T.C.
Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

SIÇANLARDA CCl_4 İLE İNDÜKLENMİŞ KARACİĞER HASARINDA NİNTEDANİBİN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Dr. Cihad ÖZÇELİK

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Zekai HALICI

ERZURUM-2025

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİ ve TEZİ İLE İLGİLİ BİLGİLER

Adı, Soyadı : Cihad ÖZÇELİK

Anabilim Dalı : Tıbbi Farmakoloji

Tez Danışmanı ve Atanma Tarihi: Prof. Dr. Zekai HALICI 13.11.2023

Sınav tarihi: 22 / 10 / 2025

Tezin Konusu ve Başlığı : Sıçanlarda CCl_4 ile İndüklenmiş Karaciğer Hasarında Nintedanib'in Etkilerinin İncelenmesi

Belirlenme Tarihi : 13.11.2023

Tezin Niteliği : ☒ Tıpta Uzmanlık Tezi
☐ Klinik Çalışmalar ( ) Prospektif ( ) Retrospektif ( ) Kesitsel
☐ Laboratuvar Çalışmaları ( ) Invitro (Cansız) Çalışmaları (x) Hayvan Çalışmaları

Tez Sınavının Nasıl Yapıldığı: ☒ Yüz yüze katılım sağlanarak ☐ Online (Jürinin teşkil edilmesinde kurum dışından belirlenecek olan jüri üyesi, aynı il sınırları içerisinde bulunmadığından, tez sınavı dijital ortamda yapılmıştır.)

II. KARAR

Tıpta ve Diş Hekimliğinde Uzmanlık Eğitimi Yönetmeliğinin 19. maddesi gereğince yapılan tez savunma sınavının tamamlanması sonucunda adı geçenin tezinin, jüri üyelerince "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak;

☒ Kabulüne

1.Tez Sınavı ☐ Reddine (Eksikliklerin tamamlanması ve gerekli düzeltmelerin yapılması için uzmanlık öğrencisine, TUEY'nin 19. Maddesinin 6. fıkrası gereğince altı aylık ek bir süre verilmesine)

2.Tez Sınavı ☐ Reddine (TUEY'nin 19. Maddesinin 7. fıkrası gereğince, uzmanlık öğrencisinin uzmanlık öğrenciliği ile ilişiğinin kesilmesine)

☒ Oy birliği ☐ Oy çokluğu ile karar verilmiştir.

III. AÇIKLAMALAR

Lütfen, tezin reddi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız

IV. JÜRİ ÜYELERİ

	Unvanı Adı Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurum Bilgisi	İmza
Jüri Başkanı	Prof. Dr. Nuri İhsan KALYONCU	Tıbbi Farmakoloji	Karadeniz Teknik Üniversitesi	
Jüri Üyesi	Prof. Dr. Mine DUMAN	Tıbbi Farmakoloji	Karadeniz Teknik Üniversitesi	
Jüri Üyesi	Prof. Dr. Zekai HALICI	Tıbbi Farmakoloji	Atatürk Üniversitesi	

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER ..... **i**
TABLOLAR DİZİNİ ..... **iii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **iv**
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **v**
TEŞEKKÜR ..... **vi**
ÖZET ..... **vii**
ABSTRACT ..... **ix**
1. GİRİŞ ve AMAÇ **1**
2. GENEL BİLGİLER **3**
2.1. Karaciğer 3
2.2. İlaç Metabolizması ve Karaciğerin Rolü 5
2.2.1. Faz 1 İlaç Reaksiyonları 5
2.2.2. Faz 2 İlaç Reaksiyonları 6
2.3. İlaca Bağlı karaciğer Hasarı 6
2.4. İlaca Bağlı Karaciğer Hasarı Modelleri 9
2.5. Transforming Growth Factor Beta 11
2.6. Nintedanib 12
3. MATERYAL ve METOT **16**
3.1. Deney Hayvanları 16
3.2. Deney Grupları 16
3.3. Kullanılan İlaçlar 17
3.4. CCl_4 ile İndüklenmiş Karaciğer Hasarı Modeli ve Deney Prosedürü 17
3.5. Biyokimyasal Analizler 18
3.5.1. ALT ve AST Ölçümü 18
3.5.2. ELİSA Analizleri 18
3.6. Moleküler Analizler 19
3.6.1. Rat Karaciğer Dokusundan RNA Ekstraksiyonu 19
3.6.2. Revers Transkriptaz Reaksiyonu ve cDNA Sentezi 19
3.6.3. Real Time PCR ile mRNA Ekspresyonlarının Kantitatif Olarak Belirlenmesi 20

3.7. Histopatolojik İncelemeler 20
3.7.1. Doku Takibi ve Hematoksilen ve Eozin Boyama Metodu 20
3.7.2. İmmünohistokimyasal Boyama Metodu 20
3.8. İstatistiksel Analiz 21
4. BULGULAR 22
4.1. Karaciğer Transaminazları Bulguları 22
4.1.1. ALT 1. Gün Bulguları 22
4.1.2. AST 1. Gün Bulguları 23
4.1.3. ALT 1. Hafta Bulguları 24
4.1.4. Aspartat Amino Transferaz (AST) 1. Hafta Bulguları 25
4.2. ELISA Bulguları 26
4.2.1. TNF-α Bulguları 26
4.2.1.1 TNF-α 1. Gün Bulguları 26
4.2.1.2. TNF-α 1. Hafta Bulguları 27
4.2.2. IL-6 ELISA Bulguları 28
4.2.2.1. IL-6 1. Gün Bulguları 28
4.2.2.2. IL-6 1. Hafta Bulguları 29
4.3. Real Time PCR Bulguları 30
4.3.1. TGF-β Ekspresyon Bulguları 30
4.3.1.1. TGF-β 1. Gün Ekspresyon Bulguları 30
4.3.1.2. TGF-β 1. Hafta Ekspresyon Bulguları 31
4.3.2. α-SMA Gen Ekpresyonu Bulguları 32
4.3.2.1. α-SMA 1. Gün Gen Ekspresyonu Bulguları 32
4.3.2.2. α-SMA 1. Hafta Gen Ekspresyonu Sonuçları 33
4.4. Histopatoloji Bulguları 34
4.4.1. Hematoksilen ve Eozin Boyama Bulguları 34
4.4.2. İmmunhistokimyasal Boyama Bulguları 35
5. TARTIŞMA 39
6. SONUÇLAR 46
KAYNAKLAR 47

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1.1. Oluşum mekanizmasına göre İlaca Bağlı Karaciğer Hasarı Nedenleri..... 7
Tablo 4.1. Histopatoloji ve immunohistokimyasal bulguların özeti 38

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. 1. Gün ALT Bulguları 22
Şekil 4.2. 1. Gün AST Bulguları 23
Şekil 4.3. 1. Hafta ALT Bulguları 24
Şekil 4.4. 1. Hafta AST Bulguları 25
Şekil 4.5. 1. Gün TNF-α ELISA Bulguları 26
Şekil 4.6. 1. Hafta TNF-α ELISA Bulguları 27
Şekil 4.7. 1. Gün IL-6 ELISA Bulguları 28
Şekil 4.8. 1. Hafta IL-6 ELİSA Bulguları 29
Şekil 4.9. TGF-β 1. Gün Göreceli mRNA Ekspresyon Bulguları 30
Şekil 4.10. TGF-β 1. Hafta Göreceli mRNA Ekspresyon Bulguları 31
Şekil 4.11. α-SMA 1. Gün Göreceli mRNA Ekspresyon Bulguları 32
Şekil 4.12. α-SMA 1. Hafta Göreceli mRNA Ekspresyon Bulguları 33
Şekil 4.13. Histopatolojik bulgular 36
Şekil 4.14. İmmünohistokimyasal bulgular 37

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALP : Alkalen Fosfotaz
ALT : Alanin Amino Transferaz
AST : Aspartat Amino Transferaz
AUC : Eğri Altında Kalan Alan
CCL3OO : Trikolorometilperoksi
CCl_4 : Karbon Tetra Klorür
Cmax : Maksimum Konsantrasyon
CYP : Sitokrom P 450
DİLİ : İlaca Bağlı Karaciğer Hasarı
ELISA : Enzyme Lynked Immunosorbent Assay
FGF : Fibroblast Büyüme Faktörü
FGFR : Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü
FLT3 : Fms Benzeri Tirozin- Protein Kinazı 3
HBV : Hepatit B Virüsü
IL-6 : İnterlökin- 6
İPF : İnterstisyel Pulmoner Fibrozis
Lck : Lenfosit Spesfik Tirozin-Protein Kinaz
NAPQI : N-asetil p benzokuinon imin
NAT : N-asetiltransferaz
PBS : Fosfat Bazlı Tampon
PDGF : Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PDGFR : Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü Reseptörü
RET : Ret Proto Onkogen
RT-PCR : Real Time- Polimer Chain Reaction
TAA : Tiyoasetamid
TGF-β : Transforme Edici Büyüme Faktörü beta
TNF-α : Tümör Nekroz Alfa
UGT : UDP-glukoronosiltransferaz
VEGF : Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VEGFR : Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü
α-SMA : Alpha Smooth Muscle Actin
β-aktin : Beta Aktin

TEŞEKKÜR

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda eğitime başladığım ilk günden beri maddi manevi her türlü desteği gösteren, gerek bilimsel hayatımda gerek de sosyal hayatımda tecrübeleri bana yol gösteren, sorduğum, danıştığım hiçbir meseleyi cevapsız bırakmayan kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Zekai HALICI hocama teşekkür ederim.

Bana hem hocalık hem de ablalık yapan, sıkıştığım, çözmeye muvaffak olamadığım her konuda ilk kapısını çaldığım kıymetli hocam Prof. Dr. Elif ÇADIRCI hocama teşekkür ederim.

Anabilim dalına geldiğim ilk günden beri çalışkanlığı ve iş disiplini ile bizlere örnek olan, bilimsel çalışmalardaki heyecanını bizlere her daim hissettiren kıymetli Rektör hocamız Prof. Dr. Ahmet HACIMÜFTÜOĞLU'na ve onun nezdinde anabilim dalımızdaki tüm hocalarımıza teşekkür ederim.

Asistanlığım süresince yüklendiğim bütün görev ve sorumlulukları birlikte paylaştığımız Dr. Taha TAVACI, Dr. Abdullah Serdar TOPATAN, Dr. Ecz. Nurullah AKGÜN, Dr. Öğr.Üyesi Hamza HALICI, Ecz. Zeynep KARAKÖY, Ecz. Emir Enis YURTGÜLÜ ve bölümdeki çömezim evdeki kıdemlim Dr. Ayşegül TAVACI ÖZÇELİK' e teşekkürü bir borç bilirim.

Tüm hayatım boyunca beni destekleyen kıymetli annem, babam ve kardeşime ayrıca teşekkür ederim. En büyük teşekkürü ise güler yüzü, anlayışı ve güzel ahlakıyla yaşamımı güzelleştiren kıymetli eşime ve varlığıyla hayatımın anlamını değiştiren, mutluluk katan canım oğluma ediyorum.

Dr. Cihad ÖZÇELİK

ÖZET

Sıçanlarda CCl_4 ile İndüklenmiş Karaciğer Hasarında Nintedanib' in Etkilerinin İncelenmesi

Amaç: Bu çalışmada karbontetraklorür (CCl_4) ile indüklenen karaciğer hasarı modelinde multiple tirozin kinaz inhibitörü ve ilaca bağlı karaciğer hasarı yan etkisi bulunan nintedanibin 3 farklı zamanda uygulanarak ortaya çıkacak olası etkinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Materyal Metod: 72 sıçan, her biri 12 hayvandan oluşan 6 gruba rastgele dağıtıldı. Sağlıklı gruba intraperitoneal 1 ml zeytinyağı, nintedanib grubuna ise oral yolla 100 mg/kg nintedanib verildi. Diğer dört gruba intraperitoneal 1 mg/kg CCl_4 ile karaciğer hasarı modeli oluşturuldu. Bu gruplardan üçüne, CCl_4 uygulamasından 12 saat önce, yarım saat önce ve 12 saat sonra tek doz oral 100 mg/kg nintedanib verildi. Her gruptaki sıçanların yarısı (n=6) CCl_4'ten 24 saat sonra, diğer yarısı (n=6) ise 1 hafta sonra sakrifiye edildi. Sakrifiye sonrası kan ve karaciğer örnekleri alındı. Serumda ALT ve AST düzeyleri; karaciğer dokusunda ELISA ile TNF-α ve IL-6, RT-PCR ile TGF-β ve α-SMA gen ekspresyonları ölçüldü. Ayrıca histopatolojik ve immünohistokimyasal incelemeler yapılarak TGF-β boyaması gerçekleştirildi.

Bulgular: 1.gün sakrifiye edilen sıçanlarda, karaciğer hasarının indüklendiği CCl_4 grubunda, serum ALT ve AST seviyeleri, doku IL-6 ve TNF-a seviyeleri ve TGF-β ile α-SMA gen ekspresyonları sağlıklı gruba kıyasla artmıştır. CCl_4 uygulamasından 12 saat önce Nintedanib verilen grupta ise bu parametreler hem sağlıklı hem de CCl_4 grubu ile kıyaslandığında da artmıştır. Bu bulgular histopatolojik değerlendirme ile de desteklenmektedir. Karaciğer hasarı oluşturulduktan 1 hafta sonra sakrifiye edilen sıçanlarda ise bu parametreler sağlıklı grupla benzer değerlerde ölçülmüştür.

Sonuçlar: 1.gün sakrifiye edilen sıçanlarda CCl_4' ten 12 saat önce nintedanib verilen gruptaki karaciğer hasarı, yalnızca CCl_4 uygulanan gruba kıyasla artmıştır. 1. Haftanın sonunda sakrifiye edilen sıçanlarda ise artmış hasar düzelmiştir. Bundan

dolayı nintedanib, ilaca bağlı karaciğer hasarı riski nedeniyle hepatotoksik ajanlarla birlikte kullanıldığında veya altta yatan karaciğer hastalığı bulunan bireylerde daha dikkatli kullanılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Nintedanib, İlaca Bağlı Karaciğer Hasarı, CCl_4, TGF-β, İnflamasyon

ABSTRACT

Investigation of the Effects of Nintedanib in Liver Damage Induced by CCl_4 in Rats

Aim: This study aims to evaluate the potential effect of administering Nintedanib, a multiple tyrosine kinase inhibitor with drug-induced liver side effects, at three different times in a carbon tetrachloride (CCl_4)-induced liver damage model.

Material and Methods: Seventy-two rats were randomly assigned to six groups, each consisting of 12 animals. The healthy group received 1 ml of olive oil intraperitoneally, while the Nintedanib group received 100 mg/kg nintedanib orally. A liver injury model was created in the other four groups using 1 mg/kg CCl_4. Three of these groups received a single dose of 100 mg/kg nintedanib 12 hours before, 30 minutes before, and 12 hours after CCl_4 administration. Half of the rats in each group (n=6) were sacrificed 24 hours after CCl_4 administration, and the other half (n=6) were sacrificed 1 week later. Blood and liver samples were collected after sacrifice. Serum ALT and AST levels were measured; TNF-α and IL-6 were measured in liver tissue by ELISA, and TGF-β and α-SMA gene expression was measured by RT-PCR. In addition, histopathological and immunohistochemical examinations were performed, and TGF-β staining was carried out.

Results: On day 1, in the CCl_4 group where liver injury was induced in sacrificed rats, serum ALT and AST levels, tissue IL-6 and TNF-α levels, and TGF-β and α-SMA gene expression were increased compared to the healthy group. In the group administered Nintedanib 12 hours prior to CCl_4 administration, these parameters increased compared to both the healthy group and the CCl_4 group. These findings are also supported by histopathological evaluation. In rats sacrificed one week after liver damage was induced, these parameters were measured at values similar to those in the healthy group.

Conclusions: Liver injury in rats sacrificed on day 1 was increased in the group given nintedanib 12 hours prior to CCl_4 administration compared to the group treated

with CCl_4 alone. The increased injury was resolved in the rats sacrificed at the end of the first week. Nintedanib should be used with caution when administered with hepatotoxic agents due to the risk of drug-induced liver injury, or in individuals with underlying liver disease.

Keywords: Nintedanib, Drug Induced Liver Injury, CCl_4, TGF-β, inflammation

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Nintedanib, antifibrotik özelliklere haiz oral tirozin kinaz inhibitörüdür. Nintedanib' in vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) reseptörlerinin inhibisyonunun yanı sıra RET(ret proto onkogen), FLT3(fms benzeri tirozin- protein kinazı 3) ve transforming growth factor (TGF-β) sinyal yolaklarının üzerinde de etkinliği bulunmaktadır(1). Ilk olarak interstisyel pulmoner fibrozis (İPF) tedavisinde kullanılmaya başlanan nintedanib, daha sonra sistemik skleroz ile ilişkili akciğer hastalığı ve progresif fenotipli kronik interstisyel fibrozis tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır(2). İlk onaylandığı yıldan bu yana kullanım miktarı oldukça artan nintedanibin yan etki profili incelendiğinde en sık olarak karşılaşılan problem diyaredir. Diyarenin dışında bulantı, nazofarenjit, öksürük, interstisyel pulmoner fibrosisin ilerlemesi gibi yan etkiler diğer sık karşılaşılan yan etkilerdir(3). Nintedanib kullanımına bağlı olarak görülen özel ilgi gerektiren yan etkilerden birisi de karaciğer enzimlerindeki artıştır(4). INPULSIS klinik deneyinde karaciğer bozukluklarındaki oran her 100 hastadan 16.2 si iken piyasaya çıktıntan sonra bu oran 7.8'e düşmüştür(5). Bu düşüşe rağmen bu yan etki önemini korumaktadır. Çünkü karaciğer enzimlerindeki artış hastalarda doz azaltılmasına neden olabildiği gibi ilacın tamamen bırakılmasına da neden olabilmektedir(6). Bu bilgilerin aksine ilginç olarak Nintedanibin karaciğer hasarı yapmasının yanında bazı karaciğer patolojilerinde ise faydalı olabileceğine dair bilgiler literatürde mevcuttur. Nintedanibin hem koruyucu hem de tedavi edici amaçla kullanıldığı bir karaciğer fibrosis çalışmasında nintedanib hem koruyucu olarak kullanıldığında hem de tedavi edici olarak kullanıldığında CCl_4 ile indüklenen karaciğer patolojisinin zayıfladığı görülmüştür (7). Bir başka çalışmada ise nintedanibin karaciğer fibrozis modelinde inflamasyonu, anjiyogenezi ve fibrozisi iyileştirdiği görülmüştür(8). Nintedanibin karaciğer üzerindeki birbirine zıt ve kafa karıştırıcı etkilerinin nedeni düşünüldüğünde başta nintedanibin etki mekanizmasını irdelememiz gerekmektedir. Burda da akla "olağan şüpheli" olarak TGF-β gelmektedir. Çünkü nintedanib TGF-β sinyal yolağını inhibe eden ilaçlardan birisidir(1). Nintedanibin TGF-β 'nın indüklediği miyofibroblast farklılaşmasını inhibe ettiği gösterilmiştir(9). Yine nintedanib A549 hücrelerinde epitelyal mezenkimal transition'ı TGF-β /Smad yolağını regüle ederek inhibe etmiştir(10) TGF-β , karaciğer gelişimi ve homeostazisinin

sürdürülmesinde önemli bir sitokindir. Bununla beraber karaciğerin akut hasarlanmasında, fibroziste, sirozda ve hatta hepatoselüler karsinom gelişiminde bile rol oynamaktadır(11). Bu hastalıkların yanı sıra bir toksisite modeli olan karbon tetraklorür (CCl_4) ile indüklenen karaciğer toksisitesi modelinde dahi TGF-β/Smad yolağı aktif hale gelmektedir(12). Gerek TGF-β' nın karaciğer fizyolojisi ve patolojilerindeki rolü gerek de nintedanibin TGF-β sinyal yolağı üzerindeki etkileri bu şüpheyi doğuran önemli nedenlerdir. Bu nedenlere ek olarak TGF-β/Smad yolağının CCl_4 ile indüklenen karaciğer toksisitesi modelinde aktif hale gelmesi olayı daha da ilginç hale getirmektedir(12).

TGF-β, neredeyse her hücre tipinde bulunan multifonksiyonel bir sitokindir(13). TGF-β embriyonik gelişimde, hücre farklılaşması ve proliferasyonunda, yara iyileşmesinde, immun sistemin regülasyonununda önemli roller oynamaktadır(14). TGF-β'nın rol oynadığı bu işler homeostazinin sürdürülmesinin yanı sıra ve birçok hastalığın gelişiminde rol oynamasını da açıklamaktadır. TGF-β 'nın rol oynadığı sistemlerden birisi de immun sistemdir(15). TGF-β, anti inflamatuvar bir sitokin olarak bilinse de aslında bifonksiyonel rol oynayan bir sitokindir(16). TGF-β kanser gelişiminin erken safhalarında tümör süpressör gibi davranırken ilerleyen dönemde kanser hücresinin gelişimi ve büyümesine aracılık edebilmektedir(17). Yapılan bir miyokart enfarktüsü çalışmasında ise TGF-β' nın erken inhibisyonunun kardiyak disfonksiyonu erken dönemde artırdığı ancak geç dönemde ise yeniden yapılanma (remodelling) oluşumunu önlediği gösterilmiştir(18). TGF-β'nın hastalıkların erken ve geç safhalarında farklı etkilerde bulunması, TGF-β hedefli tedavilerde ya da TGF-β sinyal yolağını etkileyen farmakololojik ajanların kullanımında zamanlamanın da önemli bir etken olabileceğini düşündürmektedir. Nintedanib' in karaciğer üzerine farklı etkilerini açıklayabilmek için CCl_4 ile indüklenmiş hepatotoksisite modeli uygulanmış ve TGF-β yolağı incelenmiştir.

Tüm bu bilgiler ışığında TGF-β sinyal yolağını inhibe ettiği bilinen Nintedanibi CCl_4 ile indüklenen karaciğer toksisitesi modelinde farklı zamanlarda uygulayarak karaciğer üzerindeki hasarın zamanlamadan etkilenip etkilenmediğini araştırdık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğer

İnsan vücudunun en büyük bezi karaciğer toplam ağırlığın yüzde 2.5'ini oluşturmaktadır(19). Embriyolojik hayatın 3. Haftasında ön barsaktan tomurcuklanan karaciğer bu dönemde umbilikal ven ve portal ven aracılığıyla kanlanmaktadır.

Sağ alt diyaframın tamamı ve solun ise bir kısmı karaciğer tarafından doldurulmaktadır. Karaciğer adına Glisson kapsülü dediğimiz fibröz yapıda bir kapsül tarafından sarılmaktadır. Ayrıca diyaframın yapışık olduğu alan dışında tamamen periton ile de örtülüdür(20). Karaciğere gelen kanın yüzde 75 ' i portal ven aracılığıyla yüzde 25'i se hepatik arter aracılığıyla sağlanır. Portal ven ve hepatik arterden gelen toplam kan portal triaddaki hepatik lobüle girer ve hepatik sinüzoitlerde birbirine karışır(21).

Karaciğer insan vücudunda önemli fizyolojik görevleri yerine getirmektedir. Açlık ve tokluk durumunda kan şekerinin ayarlanmasına önemli katkıda bulunmaktadır. Karaciğer vücudun glikojen deposudur. Açlık durumunda kanın normal glisemik aralıkta tutulabilmesi için karaciğer glikojeni glukoza çevirir ve kana verir. Açlık uzadığında ise bu defa başka öncüllerden glukoz sentezler ve böylelikle glukoneogenez gerçekleştirir. Tokluk durumunda ise glukozun fazlasından glikojen sentezler ve depolar(22,23). Karaciğer ayrıca lipit metabolizması ile de ilişkilidir. Trigliserit ve LDL sentezi karaciğerde gerçekleştirilmektedir(24). Bunun dışında plazma proteinleri olan albümin, gama globülinler, pıhtılaşma faktörleri ve kompleman sistemi proteinleri karaciğer tarafından sentezlenmektedir(25,26). İlaç ve ksenobiyotiklerin vücutta etkisiz hale getirilmesi ve vücuttan atılmasında karaciğer büyük bir rol oynamaktadır(27). Yağların emülsifiye edilip daha rahat sindirilebilmesi için gerekli olan safra asitleri ve protein yıkımının son ürünü olan üre sentezi de karaciğerde gerçekleştirilmektedir(28,29).

Karaciğerin eşsiz bir histolojik yapısı vardır. Bal peteğini andıran altıgen şekilli yapılara lobül denilmektedir. Her bir lobülün orta kısmında santral ven yer almakta

iken altıgenin köşelerinin orta kısmında portal ven, kenarlarında da hepatik arter ve safra kanalının bulunduğu bir triad yer almaktadır. Bu triad portal triad olarak da adlandırılmaktadır. Dalak, pankreas ve gastrointestinal trakttan gelen damarların birleşmesi ile oluşan portal ven ve hepatik arter karaciğerin kanlanmasını oluşturmaktadır. Portal ven ile hepatik arterden santral vene doğru kan akışı gerçekleşirken safra kanalındaki akış ters yöne doğru gerçekleşmektedir. Hepatositler gerek kan akımının olduğu boşluğu gerek de safra kanalının olduğu boşlukları döşemektedir(30,31). Portal alandan santral vene doğru ilerledikçe hepatositlerin gerçekleştirdiği reaksiyonların yoğunluğu değişkenlik göstermektedir. Bu farklılık da karaciğerin metabolik zonlara ayrılmasına neden olmuştur. Portal tarafa yakın olan kısım zon 1 santral vene yakın olan kısım zon 3 ve ikisinin arasında kalan orta kısım ise zon 2 olarak adlandırılmaktadır(32). Lobüllerin portal triada yakın olan kısımlarında glukoneogenez, beta oksidayon, kolesterol sentezi gibi reaksiyonlar daha fazla yapılıyor iken, santral ven tarafında ise glikoliz, lipogenez, safra asidi sentezi gibi reaksiyonlar daha fazla gerçekleştirilmektedir(32,33). Karaciğerin önemli işlevlerinden birisi olan ilaçların ve diğer ksenobiyotiklerin metabolizmasında da farklı zonlar dahil olabilmektedir. Normalde ilaç metabolizmasında önemli rol oynayan sitokrom P 450 (CYP) enzimleri daha çok perisantral alanda yani daha çok Zon 3 te yer almaktadır(34). Hatta karaciğer toksisitesinin en sık nedenlerinden birisi olan parasetamol toksisitesinde perisantral hasar görülmektedir(35). Ancak hepatotoksik yan etkiye sahip bir başka ilaç doksorubisin ise periportal hasara neden olmaktadır(36). Karaciğerin ilaç metabolizmasındaki hayati rolü olası ilaç toksisitelerinde karaciğeri bu hasara karşı duyarlı hale getirmektedir. Deneysel hasar modellerinde sık olarak kullanılan CCl_4 ve gerek klinikte gerek de karşımıza hepatotoksik olarak çıkan alkol de yine perisantral hasara neden olmaktadır(37,38). Karaciğerin ilaç metabolizması ve ilaç atılımında hayati rol oynaması, diğer metabolizma merkezlerine uğramadan portal ven aracılığıyla karaciğere daha fazla miktarda ilacın uğraması gibi nedenler de ilaca bağlı organ hasarı açısından karaciğeri en olağan şüpheliler arasına sokmaktadır(39).

2.2. İlaç Metabolizması ve Karaciğerin Rolü

İlaçlar ksenobiyotik olarak da adlandırılan vücut için yabancı bileşiklerdir. Vücut kendisine yabancı olan ve büyük olasılıkla zararlı olabilecek bu bileşikleri zararsız hale getirmek ve vücuttan kolay atılabilir bileşiklere dönüştürmek ister. Bu dönüşüm ilaç metabolizması ile gerçekleştirilmeye çalışılır. Yani ilaç metabolizması bir nevi detoksifikasyon işlemidir. İlaç metabolizması ile genellikle lipofilik özelliğe sahip ilaçlar kolay atılabilir hidrofilik bileşiklere dönüştürülür(40). İlaç metabolizması 2 faz olarak gerçekleştirilir.

2.2.1. Faz 1 İlaç Reaksiyonları

En iyi bilinen metabolizma enzimleri CYP enzimleridir. Bu enzimler genellikle oksidaz, redüktaz ve hidrolaz aktivitelerine sahiptirler(27). CYP enzimleri genellikle hepatositlerin düz endoplazmik retikulumu ve mitokondrileri ile ince barsak epitelinde bulunurlar. Daha az olarak da böbreklerde proksimal tübülde bulunmaktadırlar(41). İnsan genom projesinde 18 aileden oluşan 57 farklı gen sekanslanmıştır(42). CYP genleri kendi içinde endojen CYP ailesi ve ksenobiyotik CYP ailesi olarak da ikiye ayrılmıştır. Endojen CYP'ler vücutta sentezlenmiş bileşikler olan steroidler, prostoglandinler, safra asitleri ve doymamış yağ asitlerinin metabolizmasında da görev almaktadırlar(43). CYP3A4 insan karaciğerinde en çok bulunan CYP enzimidir. CYP3A4 enzimi karaciğerdeki tüm CYP enzimlerinin %35' ini oluşturur. İlaçların yaklaşık % 52 sinin metabolizmasına ise dahil olur(44). CYP2E1 ve CYP2CP ise sırasıyla en çok bulunan diğer enzimlerdir(45). Her ne kadar ilaç metabolizmasının amacı ilaçları hidrofilik hale getirerek daha zararsız ve daha kolay atılabilir bileşiklere dönüştürmek olsa da bazen daha zararlı bileşiklerin ya da farmakolojik olarak aktif bileşiklerin oluşmasına yol açabilirler. Örneğin parasetamol CYP2E1 tarafından metabolize edilir. Bu reaksiyon sırasında N asetil p benzokuinon imin (NAPQI) oluşur(46). Oluşan bu metabolit normal şartlar altında hepatik glutatyonlar aracılığıyla hızlı bir şekilde konjuge edilir ve idrarla atılır. Ancak yüksek doz parasetamol alınması durumunda hepatik glutatyonlar tükenir ve sonrasında konjuge edilmeden kalan NAPQI sülfhidril gruplar aracılığıyla DNA ve proteinlere bağlanır ve hepatotoksisitenin oluşmasına neden olur(47).

2.2.2. Faz 2 İlaç Reaksiyonları

Faz 2 reaksiyonlarda genelde faz 1 reaksiyon ile oluşan metabolit ya da bazen ilacın kendisi, endojen hidrofilik bir madde ile enzimatik olarak konjuge edilir. En sık kullanılan faz 2 enzimleri UDP-glukoronosiltransferaz (UGT), sülfotransferaz, N-asetiltransferaz (NAT) ve katekol O-metiltransferaz'dır. UGT yalnızca ilaçların konjugasyonuna katkıda bulunmaz. UGT' nin bir alt tipi olan UGT1A1 bilirubinin konjugasyonundan sorumludur. Yenidoğanda bu enzimin tam eksikliği Crigler-Najjar sendromu ile ilişkilidir(48). Hafif eksikliği ise Gilbert sendromu ile ilişkilendirilmiştir(49).

2.3. İlaca Bağlı karaciğer Hasarı

İlaca bağlı karaciğer hasarı (DİLİ) bazı ilaçların toksik dozlarında bazılarının ise normal önerilen dozda alınmasına rağmen karşımıza çıkan istenmeyen ilaç reaksiyonudur(39). DİLİ batılı ülkelerde akut karaciğer yetmezliğinin en sık nedenini oluşturmaktadır ve bu haliyle toplam vakaların yarısından fazlasını oluşturmaktadır(50,51). DİLİ'nin gerçek insidansını tespit etmek oldukça zordur. Çünkü dünyadaki kültürler, sağlık sistemlerinin yeterliliği ve tutarlı bir kayıt sistemi varlığı ülkelerden ülkelere farklılık göstermektedir(39). Ayrıca karaciğer hasarına sebebiyet veren etiyolojik ajanlar da bölgeden bölgeye değişmektedir. Örneğin Güney Kore' de yapılmış prospektif bir çalışmada DİLİ insidansı 12/100.000 olarak bulunmuştur. Etiyolojinin en sık sebebi ise yüzde 72 gibi yüksek bir oranla geleneksel ve bitkisel ilaçlar tarafından oluşturmuştur(52). Avrupa' da ise insidans oranı Güney Kore'deki orana yakın olsa da en sık neden farklılık göstermektedir. Popülasyon temelli prospektif olarak yapılan iki çalışmada insidans oranı sırasıyla Fransa'da kabaca 14/100.000 ve İzlanda'da kabaca 19/100.000 bulunmuştur(53,54). Etiyolojik en sık neden ise gerek Fransa ve İzlanda'da yapılan iki çalışmada gerek de kohort yöntemi ile yapılan iki farklı çalışmada amoksisilin-klavulonik asit bulunmuştur(55,56). Sahra altı Afrikası ve az gelişmiş ülkelerde ise geleneksek ilaçlar farmakolojik tedavinin büyük bir kısmını oluşturmaktadır. İlaca bağlı hepatotoksisite verisi az olmakla birlikte çoğunlukla anti tüberkülöz ilaçlar ve anti HIV ilaçlar genellikle hepatotoksisite ile ilişkilendirilmektedir(57).

DİLİ genelde direkt (ya da intrinsik) ve idiyosinkratik olmak üzere iki farklı şekilde sınıflandırılmaktadır. Ancak son zamanlarda indirekt hepatotoksisite üçüncü bir sınıf olarak ortaya çıkmaktadır(58). DİLİ' ye neden olan bazı ilaçlar aşağıdaki tabloda özetlenmiştir.

Tablo 1.1. Oluşum mekanizmasına göre ilaca bağlı karaciğer hasarı nedenleri

Direkt Hepatotoksisite	**İdiyosinkratik Hepatotoksiste**	**İndirekt Hepatotoksisite**
Yüksek doz parasetamol	Amoksisilin-Klavulonik Asit	Antineoplastik ilaçlar
Niasin	Sefalosporinler	Glukokortikoidler
Aspirin	İzoniazid	Monoklonal Antikorlar
İV Amiodaron	Nitrofurantoin	Protein kinaz inhibitörleri
İV Metotreksat	Minosiklin	
Kanser Kemoterapisi	Florokinolonlar	

Direkt hepatotoksisite ilacın kimyasal özelliğine bağlı olarak gelişen karaciğer hasarıdır. Öngörülebilir, deney hayvanlarında tekrar edilebilir ve doz bağımlıdır. Genelde bu ilaçlar için bir eşik dozu vardır. Bu dozun aşılması durumunda karaciğer hasarı gerçekleşir(59). Bu tip karaciğer hasarında latent periyot kısadır. 1- 5 günde toksisite kendisini gösterir. Kazara ya da bilerek yüksek doz alanlar, yüksek terapötik ya da supraterapötik dozda ilaç alanlarda bu hasar gözlenir(58).

Direkt hepatotoksisitenin klinikte en iyi bilinen örneği paresetamoldür. Parasetamol dünyada analjezik ve antipiretik olarak en sık kullanılan ilaçlardan birisidir(60). Parasetamol yüksek dozlarda alındığında çok ciddi karaciğer hasarına, karaciğer yetmezliğine hatta ölüme yol açabilir(61). Direkt DİLİ olan hastalarda alanin amino transferaz(ALT) ve aspartat amino transferaz (AST) seviyeleri çok yüksek seviyelere çıkarken alkalen fosfataz(ALP) seviylerindeki artış minimaldir. Akut karaciğer yetmezliği gelişen hastalalarda koagülopati, ensefalopati ve hiperamonyemi gibi bulgular görülebilir(50,62). Toksisiteye neden olan ilaç

kesildiğinde yüksek seviyelere çıkan serum transaminaz değerleri yeniden eski haline döner. Bu olaya da adaptasyon denir(63). Bazı hastalarda ise adaptasyon gerçekleşmez ve hastanın laboratuvar bulguları ve kliniği daha da kötüleşebilir. Adaptasyonu sağlayan mekanizma tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak ilaç metabolize eden enzimlerin değişen aktivitesinden, karaciğeri koruyan yolakların aktive ya da deaktive olması gibi durumların adaptasyonu etkilediği düşünülmektedir(58).

Histolojik olarak da hafif inflamasyonla sentrilobüler ya da panlobüler nekroz izlenir. Hepatik nekroz fatal sonuçlanabileceği gibi tıpkı serum transaminazlarına benzer şekilde iyileşerek de sonuçlanabilir. Parasetamol dışında aspirin, amiodaron, niasin gibi ilaçlarda akut hepatik nekroza yol açabilir(50,64,65). Alkol alımı, açlık, başka ilaçlarla beraber kullanma ve var olan karaciğer hastalığının olması parasetamol toksisitesinin eşiğini düşürebilir(39).

İdyosenkratik DİLİ, belirgin bir intrinsik toksisiteye sahip olmayan ya da toksik etkisi çok düşük olan bazı ilaç ve ajanların, çoğunlukla 2.000 ile 100.000 hasta maruziyeti başına bir vaka gibi oldukça düşük sıklıkta karaciğer hasarına yol açtığı, öngörülemeyen ve bireysel yatkınlığa bağlı gelişen bir durumdur(54,66). İntrinsik türün aksine, idiyosinkratik DİLİ öngörülemez ve hayvan deneylerinde terkrarlanamaz. Ayrıca latent süresi de daha uzundur(39). Amoksisilin-klavulonik asit idiyosinkratik DİLİ'nin en sık nedenidir ve kabaca insidansı 1/2500' dür(54). Yüksek doz ya da toksik dozlarda değil günlük 50 mg-100 mg gibi dozlarda ortaya çıkmaktadır(67). İdiyosinkratik DİLİ' nin hangi hastada ve neden ortaya çıktığı tam olarak aydınlatılamamıştır. Örneğin pediatrik hastalar valproik asit hepatotoksisitesine daha duyarlı iken; yaşlı hastalar amoksisilin-klavulonik asit ve izoniazid toksisitesine daha duyarlıdır(68). Diğer yandan cinsiyet farklılığı da önemli bir faktör olabilir. Kadınlar nitrofurantoin, diklofenak gibi ilaçlarla daha sık ve DİLİ yaşar iken erkekler anabolik steroidler ve azotiyoprine daha duyarlıdır(68–70).

İdiyosinkratik DİLİ hepatoselüler, kolestatik ve karışık (mixed) olmak üzere 3 farklı şekilde oluşmaktadır. Hasarın hangi türe ait olduğu R oranına göre belirlenir(71). R oranı (ALT/ALT'nin Normal Üst Sınırı) / ALP/ ALP' nin Normal Üst Sınırı) ile

hesaplanır. Eğer R oranı <5 ise hepatoselüler, 2 ile 5 arasındaysa karışık, <2 ise kolestatik olarak sınıflandırılır.

İndirekt hepatotoksisite ilacın kimyasal ya da immunojenik özelliklerine göre gerçekleşmez. Burada hasar ilacın etkisinden kaynaklanmaktadır. Genelde altta yatan bir hastalık vardır. İndirekt hasar yeni tanımlanmış olmasına rağmen henüz tam anlamıyla hepatotoksisite kategorisine dahil edilmemiştir. Yine de klinik özellikler bakımından farklılık göstermektedir(58). Hasarın fenotipi altta yatan hastalığa da bağlıdır. Yağlı karaciğer hastalığı, risperidon ve haloperidol gibi ilaçların kilo alımı etkisine bağlı gerçekleşebilir(72). Anti kanser ilaçlar, akut Hepatit B' nin reaktivasyonuna neden olarak dolaylı yoldan karaciğer hasarına yol açarlar. HIV tedavisinde kullanılan antiretroviral ilaçlar da immun yanıtı artırarak Hepatit C' nin alevlenmesine yol açabilirler. Günümüzde kullanımı giderek daha da yaygınlaşan immun modülatörler, TNF-α antagonistleri ve immun check point inhibitörleri indirekt karaciğer hasarının son zamanlarda dikkat çeken nedenlerini oluşturmaktadır(73–76).

2.4. İlaca Bağlı Karaciğer Hasarı Modelleri

DİLİ yalnızca hastaları değil; hekimleri ve ilaç üreten firmaları da etkileyen büyük bir problemdir. Hekimler için hem tanı koyma hem de tedavi etme de bazı zorluklar bulunmaktadır(77). İlaç firmaları açısından ise piyasaya çıktıktan sonra en sık geri toplama nedeni hepatotoksisite yani ilaca bağlı karaciğer hasarıdır(78). Sağlık sistemlerinin neredeyse tüm paydaşlarını etkileyen bir problem olmasından dolayı, DİLİ'nin patofizyolojisinin aydınlatılması gerekmektedir. Bu bağlamda in vitro ve in vivo olarak bazı modeller bulunmaktadır ancak öne sürülen in vitro modeller diğer organların etkilerini gösterememesi ve immun yanıtın eksikliği gibi nedenlerden dolayı in vivo modellerinin yerini alamamaktadır(79).

Çalışmalarda DİLİ oluşturmak için parasetamol, CCl_4, tiyoasetamid(TAA), furosemit, bromobenzen ve etil alkol gibi kimyasallar kullanılmaktadır. Bunlar arasında klinikte en sık kullanılan iki madde parasetamol ve CCl_4' tür(79).

DİLİ modeli oluşturmak için en sık kullanılan ayrıca klinik olarak da en ilintili ilaç parasetamoldür(80). Parasetamol CYP enzimleri tarafında katalize edilen bir reaksiyonla NAPQI' ye dönüştürülür. Oluşan NAPQI hepatik glutatyonlar tarafından hızlı bir şekilde bağlanır. Ancak yüksek doz parasetamol uygulaması sonrası fazlaca oluşan NAPQI bu defa glutatyonları tüketir ve DNA ve proteinlere kovalent şekilde bağlanarak toksisiteye yol açar(47).

Fareler parasetamol toksisitesi için en sık tercih edilen ve klinik uygunluğu en fazla olan deney hayvanı türüdür(81). Hem insanlarda hem de farelerde parasetamol toksisitesi oluşturmak için gereken doz aynıdır(81). Ayrıca her iki türde de toksisitenin gelişim mekanizması oldukça benzerdir(80). Her ne kadar insan ve farelerdeki toksisitenin gelişimi benzer olsa da tamamen aynı değildir. Örneğin toksiste farelerde 12-24 saat gibi sürelerde gelişirken insanlarda bu süre 24-72 saati bulmaktadır(82,83). Model 12-16 saat aç bırakılmış farelere 200-300 mg/kg dozunda parasetamol verilerek oluşturulur. Aç bırakmanın amacı beslenme durumuna bağlı hepatik glutatyon seviyelerindeki değişimin azaltılmasıdır(84). Parasetamol verildikten sonra farelerin yiyeceğe ulaşımı sağlanmalıdır. Deneyin sonlandırılma zamanı ise deneyin hedefine bağlıdır. Metabolizma ile alakalı şeyler araştırılıyorsa 2. Saatte, intrinsik ölüm yolakları için 4. Saatte, inflamasyon ve immun aracılı cevap araştırılıyorsa 6, 12 veya 24. Saatte deney sonlandırılabilir(85).

CCl_4 bir ilaç olmamasına rağmen yüksek dozlarda verildiğinde (1 mg/kg ve üstü dozlar) akut karaciğer hasarına yol açmaktadır. Parasetamolden sonra en sık kullanılan ksenobiyotikle indüklenen karaciğer hasarı modeli CCl_4 ile oluşturulan modeldir(86). Karaciğer toksisitesi, CYP 450 enzim sistemi tarafından gerçekleştirilen reaksiyonla oluşan reaktif metaboliti CCl_3 ' e bağlı gelişmektedir(87). Oluşan CCl_3; protein, lipit ve nükleik asitleri alkillemekte ve sonuç olarak protein sentezini azaltmakta, steatoza yol açmakta ve kalsiyum metabolizmasını değiştirmektedir(86). Ayrıca CCl3, oksijenle reaksiyona girerek trikolorometilperoksi (CCl3OO) radikali oluşturur. Bu radikal de doymamış çoklu yağ asitlerinden hidrojeni çıkartır ve lipit peroksidasyonunu denilen reaksiyonu başlatır. Hem alkilleme hem de lipit peroksidasyonu CCl_4 hepatotoksisitesi için gereklidir(86). Ayrıca CCl_4, mitokondriyal DNA hasarına yol açarak da hepatoksisiteye neden olur(88).

Sıçanlar CCl_4 hepatotoksisite çalışmaları için en iyi deney hayvanlarıdır. CCl_4 hem sıçan hem de insanlarda düşük oranda metabolize edilmektedir.(89). Bu iki türün CCl_4 toksisitesinde bir diğer benzer özelliği ise histopatolojileridir(90).

CCl_4 toksisite modelini parasetamol toksisitesinden ayıran en önemli özellik bu modelin kronik karaciğer hastalıkları modelinde de kullanılabilmesidir. 2- 4 hafta boyunca haftada iki defa düşük doz CCl_4 uygulaması persistan karaciğer inflamasyonuna ve sonuç olarak da fibrozise yol açmaktadır. Bu da alkolik karaciğer hastalığı ya da yağlı karaciğer hastalığı gibi kronik karaciğer hastalıklarının modeli olarak uygun ajanlar arasına CCl_4' ü sokmaktadır. Ayrıca bileşimleri tam olarak bilinmeyen bitki ekstraktları kronik CCl_4 modellerinde kullanılarak CYP enzim sistemi üzerindeki olası etkilerinin anlaşılması test edilebilmektedir(91).

TAA ise 100 mg/kg ve üzeri dozlarda karaciğer toksisitesine yol açmaktadır. Bu etkisini hem fare hem de sıçanlarda göstermektedir. TAA, CYP enzim sistemi tarafından TAA S-oksit ve S,S dioksit metabolitlerine çevrilmektedir. S,S dioksit metaboliti lipit ve proteinlere bağlanarak toksisiteyi başlatmaktadır(92–94).

2.5. Transforming Growth Factor Beta

TGF-β, birçok farklı hücre tipinde bulunan ve bağlama bağlı olarak farklı fonksiyonlar gösteren önemli bir sitokindir. Hücrelerin hayatta kalması, çoğalması, farklılaşması, adezyon ve migrasyon gibi temel biyolojik süreçlerin yanı sıra hücre ölümünün de düzenlenmesinde TGF-β önemli rol oynar. Bu nedenle, TGF-β sinyal yolunun düzgün işleyişi organizmanın homeostazisini korumak açısından kritik öneme sahiptir (13). TGF-β' nın toplamda 5 farklı izoformu olmakla birlikte bunlardan TGFβ1, TGFβ2 ve TGFβ3 memelilerde bulunmaktadır(95). Ayrıca TGF-β' nın TGFβR1, TGFβR2, TGFβR3 olmak üzere üç tane reseptörü bulunmaktadır. TGF-β, reseptörüne bağlandıktan sonra SMAD proteinleri aracılığıyla serin rezidüleri üzerinden fosforile edilerek aşağı doğru ileti iletilir. Bu TGF-β' nın kanonik yolakla sinyal iletimidir. TGF-β' nın PI3K, Rho gibi SMAD dışı proteinlerle gerçekleştirdiği sinyal iletimine ise kanonik olmayan sinyal iletimi denilmektedir(96). TGF-β sinyal yolağı, inflamasyonun regülasyonu için oldukça hayatidir. TGF-β1 null farede yapılan

çalışmada sütten kesildikten sonra multifokal inflamatuvar sendrom gelişmiştir(97). Kanserde TGF-β, bir yandan tümör süpresör işlevi gösterirken, diğer yandan tümör gelişimini ve ilerlemesini teşvik edebilmektedir (98,99).

TGF-β, karaciğer hastalıklarının gelişiminde de önemli rol oynamaktadır. Karaciğerin dünya genelindeki en sık görülen rahatsızlıklarından birisi olan nonalkolik yağlı karaciğer hastalığında immun hücrelerin infiltrasyonu ve karaciğer makrofajı kuppfer hücrelerinin aktivasyonu gerçekleşmektedir. Hem infiltre olan immun hücrelerinde hem de aktive olan kuppfer hücrelerinde TGF-β ekspresyonları artmıştır(100–102). Ayrıca karaciğer rejenerasyonu için elzem olan TGF-β sinyalinin nonalkolik yağlı karaciğer hastalığında düzgün çalışmadığı görülmüştür(103).

TGF-β'nın karaciğer toksisite modelleri ile de ilişkisi bulunmaktadır. Sıçanlarda yapılan karaciğer toksisitesi modelinde TGF-β gen ekspresyonu toksisite gruplarında artarken tedavinin başarılı olduğu gruplarda toksisite grubuna kıyasla azalmaktadır(104). CCl_4 ile yapılan akut karaciğer toksisitesi çalışmasında ise TGF-β seviyesi 1. 3. Ve 5. Günde sakrifiye edilen sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla hala yüksek olduğu görülmektedir(12).

2.6. Nintedanib

Nintedanib, antifibrotik özelliklere sahip oral olarak uygulanan tirozin kinaz inhibitörü bir ilaçtır. Nintedanibin interstisyel pulmoner fibrosis, sistemik sklerozla ilişkili interstisyel akciğer hastalığı ve diğer progresif fenotipli kronik interstisyel akciğer hastalıklarının tedavisinde onaylanmıştır(1). Küçük bir molekül olan nintedanib, kinazların ATP bağlayan cebine geri dönüşümlü ve yarışmacı olarak bağlanır ve bu şekilde hücre içine sinyal iletilmesini engeller(105). Nintedanib; VEGF reseptörü (VEGFR) 1-3, PDGF reseptörü (PDGFR) alfa ve beta ile FGF reseptörü (FGFR) 1-3 ' ü inhibe etmektedir. Nintedanib non tirozin kinaz reseptörlerini de inhibe etmektedir. Bunlar arasında FLT3, RET ve SRC ailesinin üyelerinden Lck (lenfosit spesfik tirozin- protein kinaz), Lyn (tirozin- protein kinaz lyn) ve Src (proto- onkogen tirozin protein kinaz src) yer almaktadır(105). VEGF, PDGF ve FGF ve reseptörleri profibrotik özelliklere sahip faktörlerdir. Bu faktörler akciğerdeki fibroblastların

proliferasyonuna katkıda bulunmaktadır ve sonuç olarak interstisyel akciğer fibrozisinin patogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir(106). Nintedanibin etki ettiği non tirozin kinaz reseptörlerden Src ailesi de İPF gelişiminde rol oynayan diğer reseptör ailelerinden birisidir(107).

Nintedanibin fibrozis ile ilişkili faktör ve sitokinlere olan etkisi bunlarla da sınırlı değildir. TGF-β, fibrotik hastalıklarda merkez rol oynayan sitokinlerden birisidir(108). Nintedanib, İPF hastalarından alınan örneklerde akciğer fibroblastlarındaki TGF-β ile indüklenen kollajen sentezini inhibe etmektedir(109). Aynı şekilde nintedanib İPF hastalarından alınan örneklerde fibroblastların miyofibroblastlara dönüşümünü inhibe etmektedir(110).

Nintedanib oral olarak alındıktan sonra maksimum konsantrasyona (Cmax) 2-4 saatte ulaşır(111). İlacın biyoyararlanımı yaklaşık olarak yüzde 5' tir(112). Nintedanib metabolitleri ile beraber değerlendirildiği zaman ise biyoyararlanım yüzde 23' e çıkmaktadır. Bu da bizlere ilacın ilk geçiş etkisine uğradığını düşündürmektedir(113). İlaç fazla yağ içeren yüksek kalorili bir diyet ile alındığında nintedanib maruziyeti artmaktadır ve buna bağlı olarak da Cmax ve eğri altında kalan alan (AUC) yaklaşık yüzde 15 artmaktadır(114). İlacın Tmax' a ulaşma süresi yaklaşık 2 saat gecikmektedir ve nintedanibin gastrointestinal toleransı artırmak amacıyla yiyecek ile alınması önerilmektedir(114). Nintedanib konsantrasyonu kararlı hale 7 günde gelmektedir(115) (112).

Dolaşıma geçen nintedanibin yüzde 98 ' i proteinlerle taşınır. İlacın bağlandığı majör kan proteini ise albümindir(114). 6 mg intravenöz nintedanib uygulamasını takiben dağılım hacminin oldukça yüksek olduğu görülmüştür(112). (gMean 1050 L). Bu da nintedanibin periferal dokulara kapsamlı bir şekilde dağıldığını göstermektedir. Nintedanib daha çok plazmada dağılım gösterir ve kan/ plazma oranı 0,87' dir(114).

Nintedanib çoğunlukla hidrolitik esterazlar aracılığıyla metabolize olmaktadır. Nintedanibin hidrolitik esterazlar aracılığıyla oluşan metaboliti BIBF1202' dir. Bu molekül daha sonrasında glukoronidasyona uğrar ve BIBF1202 glukoronit oluşur.

Glukoronidasyonda başrol oynayan enzim ise UGT enzimleridir. İlacın CYP enzimleri ile metabolizması oldukça azdır. Burada daha dominant olan CYP enzimi ise CYP3A4‘ tür. Nintedanibin CYP enzimleri ile çok az kısmının metabolize olması bize CYP enzimlerini indükleyen ya da inhibe eden ilaçlarla olası etkileşiminin minimal olabileceğini düşündürmektedir(114). İlaç karaciğerde metabolize edildikten sonra safra yoluyla barsaklara atılır ve feçes yolu ile vücuttan atılır. İdrarda çok az miktarda nintedanib tespit edilebilir ancak bu miktar ihmal edilebilir düzeydedir(114).

Gastrointestinal yan etkiler klinik çalışmalarda ve global farmakovijilans veritabanlarında en sık bildirilen yan etkilerdir. Diyare 301.6/1000 insidansa sahipti ancak bunların büyük çoğunluğu ciddi olmayan vakalardı(116). Diyare destekleyici sıvı tedavisi ve loperamid gibi andiyareik ilaçlarla tedavi edilmelidir. Destekleyici tedavi ve antidiyareik ilaçlara rağmen hastada düzelme izlenmezse doz azaltılabilir ya da nintedanib tedavisine ara verilmesi gerekebilir. Bulantı kusma da sıklıkla karşılaşılan yan etkilerdendir. Genelde hastalar hafif ya da orta şiddetli bulantı kusma şikayeti ile başvururlar. Hastalar da yeterli destekleyici tedavi ile birlikte gereklilik halinde antiemetik ilaçlarla tedavi edilmelidir(117). Uygun destekleyici tedavi şikayetlerin gerilemesi için yeterli olmazsa tedaviye doz azaltarak devam edilebilir. Yine sonuç alınmazsa tedaviye ara verilmelidir(117).

DİLİ, nintedanib kullanımına bağlı sık olmayan bir yan etkisidir. Global farmakovijilans veritabanına göre nintedanibe bağlı karaciğer hasarı yıllık insidansı 31.5/1000 hastadır(116). Karaciğer enzimlerindeki yükselmeler görülebilir ancak doz azaltılmasıyla ya da ilacın kesilmesi ile geri döndürülebilir(117). Genel olarak önerilen karaciğer transaminazlarından ALT ve AST seviyeleri normalin 3 katından daha fazla artarsa doz azaltılmalı ya da ilaca ara verilmelidir. Karaciğer enzimlerindeki artış sarılık gibi klinik belirti ile ilişkilendirilirse ilaç tamamen kesilmelidir(117). Bazı hastalar nintedanibe bağlı karaciğer hasarı açısından daha yüksek risk altındadır. Bu hastalar; kadınlar, Asyalı hastalar ve vücut yüzey alanı düşük insanlardır(118). Nintedanibin karaciğer üzerindeki bu yan etkisinden dolayı, nintedanib kullanacak hastaların tedavi başlamadan önce ve tedaviden sonraki ilk ay ALT, AST ve bilirubin değerleri ölçülmelidir. Sonraki iki ayda ve sonrasında da bu takip periyodik olarak yapılmalıdır(3).

İlacın VEGF inhibisyonu yapmasından dolayı kanama yan etkisi de görülebilir. Ancak global farmakovijilans veritabanına göre kanama yan etkisinin yıllık insidansı 36.8/1000'dir. Vakaların çoğu ciddi olmayan kanamalardır ve en sık karşılaşılan kanama tipi burun kanamalarıdır(116). Arteryel tromboembolik olaylar da sık olmayan şekilde görülen yan etkiler arasındadır. Hastalarda akut miyokard iskemisinin semptom ya da bulguları olması durumunda tedaviye ara verilmesi düşünülmelidir(117).

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Deney Hayvanları

250-300 gram ağırlığındaki Wistar Albino cinsi 72 adet erkek sıçan Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM)' den temin edilmiştir. Sıçanlar 22 ± 1 °C oda sıcaklığı, %50-%60 oranında nem miktarı bulunan altlarında temiz talaş bulunan kafeslerde barındırılmıştır. Barınma süreleri boyunca deney prosedürünün gerekliliği bulunduğu zamanlar dışında musluk suyu ve pelet yem ile beslenmiştir. Bu beslenme *ad libitum* olarak sağlanmıştır. Çalışma etik onayı Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK) tarafından verilmiştir.(Toplantı Tarihi: 20.11.2023; Toplantı Sayısı 2023/13; Karar No: 202)

3.2. Deney Grupları

Deneye dahil edilen sıçanlar basit randomizasyon yöntemi ile rastgele, eşit şansla ve bir önceki atamadan bağımsız şekilde gruplara dağıtıldı. Her bir gruba 12 adet sıçan dahil edilmiş olup kendi içinde altışar sıçandan oluşan 2 gruba ayrılmıştır. Her gruptan 6 sıçan (n=6) 1.günün sonunda kalan 6 sıçan (n=6) 1.haftanın sonunda sakrifiye edilmiştir. Deney grupları aşağıdaki gibi belirlenmiştir.

- Grup 1a Sağlıklı 1.gün
- Grup 1b Sağlıklı 1.hafta
- Grup 2a Nintedanib 100 mg/kg 1.gün
- Grup 2b Nintedanib 100 mg/kg 1.hafta
- Grup 3a CCl_4 1.gün
- Grup 3b CCl_4 1.hafta
- Grup 4a CCl_4 + Nintedanib 100 mg/kg(Nintedanib CCl_4 uygulamasından 12 saat önce verilmiştir.) 1.gün
- Grup 4b CCl_4 + Nintedanib 100 mg/kg(Nintedanib CCl_4 uygulamasından 12 saat önce verilmiştir.) 1.hafta
- Grup 5a CCl_4 + Nintedanib 100 mg/kg (Nintedanib CCl_4 uygulamasından yarım saat önce verilmiştir.) 1.gün

- Grup 5b CCl_4 + Nintedanib 100 mg/kg (Nintedanib CCl_4 uygulamasından yarım saat önce verilmiştir.) 1.hafta
- Grup 6a CCl_4 + Nintedanib 100 mg/kg (Nintedanib CCl_4 uygulamasından 12 saat sonra verilmiştir.) 1.gün
- Grup 6b CCl_4 + Nintedanib 100 mg/kg (Nintedanib CCl_4 uygulamasından 12 saat sonra verilmiştir.) 1.hafta

3.3. Kullanılan İlaçlar

Ksilazin (Ankara, Türkiye, Xylasinbio, İntermed eczadeposu Ltd.Şti.): Sıçanlarda anestezi uygulaması yapmak için 10 mg/kg dozunda ksilazin 100 mg/kg ketamin ile karıştırılarak intraperitoneal olarak verilmiştir.

Ketamin (İstanbul, Türkiye, Ketalar, Pfizer): İntraperitoneal olarak anestezi için 100 mg/kg dozda, 10 mg/kg ksilazin ile kombine olarak verildi.

Karbon Tetra Klorür (CCl_4) (J.T. Baker, Deventer, Hollanda): Hepatotoksisite modeli oluşturmak için zeytinyağında çözülen CCl_4 1 mg/kg dozunda intraperitoneal olarak uygulandı.

Ofev 150 mg 60 yumuşak Kapsül (Boehringer İngelheim İlaç Ticaret Aş.) 100mg/ kg dozundaki nintedanib salin yardımıyla hacmi 1ml'ye tamamlanarak verildi.

3.4. CCl_4 ile İndüklenmiş Karaciğer Hasarı Modeli ve Deney Prosedürü

Sıçanlar 6 gruba rastgele ayrıldıktan sonra deney 2 aşamada şu sıralama ile gerçekleştirilmiştir. Grup 4'deki sıçanlara CCl_4 enjeksiyonundan 12 saat önce 100 mg/kg nintedanib salinle 1ml hacme tamamlanarak oral gavaj yardımı ile verilmiştir(119). Grup 5'teki sıçanlara ise CCl_4 enjeksiyonundan yarım saat önce nintedanib 100 mg/kg dozunda oral yolla gavaj yardımı ile verilmiştir. Sonrasında ise Grup 3, 4, 5 ve Grup 6'ya CCl_4 1 ml/kg (1:1 CCl_4 +zeytin yağı) intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Grup 6'ya daha sonra CCl_4 enjeksiyonundan 12 saat sonra 100 mg/kg nintedanib gavaj yardımıyla oral verilmiştir. Grup 2'ye ise Grup 3, 4, 5, 6'ya CCl_4

uygulaması sırasında 100 mg/kg nintedanib gavaj yardımıyla oral olarak verilmiştir. Grup 1 sağlıklıya ise CCl_4 uygulaması sırasında yalnızca zeytinyağı intraperitoneal olarak verilmiştir. Her gruptaki sıçanların yarısı (n=6) rastgele seçilerek CCl_4 enjeksiyonundan 24 saat sonra 100mg/kg ketamin ve 10 mg/kg ksilazin anestezisi altında anestezi altına alınmıştır. Anestezi altına alınan sıçanlar kalplerinden kan alınması suretiyle sakrifiye edilmiştir. Ayrıca sıçanların karaciğerleri biyokimyasal ve histopatolojik incelemeler için çıkarılmıştır. Her grupta kalan sıçanlar deneyin 2. Aşamasında 1 hafta boyunca ad libitum şeklinde beslenmiştir. Bu bir haftalık periyotta sıçanlara herhangi bir tedavi uygulanmamıştır. Bir haftanın sonunda deneyin ilk aşamasına benzer şekilde 100 mg/kg ketamin 10 mg/ kg ksilazin karışımı intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Anestezi altına alınan sıçanlardan kalplerinden kan alınması suretiyle sakrifiye edilmiştir. Karaciğerleri moleküler ve histopatolojik çalışmalar için çıkarılmış ve çalışılacağı zamana kadar -80 °C buzdolabında saklanmıştır.

3.5. Biyokimyasal Analizler

3.5.1. ALT ve AST Ölçümü

Alınan kanlar 14000 rpm dönme hızıyla 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası biyokimya tüpünün üst kısmında biriken serum pipet yardımı ile alındı. Laboratuvarımızda bulunan Chemwell marka biyokimya cihazının yönergeleri doğrultusunda ölçüm yapıldı.

3.5.2. ELİSA Analizleri

Çalışmamızda inflamasyon göstergeleri interlökin 6 (IL-6) ve tümör nekroz alfa (TNF-α) konsantrasyonları sandviç Enzim Lynked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemi ile ölçülmüştür. Bunun için öncelikle alınan karaciğer dokuları sıvı azot yardımıyla fiziksel olarak homojenize edildi. Fiziksel olarak homojenize edilen dokudan her sıçan için 100 mg doku tartıldı. Üretici firmanın direktifleri doğrultusunda kimyasal homojenizasyon işlemine tabi tutuldu. Bu işlemin ardından üretici firmanın kiti ile çalışmaya hazır doku serumu hazırlanmış oldu. Daha sonra da elde edilen doku

serumu üretici firmanın direktifleri doğrultusunda kullanıldı. ELISA protokolünün sonunda numuneler nanodrop sepktrofotometri (EPOCH Take3 Plate, Biotek) cihazı yardımıyla istenen dalga boyunda ölçüldü. Standart bir eğri çizilip ve standartların absorbansından bir denklem elde edildi. IL-6 ve TNF-α konsantrasyonları bu denklemler kullanılarak ölçülmüştür. Kullanılan ELISA kitleri; ELK Biotechnology Rat İnterlökin 6 (Katolog Numarası: ELK1158), ELK Biotechnology Rat Tumor Nekroz Faktör Alfa (Katolog Numarası: ELK1396) .

3.6. Moleküler Analizler

3.6.1. Rat Karaciğer Dokusundan RNA Ekstraksiyonu

Daha önceden çalışılmak üzere -80 derecede muhafaza edilen karaciğer dokuları sıvı azot kullanılarak homojen hale getirildi. Öğütülen her dokudan 30 mg olacak şekilde hassas terazi yardımıyla tartıldı ve sonrasında içine steril bilye ve 600 µl RLT tamponu ve 10 µl beta merkaptoetanol eklenerek Tissue Lyzer II (Qiagen) cihazında 30 hertz frekansta 2 dakika boyunca homojenize edildi. Bu işlem sonrasında ise 14000 rpm' de 3 dakika boyunca santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Süpernatantlar toplandı. QIAcube cihazında RNeasy Mini Kit protokolü takip edilerek RNA sentezi tamamlandı. 260/280 nm'de nanodrop spektrofotometri cihazıyla (EPOCH Take3, Biotek) RNA miktarları ölçülerek -80 derece buzdolabına kaldırıldı.

3.6.2. Revers Transkriptaz Reaksiyonu ve cDNA Sentezi

Daha önceden elde edilen ve – 80 derece buzdolabında saklanan RNA'lardan cDNA sentezi High-Capacity cDNA Reverse Trancription kiti kullanılarak yapıldı. cDNA sentez karışımı 10 µL total RNA, 2 µL10 X RT Buffer, 0.8 µL 25 X dNTPs mix, 2 µL 10 X RT Random Primers, 4.2 µL DEPC- H2O, 1 µL MultiScribe Reverse Transcriptase ile hazırlandı ve toplam hacim 20 µl olacak şekilde ayarlandı. Sentez Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystem) cihazı ile yapıldı. cDNA miktarı Nanodrop spektrofotometri cihazı (EPOCH Take3, Biotek) kullanılarak ölçülmüştür.

3.6.3. Real Time PCR ile mRNA Ekspresyonlarının Kantitatif Olarak Belirlenmesi

Yaptığımız çalışmada TGF-β ve α-SMA(Alfa Smooth Muscle Actin) mRNA ekspresyonları NucleoGene qPCR Probe Master Mix (2X) kullanılarak analiz edildi. Beta aktin (β-aktin) referans gen olarak kullanıldı. Real Time Polimer Chain Reaction'da (RT-PCR) TGF-β, α-SMA ve β-aktin primer propları kullanıldı. Kit protokolünde belirtildiği şekilde, reaksiyon başına; 2x qPCR mastermix 10 µl, primer-prop 5 µl, 1-100 ng cDNA 4 µl ve PCR grade water 1 µl kullanıldı. İşlem StepOne Plus Real Time PCR System cihazında yapıldı. Ct değerleri cihazda otomatik olarak delta delta Ct'ye çevrildi.

3.7. Histopatolojik İncelemeler

3.7.1. Doku Takibi ve Hematoksilen ve Eozin Boyama Metodu

Karaciğer doku örnekleri %3,7'lik formaldehit solüsyonunda 72 saat boyunca fiksasyon yapıldı. Ardından rutin doku takip işlemi yapıldı. Fikse olan doku örnekleri, ilk olarak akan suda 30 dakika yıkandı ve dokudan formaldehit uzaklaştırıldı. Akabinde artan alkol serilerinde (50, 60, 70, 80, 96 ve 99) birer saat bekletilerek dehidrasyon işlemi yapıldı. Daha sonra ksilen serisinden 45 dakika (3x15) bekletilerek doku örneklerinde şeffaflaştırma işlemi yapıldı. Son olarak dokular 60C°'de etüv içerisinde erimiş parafin içine atılarak doku içine parafin emdirildi ve doku örnekleri kesit işlemi için bloklandı. Mikrotom ile parafin doku bloklarından 5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Lam yüzeyine alınan kesitler Hematoksilen solüsyonunda 5 dakika ve eozin boyasında 2 dakika boyandı. Hazırlanan preperatlar, Olimpus CX 21 kamera ataçmanlı mikroskop ile incelenerek fotoğraflandı. Son olarak resimler Photoshop CS5 ile bir araya getirildi.

3.7.2. İmmünohistokimyasal Boyama Metodu

Adhezivli(poly-L-Lysin) lamlara alınan tüm kesitler, ksilol ve alkol serilerinden geçirilerek, deparafinize ve dehidre edildi. Daha sonra distile suda 5

dakika yıkandı. Antijen yüzeylerin açılması amacıyla Sodyum sitrat solüsyonunda 1 dakika yüksek basınç altında slaytlar 100 derecede bekletildi. Bu işlemin sonunda slayt yüzeyindeki akciğer doku alanları hidrofobik kalem ile sınırlanarak, doku yüzeyine uygulanacak solüsyon alanı sınırlandı. Akabinde slaytlar bu solüsyondan çıkarılarak fosfat bazlı tampon (PBS, pH 7.2) ile 5 dakika yıkanıp, % 3'lük H_2O_2 de 10 dakika tutularak, endojen peroksidaz inaktive edildi. Slaytların yüzeyi PBS de 3 kez yıkandıktan sonra, nonspesifik zemin boyanmasını önlemek için tüm primer ve sekonder antikorlarla uyumlu olan protein blok ile 5 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda doku kesitleri üzerinde kalan blok solüsyonunun fazlası döküldükten sonra yıkanma yapılmadan primer antikorlar damlatıldı. Primer antikora uygun olarak 1 gece 4°C'de bekletildi. Ertesi sabah antikor yüzeyleri PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkanıp, biotinize sekonder antikor ile oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. PBS ile tekrar yıkanan kesitler, streptavidin-peroksidaz da 10 dakika bekletildikten sonra PBS ile aynı şekilde yıkandı. Yıkama işleminden sonra kesitlere 3-3'Diaminobenzidine(DAB) kromojen, damlatılarak kromojeni almasına göre 15 dakika bekletildi. Zemin boyanması için Mayer's hematoksilende 2 dakika tutulduktan sonra musluk suyunda yıkandı. Daha sonra alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek lamelle kapatılacak ve ışık mikroskobu(Olimpus CX21) ile incelendi.

Kesitler immun pozitifliklerine göre yok(-), hafif(+), orta(++) ve şiddetli(+++) olarak değerlendirildi.

3.8. İstatistiksel Analiz

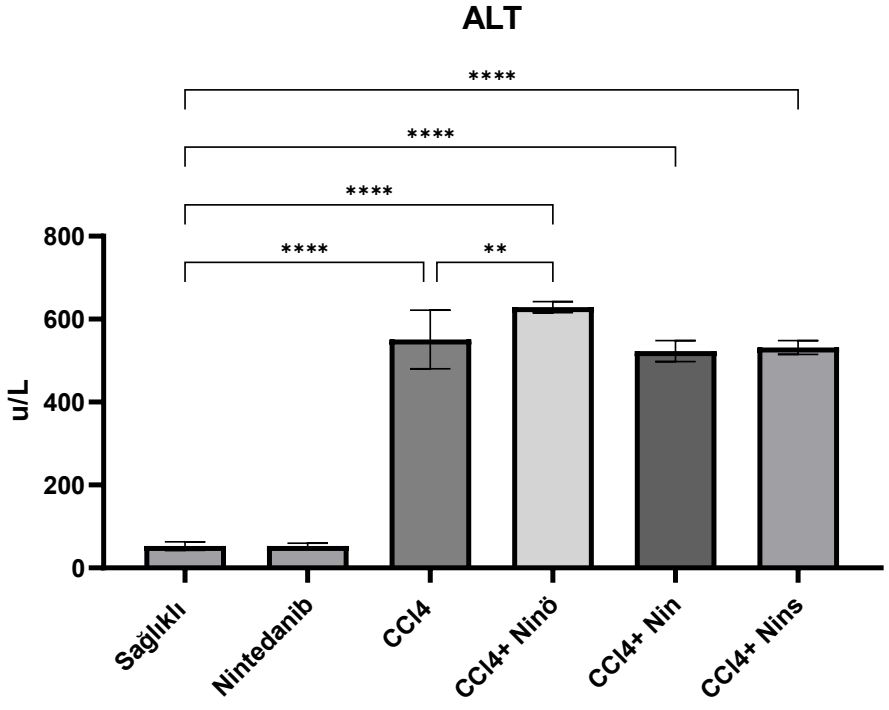
Tüm istatistiksel analiz GraphPad Prism 8 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tek yönlü varyans analizi(ANOVA) ve ardından Tukey testi kullanılmıştır. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak sonuç bölümünde sunuldu. p değerinin $<0,05$ olduğu değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Karaciğer Transaminazları Bulguları

4.1.1. ALT 1. Gün Bulguları

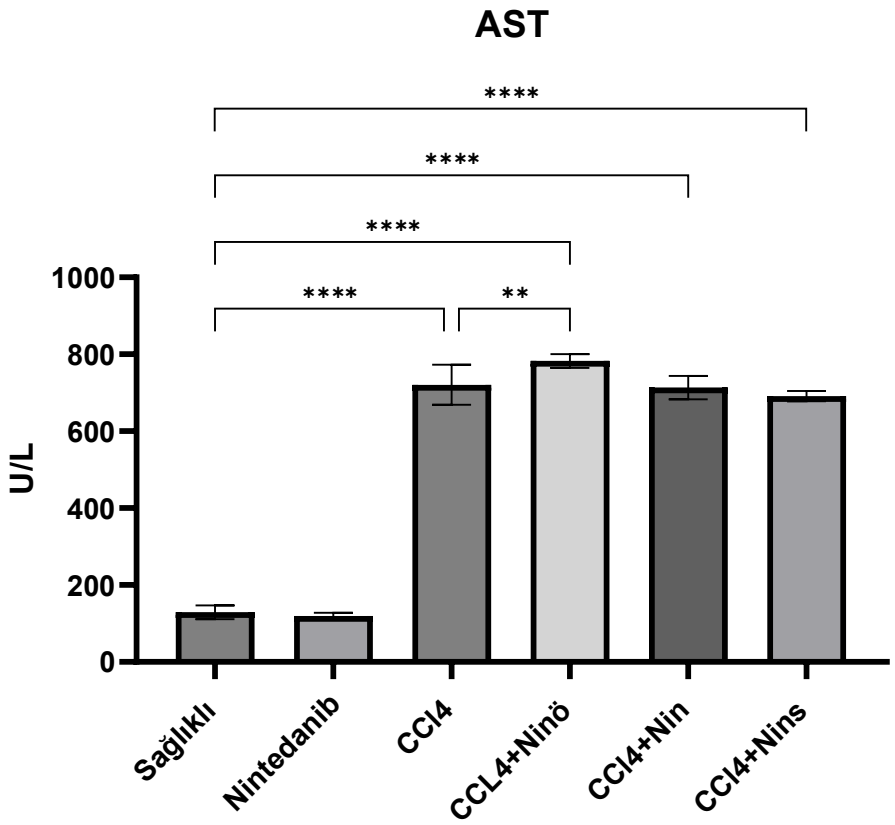
Yapılan ölçümlerde ALT seviyeleri CCl_4 grubunda sağlıklı gruba kıyasla anlamlı derecede artmıştır.($p< 0,0001$). CCl_4+Nin ve CCl_4+Nins gruplarındaki ALT seviyeleri sağlıklı gruba kıyasla artmış iken ($p<0,0001$), CCL_4 grubuyla aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır. CCl_4 ile oluşturduğumuz toksisiteden 12 saat önce nintedanib verdiğimiz CCl_4+Ninö grubundaki ALT seviyeleri de sağlıklı gruba kıyasla anlamlı derece artmıştır ($p<0,0001$), İlginç olarak bu gruptaki ALT seviyeleri CCl_4 grubu ile kıyaslandığında da anlamlı derecede artış izlenmiştir. ($p<0,01$)



Şekil 4.1. 1. Gün ALT Bulguları
CCl_4: Karbon Tetra Klorür, CCl_4+Ninö: Karbo Tetra Klorür+Nintedanib 12 saat önce, CCl_4+Nin:Karbon Tetra Klorür+Nintedanib, CCl_4+Nins:Karbon Tetra Klorür+ Nintedanib 12 saat sonra. Birbiriyle karşılaştırılan gruplar oklarla belirtilmiştir.(One Way Anova-Tukey testine göre gruplar arasındaki farklar ****$p<0,0001$ ** $p<0,01$' i ifade etmektedir.)

4.1.2. AST 1. Gün Bulguları

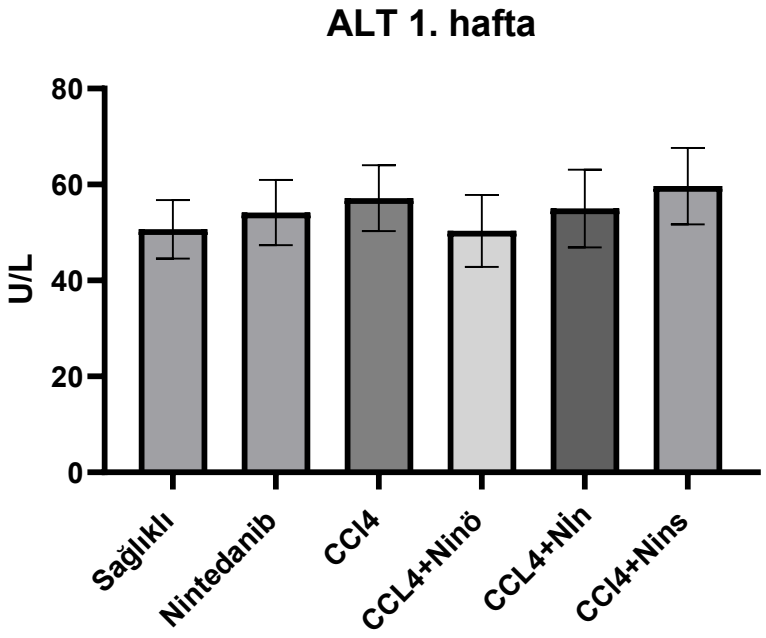
Yapılan ölçümlerde AST seviyeleri CCl_4 grubunda sağlıklı gruba kıyasla anlamlı derecede artmıştır.($p< 0,0001$). CCl_4+Nin ve CCl_4 +Nins gruplarındaki AST seviyeleri sağlıklı gruba kıyasla artmış iken ($p<0,0001$), CCL_4 grubuyla aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır. Nintedanibin CCl_4 uygulamasından 12 saat önce verildiği CCl_4+Ninö grubundaki AST seviyeleri de sağlıklı gruba kıyasla artmıştır.($p<0,0001$) İlginç olarak bu gruptaki AST seviyelerindeki artış CCl_4 grubu ile kıyaslandığında da gözlemlenmiştir ($p< 0,01$).



Şekil 4.2. 1. Gün AST Bulguları
CCl_4: Karbon Tetra Klorür, CCl_4+Ninö: Karbo Tetra Klorür+Nintedanib 12 saat önce, CCl_4+Nin:Karbon Tetra Klorür+Nintedanib, CCl_4+Nins:Karbon Tetra Klorür+ Nintedanib 12 saat sonra. Birbiriyle karşılaştırılan gruplar oklarla belirtilmiştir.(One Way Anova-Tukey testine göre gruplar arasındaki farklar ****$p<0,0001$ ** $p<0,01$' i ifade etmektedir.)

4.1.3. ALT 1. Hafta Bulguları

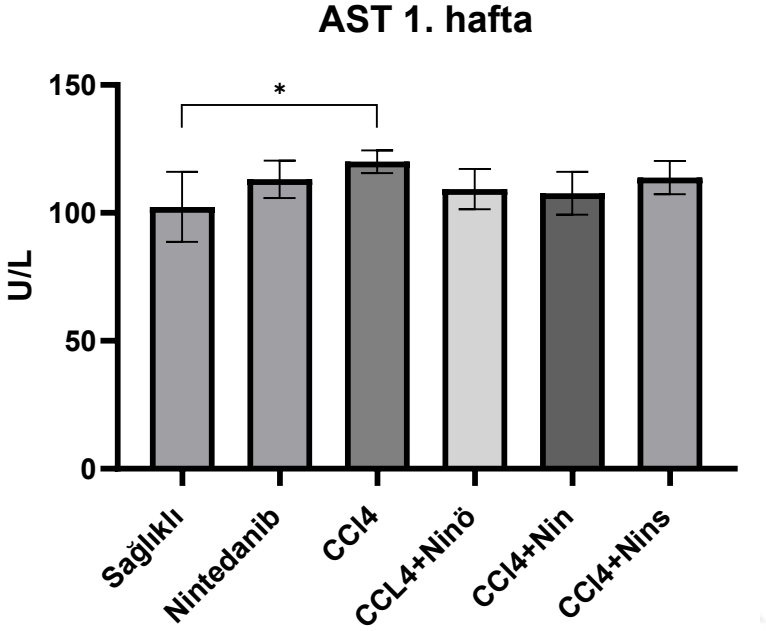
1. haftanın sonunda sakrifiye edilen sıçanlardaki ALT seviyeleri gruplar birbirleri ile kıyaslandığında istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir.



Şekil 4.3. 1. Hafta ALT Bulguları
CCl_4: Karbon Tetra Klorür, CCl_4+Ninö: Karbo Tetra Klorür+Nintedanib 12 saat önce, CCl_4+Nin:Karbon Tetra Klorür+Nintedanib, CCl_4+Nins:Karbon Tetra Klorür+ Nintedanib 12 saat sonra.

4.1.4. Aspartat Amino Transferaz (AST) 1. Hafta Bulguları

Yapılan ölçümlerde AST seviyeleri CCl_4 grubunda sağlıklı gruba kıyasla anlamlı derecede artmıştır.($p< 0,05$). Diğer grupların AST seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemiştir.



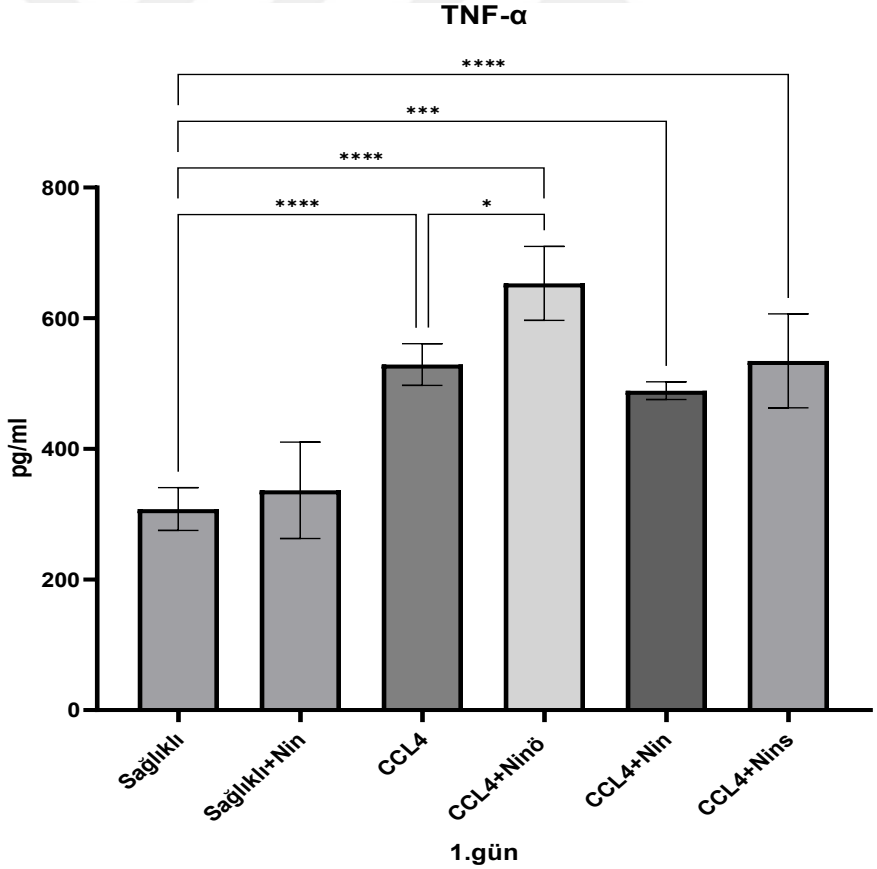
Şekil 4.4. 1. Hafta AST Bulguları
CCl_4: Karbon Tetra Klorür, CCl_4+Ninö: Karbo Tetra Klorür+Nintedanib 12 saat önce, CCl_4+Nin:Karbon Tetra Klorür+Nintedanib, CCl_4+Nins:Karbon Tetra Klorür+ Nintedanib 12 saat sonra. Birbiriyle karşılaştırılan gruplar oklarla belirtilmiştir. (One Way Anova-Tukey testine göre gruplar arasındaki farklar * $p<0,05$' i ifade etmektedir.)

4.2. ELISA Bulguları

4.2.1. TNF-α Bulguları

4.2.1.1 TNF-α 1. Gün Bulguları

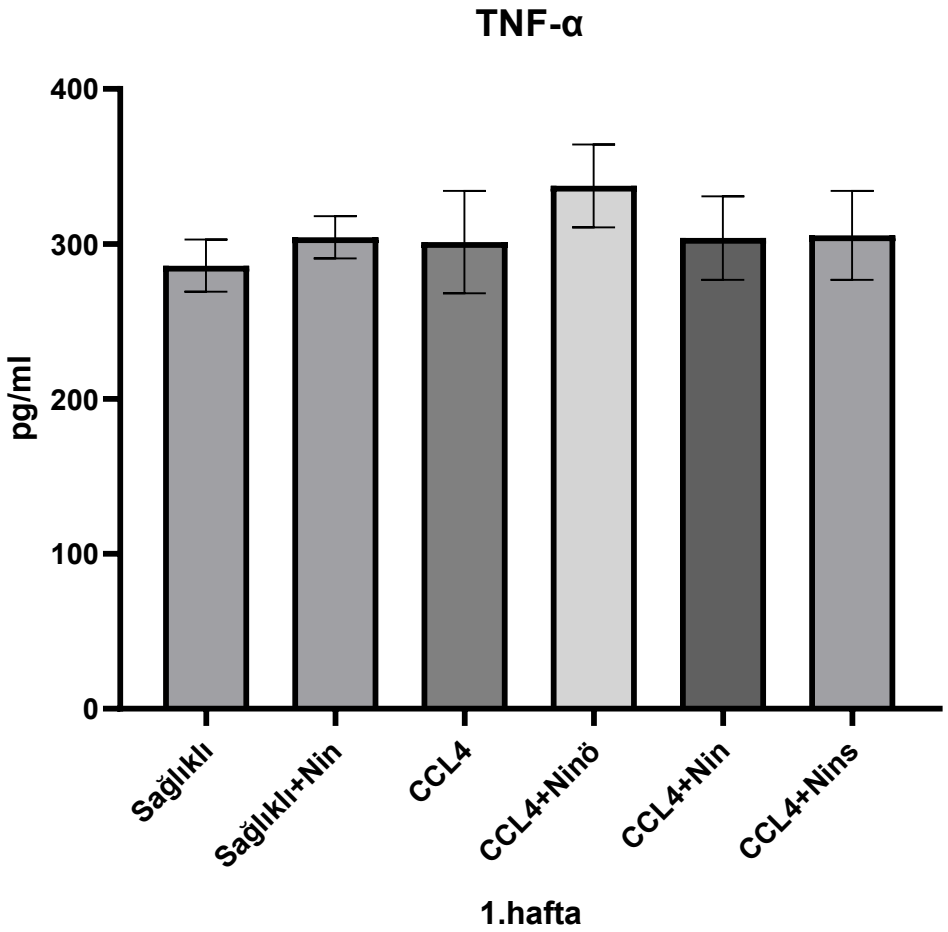
Yapılan ölçümlerde TNF-α seviyeleri CCl_4 grubunda sağlıklı gruba kıyasla anlamlı derecede artmıştır.($p< 0,0001$). CCl_4+Nin ve CCl_4+Nins gruplarındaki TNF-α seviyeleri sağlıklı gruba kıyasla artmış iken (sırasıyla $p<0,001$, $p<0,0001$), CCL_4 grubuyla aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır. Nintedanibin 12 saat önce verildiği CCl_4+Ninö grubundaki TNF-α seviyelerine bakıldığında sağlıklı grupla kıyaslandığında anlamlı derecede artış olduğu görülmüştür($p<0,0001$). İlginç olarak CCl_4+Ninö grubundaki TNF-α seviyeleri CCl_4 ile kıyaslandığında artmıştır ($p<0,05$) .



Şekil 4.5. 1. Gün TNF-α ELISA Bulguları
CCl_4: Karbon Tetra Klorür, CCl_4+Ninö: Karbo Tetra Klorür+Nintedanib 12 saat önce, CCl_4+Nin:Karbon Tetra Klorür+Nintedanib, CCl_4+Nins:Karbon Tetra Klorür+ Nintedanib 12 saat sonra. Birbiriyle karşılaştırılan gruplar oklarla belirtilmiştir.(One Way Anova-Tukey testine göre gruplar arasındaki farklar ****$p<0,0001$, *** $p<0,001$' i, * $p<0,05$'i ifade etmektedir.)

4.2.1.2. TNF-α 1. Hafta Bulguları

Yapılan ölçümlerde 1. Haftanın sonunda sakrifiye edilen sıçanlarda karaciğer doku TNF-α seviyeleri istatistiksel olarak herhangi bir farklılık göstermemiştir.

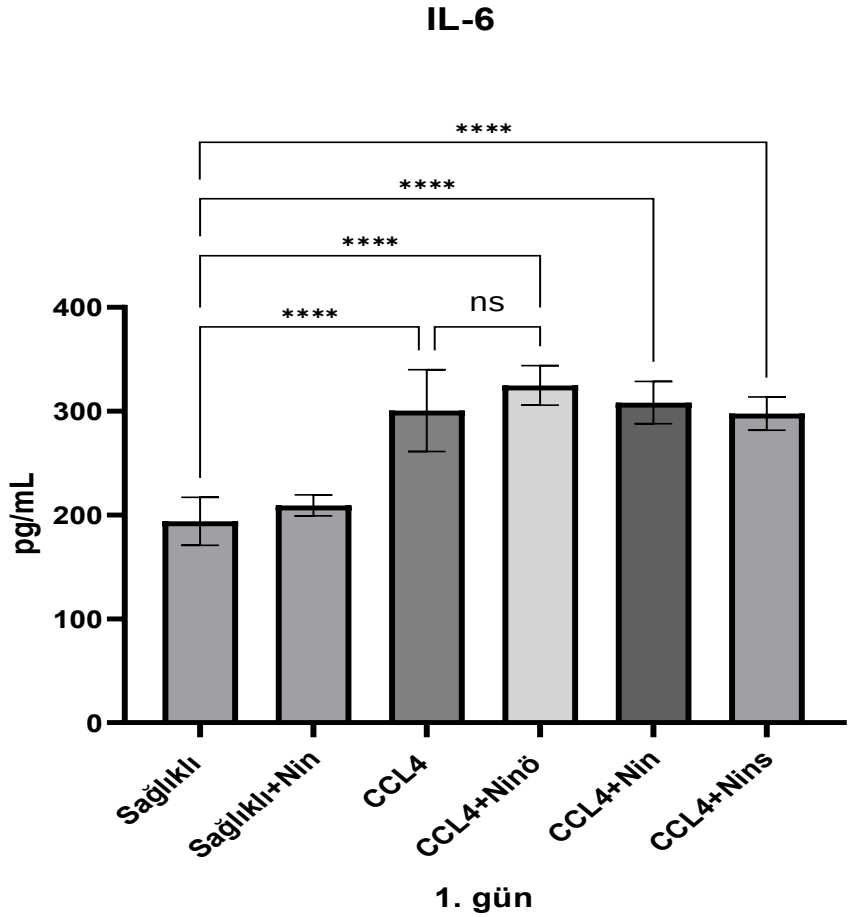


Şekil 4.6. 1. Hafta TNF-α ELISA Bulguları
CCl_4: Karbon Tetra Klorür, CCl_4+Ninö: Karbo Tetra Klorür+Nintedanib 12 saat önce, CCl_4+Nin:Karbon Tetra Klorür+Nintedanib, CCl_4+Nins:Karbon Tetra Klorür+ Nintedanib 12 saat sonra.

4.2.2. IL-6 ELISA Bulguları

4.2.2.1. IL-6 1. Gün Bulguları

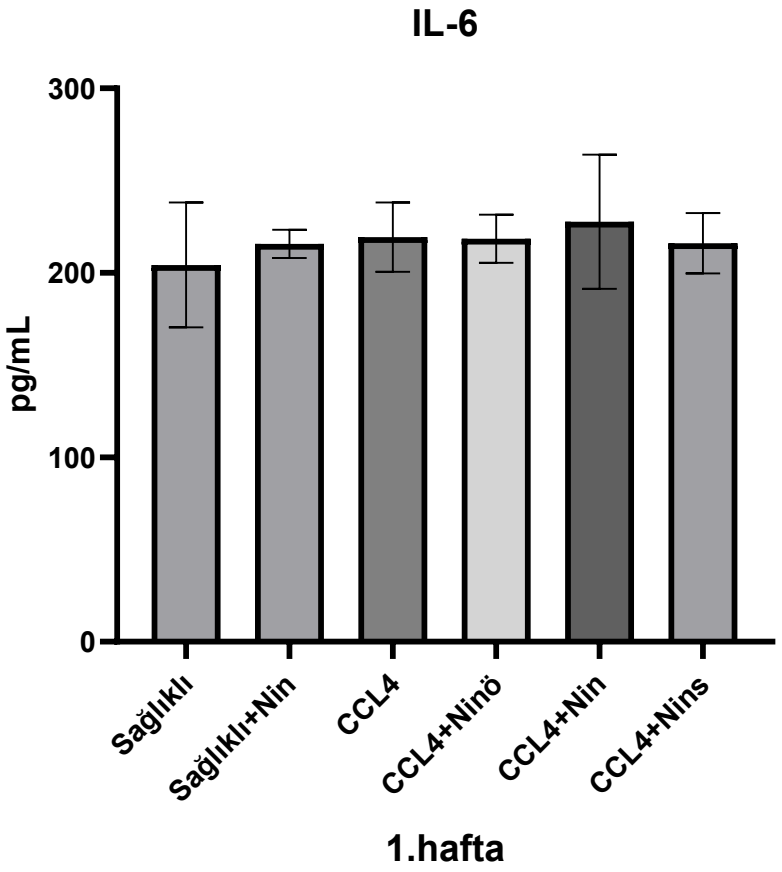
Yapılan ölçümlerde karaciğer dokularındaki IL-6 seviyeleri CCl_4 grubunda sağlıklı gruba kıyasla anlamlı derecede artmıştır.($p< 0,0001$). CCl_4+Nin ve CCl_4+Nins gruplarındaki IL-6 seviyeleri sağlıklı gruba kıyasla artmış iken ($p<0,0001$), CCl_4 grubuyla aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır. Nintedanibin CCl_4'ten 12 saat önce uygulandığı CCl_4+Ninö grubundaki IL-6 seviyeleri sağlıklı gruba kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0,0001$). CCl_4+Ninö grubu CCl_4 grubu ile kıyaslandığında IL-6 seviyeleri matematiksel olarak daha fazla olmasına rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı gerçekleşmemiştir.



Şekil 4.7. 1. Gün IL-6 ELISA Bulguları
CCl_4: Karbon Tetra Klorür, CCl_4+Ninö: Karbo Tetra Klorür+Nintedanib 12 saat önce, CCl_4+Nin:Karbon Tetra Klorür+Nintedanib, CCl_4+Nins:Karbon Tetra Klorür+ Nintedanib 12 saat sonra. Birbiriyle karşılaştırılan gruplar oklarla belirtilmiştir.(One Way Anova-Tukey testine göre gruplar arasındaki farklar ****$p<0,0001$' i ifade etmektedir.)

4.2.2.2. IL-6 1. Hafta Bulguları

Yapılan ölçümlerde 1. Haftanın sonunda sakrifiye edilen sıçanlarda karaciğer doku İnterlökin-6 seviyeleri istatistiksel olarak herhangi bir farklılık göstermemiştir.



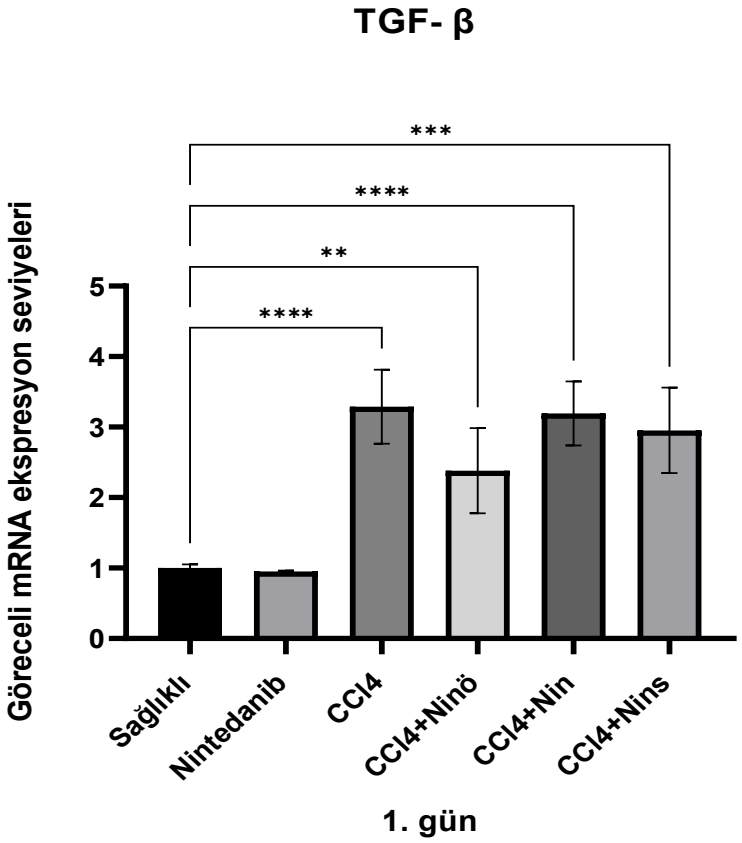
Şekil 4.8. 1. Hafta IL-6 ELİSA Bulguları
CCl_4: Karbon Tetra Klorür, CCl_4+Ninö: Karbo Tetra Klorür+Nintedanib 12 saat önce, CCl_4+Nin:Karbon Tetra Klorür+Nintedanib, CCl_4+Nins:Karbon Tetra Klorür+ Nintedanib 12 saat sonra.

4.3. Real Time PCR Bulguları

4.3.1. TGF-β Ekspresyon Bulguları

4.3.1.1. TGF-β 1. Gün Ekspresyon Bulguları

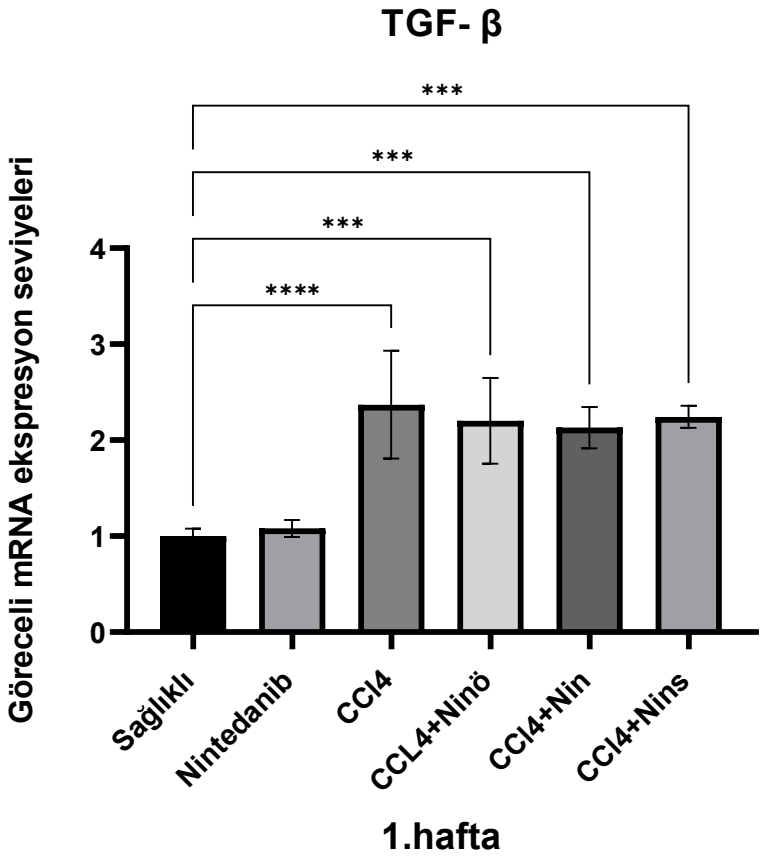
1. gün sakrifiye edilen sıçanlarda CCl_4 ile indüklenen karaciğer hasarı modelinde CCl_4 grubunda ve CCl_4+Nin grubunda TGF-β ekspresyonları sağlıklı gruba kıyasla anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,0001$). CCl_4+Nins grubunda ise TGF-β ekspresyonları yine anlamlı şekilde artmıştır.($p<0,001$). Nintedanibin 12 saat önce uygulandığı CCl_4+Ninö grubu ile sağlıklı arasındaki ilişki de $p<0,01$ şeklinde gerçekleşmiştir.



Şekil 4.9. TGF-β 1. Gün Göreceli mRNA Ekspresyon Bulguları
CCl_4: Karbon Tetra Klorür, CCl_4+Ninö: Karbo Tetra Klorür+Nintedanib 12 saat önce, CCl_4+Nin:Karbon Tetra Klorür+Nintedanib, CCl_4+Nins:Karbon Tetra Klorür+ Nintedanib 12 saat sonra. Birbiriyle karşılaştırılan gruplar oklarla belirtilmiştir. (One Way Anova-Tukey testine göre gruplar arasındaki farklar **p<0,01'i; *** p<0,001'i, ve **** p<0,0001'i ifade etmektedir .)

4.3.1.2. TGF-β 1. Hafta Ekspresyon Bulguları

1. haftada sakrifiye edilen sıçanlarda CCl_4 ile karaciğer hasarı modelinin indüklendiği CCl_4 grubunda TGF-β mRNA ekspresyon seviyeleri sağlıklı gruba kıyasla anlamlı derece artmıştır p<0,0001). CCl_4+Ninö, CCl_4+Nin ve CCl_4+Nins gruplarındaki TGF-β mRNA gen ekspreyonu seviyeleri ise sağlıklıya kıyasla yine anlamlı derecede artmıştır (p<0,001).

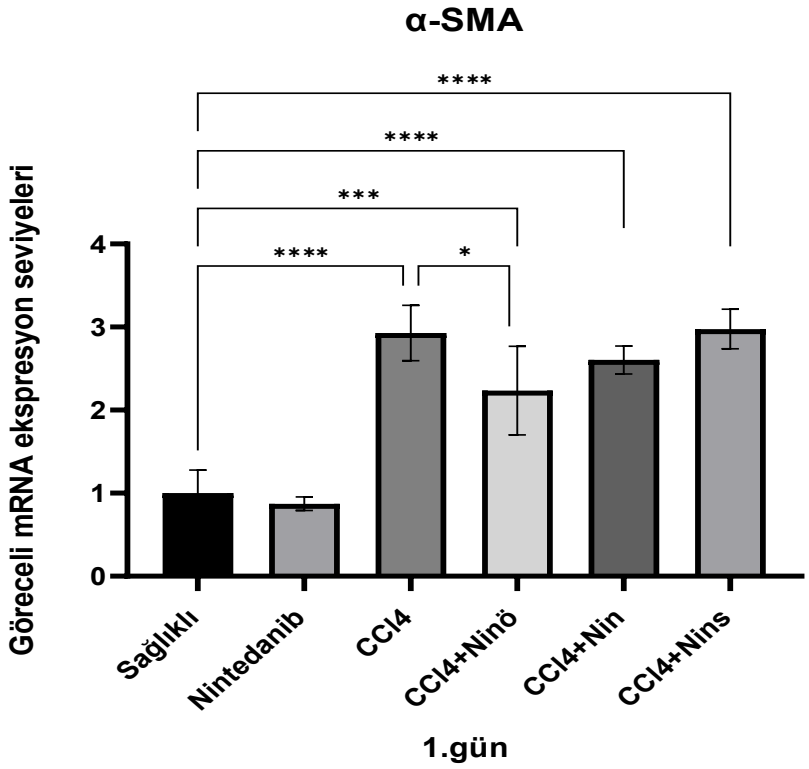


Şekil 4.10. TGF-β 1. Hafta Göreceli mRNA Ekspresyon Bulguları
CCl_4: Karbon Tetra Klorür, CCl_4+Ninö: Karbo Tetra Klorür+Nintedanib 12 saat önce, CCl_4+Nin:Karbon Tetra Klorür+Nintedanib, CCl_4+Nins:Karbon Tetra Klorür+ Nintedanib 12 saat sonra. Birbiriyle karşılaştırılan gruplar oklarla belirtilmiştir. (One Way Anova-Tukey testine göre gruplar arasındaki farklar *** p<0,001'i, ve **** p<0,0001'i ifade etmektedir .)

4.3.2. α-SMA Gen Ekpresyonu Bulguları

4.3.2.1. α-SMA 1. Gün Gen Ekspresyonu Bulguları

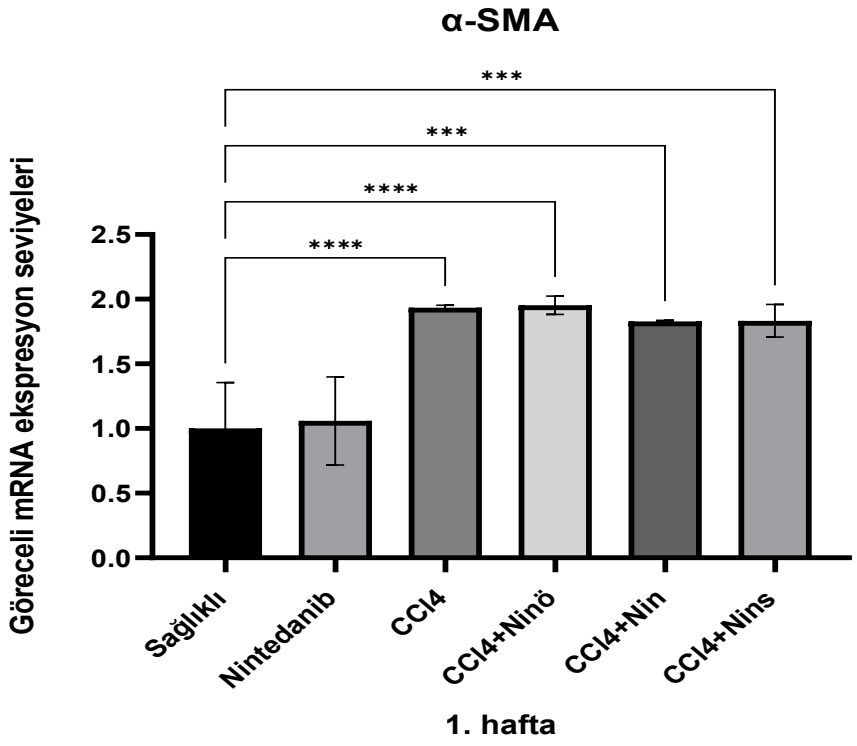
1. gün sakrifiye edilen sıçanlarda CCl_4 ile karaciğer hasarının indüklendiği CCl_4 grubunda, CCl_4+Nin ve CCl_4+Nins gruplarındaki α-SMA ekspresyonları sağlıklı gruba kıyasla anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,0001$). Nintedanibin CCl_4'ten 12 saat önce verildiği CCl_4+Ninö grubunda ise α-SMA gen ekspresyonları sağlıklı gruba kıyasla yine anlamlı şekilde artmış olmakla birlikte bu artış nintedanibin CCl_4 ile verildiği diğer gruplar kadar artış izlenmemiştir. ($p<0,001$). CCl_4+Ninö grubundaki α-SMA gen ekspresyonları CCl_4 grubu ile kıyaslandığında da istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır $p<0,05$) .



Şekil 4.11. α-SMA 1. Gün Göreceli mRNA Ekspresyon Bulguları
CCl_4: Karbon Tetra Klorür, CCl_4+Ninö: Karbo Tetra Klorür+Nintedanib 12 saat önce, CCl_4+Nin:Karbon Tetra Klorür+Nintedanib, CCl_4+Nins:Karbon Tetra Klorür+ Nintedanib 12 saat sonra. Birbiriyle karşılaştırılan gruplar oklarla belirtilmiştir. (One Way Anova-Tukey testine göre gruplar arasındaki farklar * $p<0,05$'i ; *** $p<0,001$'i, ve **** $p<0,0001$'i ifade etmektedir .)

4.3.2.2. α-SMA 1. Hafta Gen Ekspresyonu Sonuçları

1. hafta sakrifiye edilen sıçanlarda CCl_4 ile indüklenen karaciğer hasarı modeli grubunda ve CCl_4' ten 12 saat önce uyguladığı CCl_4+Ninö gruplarındaki α-SMA ekspresyonları sağlıklı gruba kıyasla anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,0001$). CCl_4+Nin ve CCl_4+Nins grubunda ise α-SMA gen ekspresyonları sağlıklı gruba kıyasla yine anlamlı şekilde artmış olmakla birlikte bu artış diğer artış olan gruplar kadar yüksek değildir ($p<0,001$).



Şekil 4.12. α-SMA 1. Hafta Göreceli mRNA Ekspresyon Bulguları
CCl_4: Karbon Tetra Klorür, CCl_4+Ninö: Karbo Tetra Klorür+Nintedanib 12 saat önce, CCl_4+Nin:Karbon Tetra Klorür+Nintedanib, CCl_4+Nins:Karbon Tetra Klorür+ Nintedanib 12 saat sonra. Birbiriyle karşılaştırılan gruplar oklarla belirtilmiştir. (One Way Anova-Tukey testine göre gruplar arasındaki farklar *** $p<0,001$'i, ve **** $p<0,0001$'i ifade etmektedir .)

4.4. Histopatoloji Bulguları

4.4.1. Hematoksilen ve Eozin Boyama Bulguları

Deneyde 24. Saat sonunda sakrifiye edilen sıçanlardan alınan karaciğer doku örneklerinde;

Sağlıklı grubunda karaciğer lobülünde sağlıklı görünümde santral ven etrafında kuşak şeklinde saran hepatosit kordonları izlendi. Hepatosit kordonları arasında sinüzoidal kapiller yapılar görülmekteydi. Bu grupta herhangi bir dejenerasyon izlenmedi.

Nintedanib grubunda sağlıklı grubuna benzer bir histolojik görünüm izlenmekteydi. Herhangi bir hasar izlenmedi.

CCl_4 grubunda özellikle santral ven etrafında hepatosit hücrelerinde vakuolizasyon ve izlendi. Yine hepatosit kordonlarında yer yer nekrotik ve apoptotik hücreler görülürken sinüzoidal kapiller alanlarda genişlemeler ve hemoraji alanları izlenmiştir.

CCl_4 +Ninö vakuolizasyon ile birlikte çok sayıda ileri düzeyde hipertrofik hücreler izlenmiştir. Hemoraji alanları ile birlikte nekrotik hücrelerde görülmekteydi.

CCl_4+Nin grubunda vakuolizasyon ile birlikte ileri düzeyde hipertrofik hücreler dikkat çekmekteydi. Yer yer sinüzoidal alanda genişlemeler ve hemoraji alanları görülmekteydi.

CCl_4+ Nins grubunda hepatosit hücrelerinde vakuolizasyon görülürken, sinüzoidal alanda hemoraji izlenmekteydi. Bu grupta nadiren ileri düzeyde hipertrofiye olmuş hepatosit hücreleri görülmekteydi.

Deneyde 1.hafta sonunda alınan karaciğer dokularında;

Sağlıklı grubunda normal görünümlü karaciğer lobülü ve buradan portal alana direne alan sinüzoidal kapiller görülmektedir. Sinüzoidallerin etrafında sağlıklı görünümlü hepatositler izlenmiştir.

Nintedanib grubunda da sağlıklı grubuna benzer histolojik görünüm izlenmiştir. Herhangi bir patolojiye rastlanmamıştır.

CCl_4 grubunda santral ven etrafında hücresel doku kayıpları, yer yer nekrotik ve apoptotik hücrelere rastlanmıştır. Hepatosit kordonları arasında hemoraji alanları izlenmiştir.

CCl_4+Ninö grubunda santral ven etrafında hepatosit kordonları izlendi.

CCl_4 + Nin grubunda santral ven etrafında hepatosit hücrelerinde hücresel doku kayıpları ve yine yer yer nekrotik hücreler izlenmektedir.

CCl_4 + Nins grubunda santral ven etrafında çok sayıda hücresel doku kaybı ve yine bu alanların etrafındaki bazı hücrelerde apoptotik ve nekrotik hücreler görülmektedir.

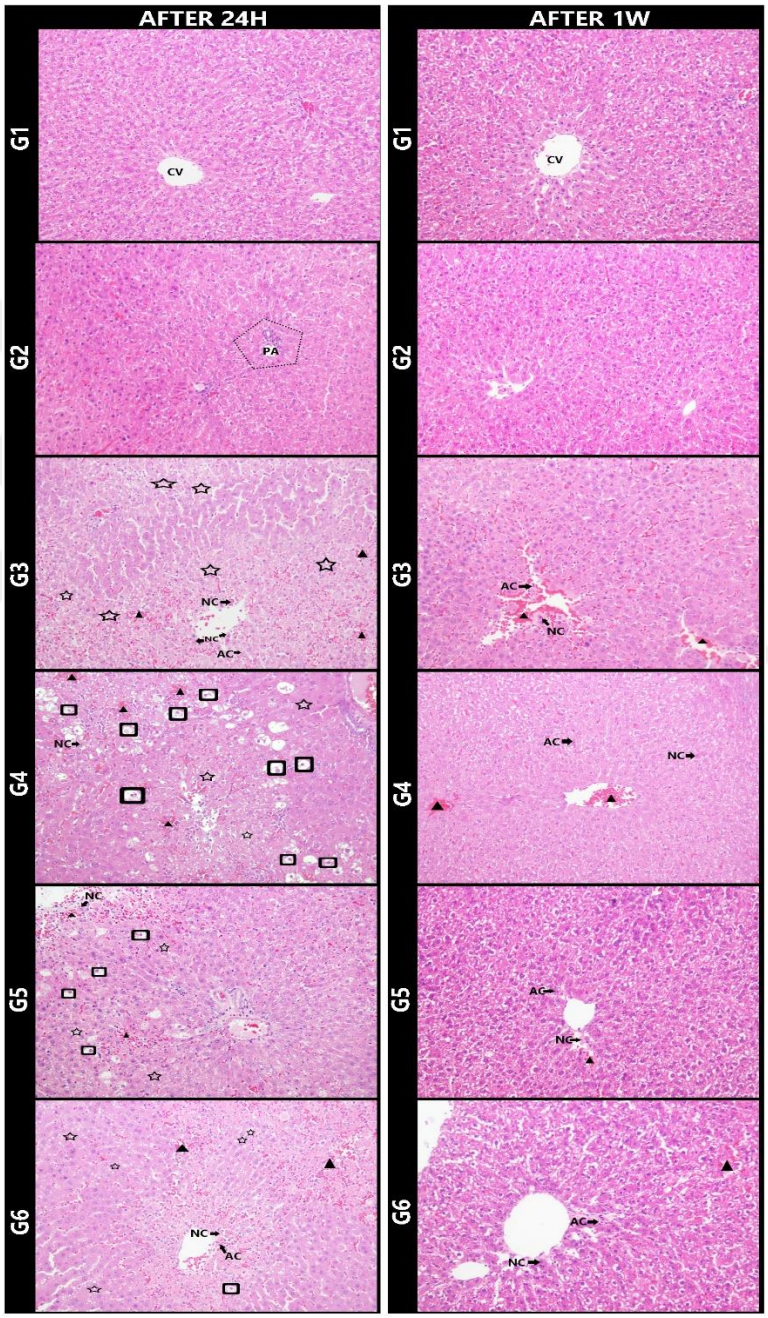
4.4.2. İmmunhistokimyasal Boyama Bulguları

İmmünohistokimyasal boyamada karaciğer dokusunda TGF-β antikoru boyanmıştır. Karaciğer dokusunda görülen görülen immünpozitiflik derecesi gruplar arasında boyanma yoğunluğu ve boyanan hücre sayısına göre skorlama yapılmıştır. Buna göre immün negatif (%0-1) için -, immün pozitiflik hafif (%10-33) için +, immün pozitiflik orta (%33-66) için ++ ve immün pozitiflik şiddetli (%66-99 için +++ olarak skorlanmıştır (Tablo 4.1).

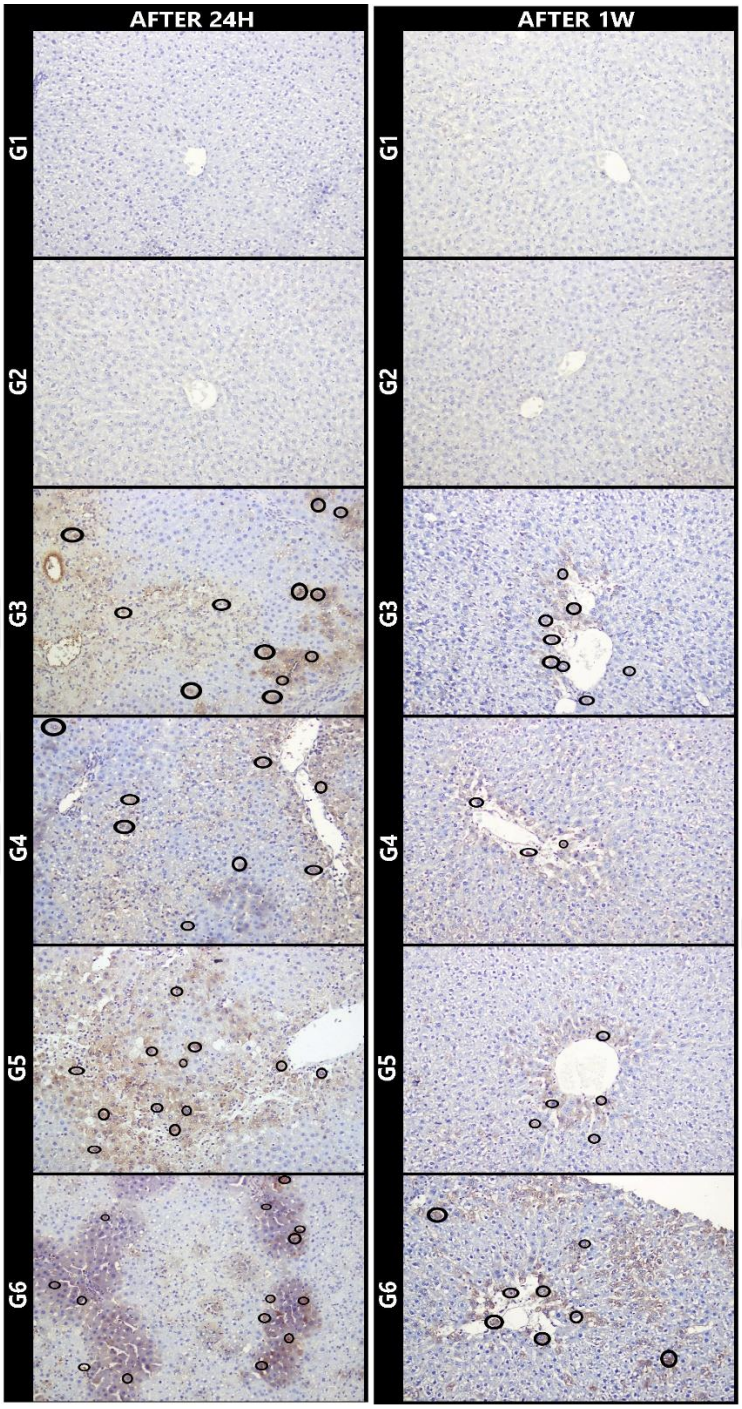
TGF-β antikoru ile yapılan immünohistokimyasal boyama sonucunda;

24 saat sonra sakrifiye edilen sıçanlardan alınan karaciğer doku örneklerinde Sağlıklı, Nnitedanib gruplarında yok (-), CCl_4, CCl_4+Nin ve CCl_4+ Nins gruplarında şiddetli (+++), CCl_4+Ninö gruplarında ise orta şiddetli (++) immün pozitiflik görülmüştür.

1. haftanın sonunda sakrifiye edilen sıçanlardan alınan karaciğer doku örneklerinde Sağlıklı ve Nintedanib gruplarında yok (-), CCl_4 ve CCl_4+Nins gruplarında orta (++), CCl_4+ Ninö ve CCl_4+Nin gruplarında ise hafif (+) immün pozitiflik görülmüştür.



Şekil 4.13. Histopatolojik bulgular
(PA:Portal Alan, CV:Santral ven, AC:Apoptotik Hücre, NC:Nekrotik Hücre, Yıldız:Vakolizasyon, Üçgen:Hemoraji, Kare:Hipertrofik Hücre) G1:Sağlıklı, G2:Nintedanib, G3:CCl_4, G4:CCl_4+Ninö, G5:CCl_4+Nin, G6:CCl_4+Nins



Şekil 4.14. İmmünohistokimyasal bulgular (Yuvarlak: İmmün pozitif hücreler)
G1:Sağlıklı, G2:Nintedanib, G3:CCl_4, G4:CCl_4+Ninö, G5:CCl_4+Nin, G6:CCl_4+Nins

Tablo 4.1. Histopatoloji ve immunohistokimyasal bulguların özeti

GRUPLAR		HEMORAJİ	Vakoulizasyon	Hipertrofik hepatosit hücresi	Apoptotik Hücre	Nekrotik hücre	TGF-β Skorlaması
1.GÜN	G1	-	-	-	-	-	-
	G2	-	-	-	-	-	-
	G3	+++	+++	-	+	+	+++
	G4	+++	+++	+++	++	++	++
	G5	++	++	++	+	+	+++
	G6	++	++	+	+	+	+++
1.HAFTA	G1	-	-	-	-	-	-
	G2	-	-	-	-	-	-
	G3	+	-	-	+	+	++
	G4	-	-	-	+	+	+
	G5	-	-	-	+	+	+
	G6	-	-	-	+	+	++

(G1:Sağlıklı, G2:Nintedanib, G3:CCl_4, G4:CCl_4+Ninö, G5:CCl_4+Nin, G6:CCl_4+Nins)

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda CCl_4 ile indüklenen karaciğer hasarı modelinde multiple tirozin kinaz inhibitörü ve TGF-β sinyal yolaklarını inhibe ederek etkisini gösteren bir ilaç olan Nintedanib' i 3 farklı zamanda uygulayarak karaciğer hasarı derecesinin değişip değişmediğini gösterdik. Hasar derecesini göstermek için karaciğer transaminazları olan ALT ve AST ile önemli proinflamatuvar sitokinlerden IL-6 ve TNF-α ölçümlerini ile gerçekleştirdik. Bu ölçümlerin yanında hem akut karaciğer toksisitesinde hem de karaciğer fibrozisinde önemli rol oynayan TGF-β ile α-SMA gen ekspresyonları ölçüldü. Ayrıca karaciğerin histopatolojik incelemesi ile birlikte immunohistokimyasal olarak da TGF-β boyaması gerçekleştirildi. Her gruptaki sıçanların yarısı 1.günde kalan yarısı ise 1.haftada sakrifiye edilmiştir Böylelikle DİLİ yan etkisi olan nintedanibin farklı zamanlarda uygulanmasının CCl_4 ile oluşturulan karaciğer toksisitesi modelinde karaciğer hasarını artırıp artırmadığı gösterilmiştir. Ayrıca sıçanların 1.haftada da sakrifiye edilmesi ile oluşan hasarın ileri dönemde karaciğeri nasıl etkilediği gösterilmiştir.

DİLİ hastalar, hekimler ve ilaç üreten firmalar için büyük bir sorun teşkil etmektedir. Bu yüzden DİLİ'nin patofizyolojisini anlamak ve etkin tedavi yöntemleri sunmak için hayvan deneyi modelleri geliştirilmiştir. Bunlardan en sık olarak istifade edilen modeller parasetamol ve CCl_4 toksisitesi modelleridir(79). Biz de çalışmamızda hem histopatoloji bulgularının insana olan benzerliğinden hem de CCl_4' ü metabolize etme şekilleri insan ve sıçanlarda birbirine benzer olduğu için sıçanlarda CCl_4 ile oluşturulan karaciğer hasarı modelini tercih ettik(89,90). Sonuçlarımıza göre CCl_4 grubumuzda karaciğer hasarının en önemli iki belirteci olan ALT ve AST seviyelerinin sağlıklı gruba kıyaslandığında anlamlı bir şekilde arttığı görülmüştür. Bu da CCl_4 uygulamasına bağlı karaciğer hasarı modelinin başarılı bir şekilde indüklendiğini göstermektedir. CCl_4 ile birlikte nintedanib uygulanan gruplarda da ilgi çekici sonuçlar bulunmaktadır. Nintedanibin CCl_4 uygulamasından 12 saat önce uygulandığı CCl_4+Ninö grubundaki ALT ve AST seviyeleri, CCl_4 grubuna kıyasla daha da artmıştır. ALT ve AST seviyelerindeki bu farklılık da CCl_4 uygulamasından 12 saat önce Nintedanib verilen grupta karaciğer hasarının, sadece CCl_4 verilen gruptan daha şiddetli gerçekleştiğini göstermektedir. Çalışmamızdaki ilgi çekici bir başka bulgu ise

Nintedanibin CCl_4 verilmesinden yarım saat önce uygulandığı ve 12 saat sonra uygulandığı gruplardaki ALT ve AST seviyelerinin sağlıklı gruba kıyasla anlamlı bir şekilde artmış olmasına rağmen CCl_4 grubundan farklı bulunmamış olmasıdır. Yani Nintedanib CCl_4' ten önce uygulandığında karaciğer hasarını artırıyor gibi görünüyorken CCl_4 uygulanmasından yarım saat önce ve 12 saat sonra verildiğinde karaciğer hasarını artırmamıştır.

İlk hafta sonunda sakrifiye edilen sıçanların ALT ve AST seviyelerine bakıldığında ise sonuçların sağlıklı sıçanlarla benzer seviyelere geldiğini göstermektedir. Bu durumun olası iki açıklaması vardır. İlk olası açıklama olarak karaciğer hasarı o kadar yüksek devam etmiştir ki karaciğerde hepatositler çok azalmıştır. Ancak yaptığımız histopatolojik incelemede nekrotik ve apoptotik hücrelerde o denli bir artış yoktur. Ayrıca dokudaki hasarı gösteren hemoraji ve vakoulizasyon doku preperatlarında gözlemlenmemiştir. İkinci olası açıklama ise hem CCl_4 hem de nintedanibin kesilmesiyle karaciğerdeki hasarın geri dönüşlü olduğudur. Bu durumun daha olası olduğunu düşünmekteyiz. CCl_4 ile indüklenen karaciğer hasarı modelleri incelendiğinde etkene maruziyet sürmezse tek doz uygulamadan sonra modelin akut hasarla sınırlandığı ve hasarın geri dönüşlü olduğu görülmektedir. Tekrarlayan uygulamalarda kronik karaciğer hasarı ortaya çıkmaktadır(37). Ayrıca nintedanibin klinik kullanımına baktığımızda da nintedanibe bağlı karaciğer hasarı gelişen hastalarda ilacın kesilmesi ya da ilacın düşük dozda devam edilmesi önerilmektedir. Hasarın düzeldiği düşünülen hastalarda ise yeniden ilacın normal dozuna çıkabileceği bildirilmektedir(117). Bizim modelimizde de nintedanib ve CCl_4 bir kere uygulanmış ve sonrasında tekrar uygulama yapılmamıştır. Bu yüzden hastaların ALT ve AST seviyelerinin sağlıklı gruba benzer seviyelere gelmesinin olası açıklamasının bu olduğunu düşünmekteyiz. Sonuçlarımızda yalnızca 1. Hafta sonunda sakrifiye edilen sıçanların AST seviyelerinde yükseklik gözükmektedir. Ancak burada ilk gün sonuçlarına kıyasla AST seviyelerinin çok düştüğü ve bu durumun klinik olarak anlamlı olmadığını düşünmekteyiz.

İnflamasyon ile ilaca bağlı karaciğer hasarı modelleri arasında da sıkı bir ilişki bulunmaktadır. Proinflamatuvar sitokinlerin gerek protein düzeyindeki seviyeleri gerek de gen ekspresyonları DİLİ modellerinde artmaktadır(104,120,121). Tedavinin

başarılı olup, hasarın azaldığı gösterilen çalışmalarda ise proinflamatuvar sitokinlerin düzeylerinin hem gen düzeyinde hem de protein düzeyinde azaldığı görülmektedir(122,123). Bizim çalışmamızda da literatüre paralel olarak CCl_4 grubunda proinflamatuvar sitokinlerden TNF-α ve IL-6 seviyeleri artmıştır. Karaciğer hasarının önemli göstergelerinden ALT ve AST seviyelerinin de IL-6 ve TNF-α seviyelerine paralel olarak artmış olması da inflamasyon ile karaciğer hasarı arasındaki ilişkiyi göstermesi açısından anlamlıdır. Bunun yanı sıra CCl_4+Ninö grubunda da CCl_4 grubuna kıyasla TNF-α için istatistiksel olarak anlamlı artış izlenmiştir. IL-6 için ise matematiksel olarak anlamlı bir artış görülmesine rağmen bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu iki inflamatuvar sitokin seviyelerindeki artış, ALT ve AST seviyelerindeki artış ile beraber değerlendirildiğinde de CCl_4+Ninö grubundaki karaciğer hasarının daha fazla gerçekleştiğini desteklemektedir. Diğer yandan 1.haftanın sonunda sakrifiye edilen sıçanların IL-6 ve TNF-α seviyeleri sağlıklı sıçanların seviyeleri ile benzerdir. Bu sonuçlardan da CCl_4+Ninö grubunda akut dönemde gerçekleşmiş olan fazla hasarın kronik döneme taşınmadığı ve hasar sonrası karaciğerin normale döndüğü anlaşılmaktadır. Histopatoloji, ALT, AST ve proinflamatuvar sitokinlerin sonucu beraber değerlendirildiğinde de ilk haftanın sonunda her şeyin normale dönmekte olduğu görülmektedir. Bu durum yukarda da bahsedilen nintedanibin klinik kullanımdaki verileri ile de uyumlu görünmektedir. İlaç kesildikten sonra karaciğer normale dönmektedir.

İnflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinlerin dengesi inflamasyonun sınırlı alanda gelişmesini ve oluşan hasarın kontrollü bir şekilde gerçekleşmesni sağlamaktadır. Dengenin bozulması inflamasyonun daha fazla ya da daha az olmasına yol açabilmektedir. TNF-α inhibitörü infliximab, parasetamole bağlı karaciğer toksisitesinde kullanıldığı bir çalışmada parasetamol grubuna kıyasla ALT AST seviyelerini düşürdüğü ve karaciğer hasarını azalttığı gösterilmiştir(123). Bir başka TNF-α inhibitörü adalimumab ve proinflamatuvar sitokin IL-6' ya karşı geliştirilmiş monoklonal antikor toculizumab' ın uygulandığı bir çalışmada ise akut akciğer hasarının adalimumab ve toculizumab uygulanan gruplarda azaldığı ancak en fazla azalmanın iki ilacın birlikte uygulandığı gruplarda olduğu gözlenmiştir(124). Bizim çalışmamızda ise bu denge TGF-β sinyal yolağı tarafından bozulmaktadır. TGF-β,

antiinflamatuvar özelliklere sahip olmakla birlikte inflamasyonu modüle eden önemli bir sitokindir. İlk baştaki akut hasardan, kronik hasara ve sonrasındaki fibrozis ve kansere kadar olan tüm süreçlerde rol oynamaktadır(125). TGF-β, karaciğer fizyolojisi ve patolojisi için esansiyel bir sitokindir. Akut karaciğer toksisitesinde hem TGF-β gen ekspresyonu hem de protein düzeyi artmaktadır(12,104). Bizim çalışmamızda da 1.gün sakrifiye edilen sıçanlarda literatürdeki bilgiye benzer olarak CCl_4 grubunda TGF-β gen ekspresyonu sağlıklı gruplara kıyasla artmıştır. Ayrıca yaptığımız immunhistokimyasal boyamada da TGF-β, CCl_4 grubunda pozitif olarak boyanmıştır. CCl_4+Ninö grubunda TGF-β sinyal yolaklarının bir kısmının inhibisyonundan dolayı TGF-β gen ekspresyonu sağlıklı gruba kıyasla artmış olmasına rağmen CCl_4 grubu ile kıyaslandığında ise matematiksel olarak azalmıştır. Gen düzeyindeki azalmaya paralel olarak da protein düzeyinde azalma da izlenmiştir. Yaptığımız immunhistokimyasal boyamada CCl_4 grubuna kıyasla CCl_4+Ninö grubundaki TGF-β boyanması azalmıştır. Yukarda tartıştığımız biyokimyasal sonuçlar ve inflamatuvar sitokin ölçümlerine dayanarak CCl_4+Ninö grubundaki karaciğer hasarının CCl_4 grubuna kıyasla daha fazla olduğunu söylemiştik. Hemoraji, vakuolizasyon, nekrotik hücre gibi histopatoloji bulguları da savımızı destekleyen diğer parametrelerdir. Sonuç olarak akut inflamasyonun seyrinde antiinflamatuvar bir sitokin olan TGF-β'nın gen ekspresyonunun azalması ve buna paralel olarak protein düzeyinde de azalmanın izlenmesi inflamasyonun daha kontrolsüz gerçekleşmesine ve böylelikle de CCl_4+Ninö grubunda karaciğer hasarının beklenenden daha fazla olmasına neden olmuştur. 1.haftanın sonunda sakrifiye edilen sıçanlarda ise CCl_4 maruziyetinin bitmesi ile hasar devam etmemiştir. TGF-β'nın immunhistokimyasal boyanma pozitifliği CCl_4, CCl_4+Ninö, CCl_4+Nin, CCl_4+Nins gruplarnda devam etse de, bu gruplardaki 1.gün sakrifiye edilen sıçanlara kıyasla boyanma pozitifliğinin azaldığı görülmüştür. Gen ekspresyonu seviyelerinde de durum benzerdir.

Yapılan çalışmalar TGF-β'nın hücreler ve dokular üzerine olan etkisinin zamana ve altta yatan hastalığa göre değişkenlik gösterdiğini bildirmektedir(126). Bu değişkenlik aynı hastalığın farklı dönemlerinde bile görülebilmektedir. Kanserin erken evresinde tümör süpressor olarak fonksiyon gösteren TGF-β , kanserin geç evrelerinde aktive olduğunda metastaza, yeni tümör oluşumuna hatta kemorezistansa neden

olabilir(127). TGF-β'nın erken dönemdeki inhibisyonu anterior miyokardiyal enfarkt modelinde erken dönem mortaliteyi ve morbiditeyi artırırır iken, geç dönemdeki inhibisyonu ise remodellingi azaltmıştır(18). Bizim sonuçlarımız ise enfarkt modeli çalışmasına benzerlik göstermektedir. 1.gün sakrifiye edilen sıçanlarda nintedanibin 12 saat önce verildiği CCl_4+Ninö grubunda karaciğer hasarının önemli göstergelerinden ALT, AST seviyeleri ve inflamatuvar sitokinlerden IL-6 ve TNF-α seviyelerinin CCl_4 grubuna kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Yani inflamasyonun erken döneminde antiinflamatuvar sitokinlerden TGF-β'nın azalması hasarın daha şiddetli olmasına yol açmıştır.

α-SMA, genellikle düz kaslarda bulunur ve hücre iskeletinin oluşumuna katkıda bulunur. Genellikle fibrozis ile ilişkilendirilmiştir. Ancak CCl_4'e bağlı karaciğer toksisitesi gibi durumlarda gen ekspresyonu artmaktadır(128). Bizim çalışmamızda da 1.gün sakrifiye edilen sıçanlarda CCl_4 grubundaki α-SMA gen ekspresyonu sağlıklı gruba kıyasla artmıştır. Nintedanibin CCl_4'ten 12 saat önce uygulandığı CCl_4+Ninö grubunda ise α-SMA gen ekspresyonu sağlıklı gruba kıyasla artmış olmasına rağmen bu artış sadece CCl_4 uygulanan grup kadar gerçekleşmemiştir. Bu durumun α-SMA'nın TGF-β tarafından indüklenen bir sitokin olması ve nintedanib uygulaması ile beraber gerçekleşen TGF-β inhibisyonundan dolayı gerçekleştiğini düşünmekteyiz. 1.hafta sakrifiye edilen sıçanlarda ise CCl_4 grubu ve CCl_4+Ninö grubunda α-SMA gen ekspresyonu seviyeleri benzer oranlarda atmış görünmektedir. Bu durumun ise CCl_4 maruziyetinin ortadan kalkması ile karaciğerin normale dönmeye başlamış olmasından kaynaklandığını düşünüyoruz.

Çalışmamızda DİLİ yan etkisine neden olan nintedanib, CCl_4'e bağlı hepatotoksisite zemininde farklı zamanlarda kullanılmıştır. İlk gün sakrifiye edilen sıçanlarda nintedanibin CCl_4'ten 12 saat önce uygulandığı CCl_4+Ninö grubunda, CCl_4 grubuna kıyasla daha fazla hasar gerçekleşmiştir. Bu durumun neden gerçekleştiği tartışılması gereken bir konudur. Öncelikle iki ilacı metabolize eden enzimler farklıdır. Nintedanib, daha çok hidrolik esterazlar aracılığıyla metabolize olmakta ve sonrasında glukoronidasyona uğramaktadır. CYP enzimleri ile metabolizması oldukça azdır(114). CCl_4 ise CYP enzimleri tarafından metabolize edilmekte ve esas hepatotoksik etki metaboliti olan CCl3 tarafından gerçekleştirilmektedir(87). Yapılan preklinik

çalışmalarda nintedanib ve metaboliti BIBF 1202 ve onun da metaboliti BIBF 1202 glukoronid, preklinik çalışmalarda CYP enzimlerini indüklememiş veya inhibe etmemiştir. Bu yüzden de nintedanibin CYP metabolizmasına dayanan ilaç-ilaç etkileşimi riski düşük kabul edilmektedir(117). Tüm bu nedenlerde dolayı bizim çalışmamızda da bu etkileşime bağlı karaciğer hasarının artmış olma ihtimali oldukça düşüktür diye düşünmekteyiz.

Altta yatan karaciğer hastalığının bulunması da ilaca bağlı karaciğer hasarı ile ilişkilendirilmektedir. Tüberküloz tedavisi sırasında hastada Hepatit B veya Hepatit C bulunması durumunda tüberküloz tedavisinde kullanılan ilaçlara bağlı karaciğer hasarı ihtimali artmaktadır(129). Kronik viral hepatitlerde immun sistemin dengesi oldukça önemlidir. İmmunsupresyona neden olabilecek herhangi bir ilacın verilmesi hastada akut hepatit alevlenmesine yol açıp indirekt DİLİ görülmesine neden olabilmektedir(58). Bu durumun klinik hayattaki karşılığını kanser kemoterapisi rejimlerinde görebilmekteyiz. Kanser kemoterapisine başlamadan önce hastanın HBV serolojisini kontrol etmek standart bir uygulama haline gelmiştir. Hatta kronik HBV tanılı hastalara profilaktik antiviral terapi, kemoterapinin öncesinden başlayarak kemoterapinin tamamlanmasından 6 ay sonrasına kadar önerilmektedir(130). Viral enfeksiyonlar ve DİLİ arasındaki ilişki de kafa karıştırıcı bulgular da bulunmaktadır. Hem viral hem de bakteriyel enfeksiyon esnasında parasetamol toksisitesi eşiğinin düştüğü hayvan çalışmasında gösterilmiştir(131). Ancak adenovirus ve retrovirus enfeksiyonlarında ise tam tersi bir durum gösterilmiştir(132,133). Altta yatan karaciğer hasarı ve DİLİ arasındaki ilişki enfeksiyonlarla sınırlı değildir. Kronik alkol tüketimi ve alkole bağlı yağlı karaciğer hastalığı dünyada önde gelen hastalıklardan birisidir. Hastalarda karaciğer fibrozisi ve siroza yol açabilir. (134). Alkol, reçeteli ilaçlarla iki temel yolla etkileşebilir: İlaçların vücuttaki dağılım ve atılım süreçlerini yani farmakokinetik parametreleri değiştirebilir ya da ilaçların mevcut olduğu durumlarda alkolün metabolizmasını farklılaştırabilir. Aşırı alkol tüketimi, mide boşalmasını hızlandırarak veya ilaç metabolizmasında görevli CYP2E1 gibi enzimleri artırarak ilaçların vücutta işlenme şeklini etkileyebilir(135,136). Bundan dolayı da alkol tüketimi DİLİ açısından önemli bir faktör olarak karşımıza çıkar. Alkol kullanımı ile izoniazid, metotreksat ve halotan' a bağlı karaciğer hasarının arasında ilişki olduğu

düşünülse de mevcut kanıtlar kısıtlı görünmektedir(137). Yine ağır alkol tüketen insanlar için duloksetin hepatotoksisite açısından etiketlenmiş olsa da mevcut kanıt burada da kısıtlıdır(138). Biz de çalışmamızda CCl_4'e bağlı karaciğer hasarı modeli oluşturarak karaciğerde bir nevi hastalık hali oluşturmuş olduk. Karaciğer hasarının ilaçla birlikte indüklendiği CCl_4+Nin ve hasardan 12 saat sonra ilaç verildiği CCl_4+Nins gruplarında hem 1.gün sakrifiye edilen sıçanlarda hem de 1.hafta sakrifiye edilen sıçanlarda CCl_4 grubuna kıyasla artmış bir karaciğer hasarı yoktur. Ancak nintedanibin CCl_4'ten 12 saat önce verildiği grupta karaciğer hasarı 1.günde artmış olarak bulunmuştur. Bu bilgiler bize altta yatan bir karaciğer hastalığı varlığında DİLİ yan etkisi olan nintedanibin dikkatli kullanılması gerektiğini düşündürmektedir. Çalışmamıza farklı bir açıdan bakarsak da DİLİ yan etkisine sahip nintedanib, hepatotoksik bir kimyasal olan CCl_4 ile yakın zamanda alındığından dolayı hepatotoksik özelliğe sahip ilaçlarla da nintedanib kullanımı dikkatle takip etmeye değer olabilir. Biz artmış karaciğer hasarının TGF-β sinyal yolaklarının inhibisyonuyla beraber gerçekleşen kontrolsüz inflamasyondan gerçekleşmiş olabileceğini düşündük. TGF-β'nın rol oynaması nedeniyle bu bir farmakodinamik etkileşim gibi durmaktadır. Ancak her ne kadar yukarda CYP enzimleri üzerinden ilaç etkileşiminin düşük ihtimalli olduğunu söylemişsek de bu çalışmada değerlendirmediğimiz başka bir farmakokinetik ya da farmakodinamik etkileşim bu duruma yol açmış olabilir. Klinikte nintedanib kullanan hastalarda karaciğer enzim yükselmesi durumlarında nintedanib kesilmeden veya doz azaltımı yapılmadan önce hastanın aldığı diğer ilaçlar ve ksenobiyotiklerin karaciğer hasarı açısından incelenmesi ve nintedanib tedavisinin devamı ile ilgili karar alırken bunların da dikkate alınması gerekebilir diye düşünmekteyiz. Çalışmamızı kısıtlayan bir başka durum ise deneylerin sıçanlarla yapılmış olmasıdır. Klinikte önemli yararlar gösteren nintedanib ile ilgili çalışmaların artması ilacın daha güvenli bir şekilde kullanılmasına fayda sağlayacaktır.

6. SONUÇLAR

Çalışmamızda CCl_4 ile indüklenen karaciğer hasarı modelinde multiple tirozin kinaz inhibitörü nintedanibin karaciğer hasarına etkisi 3 farklı zamanda uygulanarak olası etkisi değerlendirilmiştir. Ayrıca sıçanlar 24. Saatte ve 1.haftanın sonunda sakrifiye edilerek olası etkinin ileri döneme taşınıp taşınmadığı da değerlendirilmiştir. Bulgularımıza göre CCl_4 uygulamasından 12 saat önce Nintedanib verdiğimiz CCl_4+Ninö grubunda karaciğer transaminazları olan ALT, AST ile IL-6 ve TNF-α seviyeleri 1.gün sakrifiye edilen sıçanlarda yüksek bulunmuştur. Histopatoloji bulgularının da bu durumu desteklemesiyle karaciğer hasarının bu grupta CCl_4 grubundan daha fazla olduğu görülmüştür. Nintedanibin CCl_4' ten yarım saat önce verildiği CCl_4+Nin ve 12 sat sonra verildiği CCl_4+Nins gruplarında ALT, AST ile IL-6 ve TNF-α seviyeleri sağlıklı gruba kıyasla artmış olmasına rağmen CCl_4 grubuyla aralarında bir fark bulunamamıştır. Ancak 1. hafta sakrifiye edilen sıçanların sonuçları incelendiğinde ise karaciğer hasarı indüklenmiş bütün gruplarda karaciğer hasarının normale döndüğü birbirlerinden farkı olmadığı anlaşılmaktadır. Bu tarafıyla da çalışmamızın bulguları nintedanibin gerçek hayattaki verileri ile uyumlu görünmektedir. Biz ilk gün sonunda artmış karaciğer hasarının nintedanibin yaptığı TGF-β sinyal yolaklarını inhibe etmesinden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Bu haliyle de çalışmamız nintedanibe bağlı DİLİ gelişmesini mekanistik olarak açıklayan ilk çalışmalardan birisidir. Ancak çalışmamızın sıçanlarla gerçekleştirilmiş olmasından dolayı klinik çalışmalarla da doğrulanması gerekmektedir. Ayrıca deneyimiz 1.haftanın sonunda sonlandırılmıştır. Bu tarafıyla da nintedanibin uzun dönem etkilerini gösterme açısından da daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Raschi E, Fusaroli M, Gatti M, Caraceni P, Poluzzi E, De Ponti F. Liver Injury with Nintedanib: A Pharmacovigilance– Pharmacokinetic Appraisal. Pharmaceuticals. 2022;
2. Lamb YN. Nintedanib: A Review in Fibrotic Interstitial Lung Diseases. Drugs. 2021.
3. Bendstrup E, Wuyts W, Alfaro T, Chaudhuri N, Cornelissen R, Kreuter M, et al. Nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis: Practical management recommendations for potential adverse events. Respiration. 2019.
4. Richeldi L, du Bois RM, Raghu G, Azuma A, Brown KK, Costabel U, et al. Efficacy and Safety of Nintedanib in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. N Engl J Med. 2014;
5. Noth I, Oelberg D, Kaul M, Conoscenti CS, Raghu G. Safety and tolerability of nintedanib in patients with idiopathic pulmonary fibrosis in the USA. European Respiratory Journal. 2018.
6. Ogura T, Inoue Y, Azuma A, Homma S, Kondoh Y, Tanaka K, et al. Real-World Safety and Tolerability of Nintedanib in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Interim Report of a Post-Marketing Surveillance in Japan. Adv Ther. 2023;
7. Wollin L, Togbe D, Ryffel B. Effects of Nintedanib in an Animal Model of Liver Fibrosis. Biomed Res Int. 2020;
8. Öztürk Akcora B, Storm G, Prakash J, Bansal R. Tyrosine kinase inhibitor BIBF1120 ameliorates inflammation, angiogenesis and fibrosis in CCl_4-induced liver fibrogenesis mouse model. Sci Rep. 2017;
9. Lin X, Wen J, Liu R, Gao W, Qu B, Yu M. Nintedanib inhibits tgf-β-induced myofibroblast transdifferentiation in human tenon's fibroblasts. Mol Vis. 2018;
10. Ihara H, Mitsuishi Y, Kato M, Takahashi F, Tajima K, Hayashi T, et al. Nintedanib inhibits epithelial-mesenchymal transition in A549 alveolar epithelial cells through regulation of the TGF-β/Smad pathway. Respir Investig. 2020;
11. Fabregat I, Moreno-Càceres J, Sánchez A, Dooley S, Dewidar B, Giannelli G, et al. TGF-β signalling and liver disease. FEBS J. 2016;
12. Niu L, Cui X, Qi Y, Xie D, Wu Q, Chen X, et al. Involvement of TGF-β1/Smad3 Signaling in Carbon Tetrachloride-Induced Acute Liver Injury in Mice. PLoS One. 2016;
13. Deng Z, Fan T, Xiao C, Tian H, Zheng Y, Li C, et al. TGF-β signaling in health, disease, and therapeutics. Signal Transduction and Targeted Therapy. 2024.
14. Santibañez JFS, Quintanilla M, Bernabeu C. TGF-β/TGF-β receptor system and its role in physiological and pathological conditions. Clinical Science. 2011.
15. Travis MA, Sheppard D. TGF-β activation and function in immunity. Annual

Review of Immunology. 2014.

16. Batlle E, Massagué J. Transforming Growth Factor-β Signaling in Immunity and Cancer. Immunity. 2019.
17. Jimi E, Furuta H, Matsuo K, Tominaga K, Takahashi T, Nakanishi O. The cellular and molecular mechanisms of bone invasion by oral squamous cell carcinoma. Oral Diseases. 2011.
18. Ikeuchi M, Tsutsui H, Shiomi T, Matsusaka H, Matsushima S, Wen J, et al. Inhibition of TGF-β signaling exacerbates early cardiac dysfunction but prevents late remodeling after infarction. Cardiovasc Res. 2004;
19. Si-Tayeb K, Lemaigre FP, Duncan SA. Organogenesis and Development of the Liver. Developmental Cell. 2010.
20. Juza RM, Pauli EM. Clinical and surgical anatomy of the liver: A review for clinicians. Clinical Anatomy. 2014.
21. Buob S, Johnston AN, Webster CRL. Portal Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. Journal of Veterinary Internal Medicine. 2011.
22. Han HS, Kang G, Kim JS, Choi BH, Koo SH. Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. Experimental and Molecular Medicine. 2016.
23. Petersen MC, Vatner DF, Shulman GI. Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. Nature Reviews Endocrinology. 2017.
24. Nguyen P, Leray V, Diez M, Serisier S, Le Bloc'H J, Siliart B, et al. Liver lipid metabolism. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl). 2008;
25. Haussinger D, Lamers WH, Moorman AFM. Hepatocyte heterogeneity in the metabolism of amino acids and ammonia. Enzyme. 1992.
26. Hou Y, Hu S, Li X, He W, Wu G. Amino acid metabolism in the liver: Nutritional and physiological significance. In: Advances in Experimental Medicine and Biology. 2020.
27. Almazroo OA, Miah MK, Venkataramanan R. Drug Metabolism in the Liver. Clinics in Liver Disease. 2017.
28. Morris SM. Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. Annual Review of Nutrition. 2002.
29. Chiang JYL, Ferrell JM. Bile acid metabolism in liver pathobiology. Gene Expression. 2018.
30. Trefts E, Gannon M, Wasserman DH. The liver. Current Biology. 2017.
31. Saxena R, Theise ND, Crawford JM. Microanatomy of the human liver - Exploring the hidden interfaces. Hepatology. 1999.
32. Martini T, Naef F, Tchorz JS. Spatiotemporal Metabolic Liver Zonation and Consequences on Pathophysiology. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease. 2023.
33. Kietzmann T. Metabolic zonation of the liver: The oxygen gradient revisited. Redox Biology. 2017.

34. Jungermann K, Kietzmann T. Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. Annual Review of Nutrition. 1996.

35. Yayla M, Halici Z, Unal B, Bayir Y, Akpinar E, Gocer F. Protective effect of Et-1 receptor antagonist bosentan on paracetamol induced acute liver toxicity in rats. Eur J Pharmacol. 2014;

36. Alsahli TG, Alharbi KS, Alenezi SK, Alqahtani R, Afzal M, Sayyed N. Aegeline improves doxorubicin-induced liver toxicity by modulating oxidative stress and Bax/Bcl2/caspase/NF-κB signaling. Sci Rep [Internet]. 2025 Jul 26;15(1):27203. Available from: https://www.nature.com/articles/s41598-025-09675-8

37. Ezhilarasan D, Karthikeyan S, Najimi M, Vijayalakshmi P, Bhavani G, Jansi Rani M. Preclinical liver toxicity models: Advantages, limitations and recommendations. Toxicology [Internet]. 2025 Feb;511:154020. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300483X24003019

38. Sakhuja P. Pathology of alcoholic liver disease, can it be differentiated from nonalcoholic steatohepatitis? World J Gastroenterol. 2014;

39. Andrade RJ, Chalasani N, Björnsson ES, Suzuki A, Kullak-Ublick GA, Watkins PB, et al. Drug-induced liver injury. Nat Rev Dis Prim. 2019;

40. Benedetti MS, Whomsley R, Poggesi I, Cawello W, Mathy FX, Delporte ML, et al. Drug metabolism and pharmacokinetics. Drug Metabolism Reviews. 2009.

41. Mittal B, Tulsyan S, Kumar S, Mittal RD, Agarwal G. Cytochrome P450 in Cancer Susceptibility and Treatment. In: Advances in Clinical Chemistry. 2015.

42. Nebert DW, Wikvall K, Miller WL. Human cytochromes P450 in health and disease. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 2013.

43. Rendic S, Guengerich FP. Survey of human oxidoreductases and cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of xenobiotic and natural chemicals. Chemical Research in Toxicology. 2015.

44. Guengerich FP. Cytochromes P450, drugs, and diseases. Molecular interventions. 2003.

45. Achour B, Barber J, Rostami-Hodjegan A. Expression of hepatic drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes and their intercorrelations: A meta-analysis. Drug Metab Dispos. 2014;

46. Ye H, Nelson LJ, Del Moral MG, Martínez-Naves E, Cubero FJ. Dissecting the molecular pathophysiology of drug-induced liver injury. World Journal of Gastroenterology. 2018.

47. Aksakalli-Magden Z, Ugan R, Toktay E, Halici Z, Cadirci E. Potential role of angiotensin converting enzyme/neprilysin pathway and protective effects of omapatrilat for paracetamol-induced acute liver injury. Exp Ther Med. 2022;

48. Clarke DJ, Moghrabi N, Monaghan G, Cassidy A, Boxer M, Hume R, et al. Genetic defects of the UDP-glucuronosyltransferase-1 (UGT1) gene that cause

familial non-haemolytic unconjugated hyperbilirubinaemias. In: Clinica Chimica Acta. 1997.

49. Vítek L, Tiribelli C. Gilbert's syndrome revisited. Journal of Hepatology. 2023.
50. Reuben A, Koch DG, Lee WM. Drug-induced acute liver failure: Results of a U.S. multicenter, prospective study. Hepatology. 2010;
51. Wei G, Bergquist A, Broomé U, Lindgren S, Wallerstedt S, Almer S, et al. Acute liver failure in Sweden: Etiology and outcome. J Intern Med. 2007;
52. Suk KT, Kim DJ, Kim CH, Park SH, Yoon JH, Kim YS, et al. A prospective nationwide study of drug-induced liver injury in korea. Am J Gastroenterol. 2012;
53. Sgro C, Clinard F, Ouazir K, Chanay H, Allard C, Guilleminet C, et al. Incidence of drug-induced hepatic injuries: A French population-based study. Hepatology. 2002;
54. Björnsson ES, Bergmann OM, Björnsson HK, Kvaran RB, Olafsson S. Incidence, presentation, and outcomes in patients with drug-induced liver injury in the general population of iceland. Gastroenterology. 2013;
55. Andrade RJ, Lucena MI, Fernández MC, Pelaez G, Pachkoria K, García-Ruiz E, et al. Drug-induced liver injury: An analysis of 461 incidences submitted to the Spanish registry over a 10-year period. Gastroenterology. 2005;
56. Björnsson E, Olsson R. Outcome and prognostic markers in severe drug-induced liver disease. Hepatology. 2005;
57. Amadi CN, Orisakwe OE. Herb-induced liver injuries in developing nations: An update. Toxics. 2018.
58. Hoofnagle JH, Björnsson ES. Drug-Induced Liver Injury — Types and Phenotypes. N Engl J Med. 2019;
59. Zimmerman H. Hepatotoxicity: the adverse effects of drugs and other chemicals on the liver. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1999.
60. Ohashi N, Kohno T. Analgesic Effect of Acetaminophen: A Review of Known and Novel Mechanisms of Action. Frontiers in Pharmacology. 2020.
61. Fisher ES, Curry SC. Evaluation and treatment of acetaminophen toxicity. In: Advances in Pharmacology. 2019.
62. Larson AM, Polson J, Fontana RJ, Davern TJ, Lalani E, Hynan LS, et al. Acetaminophen-induced acute liver failure: Results of a United States multicenter, prospective study. Hepatology. 2005;
63. Watkins PB. Idiosyncratic Liver Injury: ChallengeS and Approaches. Toxicol Pathol. 2005;
64. Pye M, Northcote RJ, Cobbe SM. Acute hepatitis after parenteral amiodarone adnministration. Heart. 1988;
65. Dalton TA, Berry RS. Hepatotoxicity associated with sustained-release niacin. Am J Med. 1992;

66. Chalasani N, Bonkovsky HL, Fontana R, Lee W, Stolz A, Talwalkar J, et al. Features and outcomes of 899 patients with drug-induced liver injury: The DILIN prospective study. Gastroenterology. 2015;

67. Chen M, Borlak J, Tong W. High lipophilicity and high daily dose of oral medications are associated with significant risk for drug-induced liver injury. Hepatology. 2013;

68. Dipaola F, Molleston JP, Gu J, Cirulli ET, Chalasani N, Barnhart H, et al. Antimicrobials and Antiepileptics Are the Leading Causes of Idiosyncratic Drug-induced Liver Injury in American Children. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2019;

69. George N, Chen M, Yuen N, Hunt CM, Suzuki A. Interplay of gender, age and drug properties on reporting frequency of drug-induced liver injury. Regul Toxicol Pharmacol. 2018;

70. Fountain FF, Tolley E, Chrisman CR, Self TH. Isoniazid hepatotoxicity associated with treatment of latent tuberculosis infection: A 7-year evaluation from a public health tuberculosis clinic. Chest. 2005;

71. Danan G, Benichou C. Causality assessment of adverse reactions to drugs-I. A novel method based on the conclusions of international consensus meetings: Application to drug-induced liver injuries. J Clin Epidemiol. 1993;

72. Kumra S, Herion D, Jacobsen LK, Briguglia C, Grothe D. Case study: Risperidone-induced hepatotoxicity in pediatric patients. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry. 1997;

73. Ghabril M, Bonkovsky HL, Kum C, Davern T, Hayashi PH, Kleiner DE, et al. Liver Injury From Tumor Necrosis Factor-α Antagonists: Analysis of Thirty-four Cases. Clin Gastroenterol Hepatol. 2013;

74. Fontana RJ, Hayashi P, Bonkovsky HL, Kleiner DE, Kochhar S, Gu J, et al. Presentation and outcomes with clinically apparent interferon beta hepatotoxicity. Dig Dis Sci. 2013;

75. Kleiner DE, Berman D. Pathologic changes in ipilimumab-related hepatitis in patients with metastatic melanoma. Dig Dis Sci. 2012;

76. Aliberti S, Grignani G, Allione P, Fizzotti M, Galatola G, Pisacane A, et al. An acute hepatitis resembling autoimmune hepatitis occurring during imatinib therapy in a gastrointestinal stromal tumor patient. Am J Clin Oncol Cancer Clin Trials. 2009;

77. Lee WM. Etiologies of acute liver failure. Seminars in Liver Disease. 2008.

78. Craveiro NS, Lopes BS, Tomás L, Almeida SF. Drug Withdrawal Due to Safety: A Review of the Data Supporting Withdrawal Decision. Curr Drug Saf. 2019;

79. McGill MR, Jaeschke H. Animal models of drug-induced liver injury. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease. 2019.

80. Jaeschke H, Xie Y, McGill MR. Acetaminophen-induced liver injury: From animal models to humans. Journal of Clinical and Translational Hepatology.

2014.

81. McGill MR, Williams CD, Xie Y, Ramachandran A, Jaeschke H. Acetaminophen-induced liver injury in rats and mice: Comparison of protein adducts, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the mechanism of toxicity. Toxicol Appl Pharmacol. 2012;

82. Mcgill MR, Yan HM, Ramachandran A, Murray GJ, Rollins DE, Jaeschke H. HepaRG cells: A human model to study mechanisms of acetaminophen hepatotoxicity. Hepatology. 2011;

83. McGill MR, Sharpe MR, Williams CD, Taha M, Curry SC, Jaeschke H. The mechanism underlying acetaminophen-induced hepatotoxicity in humans and mice involves mitochondrial damage and nuclear DNA fragmentation. J Clin Invest. 2012;

84. Bartolone JB, Sparks K, Cohen SD, Khairallah EA. Immunochemical detection of acetaminophen-bound liver proteins. Biochem Pharmacol. 1987;

85. Mossanen jc, Tacke f. Acetaminophen-induced acute liver injury in mice. Lab Anim. 2015;

86. Weber LWD, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: Carbon tetrachloride as a toxicological model. Critical Reviews in Toxicology. 2003.

87. Slater TF. Necrogenic action of carbon tetrachloride in the rat: A speculative mechanism based on activation. Nature. 1966;

88. Knockaert L, Berson A, Ribault C, Prost PE, Fautrel A, Pajaud J, et al. Carbon tetrachloride-mediated lipid peroxidation induces early mitochondrial alterations in mouse liver. Lab Investig. 2012;

89. Thrall KD, Vucelick ME, Gies RA, Zangar RC, Weitz KK, Poet TS, et al. Comparative metabolism of carbon tetrachloride in rats, mice, and hamsters using gas uptake and pbpk modeling. J Toxicol Environ Heal - Part A. 2000;

90. Teschke R. Liver injury by carbon tetrachloride intoxication in 16 patients treated with forced ventilation to accelerate toxin removal via the lungs: A clinical report. Toxics. 2018.

91. Tsukamoto H, Machida K, Dynnyk A, Mkrtchyan H. “Second hit” models of alcoholic liver disease. Seminars in Liver Disease. 2009.

92. Hunter AL, Holscher MA, Neal RA. Thioacetamide induced hepatic necrosis. I. Involvement of the mixed function oxidase enzyme system. J Pharmacol Exp Ther. 1977;

93. Hajovsky H, Hu G, Koen Y, Sarma D, Cui W, Moore DS, et al. Metabolism and toxicity of thioacetamide and thioacetamide S-Oxide in rat hepatocytes. Chem Res Toxicol. 2012;

94. Kang JS, Wanibuchi H, Morimura K, Wongpoomchai R, Chusiri Y, Gonzalez FJ, et al. Role of CYP2E1 in thioacetamide-induced mouse hepatotoxicity. Toxicol Appl Pharmacol. 2008;

95. Chia ZJ, Cao YN, Little PJ, Kamato D. Transforming growth factor-β receptors:

versatile mechanisms of ligand activation. Acta Pharmacologica Sinica. 2024.

96. Vander Ark A, Cao J, Li X. TGF-β receptors: In and beyond TGF-β signaling. Cellular Signalling. 2018.

97. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-β1 gene results in multifocal inflammatory disease [14]. Nature. 1992;

98. Massagué J. TGFβ in Cancer. Cell. 2008.

99. Ikushima H, Miyazono K. TGFB 2 signalling: A complex web in cancer progression. Nature Reviews Cancer. 2010.

100. Ghafoory S, Varshney R, Robison T, Kouzbari K, Woolington S, Murphy B, et al. Platelet TGF-β1 deficiency decreases liver fibrosis in a mouse model of liver injury. Blood Adv. 2018;

101. Meijer C, Wiezer MJ, Diehl AM, Yang SQ, Schouten HJ, Meijer S, et al. Kupffer cell depletion by CI2MDP-liposomes alters hepatic cytokine expression and delays liver regeneration after partial hepatectomy. Liver. 2000;

102. Karlmark KR, Weiskirchen R, Zimmermann HW, Gassler N, Ginhoux F, Weber C, et al. Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1+ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis. Hepatology. 2009;

103. Gough NR, Xiang X, Mishra L. TGF-β Signaling in Liver, Pancreas, and Gastrointestinal Diseases and Cancer. Gastroenterology. 2021.

104. Karcioglu SS, Palabiyik SS, Bayir Y, Karakus E, Mercantepe T, Halici Z, et al. The Role of RAAS Inhibition by Aliskiren on Paracetamol-Induced Hepatotoxicity Model in Rats. J Cell Biochem. 2016;

105. Hilberg F, Roth GJ, Krssak M, Kautschitsch S, Sommergruber W, Tontsch-Grunt U, et al. BIBF 1120: Triple angiokinase inhibitor with sustained receptor blockade and good antitumor efficacy. Cancer Res. 2008;

106. Selman M, King J, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: Prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. Annals of Internal Medicine. 2001.

107. Beyer C, Distler JHW. Tyrosine kinase signaling in fibrotic disorders. Translation of basic research to human disease. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease. 2013.

108. Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF-β: The master regulator of fibrosis. Nature Reviews Nephrology. 2016.

109. Hostettler KE, Zhong J, Papakonstantinou E, Karakiulakis G, Tamm M, Seidel P, et al. Anti-fibrotic effects of nintedanib in lung fibroblasts derived from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. Respir Res. 2014;

110. Keating GM. Nintedanib: A Review of Its Use in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Drugs. 2015;

111. Mross K, Stefanic M, Gmehling D, Frost A, Baas F, Unger C, et al. Phase I study of the angiogenesis inhibitor BIBF 1120 in patients with advanced solid

tumors. Clin Cancer Res. 2010;

112. Dallinger C, Trommeshauser D, Marzin K, Liesener A, Kaiser R, Stopfer P. Pharmacokinetic Properties of Nintedanib in Healthy Volunteers and Patients With Advanced Cancer. J Clin Pharmacol. 2016;

113. Schmid U, Doege C, Dallinger C, Freiwald M. Population pharmacokinetics of nintedanib in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. Pulm Pharmacol Ther. 2018;

114. Wind S, Schmid U, Freiwald M, Marzin K, Lotz R, Ebner T, et al. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Nintedanib. Clinical Pharmacokinetics. 2019.

115. Ogura T, Taniguchi H, Azuma A, Inoue Y, Kondoh Y, Hasegawa Y, et al. Safety and pharmacokinetics of nintedanib and pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis. Eur Respir J. 2015;

116. Lasky JA, Criner GJ, Lazarus HM, Kohlbrenner V, Bender S, Richeldi L. Safety of Nintedanib in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Global Pharmacovigilance Data. Adv Ther. 2020;

117. Boehringer Ingelheim İlaç Tic.Aş. Ofev. Kısa Ürün Bilgisi [Internet]. Available from: https://www.titck.gov.tr/kubkt

118. Ikeda S, Sekine A, Baba T, Yamanaka Y, Sadoyama S, Yamakawa H, et al. Low body surface area predicts hepatotoxicity of nintedanib in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. Sci Rep. 2017;

119. Fu Y, Gong T, Tsauo J, Sang M, Zhao H, Zhang X, et al. Nintedanib, a multitarget tyrosine kinase inhibitor, suppresses postoperative peritoneal adhesion formation in a rat model. Surg (United States). 2021;

120. Yoladi FB, Palabiyik-Yucelik SS, Bahador Zirh E, Halici Z, Baydar T. Effects of idebenone and coenzyme Q10 on NLRP3/caspase-1/IL-1β pathway regulation on ethanol-induced hepatotoxicity in rats. Drug Chem Toxicol [Internet]. 2024 Nov 28;47(6):1205–17. Available from: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01480545.2024.2351191

121. Polat B, Halici Z, Cadirci E, Karakus E, Bayir Y, Albayrak A, et al. Liver 5-HT7 receptors: A novel regulator target of fibrosis and inflammation-induced chronic liver injury in vivo and in vitro. Int Immunopharmacol. 2017;

122. Palabiyik SS, Karakus E, Akpinar E, Halici Z, Bayir Y, Yayla M, et al. The Role of Urotensin Receptors in the Paracetamol-Induced Hepatotoxicity Model in Mice: Ameliorative Potential of Urotensin II Antagonist. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2016;

123. Ferah I, Halici Z, Bayir Y, Demirci E, Unal B, Cadirci E. The role of infliximab on paracetamol-induced hepatotoxicity in rats. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2013;

124. Sarioğlu N, Sunay FB, Yay A, Korkut O, Erel F, Hişmioğullari AA, et al. Antiinflammatory effects of adalimumab, tocilizumab, and steroid on lipopolysaccharide-induced lung injury. Turkish J Med Sci. 2021;

125. Dooley S, Ten Dijke P. TGF-β in progression of liver disease. Cell and Tissue Research. 2012.

126. David CJ, Massagué J. Contextual determinants of TGFβ action in development, immunity and cancer. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2018.

127. Colak S, ten Dijke P. Targeting TGF-β Signaling in Cancer. Trends in Cancer. 2017.

128. LI Y, GUO Z, CUI H, WANG T, XU Y, ZHAO J. Urantide prevents CCl_4-induced acute liver injury in rats by regulating the MAPK signalling pathway. Mol Med Rep. 2021;

129. Ghabril M, Vuppalanchi R, Chalasani N. Drug-Induced Liver Injury in Patients With Chronic Liver Disease. Liver Int [Internet]. 2025 Mar 10;45(3). Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/liv.70019

130. Cohen EB, Regev A, Garg A, Di Bisceglie AM, Lewis JH, Vierling JM, et al. Consensus Guidelines: Best Practices for the Prevention, Detection and Management of Hepatitis B Virus Reactivation in Clinical Trials with Immunosuppressive/Immunomodulatory Therapy. Drug Saf. 2024;

131. Maddox JF, Amuzie CJ, Li M, Newport SW, Sparkenbaugh E, Cuff CF, et al. Bacterial- and viral-induced inflammation increases sensitivity to acetaminophen hepatotoxicity. J Toxicol Environ Heal - Part A Curr Issues. 2010;

132. Chow HH, Tang Y, Li P, Fisher RL, Brendel K, Watson RR. Increased resistance to acetaminophen-induced hepatotoxicity in retrovirus-infected mice. Biopharm Drug Dispos. 1996;

133. Getachew Y, James L, Lee WM, Thiele DL, Miller BC. Susceptibility to acetaminophen (APAP) toxicity unexpectedly is decreased during acute viral hepatitis in mice. Biochem Pharmacol. 2010;

134. Gao B, Bataller R. Alcoholic liver disease: Pathogenesis and new therapeutic targets. Gastroenterology. 2011.

135. Liangpunsakul S, Kolwankar D, Pinto A, Gorski JC, Hall SD, Chalasani N. Activity of CYP2E1 and CYP3A enzymes in adults with moderate alcohol consumption: A comparison with nonalcoholics. Hepatology. 2005;

136. Mohammadi S, Nezami A, Esmaeili Z, Rouini MR, Ardakani YH, Lavasani H, et al. Pharmacokinetic changes of tramadol in rats with hepatotoxicity induced by ethanol and acetaminophen in perfused rat liver model. Alcohol. 2019;

137. Zimmerman HJ. Effects of Alcohol on Other Hepatotoxins. Alcohol Clin Exp Res. 1986;

138. Vuppalanchi R, Hayashi PH, Chalasani N, Fontana RJ, Bonkovsky H, Saxena R, et al. Duloxetine hepatotoxicity: A case-series from the drug-induced liver injury network. Aliment Pharmacol Ther. 2010.