmiştir (Deepa ve Varalakshimi, 2003; Deepa ve ark, 2014).

Gokcimen ve ark (2007) 20 mg/kg DOX uygulaması sonrası 10. günde karaciğer dokularında hepatositlerde dejenerasyonlar, sinüzoidal dilatasyonlar ve periportal alanda mononükleer hücre infiltrasyonları izlemişlerdir (Gokcimen ve ark, 2007).

Jacevic ve ark (2017) 10 mg/kg DOX uygulaması sonrası 14. günde karaciğer dokularını ışık mikroskopunda incelediklerinde DOX uygulanan grupta karaciğer parankim yapısında kayıplar, intrastoplazmik vakuoller, sinüzoidlerde ödem ve hiperemi, fokal hemoraji, sinüzoidal boşluklarda hipertrofik kupffer hücreleri, kan damarlarında dilatasyonlar ve polimorfonükleer hücre infiltrasyonları gözlemişlerdir (Jacevic ve ark, 2017).

Mansouri ve ark (2017) 15mg/kg DOX uygulamasının ardından 10. günde karaciğer dokularında yaptıkları ışık mikroskopik incelemelerde hepatik kordon yapılarında bozulmalar, sinüzoidal genişlemeler, hepatositlerde vakuolizasyonlar ve çekirdekte yoğunlaşmalar izlemişlerdir (Mansouri ve ark, 2017).

Barakat ve ark (2018) 6 mg/kg DOX'u haftada 1 kez olmak üzere 3 hafta boyunca farelere vererek 3. haftanın sonunda karaciğer dokularını ışık mikroskopu altında incelediklerinde nekrozis, lenfositik infiltrasyon, nükleer piknozis, vakuolar dejenerasyonlar ve kan damarlarında konjesyon bulgularını rapor etmişlerdir (Barakat ve ark, 2018).

Bilgiç ve Ozgocmen (2019) tek doz 20 mg/kg DOX uygulaması sonrası 6. günde karaciğer dokularında granüler ve vakuolar dejenerasyonlar, hemorajik alanlar, makroveziküler ve mikroveziküler steatozis, parankimal mononükleer hücre infiltrasyonları, hepatositlerde piknotik nükleus, sinüzoidlerde dilatasyon ve vasküler konjesyon ve dilatasyon gözlemişlerdir (Bilgiç ve Ozgocmen, 2019).

Yapılan çalışmalar arasında farklı doz ve farklı sürelerde DOX uygulamasından kaynaklı farklılıklar bulunmasına rağmen ışık mikroskopik incelemeler sonucu elde ettiğimiz bulguların literatürde DOX'a bağlı hepatotoksisite çalışmalarındaki bulgular ile uyumlu olduğu ve genel olarak DOX uygulamasının karaciğer parankim yapısında bozulmalara yol açtığı görülmektedir.

MKH'ler özellikle sahip oldukları farklılaşma yetenekleri ve parakrin etkiler sayesinde hem hayvan çalışmalarında hem de klinik uygulamalarda karaciğer hastalıklarının tedavisinde iyileşme sürecini tetikleyebilmektedir (Banas ve ark, 2009; Parekkadan ve ark, 2007).

Kanazawa ve ark (2011) sıçanlarda oluşturdukları hepatik iskemi reperfüzyon modelinde kemik iliği kaynaklı MKH uygulamasının karaciğerde konjesyon, vakuolizasyon ve nekrozisde azalmaya sebep olarak karaciğer rejenerasyonunu tetiklediğini göstermişlerdir (Kanazawa ve ark, 2011)

Cai ve ark (2015) akut karaciğer hasarından sonra MKH uygulamasının 24.saat, 72. saat ve 120. saatteki karaciğer yapısına etkisini incelemiştir. Özellikle 72. saat ve 120. saatte histolojik yapıda iyileşmeler gözlemlemiştir (Cai ve ark, 2015).

Gad ve ark (2017) metotreksat ile oluşturdukları hepatotoksisite modelinde kemik iliği kaynaklı MKH'lerin karaciğer dokusunda toksisiteye bağlı gelişen hepatik sinüzoidal dilatasyonlar ve hepatosit nekrozisi içeren yapısal bozulmaları onardığı ve karaciğer dokusunda iyileşmelere sebep olduğunu izlemiştir (Gad ve ark, 2017).

Bizim çalışmamızda da MKH uygulamasının vakuolizasyon içeren hepatositlerde ve sinüzoidal dilatasyonlarda azalmalara ve hepatik kordon yapılarında düzelmeleri tetikleyerek DOX toksisitesine bağlı oluşan yapısal hasarı iyileştirici etkiye sahip olduğu gözlenmiştir.

Çalışmamızda hesaplanan hepatik hasar skoru (HDS) ile yapısal değişiklikler nicel verilere dönüştürüldüğünde DOX grubu [HDS: 2.00(1.00-4.00)] ile Kontrol grubu [HDS :0.00 (0.00-1.00)] arasında anlamlı bulundu ve DOX grubunda HDS'nin daha yüksek olduğu saptandı. Bu veriler uygulanan süre ve dozun DOX'a bağlı hepatotoksisite oluşumuna sebep olduğunu yapısal olarak doğrulamaktadır. MKH uygulanan grupta karaciğer parankim yapısında gözlenen iyileşmeler ve MKH grubunda DOX grubuna kıyasla HDS'de [2.00 (1.00-3.00)] gözlenen azalma MKH uygulamasının DOX ilişkili hepatotoksisiteyi yapısal olarak iyileştirebilecek özelliğe sahip olabileceğini işaret etmektedir.

Çalışmamızda ayrıca karaciğer dokularında yapılan geçirimli elektron mikroskopik incelemeler karaciğer parankim yapısındaki değişikliklerin ve hücresel yapıların ince yapı düzeyinde ayrıntılı bir şekilde izlenmesini sağladı. Kontrol grubunda normal yapıda çekirdek ve sitoplazma içeriğine sahip hepatositleri içeren karaciğer parankim yapısı gözlemlendi. DOX uygulanan grupta hepatosit sitoplazmasında vakuolizasyonlar, ER'lerde dilatasyonlar ve mitokondriyonlarda yapısal bozulmalar gözlemlendi. Hepatositlerin çekirdeklerinde, mitokondriyonlarında, ER yapılarında ve sitoplazma içeriklerinde DOX toksisitesine bağlı yapısal değişikliklerin varlığı ince yapı düzeyinde görüntülendi.

Mitokondriyonlar, hücresel stres ve hasar şartlarında hücrelerin ölüm ya da hayatta kalmasını düzenleyici role sahiptirler ve bu özelliklerinden dolayı ilaç toksisitesinde oldukça önemlidirler. DOX, plazma dışında çekirdek ve mitokondriyonlarda da birikme eğilimindedir ve bu birikim DOX toksisitesinin oluşumunda önemli role sahiptir. Yapılan çalışmalarda DOX uygulamasının mitokondriyonlarda yapısal hasara ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna sebep olabileceği görülmektedir (Tokarska-Schlattner ve ark, 2006; Lal ve ark, 2010; Bartlett ve ark, 2017, Guven ve ark, 2018).

Bu bağlamda çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular DOX uygulamasının mitokondriyonlarda krista yapılarında gözlenen kayıpları içeren morfolojik bozulmaların DOX toksisitesiyle ilişkili olduğu çeşitli çalışmalarla uyum içerisindedir (Kalender ve ark, 2005; Oktem ve ark, 2012; Hinkley ve ark, 2019). DOX maruziyeti sonucunda mitokondriyonlarda elektronik taşıma zincirinde (ETC) meydana gelen bozulmalar mitokondriyal matrikste oksidan üretimini kuvvetlendirebilir (Arola ve ark, 2000, Kavazis ve ark, 2017). Artan ROS artışı mitokondriyal zarın stabilitesi ve geçirgenliğinde değişikliklere ve yapısal hasarın tetiklenmesine yol açabilmektedir (Buko ve ark, 1998; Lenaz ve ark, 2001; Santos ve ark, 2002; Kavazis ve ark, 2017).

DOX uygulaması mitokondriyonlara ek olarak ER yapılarında da morfolojik değişikliklere sebep olabilmektedir. ER diğer organellerle birlikte karbonhidrat metabolizması, biyotransformasyon, steroid metabolizması ve protein sentezini içeren önemli süreçlerde yer almaktadır (Csala ve ark, 2006). GER protein sentezi sürecinde görevli iken, DER karaciğerde glikojen sentezi ve ilaçların detoksifikasyonunun gerçekleştiği yerdir. Çalışmamızda DOX uygulanan grupta bazı hepatositlerde DER yapılarında artış ve ER yapılarında dilatasyonlar gözlenmiştir. ER'lerde gözlenen genişlemeler ciddi hasarlı hepatositlerin belirteci kabul edilmektedir (Gartner ve ark, 2001; Kalender ve ark, 2005; Fofelle ve Fromenty, 2016). Çalışmamızda DOX uygulanan grupta DER sayılarında ve ER dilatasyonlarında gözlenen artış DOX'un karaciğerin detoksifikasyon yeteneğinde azalmaya sebep olarak hepatotoksisiteyi tetiklediğinin göstermektedir. Hücrelerde toksik durum sonlandığında ya da toksisiteye cevap verildiğinde dilatasyonlar kaybolarak ER yapıları normal morfolojilerine geri dönebilir (Kumar ve ark, 2005). Çalışmamızda MKH uygulanan grupta genişlemiş ER yapılarında yaygın dilatasyonlara rastanılmamıştır. Bu durum MKH uygulamasının karaciğerin detoksifikasyon yeteneğini artırarak DOX kaynaklı hepatotoksisiteye etki edebileceğini işaret etmektedir.

Mitokondriyon ve ER değişimlerine ek olarak DOX uygulanan grupta çekirdekte gözlenen perifereal heterokromatin artışı ve girintili zar yapısı DOX'un hücresel yapıdaki etkilerini göstermektedir. MKH uygulanan grupta ise normal kromatin dağılımına sahip hepatositler ve normal görünümde çekirdek zarı izlendi. Elektron mikroskopik incelemeler ışık mikroskopunda hepatositlerde gözlenen litik alanların, vakuolizasyonun ve nekrozisin ayrıntılı bir şekilde görülmesini sağladı.

Sıçanlardan alınan serum örneklerinde ALT ve AST ölçümleri yapıldı. ALT ve AST ölçümlerinin istatistiksel analizi sonucu Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında DOX grubunda literatürle tutarlı olarak ALT ve AST seviyelerinde yükselme gözlemlendi (Roomi ve

ark, 2014; Nagai ve ark, 2015; Wang ve ark, 2015; Barakat ve ark, 2018; Kabel ve ark, 2018). ALT ve AST gibi transaminazların miktarı çalışmalarda karaciğer fonksiyonunun göstergesi olarak kullanılmaktadır. Karaciğer hücreleri inflamasyon, nekroz ya da toksik durumlardan dolayı zarar gördüğünde ALT ve AST kan dolaşımına salındığından bu enzim aktivitelerinde artış meydana gelmektedir ve kandaki miktarları doku hasarının derecesiyle doğrudan ilişkilidir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında DOX grubundaki ALT ve AST seviyelerindeki artış DOX'un karaciğer dokusunda oluşturduğu toksisitenin biyokimyasal göstergesidir. DOX grubuyla karşılaştırıldığında DOX+MKH grubunda ALT ve AST seviyelerinde azalma gözlemlendi. Literatürde yer alan çalışmalarda da farklı etkenlerle oluşturulan karaciğer hasarı sonrası benzer şekilde MKH uygulamasının ALT ve AST enzim aktivitelerinde düşüşe sebep olduğu gösterilmiştir (Jin ve ark, 2013; Salamone ve ark, 2013; Yuan ve ark, 2014; Cai ve ark, 2015; Zheng ve ark, 2015, Wang ve ark, 2016). DOX+MKH grubunda ALT ve AST aktivitelerinde gözlenen bu düşüş MKH uygulamasının ALT ve AST aktivitesini düzenleyerek karaciğer hasarını iyileştirici etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir.

DOX toksisitesine ilişkin yapılan çalışmalar DOX uygulamasının ROS'ların üretiminde artışa sebep olarak lipid peroksidasyonunu tetiklediğini göstermektedir (Ozben, 2007; Chatterjee ve ark, 2010; Uygur ve ark, 2014). Bu bilgi doğrultusunda karaciğer dokularında lipid peroksidasyonun belirlenmesi amacıyla yapılan MDA ölçümlerinde Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında DOX grubunda MDA aktivitesinde artış gözlemlendi. Literatürle uyumlu olarak DOX grubunda MDA aktivitesinde gözlenen artış DOX uygulamasıyla oluşan akut uyarı sonucu serbest radikal üretiminin lipid peroksidasyonunu tetiklediğinin göstergesi olarak kabul edilmektedir (Kalender ve ark, 2005; Ozben, 2007; Chatterjee ve ark, 2010; Wang ve ark, 2014; Wang ve ark, 2015; Jacevic ve ark, 2017; Mansouri ve ark, 2017; Barakat ve ark, 2018). DOX grubuyla karşılaştırıldığında DOX+MKH grubunda MDA aktivitesinde ise düşüş tespit edilmişti. Çeşitli araştırmacılar da oluşturdukları karaciğer hasar modellerinde MKH uygulamasının MDA aktivitesini düşürdüğünü göstermişlerdir (Jin ve ark, 2013; Ayatollahi ve ark, 2014). DOX+MKH grubunda MDA aktivitesinde gözlenen düşüş MKH uygulamasının lipid peroksidasyonunu iyileştirici etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir.

DOX toksisitesinin temel mekanizması olarak kabul edilen ROS artışına bağlı lipid peroksidasyonu durumunda DOX toksisitesinin oksidan/antioksidan dengesinde değişikliklere sebep olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Deepa ve Varalakshimi, 2003; Wang ve ark, 2014; Wang ve ark, 2015; Kabel ve ark, 2018). Çalışmamızda DOX

uygulanan grupta Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında SOD, CAT ve GSH aktivitesinde düşüş gözlemlendi. Benzer şekilde Wang ve ark (2014; 2015) yaptığı çalışmalarda DOX uygulaması sonrası SOD ve GSH aktivitelerinde azalma olduğu literatürde görülmektedir (Wang ve ark, 2014; Wang ve ark, 2015). Mansouri ve ark (2017) çalışmalarında DOX uygulamasının SOD ve CAT aktivitesinde önemli azalmaya sebep olduğunu rapor etmişlerdir (Mansouri ve ark, 2017). Kabel ve ark (2018) yaptığı çalışmada CAT aktivitesinde düşüş izlemiştir (Kabel ve ark, 2018). Bu durum literatürle uyumlu olarak ROS artışına bağlı antioksidan üretiminin düzenlenebildiğinin ve lipid peroksidasyonundaki artışın DOX'u detoksifiye edebilme yeteneğini düşürerek antioksidan tükenmesiyle sonuçlandığının göstergesi şeklinde yorumlanabilir (Deepa ve Varalakshimi, 2003; Ozben, 2007). DOX grubuyla karşılaştırıldığında MKH uygulanan grupta SOD aktivitesinde fark gözlenmezken, CAT ve GSH aktivitesinde artış meydana geldi. MKH uygulaması sonrası antioksidan enzimlerdeki artış MKH uygulamasının vücudun antioksidan kapasitesini arttırabileceğinin göstergesi olabilir. Bu sonuçlar MKH'lerin antioksidan özellikleriyle ilgili çalışmaları destekler niteliktedir (da Costa Gonçaves ve ark, 2017; Inan ve ark, 2017).

DOX uygulamasıyla oluşan oksidatif stresin karaciğer dokusunda apoptozu tetiklediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Gao ve ark, 2016; Zhao ve Zhang 2017). Çalışmamızda terminal deoksinükleotidil transferaz tarafından DNA kırıklarının işaretlenmesiyle dokularda apoptotik hücre ölümünün saptanmasında kullanılan yöntem olan TUNEL metoduyla karaciğer hücrelerinde apoptoz saptandı. TUNEL boyamasından elde edilen sonuçlar DOX uygulamasının karaciğerde apoptotik hücre sayısında artışa MKH uygulamasının ise apoptotik hücre sayısında azalmaya sebep olduğunu gösterdi. Önceki çalışmalarda da DOX toksisitesinin karaciğer hücrelerinde apoptozu tetiklediği ve apoptotik hücrelerde artışa sebep olduğu gösterilmiştir (Gao ve ark, 2016; Zhao ve Zhang 2017). Farklı dokularda MKH uygulamasının apoptotik hücre sayısında azalmalara sebep olabileceği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Bernard ve ark, 2018; Wen ve ark, 2017, He ve ark, 2018).

Cai ve ark, 2015 yılında kemik iliği kaynaklı MKH'lerin akut karaciğer hasarı sonrası hepatositlerde apoptotik hücre sayılarında azalmaya sebep olarak apoptozisi baskılayabildiğini göstermiştir (Cai ve ark, 2015)

Eom ve arkadaşları 2015 yılında yaptıkları çalışmada karaciğer fibrozis modelinde MKH uygulamasının hepatosit apoptotizisinde azalmaya sebep olduğunu bildirmiştir (Eom ve ark, 2015).

van Poll ve ark 2008 yılında D-galaktozamine ile oluşturulmuş karaciğer yetmezliğinde MKH kaynaklı moleküllerin hem *iv vivo* hem *in vitro* ortamda hücre

ölümünde azalmaya sebep olduğunu göstermiştir. İn vivo ortamda apoptotik hepatositlerde % 90 azalma rapor edilmiştir. Ex vivo ortamda da MKH'lerin salgılarının hepatosit ölümünü inhibe edici, proliferasyonu uyarıcı etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir (van Poll ve ark, 2008).

Çalışmamızda MKH grupta apoptotik hücre sayısında gözlenen azalma MKH'lerin antiapoptotik özelliklerinin izlendiği çalışmalarla uyum göstermektedir (van Poll ve ark, 2008; Cai ve ark, 2015; Eom ve ark, 2015).

Apoptoz süreci hücre ölüm reseptörleri tarafından uyarılan intrinsik ve ekstrinsik apoptotik yolları içermektedir. DOX maruziyetinin apoptoz mekanizmasındaki rolü araştırılmaya devam edilmekle birlikte oksidatif stresin apoptozun tetiklenmesiyle yakın ilişkili olduğu olduğu yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (Gao ve ark, 2016; Koleini ve Kardami, 2017; Zhao ve Zhang 2017). İntrensek yolak mitokondriyal sitokrom c salınımı aracılığıyla gerçekleşen yolaktır. Özellikle besin eksikliği, kemoteropatik ajanlarla indüklenen hasar ve radyasyon gibi etkenler aracılığıyla intrinsik apoptotik yolak tetiklenmektedir (Sarosiek ve ark, 2017). Bcl-2 ailesi proteinleri olan anti-apoptotik (Bcl-2) ve pro-apoptotik (Bax) proteinler intrinsik apoptoz mekanizmasının düzenlenmesinde önemlidirler. Bcl-2 proteini, mitokondriyonların dış zarında yerleşik hücre içi zar proteindir ve mitokondriden sitokrom c salınımını bloke ederek apoptoz sürecinde antiapoptotik etki göstermektedir. Bax proteini, apoptotik sinyalden önce sitozolde yerleşik sinyal oluşumundan sonra çekirdekten mitokondriye yönelerek mitokondriyonlardan sitokrom c salınımını uyararak proapoptotik proteindir (Beere ve ark, 2000; Phama ve ark, 2006; Wang ve ark, 2015). Bcl-2 aile üyelerinin önemli bir özelliği bu proteinler arasındaki heterodimer ve homodimer oluşturma yeteneklerinin oluşudur. Bax proteini kendi aralarında homodimer oluşturduklarında sitokrom c salınımında artış meydana gelirken, Bax-Bcl-2 proteinleri arasındaki heterodimerizasyon apoptotik ölümün baskılanmasında rol oynamaktadır (Ding ve ark, 2015; Zeng ve ark, 2015).

Zhang ve Zhao (2017) yaptıkları çalışmada DOX'un apoptoz ile ilişkili hücre ölüm reseptörlerini uyardığını göstermiştir (Zhao ve Zhang, 2017).

Ayrıca Gao ve ark (2016) hepatic dokuda DOX'un antiapoptotik BCL-2 ailesi proteinlerinin inhibisyonuna proapoptotik Bax ve Bak 'ın aktivasyonuna sebep olduğunu göstermiştir (Gao ve ark, 2016). Bu bulgular çalışmamızdaki Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında DOX grubunda gözlenen Bax ve Bcl-2 proteinlerindeki değişimi destekler niteliktedir.

Çalışmamızda MKH uygulaması sonrası DOX grubuyla karşılaştırıldığında DOX+MKH grubunda Bax ekspresyonunda azalma izlenirken Bcl-2 ekspresyonunda değişim gözlenmemiştir. Bax ve Bcl-2 proteinleri hücre ölümünün düzenlenmesinde birlikte etki edebileceği gibi hücre ölümünün düzenlenmesinde bağımsız olarak da rol alabilmektedirler (Kundson ve Korsmeyer, 1997; Pavlowski ve Kraft, 2000).

Yapılan çalışmalar Bax / Bcl-2 oranının doğrudan hücre apoptozisini yansıtabildiğini göstermiştir (Liu ve ark, 2017). Bu sebeple Bax/Bcl-2 oranındaki artış ya da azalma apoptoz uyarısından sonra ölüm ve hayatta kalma olayını belirleyebilmektedir (Xu ve ark, 2018). Çalışmamızda Bax ve Bcl-2 ekspresyonları birbirine oranlandığında DOX grubunda Bax/Bcl oranında anlamlı artış görülürken, DOX+MKH grubunda azalma gözlenmiştir. Apoptoz ile ilgili diğer bulgularda göz önünde bulundurulduğunda bu sonuçlar DOX uygulamasının apoptozu tetikleyebildiğini MKH uygulamasının ise Bax ekspresyonunda azalmaya sebep olarak apoptoz sürecini geriletebileceğini göstermektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak çalışmamızda DOX uygulamasının karaciğer dokusunda yapısal ve biyokimyasal hasar oluşumuna sebep olduğu ve hücrel apoptoz sürecini tetiklediği ve DOX'a bağlı gelişen hepatotoksisite sonrası MKH uygulamasının yapısal hasarını geriletilici, antioksidan enzim aktivitelerini düzenleyici ve Bax protein ekspresyonunda değişime sebep olarak Bax /Bcl2 oranını düşürücü etki gösterdiği görüldü.

MKH'lerin sahip olduğu parakrin etkiler sayesinde antiinflamatuvar, antioksidan ve antiapoptotik özelliklerinin olduğu göz önünde bulundurulduğunda çalışmamızda MKH uygulamasının oluşturduğu bu etkilerinin MKH'lerin bu özellikleri sayesinde gelişmiş olabileceğini düşünmekteyiz.

Bu bağlamda MKH uygulamasının özgün tedavi edici etkilerinin detaylı bir şekilde araştırılması ve MKH'lerin parakrin etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi için *in vivo* ve *in vitro* daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda MKH uygulamasının DOX'a bağlı karaciğer hasarının iyileştirilmesinde umut verici olabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Aebi H.** Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology* 1984, 105, 121–126.
- Aggarwal S, Pittenger MF.** Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005, 105, 1815–1822.
- Agudelo D, Bourassa P, Bérubé G, Tajmir-Riahi HA.** Intercalation of antitumor drug doxorubicin and its analogue by DNA duplex: Structural features and biological implications. *International Journal of Biological Macromolecules* 2014, 66, 144–150.
- Airoidi M, Barone G, Gennaro G, Giuliani AM, Giustini M.** Interaction of doxorubicin with polynucleotides. a spectroscopic study. *Biochemistry* 2014, 53, 2197–2207.
- Alison MR, Islam S, Lim S.** Stem cells in liver regeneration fibrosis and cancer: the good, the bad, the ugly. *Journal of Pathology* 2009, 217, 282-289.
- Ammar HI, Sequiera G, Nashed MB, Ammar RI, Gabr HM, Elsayed HE, Sareen N, Rub E, Zickri MB, Dhingra S.** Comparison of adipose tissue- and bone marrow- derived mesenchymal stem cells for alleviating doxorubicin-induced cardiac dysfunction in diabetic rats. *Stem Cells Research and Therapy* 2015, 6(1), 148.
- Anan HH, Zidan RA, Shaheen MA, Abd- El Fattah EA.** Therapeutic efficacy of bone marrow derived mesenchymal stromal cells versus losartan on adriamycin-induced renal cortical injury in adult albino rats. *Cytotherapy* 2016, 18, 970–984.
- Arcamone F.** ‘Doxorubicin Anticancer Antibiotics’. Academic Press, New York,1981.
- Arıncı K, Elhan A.** Anatomi kemikler, eklemler, kaslar, iç organlar. Güneş Tıp Kitabevleri, 2016.
- Arola OJ, Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM.** Acute doxorubicin cardiotoxicity involves cardiomyocyte apoptosis. *Cancer Research* 2000, 60, 1789–1792.
- Arthur A, Rychkov G, Shi S, Koblar SA, Gronthos S.** Adult human dental pulp stem cells

differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells* 2008, 26, 1787–1795.

Asahina K, Tsai SY, Li P, Ishii M, Maxson RE, Socov HM, Tsukamoto H. Mesenchymal origin of hepatic stellate cells, submesothelial cells, and perivascular mesenchymal cells during mouse liver development. *Hepatology* 2009, 49, 998–1011.

Aubel-Sadron G, Londos-Gagliardi D. Daunorubicin and doxorubicin, anthracycline antibiotics, a physicochemical and biological review. *Biochimie* 1984, 66, 333-352.

Ayatollahi M, Hesami Z, Jamshidzadeh A, Gramizadeh B. Antioxidant effects of bone marrow mesenchymal stem cell against carbon tetrachloride-induced oxidative damage in rat livers. *International Journal of Organ Transplantation Medicine* 2014, 5, 166–173.

Bagchi D, Bagchi M, Hassoun EA, Kelly J, Stohs SJ. Adriamycin-induced hepatic and myocardial lipid peroxidation and DNA damage, and enhanced excretion of urinary lipid metabolites in rats. *Toxicology* 1995, 95, 1–9.

Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Osaki M, Kato T, Okochi H, Ochiya T. Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2009, 24, 70–77.

Barakat BM, Ahmed HI, Bahr HI, Elbahaie AM. Protective effect of boswellic acids against doxorubicin-induced hepatotoxicity: impact on Nrf2/HO-1 defense pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018, 8296451.

Bartlett JJ, Trivedi PC, Pulinilkunnil T. Autophagic dysregulation in doxorubicin cardiomyopathy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2017, 104, 1–8.

Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Tailor P, Morimoto RI, Cohen GM, Green DR. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nature Cell Biology* 2000, 2, 469–475.

Bernard J, Paul D, Boiron M, Jacquillat C, Maral UR. Rubidomycin. Berlin, Hiedelburg, New york, Springer, 1969.

Bernard O, Jeny F, Uzunhan Y, Dondi E, Terfous R, Label R, Sutton A, Larghero J, Vanneaux V, Nunes H, Boncoeur E, Planes C, Dard N. Mesenchymal stem cells reduce hypoxia-induced apoptosis in alveolar epithelial cells by modulating HIF and ROS hypoxic signaling. *American Journal of Physiology* 2018, 324, L360- L371.

Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, Galun E, Rachmilewitz J. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* 2005, 105, 2214–2219.

Bilgic S, Ozgocmen M. The protective effect of misoprostol against doxorubicin induced liver injury. *Biotechnic and Histochemistry* 2019, 94, 583–591.

Bonadonna G, Valagussa P, Brambilla C, Ferrari L, Moliterni A, Terenziani M, Zambetti M. Primary chemotherapy in operable breast cancer: eight-year experience at the Milan Cancer Institute. *Journal of Clinical Oncology* 1998, 16, 93–100.

Bort R, Signore M, Tremblay K, Barbera JPM, Zaret KS. Hex homeobox gene controls the transition of the endoderm to a pseudostratified, cell emergent epithelium for liver bud development. *Developmental Biology* 2006, 290, 44–56.

Brockmann H, Bauer K. Rhodomycin, ein rotes antibiotikum aus actinomyceten. *Naturwissenschaften* 1950, 37, 492-493.

Buko V, Ergov A, Karput S. Mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation in thioacetamide-induced liver necrosis. *Toxicology Letters* 1998, 95,162.

Bulucu F, Oktenli C, Kenar L, Ocal R, Koc B, Inal V, Yamanel L, Yaman H, Sanisoglu YS, Aydin A. Efficacy of deferoxamine, N-acetylcysteine and selenium treatments in rats with Adriamycin-induced nephrotic syndrome. *Journal of Nephrology* 2008, 21, 576–583.

Cai Y, Zou Z, Liu L, Chen S, Chen Y, Lin Z, Shi K, Xu L, Chen Y. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells inhibits hepatocyte apoptosis after acute liver injury. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 2015, 8, 107–116.

Camaggi CM, Comparsi R, Strocchi E, Testoni F, Angelelli B, Pannuti F. Epirubicin and doxorubicin comparative metabolism and pharmacokinetics. A cross-over study. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 1988, 21(3), 221-228.

Campagnoli C, Roberts IAG, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 2001, 98(8), 2396-2402.

Can A. Kök hücre biyolojisi, türleri ve tedavide kullanımları. Ankara, Akademisyen Tıp Kitabevi, 2014, 363-410.

Canzoneri JC, Oyelere AK. Interaction of anthracyclines with iron responsive element mRNAs. *Nucleic Acids Research* 2008, 36, 6825–6834.

Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research* 1991, 9, 641–65.

Caplan AI. The mesengenic process. *Clinic in Plastic Surgery* 1994. 21, 429-435.

Cappetta D, De Angelis A, Sapio L, Prezioso L, Illiano M, Quaini F, Rossi F, Berrino L, Naviglio S, Urbanek K. Oxidative stress and cellular response to doxorubicin: a common factor in the complex milieu of anthracycline cardiotoxicity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017, 1521020.

Carter SK, Umezawa H, Douros, J, Sakurai Y. Antitumor Antibiotics. Springer Science and Business Media, 2012, 303.

Carvalho C, Santos RX, Cardoso S, Correia S, Oliveira PJ, Santos MS, Moreir PI. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Current Medicinal Chemistry* 2009, 16, 3267-3285.

Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007, 25, 2739–2749.

Chatterjee K, Zhang J, Honbo N, Karliner JS. Doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiology*, 2010, 115(2), 155- 162.

Chen MY, Lie PC, Li ZL, Wei X. Endothelial differentiation of Wharton’s jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Experimental Hematology* 2009, 37, 629–640.

Cho KA, Ju SY, Cho SJ, Jung YJ, Woo SY, Seoh JY, Han HS, Ryu KH. Mesenchymal

stem cells showed the highest potential for the regeneration of injured liver tissue compared with other subpopulations of the bone marrow. *Cell Biology International* 2009, 33, 772–777.

Collardeau-Frachon S, Scoazec JY. Vascular development and differentiation during human liver organogenesis. *Anatomical Record* 2008, 291, 614–627.

Conklin KA. Coenzyme Q10 for prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Integrative Cancer Therapies* 2005, 4, 110–130.

Corcione A, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 2006, 107, 367–372.

Crisostomo PR, Wang Y, Markel TA, Wang M, Lahm T, Meldrum DR. Human mesenchymal stem cells stimulated by TNF-alpha, LPS, or hypoxia produce growth factors by an NF kappa B- but not JNK-dependent mechanism. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 2008, 294(3), C675-C682.

Csala M, Banhegyi G, Benedetti A. Endoplasmic reticulum: a metabolic compartment . *FEBS Letters* 2006, 580-2160-2165.

Cummings MC, Winterfold CM, Walker NI. Apoptosis. *American Journal of Surgical Pathology* 1997, 21,88-101.

da Costa Gonçalves F, Grings M, Nunes NS, Pinto FO, Garcez TNA, Visioli F, Leipnitz G, Paz AH. Antioxidant properties of mesenchymal stem cells against oxidative stress in a murine model of colitis. *Biotechnology Letters* 2017, 39, 613–622.

Damiani V, Falvo E, Fracasso G, Federici L, Pitea M, De Laurenzi V, Sala G, Ceci P. Therapeutic efficacy of the novel stimuli-sensitive nano-ferritins containing doxorubicin in a head and neck cancer model. *International Journal of Molecular Sciences* 2017, 18, 1–9.

da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the *in vivo* identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2008, 26, 2287–2299.

Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Experimental Hematology* 2000, 28, 875–884.

Deepa PR, Varalakshmi P. Protective effect of low molecular weight heparin on oxidative injury and cellular abnormalities in adriamycin-induced cardiac and hepatic toxicity. 2003, 146 (2), 201-210.

Deepa KI, Mandlikb Km, Suresh RN. Models of hepatotoxicity and the underlying cellular, biochemical and immunological mechanism(s): a critical discussion. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2014, 37,118-133.

De Ugarte DA, Alfonso Z, Zuk PA, Elbarbary A, Zhu M, Ashjian P, Benhaim P, Hedrick MH, Fraser JK. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunology Letters* 2003, 89, 267–270.

Devine SM, Cobbs C, Jennings M, Bartholomew A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood* 2003,101, 2999–3001.

Ding X, Chen Y, Han L, Qui W, Gu X, Zhang H. Apoptosis related protein 3 is a lysosomal membrane protein. *Biochemical and Biophysics Research Communications* 2015, 460, 915-922.

Di Marco A, Gaetani M, Dorigotti L, Soldati M, Bellini O. Daunomycin: a new antibiotic with antitumor activity. *Cancer Chemotherapy Reports* 1964, 38, 31-38.

Di Marco A, Gaetani M, Scarpinato B. Adriamycin (NSC-123,127): a new antibiotic with antitumor activity. *Cancer Chemotherapy Reports* 1969, 53(1), 33-37.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006, 8, 315–317.

Dubbelboer IR, Lilienberg E, Ahnfelt E, Sjögren E, Axén N, Lennernäs H. Treatment of intermediate stage hepatocellular carcinoma: a review of intrahepatic doxorubicin drug-

delivery systems. *Therapeutic Delivery* 2014, 5(4), 447-466.

Elvevold K, Smedsrød B, Martinez I. The liver sinusoidal endothelial cell: a cell type of controversial and confusing identity. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 2008, 294 (2), G391-G400.

Edlich, F, Martinou J. Bcl-2 protein interplay on the outer mitochondrial membrane. In *Mitochondria and Cell Death* 2016, 69–83.

El-Tawil OS, Abou-Hadeed AH, El-bab MF, Shalaby AA. Amphetamine-induced cytotoxicity and oxidative stress in isolated rat hepatocytes. *Pathophysiology* 2011, 18, 279-285.

Eom YW, Shim KY, Baik SK. Mesenchymal stem cell therapy for liver fibrosis. *Korean Journal of Internal Medicine* 2015, 30, 580–589.

Ettlinger L, Gäumann E, Hütter R, Keller-Schierlein W, Kradolfer F, Neipp L, Prelog V, Reusser P, Zähler H. Stoffwechselprodukte von actinomyceten, XVI. cinerubine. *Chemische Berichte* 1959, 92, 1867–1879.

Ferreira AL, Matsubara LS, Matsubara BB. Anthracycline-induced cardiotoxicity. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry* 2008, 6, 278–281.

Fitzsimmons REB, Mazurek MS, Soos A, Simmons CA. Mesenchymal stromal/stem cells in regenerative medicine and tissue engineering. *Stem Cells International* 2018, 1–16.

Fornari FA, Randolph JK, Yalowich JC, Ritke MK, Gewirtz DA. Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells. *Molecular Pharmacology* 1994, 45, 649–656.

Forte G, Minieri M, Cossa P, Antenucci D, Sala M, Gnocchi V, Fiaccavento R, Carotenuto F, De Vito P, Baldini PM, Prat M, Di Nardo P. Hepatocyte growth factor effects on mesenchymal stem cells: proliferation, migration, and differentiation. *Stem Cells* 2006, 24, 23–33.

Foufelle F, Fromenty B. Role of endoplasmic reticulum stress in drug- induced toxicity. *Pharmacology Research and Perspectives* 2016, 4(1) e00211.

Fox JL, MacFarlane M. Targeting cell death signalling in cancer: Minimising ‘Collateral damage’. *British Journal of Cancer* 2016, 115, 5–11.

Frederick CA, Williams LD, Ughetto G, van der Marel GA, van Boom HJ, Rich A, Wang AHJ. Structural comparison of anticancer drug-DNA complexes: adriamycin and daunomycin. *Biochemistry* 1990, 29, 2538–2549.

Friedenstein AJ, Piatetzky S, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 1966,16, 381-390.

Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinetics* 1970, 3,393-403.

Friedman R, Betancur M, Boissel L, Tuncer H, Cetrulo C, Klingemann H. Umbilical cord mesenchymal stem cells: adjuvants for human cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2007, 13, 1477–1486.

Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiological Reviews* 2008, 88(1), 125–172.

Gad AM, Hassan WA, Fikry EM. Significant curative functions of the mesenchymal stem cells on methotrexate- induced kidney and liver injuries in rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 2017, 31(8), e 21919.

Gao Y, Yang H, Fan Y, Li L, Fang J, Yang W. Hydrogen-rich saline attenuates cardiac and hepatic injury in doxorubicin rat model by inhibiting inflammation and apoptosis. *Mediators of Inflammation* 2016, 1320365.

Gartner LP, Hiatt JL. Cytoplasm. in color textbook of histology. (2nd ed). WB Saunders Company, 2001, 11, 49.

Gnecchi M, He H, Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H, Noiseux N, Zhang L, Pratt RE, Ingwall JS, Dzau VJ. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nature Medicine* 2005, 11(4), 367-368.

Gokcimen A, Cim A, Tola HT, Bayram D, Kocak A, Özgüner F, Ayata A. Protective effect of N-acetylcysteine, caffeic acid and vitamin E on doxorubicin hepatotoxicity. *Human*

and *Experimental Toxicology* 2007, 26, 519–525.

Götherström C, Ringdén O, Tammik C, Zetterberg E, Westgren M, Le Blanc K. Immunologic properties of human fetal mesenchymal stem cells. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2004, 190, 239–245.

Granados-Principal S, Quiles JL, Ramirez-Tortosa CL, Sanchez-Rovira P, Ramirez-Tortosa Mc. New advances in molecular mechanisms and the prevention of adriamycin toxicity by antioxidant nutrients. *Food and Chemical Toxicology* 2010, 48, 1425–1438.

Green D, Kroemer G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends in Cell Biology* 1998, 8, 267–271.

Greupink R, Bakker HI, Bouma W, Reker-Smit C, Meijer DKF, Beljaars L, Poelstra K. The antiproliferative drug doxorubicin inhibits liver fibrosis in bile duct-ligated rats and can be selectively delivered to hepatic stellate cells in vivo. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2006, 317, 514–521.

Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000, 97, 13625–13630.

Guhathakurta S, Subramanyan UR, Balasundari R, Das CK, Madhusankar N, Cherian KM. Stem cell experiments and initial clinical trial of cellular cardiomyoplasty. *Asian Cardiovascular and Thoracic Annals* 2009, 17, 581–586.

Gupta DM, Panetta NJ, Longaker MT. Osteogenic differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. *Methods in Molecular Biology* 2011, 698, 201–214.

Güven C, Sevgiler Y, Taskin E. Mitochondrial dysfunction associated with doxorubicin. *Mitochondrial Disease* 2018, 13, 324–360.

Hadwa AAK, Heba F, Sara AG. Protective effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on methotrexate-induced brain and liver injury in female albino rats: histological study. *Stem Cell* 2017, 8(1), 100–111.

Hall JE. Guyton ve Hall tıbbi fizyoloji (13. baskı), Yeğen BÇ, Güneş Tıp Kitabevleri, 2017.

Harris LJ, Abdollahi H, Zhang P, McIlhenny S, Tulenko T DiMuzio PJ. Differentiation of adult stem cells into smooth muscle for vascular tissue engineering. *Journal of Surgical Research* 2011, 168(2), 306–314.

He Y, Zhang D, Zeng Y, Ma J, Wang J, Guo H, Zhang J, Wang M, Zhang W, Gong N. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect islet grafts against endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis during the early stage after transplantation. *Stem Cells* 2018, 36(8), 1045-1061.

Henninger C, Huelsenbeck J, Huelsenbeck S, Grösch S, Schad A, Lackner KJ, Kaina B, Fritz G. The lipid lowering drug lovastatin protects against doxorubicin-induced hepatotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2012, 261, 66–73.

Herlihy B. *The Human Body in Health and Illness* (4 th ed) 2007, Saunders Elsevier,537.

Hideg K, Kálai T. Novel antioxidants in anthracycline cardiotoxicity. *Cardiovascular Toxicology* 2007, 7, 160–164.

Hinkley JM, Morton AB, Ichinoseki-Sekine N, Huertas AM, Smuder AJ. Exercise training prevents doxorubicin-induced mitochondrial dysfunction of the liver. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 2019, 51(6), 1106-1115.

Hoffman T. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone. *Proceeding of the National Academy of Science United states of America* 2002, 99(13), 8932-8937.

Hong CW, Chow L, Turkbey EB, Lencioni R, Libutti SK, Wood BJ. Imaging features of radiofrequency ablation with heat deployed liposomal doxorubicin in hepatic tumors. *Cardiovascular and Interventional Radiology* 2016, 39(3), 409–416.

Hortobagyi GN. Anthracyclines in the treatment of cancer. *Drugs* 1997, 54, 1–7.

Horwitz EM, Gordon PL, Koo WKK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, Muul L,

Huang JI, Kazmi N, Durbhakula MM, Hering TM, Yoo JU, Johnstone B. Chondrogenic potential of progenitor cells derived from human bone marrow and adipose tissue: A patient-matched comparison. *Journal of Orthopaedic Research* 2005, 23, 1383–1389.

Hung SC, Chen NJ, Hsieh SL, Li H, Ma HL, Lo WH. Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow. *Stem Cells* 2002, 20, 249-258.

Idriss NK, Sayyed HG, Osama A, Sabry D. Treatment efficiency of different routes of bone marrow-derived mesenchymal stem cell injection in rat liver fibrosis model. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2018, 48, 2161-2171.

Inan M, Bakar E, Cerkezkayabekir A, Sanal F, Ulucam E, Subaşı C, Karaöz E. Mesenchymal stem cells increase antioxidant capacity in intestinal ischemia/reperfusion damage. *Journal of Pediatric Surgery* 2017, 52, 1196–1206.

In't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Noort WA, Claas FH, Willemze R, Fibbe WE, Kanhai HH . Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* 2003, 102,1548–1549.

Jacevic V, Djordjevic A, Srdjenovic B, Milic-Tores V, Segrt Z, Dragojevic-Simic V, Kuca K. Fullerenol nanoparticles prevents doxorubicin-induced acute hepatotoxicity in rats. *Experimental and Molecular Pathology* 2017, 102, 360–369.

Jalali AS, Hasanzadeh S. Crataegus monogyna fruit aqueous extract as a protective agent against doxorubicin-induced reproductive toxicity in male rats. *Avicenna Journal of Phytomedicine* 2013, 3, 159–170.

Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, Mao N. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2005, 105, 4120–4126.

Jin G, Qiu G, Wu D, Hu Y, Qiao P, Fan C, Gao F. Allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells attenuate hepatic ischemia-reperfusion injury by suppressing oxidative stress and inhibiting apoptosis in rats. *International Journal of Molecular Medicine* 2013, 31, 1395–1401.

Kabel AM, Alzahrani AA, Bawazir NM, Khawtani RO, Arab HH. Targeting the proinflammatory cytokines, oxidative stress, apoptosis and TGF- β 1/STAT-3 signaling by irbesartan to ameliorate doxorubicin-induced hepatotoxicity. *Journal of Infection and Chemotherapy* 2018, 24, 623–631.

Kalender Y, Yel M, Kalender S. Doxorubicin hepatotoxicity and hepatic free radical metabolism in rats. The effects of vitamin E and catechin. *Toxicology* 2005, 209(1), 39-45.

Kanazawa H, Fujimoto Y, Teratani T, Iwasaki J, Kasahara N, Negishi K, Tsuruyama T, Uemoto S, Kobayashi E. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells ameliorate hepatic ischemia reperfusion injury in a rat model. *PLOS ONE* 2011, 6, 2–9.

Kassis I, Zangi L, Rivkin R, Levdansky L, Samuel S, Marx G, Gorodetsky R. Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. *Bone Marrow Transplantation* 2006, 37,967-976.

Kavazis AN, Morton AB, Hall SE, Smuder AJ. Effects of Doxorubicin on cardiac muscle subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria. *Mitochondrion* 2017, 34, 9-19.

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 1972, 26, 239.

King PD, Perry MC. Hepatotoxicity of chemotherpy. *The Oncologist* 2001, 6, 162-176.

Kisseleva T, Gigante E, Brenner DA. Recent advances in liver stem cell therapy. *Current Opinion in Gastroenterology* 2010, 26, 395–402.

Koleini N, Kardami E. Autophagy and mitophagy in the context of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Oncotarget* 2017, 8, 46663–46680.

Krampera M, Sartoris S, Liotta F, Pasini A, Angeli R, Cosmi L, Andreini A, Mosna F, Bonetti B, Rebellato E, Testi MG, Frosali F, Pizzolo G, Tridente G, Maggi E, Romagnani S Annunziato F. Immune regulation by mesenchymal stem cells derived from adult spleen and thymus. *Stem Cells and Development* 2007,16(5), 797-810.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Cellular adaptations, cell injury and cell death in pathologic basis of disease (7 th ed), India, WB Saunders Company, 2005, 3-46.

Kundson CM, Korsmeyer SJ. Bcl-2 and Bax function independently to regulate cell death. *Nature Genetics* 1997, 16, 358-363.

Kunter U, Rong S, Djuric Z, Boor P, Müller-Newen G, Yu D, Floege J. Transplanted mesenchymal stem cells accelerate glomerular healing in experimental glomerulonephritis.

Journal of the American Society of Nephrology 2006, 17, 2202–2212.

Kwok JC, Richardson DR. Anthracyclines induce accumulation of iron in ferritin in myocardial and neoplastic cells: Inhibition of the ferritin iron mobilization pathway. *Molecular Pharmacology* 2003, 63, 849–861.

Lal S, Mahajan A, Ning Chen W, Chowbay B. Pharmacogenetics of target genes across doxorubicin disposition pathway: a review. *Current Drug Metabolism* 2010, 11, 115–128.

Lee RH, Seo MJ, Reger RL, Spees JL, Pulin AA, Olson SD, and Prockop DJ. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *PNAS* 2006, 103, 46.

Lemaigre F, Zaret KS. Liver development update: new embryo models, cell lineage control, and morphogenesis. *Current Opinion in Genetics and Development* 2004, 14, 582–590.

Lenaz G. The mitochondrial production of reactive oxygen species: Mechanism and implications in human pathology. *IUBMB Life* 2001, 52(3-5) 159-164.

Leuning DG, Beijer NRM, Du Fossé NA, Vermeulen S, Lievers E, Van Kooten C, Rabelink TJ, De Boer J. The cytokine secretion profile of mesenchymal stromal cells is determined by surface structure of the microenvironment. *Scientific Reports* 2018, 8, 1–9.

Li, F, Wang, X, Niyibizi C. Bone marrow stromal cells contribute to bone formation following infusion into femoral cavities of a mouse model of osteogenesis imperfecta. *Bone* 2010, 47, 546–555.

Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP- dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997, 91(4), 479-489.

Li S, Zheng X, Li H, Zheng J, Chen X, Liu W, Tai Y, Zhang Y, Wang G, Yang Y. Mesenchymal stem cells ameliorate hepatic ischemia/reperfusion injury via inhibition of neutrophil recruitment. *Journal of Immunology Research* 2018, 1–10.

Lin M, Li L, Li L, Pokhrel G, Qi G, Rong R, Zhu T. The protective effect of baicalin against renal ischemia-reperfusion injury through inhibition of inflammation and apoptosis.

BMC Complementary and Alternative Medicine 2014, 14,19.

Lipshultz SE, Cohen H, Colan SD, Herman EH. The relevance of information generated by *in vitro* experimental models to clinical doxorubicin cardiotoxicity. *Leukemia and Lymphoma* 2006, 47, 1454–1458.

Liu W, Song F, Ren L, Guo W, Wang T, Feng Y, Tang L, Li K. The multiple functional roles of mesenchymal stem cells in participating in treating liver diseases. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2015, 19, 511–520.

Liu Y, Wang L, Du Y, Chen Z, Guo J, Weng X, Wang X, Wang M, Chen D, Liu X. Effects of apigenin pretreatment against renal ischemia/reperfusion injury via activation of the JAK2/STAT3 pathway. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2017, 95, 1799–1808.

Loo CKC, Wu XJ. Origin of stellate cells from submesothelial cells in a developing human liver. *Liver International* 2008, 28, 1437–1445.

Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *Journal of Cellular Physiology* 1998, 176, 57-66.

Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D, Hardy WB, Moorman MA, McIntosh KR, Mosca JD. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *Journal of Biomedical Science* 2003, 10, 228–241.

Mansour MF, Greish SM, El-Serafi AT, Abdelall H, El-Wazir YM. Therapeutic potential of human umbilical cord derived mesenchymal stem cells on rat model of liver fibrosis. *American Journal of Stem Cells* 2019, 8(1), 7-18.

Mansouri E, Jangaran A, Ashtari A. Protective effect of pravastatin on doxorubicin-induced hepatotoxicity. *Bratislava Medical Journal* 2017, 118(5),273-277.

Manuguerra-Gagné R, Boulos PR, Ammar A, Leblond FA, Kroszl G, Pichette V, Lesk MR, Roy DC. Transplantation of mesenchymal stem cells promotes tissue regeneration in a glaucoma model through laser-induced paracrine factor secretion and progenitor cell recruitment. *Stem Cells* 2013, 31, 1136–1148.

Mao F, Tu Q, Wang L, Chu F, Li X, Li HS, Xu W. Mesenchymal stem cells and their

therapeutic applications in inflammatory bowel disease. *Oncotarget* 2017, 8, 38008–38021.

Mendes SC. Mesenchymal progenitor cells localize within hematopoietic sites throughout ontogeny. *Development* 2005, 132, 1127–1136.

Meredith A, Dass CR. Increasing tole of the cancer chemothrerapeutic doxorubicin in cellular metabolism. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2016, 68(6), 729-741.

Mescher AL. Junqueira Temel Histoloji Konu ve Atlas (14.baskı), Solakoğlu S, Erdoğan A, Mutlu HS, Güneş Tıp Kitabevleri, 2019, 573.

Milosavljevic N, Gazdic M, Markovic BS, Arsenijevic A, Nurkovic J, Dolicanin Z, Djonov V, Lukic ML, Volarevic V. Mesenchymal stem cells attenuate acute liver injury by altering ratio between interleukin 17 producing and regulatory natural killer T cells. *Liver Transplantation* 2017, 23, 1040–1050.

Minguell JJ, Erices A. Mesenchymal stem cells and the treatment of cardiac disease. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)* 2006, 231(1), 39-49.

Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews* 2004, 56, 185–229.

Moore-Scott BA, Opoka R, Lin SCJ, Kordich JJ, Wells JM. Identification of molecular markers that are expressed in discrete anterior-posterior domains of the endoderm from the gastrula stage to mid-gestation. *Developmental Dynamics* 2007, 236, 1997–2003.

Moreira A, Kahlenberg S, Hornsby P. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for diabetes. *Journal of Molecular Endocrinology* 2017, 59, R109–R120.

Morikawa S, Mabuchi Y, Kubota Y, Nagai Y, Niibe K, Hiratsu E, Suzuki S, Miyauchi-Hara C, Nagoshi N, Sunabori T, Shimmura S, Miyawaki A, Nakagawa T, Suda T, Okano H, Matsuzaki Y. Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *Journal of Experimental Medicine* 2009, 206, 2483–2496.

Muggia FM, Green MD. New anthracycline antitumor antibiotics. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 1991, 11, 43-64.

Muraca M. Evolving concepts in cell therapy of liver disease and current clinical perspectives. *Digestive and Liver Disease* 2011, 43, 180–187.

Murphy MB, Moncivais K, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Experimental & Molecular Medicine* 2013, 45, e54.

Myers TJ, Granero-Molto F, Longobardi L, Li T, Yan Y, Spagnoli A. Mesenchymal stem cells at the intersection of cell and gene therapy. *Expert Opinion on Biological Therapy* 2010, 10(12), 1663–1679.

Nagai K, Oda A, Konishi H. Theanine prevents doxorubicin-induced acute hepatotoxicity by reducing intrinsic apoptotic response. *Food and Chemical Toxicology* 2015, 78, 147–152.

Nakahara H, Goldberg VM, Caplan AI. Culture-expanded human periosteal-derived cells exhibit osteochondral potential in vivo. *Journal of Orthopaedic Research* 1991, 9, 465–476.

Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Review in Translational Hematology* 2007, 110(10), 3499-3506.

Netter FH. İnsan anatomisi atlası (6.baskı), Cumhuriyet M, Nobel Tıp Kitabevi, 2011.

Niemeyer P, Seckinger A, Simank HG, Kasten P, Südkamp N, Krause U. Allogenic transplantation of human mesenchymal stem cells for tissue engineering purposes: an *in vitro* study. *Der Orthopäde* 2004, 33, 1346–1353.

Nitiss JL. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer* 2009, 9, 1–27.

Niu Q, Liu Y, Li Z, Qin X. Metabolomics study of doxorubicin induced hepatotoxicity. *Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica* 2015, 50, 708–713.

Noël D, Djouad F, Bouffi C, Mrugala D, Jorgensen C. Multipotent mesenchymal stromal cells and immune tolerance. *Leukemia and Lymphoma* 2007, 48, 1283–1289.

North TE, Goessling W. Endoderm specification, liver development, and regeneration. *Methods in Cell Biology* 2011, 101, 205–223.

Ohakawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by

thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 1979, 95(2), 351-358.

Oktem G, Uysal A, Oral O, Sezer ED, Olukman M, Erol A, Akgur SA, Bilir A. Resveratrol attenuates doxorubicin-induced cellular damage by modulating nitric oxide and apoptosis. *Experimental and Toxicologic Pathology* 2012, 64, 471–479.

Omobowale TO, Oyagbemi AA, Ajufu UE, Adejumobi OA, Ola-Davies OE, Adedapo AA, Yakubu MA. Ameliorative effect of gallic acid in doxorubicin-induced hepatotoxicity in wistar rats through antioxidant defense system. *Journal of Dietary Supplements* 2018, 15, 183–196.

Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, Phinney DG. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, 100, 8407–8411.

Ortiz LA, DuTreil M, Fattman C, Pandey AC, Torres G, Go K, Phinney DG. Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007, 104, 11002–11007.

Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhäuser M WC. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells *in vitro*. *Stem Cells* 2004, 22, 377–384.

Ovale WK, Nahirney PC. Netter temel histoloji, Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P, Güneş Tıp Kitaabevi, 2009.

Owen M, Friedenstein A. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Foundation Symposium* 1988, 136, 42-60.

Ozaki Y, Nishimura M, Sekiya K, Suehiro F, Kanawa M, Nikawa H, Hamada T, Kato Y. Comprehensive analysis of chemotactic factors for bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development* 2007, 16, 119–129.

Ozben T. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2007, 96 (9), 2181-2196.

Pan RL, Wang P, Xiang LX, Shao JZ. Delta-like 1 serves as a new target and contributor to liver fibrosis down-regulated by mesenchymal stem cell transplantation. *Journal of Biological Chemistry* 2011, 286, 12340–12348.

Parekkadan B, Van Poll D, Sukanuma K, Carter EA, Berthiaume F, Tilles AW, Yarmush ML. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. *PLOS ONE* 2007, 2 (9), e941.

Pavlovski J, Kraft AS. Bax- induced apoptotic cell death. *Proceeding of the National Academy and Sciences* 2000, 97(2), 529-531.

Phama TND, Mariona M, Denizeau F, Jumariab C. Cadmium-induced apoptosis in rat hepatocytes does not necessarily involve caspase-dependent pathways. *Toxicology in Vitro* 2006, 20(8), 1331-1342.

Phinney DG, Isakova I. Plasticity and therapeutic potential of mesenchymal stem cells in the nervous system. *Current Pharmaceutical Design* 2005, 11, 1255–1265.

Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair-current views. *Stem Cells* 2007, 25, 2896–2902.

Piersma AH, Brockbank KG, Ploemacher RE, van Vliet E, Brakel-van Peer KM, Visser PJ. Characterization of fibroblastic stromal cells from murine bone marrow. *Experimental Hematology* 1985, 13, 237–243.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999, 284, 143–147.

Pizzo PA, Poplack DG. Principles and practice of pediatric oncology (5th ed), Williams and Wilkins L, New York, 2006, 229–332.

Poltavtseva RA, Poltavtsev AV, Lutsenko GV, Svirshchevskaya EV. Myths, reality and future of mesenchymal stem cell therapy. *Cell and Tissue Research* 2019, 375, 563–574.

Prockop D. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997, 276, 71–74.

Prockop DJ, Oh JY. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation. *Molecular Therapy* 2012, 20, 14–20.

Pugazhendhi A, Edison TNJI, Velmurugan BK, Jacob JA, Karuppusamy I. Toxicity of Doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems. *Life Sciences* 2018, 200, 26–30.

Rephaeli A, Waks-Yona S, Nudelman A, Tarasenko I, Phillips DR, Cutts SM, Kessler-Ickson G. Anticancer prodrugs of butyric acid and formaldehyde protect against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *British Journal of Cancer* 2007, 96, 1667-1674.

Ringdén O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lönnies H, Marschall HU, Dlugosz A, Szakos A, Hassan Z, Omazic B, Aschan J, Barkholt L, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation* 2006, 81, 1390–1397.

Risbud M V, Guttapalli A, Tsai TT, Lee JY, Danielson KG, Vaccaro AR, Albert TJ, Gazit Z, Gazit D, Shapiro IM. Evidence for skeletal progenitor cells in the degenerate human intervertebral disc. *Spine* 2007, 32, 2537–2544.

Robert J, Gianni L. Pharmacokinetics and metabolism of anthracyclines. *Cancer Surveys* 1993, 17, 219-252.

Roomi MW, Kalinovsky T, Roomi NW, Rath M, Niedzwiecki A. Prevention of Adriamycin-induced hepatic and renal toxicity in male BALB/c mice by a nutrient mixture. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2014, 7, 1040–1044.

Ross MH, Pawlina W. Histoloji konu anlatımı ve atlas (6 th ed), Baykal B, Ankara, Palme Yayıncılık, 2014, 628-662.

Rüster B, Göttig S, Ludwig RJ, Bistrrian R, Müller S, Seifried E, Gille J, Henschler R. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood* 2006, 108, 3938–3944.

Sadler TW. Medikal Embriyoloji (11. baskı), Başaklar AC, Ankara, Palme Yayıncılık, 2011.

Salem HK, Thiemermann C. Mesenchymal stromal cells: Current understanding and clinical status. *Stem Cells* 2010, 28, 585–596.

Salomone F, Barbagallo I, Puzzo L, Piazza C, Volti GL. Efficacy of adipose tissue-mesenchymal stem cell transplantation in rats with acetaminophen liver injury. *Stem Cell Research* 2013, 11(3), 1037-1044.

Sancak B, Cumhuri M. Fonksiyonel anatomi: baş, boyun ve iç organlar (3 th ed), Ankara, ODTÜ Yayıncılık, 2004.

Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro*. *Experimental Neurology* 2000, 164, 247–256.

Santos DL, Moreno AJ, Leino RL, Froberg MK, Wallace KB. Carvedilol protects against doxorubicin-induced mitochondrial cardiomyopathy. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2002, 185(3), 218-227.

Sarosiek KA, Fraser C, Muthalagu N, Bholra PD, Chang W, McBrayer SK, Cantlon A, Fisch S, Golomb-Mello G, Ryan JM, Deng J, Jian B, Corbett C, Goldenberg M, Madsen JR, Liao R, Walsh D, Sedivy J, Murphy DJ, Carrasco DR, Robinson S, Moslehi J, Letai A. Developmental regulation of mitochondrial apoptosis by c-Myc governs age- and tissue-specific sensitivity to cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2017, 31(1), 142–156.

Schäffler A, Büchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells-basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells* 2007, 25, 818–827.

Schulz C, Gomez Perdiguero E, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, Prinz M, Wu B, Jacobsen SE, Pollard JW, Frampton J, Liu KJ, Geissmann F. A lineage of myeloid cells independent of myb and hematopoietic stem cells. *Science* 2012, 335, 86–90.

Segers VFM, Van Riet I, Andries LJ, Lemmens K, Demolder MJ, De Becker AJML, Kockx MM, De Keulenaer GW. Mesenchymal stem cell adhesion to cardiac microvascular endothelium: activators and mechanisms. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2006, 290, 1370–1377.

Shabalala S, Louw J, Muller CJF, Johnson R. Polyphenols, autophagy and doxorubicin-

induced cardiotoxicity. *Life Sciences* 2017, 180, 160–170.

Shen MM. Nodal signaling: development roles and regulation. *Development* 2007, 134, 1023–1034.

Shiojiri N, Sugiyama Y. Immunolocalization of extracellular matrix components and integrins during mouse liver development. *Hepatology* 2004, 40, 346–355.

Song G, Ma Z, Liu D, Qian D, Zhou J, Meng H, Zhou B, Song Z. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells attenuate severe acute pancreatitis via regulation of microRNA-9 to inhibit necroptosis in rats. *Life Sciences* 2019, 223, 9–21.

Songbo M, Lang H, Xinyong C, Bin X, Ping Z, Liang S. Oxidative stress injury in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicology Letters* 2019, 307, 41–48.

Steinherz LJ, Steinherz PG, Tan CT, Heller G, Murphy ML. Cardiac toxicity 4 to 20 years after completing anthracycline therapy. *JAMA* 1991, 266, 1672–1677.

Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry* 1988, 34(3), 497-500.

Sun L, Fan X, Zhang L, Shi G, Aili M, Lu X, Jiang T, Zhang Y. Bone mesenchymal stem cell transplantation via four routes for the treatment of acute liver failure in rats. *International Journal of Molecular Medicine* 2014, 34, 987–996.

Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2013, 65(2), 157-170.

Tang YL, Zhao Q, Qin X, Shen L, Cheng L, Ge J, Phillips MI. Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction. *The Annals of Thoracic Surgery* 2005, 80, 229–237.

Tatsumi N, Miki R, Katsu K, Yokouchi Y. Neurturin-GFR α 2 signaling controls liver bud migration along the ductus venosus in the chick embryo. *Developmental Biology* 2007, 307, 14–28.

Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, Altman

RB. Doxorubicin pathways. *Pharmacogenetics and Genomics* 2011, 21, 440–446.

Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical Biochemistry* 1969, 27, 502–522.

Till JE, McCulloch EA. Direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiation Research* 1961, 14, 213.

Tokarska-Schlattner M, Wallimann T, Schlattner U. Alterations in myocardial energy metabolism induced by the anti-cancer drug doxorubicin. *Comptes Rendus-Biologies* 2006, 329, 657–668.

Tozer RG, Tai P, Falconer W, Ducruet T, Karabadjian A, Bounous G, Molson JH, Droge W. Cysteine-rich protein reverses weight loss in lung cancer patients receiving chemotherapy or radiotherapy. *Antioxidant & Redox Signaling* 2008, 10(2), 395-402.

Tremblay KD, Zaret KS. Distinct populations of endoderm cells converge to generate the embryonic liver bud and ventral foregut tissues. *Developmental Biology* 2005, 280, 87–99.

Uygun R, Aktas C, Tulubas F, Uygun E, Kanter M, Erboğa M, Caglar V, Topcu B, Ozen OA. Protective effects of fish omega-3 fatty acids on doxorubicin-induced testicular apoptosis and oxidative damage in rats. *Andrologia* 2013, 46(8), 917-926.

Valatas V, Kolios G, Maousou P, Xidakis C, Notas G, Ljumovic D, Kouroumalis EA. Secretion of inflammatory mediators by isolated rat Kupffer cells the effect of octreotide. *Regulatory Peptides*. 2004, 120, 215-225.

Van Poll D, Parekkadan B, Cjo CH, Berthiamue F, Nahmias Y, Tilles AW, Yarmush ML. Mesenchymal stem cell- derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration *in vitro* and *in vivo*. *Hepatology* 2008, 47(5), 1634-1643.

Varga ZV, Ferdinandy P, Liaudet L, Pacher P. Drug-induced mitochondrial dysfunction and cardiotoxicity. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2015, 309, 1453-1467.

Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, Blake J, Schwager C, Eckstein V, Ansorge W, Ho AD. Comparative characteristics of

mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Experimental Hematology* 2005, 33, 1402–1416.

Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, Fu YS, Lai MC, Chen CC. Mesenchymal stem cells in the wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* 2004, 22, 1330–1337.

Wang B, Ma Y, Kong X, Ding X, Gu H, Chu T, Ying W. NAD⁺ administration decreases doxorubicin-induced liver damage of mice by enhancing antioxidation capacity and decreasing DNA damage. *Chemico-Biological Interactions* 2014, 212, 65–71.

Wang Y, Mei X, Yuan J, Lu W, Li B, Xu D. Taurine zinc solid dispersions attenuate doxorubicin-induced hepatotoxicity and cardiotoxicity in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2015, 289, 1–11.

Wang M, Zhang X, Xiong XI, Yang Z, Li P, Wang J, Sun YU, Yang Z, Hoffman RM. Bone marrow mesenchymal stem cells reverse liver damage in a carbon tetrachloride-induced mouse model of chronic liver injury. *In vivo* 2016, 30, 187–193.

Wells JM, Melton DA. Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers. *Development* 2000, 127, 1563–1572.

Wen Y, Guo Y, Huang Z, Cai J, Wang Z. Adipose-derived mesenchymal stem cells attenuate cisplatin-induced apoptosis in epithelial ovarian cancer cells. *Molecular Medicine Reports* 2017, 16(6), 9587-9592.

Wolf MB, Baynes JW. The anti-cancer drug, doxorubicin, causes oxidant stress-induced endothelial dysfunction. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects* 2006, 1760, 267–271.

Xu L, Zheng X, Wang Y, Fan Q, Zhang M, Li R, Ye J, Wu X, Zhao W, Zhang Y. Berberine protects acute liver failure in mice through inhibiting inflammation and mitochondria-dependent apoptosis. *European Journal of Pharmacology* 2018, 819, 161–168.

Yang Q, Peng J, Guo Q, Huang J, Zhang L, Yao J, Yang F, Wang S, Xu W, Wang A, Lu S. A cartilage ECM-derived 3-D porous acellular matrix scaffold for in vivo cartilage

tissue engineering with PKH 26-labeled chondrogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 2008, 29(15), 2378-2387.

Yona S, Viukov S, Guilliams M, Misharin A. Tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* 2013, 38, 79–91.

Yuan S, Jiang T, Zheng R, Sun L, Cao G, Zhang Y. Effect of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation on acute hepatic failure in rats. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2014, 8, 1150–1158.

Zaret KS. Liver specification and early morphogenesis. *Mechanisms of Development* 2000, 92: 83–88.

Zeng W, Wang X, Xu P, Liu G, Eden H, Chen X. Molecular imaging of apoptosis: from micro to macro. *Theranostics* 2015, 5, 559-582.

Zhang X, Nakaoka T, Nishishita T, Watanabe N, Igura K, Shinomiya K, Takahashi TA, Yamashita N. Efficient adeno-associated virus-mediated gene expression in human placenta-derived mesenchymal cells. *Microbiology and Immunology* 2003, 47, 109–116.

Zhao L, Zhang B. Doxorubicin induces cardiotoxicity through upregulation of death receptors mediated apoptosis in cardiomyocytes. *Scientific Reports* 2017, 7, 44735.

Zheng S, Yang J, Tang Y, Yang J, Shao Q, Guo L, Liu Q. Effect of bone marrow mesenchymal stem cells transplantation on the serum and liver HMGB1 expression in rats with acute liver failure. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 2015, 8(12), 15985-15992.

Zhou R, Li Z, He C, Li R, Xia H, Li C, Xiao J, Chen Z. Human umbilical cord mesenchymal stem cells and derived hepatocyte-like cells exhibit similar therapeutic effects on an acute liver failure mouse model. *PLOS ONE*, 2014, 9(8), e104392.

Zorn AM, Wells JM. Molecular basis of vertebrate endoderm development. *International Review of Cytology* 2007, 259, 49-111.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering* 2001, 7, 211–228.

EKLER

Ek 1 (ADÜ-HADYЕК Kararı)



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK
KURULU
(ADÜ-HADYЕК)



Aydın, 26.Aralık. 2017

Oturum : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 2017 Yılı XII. Oturum
Sayı : 64583101/2017/129
Proje Başlığı : Doxorubisin Uygulanmış Sıçanlarda Mezenkimal Kök Hücrelerin Karaciğere Etkisi
Proje Yürütücüsü : Alpaslan GÖKÇİMEN
Proje Ekibi : Tuğba ÇELİK SAMANCI

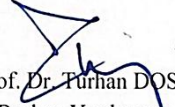
Bu çalışmanın hiçbir bölümünde:

İnsan embriyosu ve fötusu kullanılması
İnsan embriyosu ve fötusu dokularının kullanılması
Diğer insan doku ve hücrelerinin kullanılması

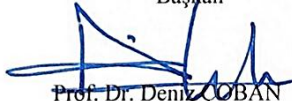
Hayvan Çalışması İnsanlarda araştırma
İnsan olmayan primatların kullanılması
Transgenik hayvanların kullanılması
Hayvanlarda genetik modifikasyon öngörülmemiştir.

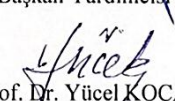
Bu çalışmanın yapılmasında etik açıdan bir sakınca bulunmamaktadır

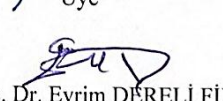

Prof. Dr. M. Dinçer BİLGİN
Başkan

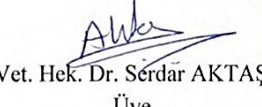

Prof. Dr. Turhan DOST
Başkan Yardımcısı

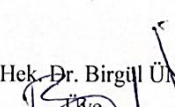

Prof. Dr. Işıl SÖNMEZ
Üye


Prof. Dr. Deniz ÇOBAN
Üye


Prof. Dr. Yücel KOCA
Üye


Doç. Dr. Evrim DEREELİ FİDAN
Üye


Vet. Hek. Dr. Serdar AKTAŞ
Üye


Vet. Hek. Dr. Birgül ÜNAL
Üye

(Toplantıya Katılmadı)
Yurdagül ALTINBAŞ
Üye

Bu rapor, sadece Adnan Menderes Üniversitesi'nde yapılacak çalışmalar için geçerlidir

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : ÇELİK SAMANCI Tuğba
Uyruk : T.C.
Doğum yeri ve tarihi : Osmangazi /19.11.1988
E-mail : tugbacelik88@hotmail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Y. Lisans	Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloj- ve Embriyoloji Anabilim Dalı	2015
Y. Lisans	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü	2012
Lisans	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2010

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2013-2019	Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Arş Gör.
2019-halen	Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloj- Embriyoloji Anabilim Dalı	Arş Gör.