

Effects of Nifedipine on Histology and AgNOR Parameters of Liver

Haluk Ozparlak (Corresponding author)

Selcuk University, Faculty of Science, Department of Biology, 42250, Konya, Turkey
E-mail: hozparlak@selcuk.edu.tr

Canan Akgul

Selcuk University, Faculty of Science, Department of Biology, 42250, Konya, Turkey

Ilhami Celik

Selcuk University, Faculty of Veterinary Medicine,
Department of Histology and Embryology, 42250, Konya, Turkey

Abstract

In the present study, effects on histology of liver of high dose nifedipine, calcium channel blocker, which was administered to the rats for 30 days were evaluated and also effects of the cessation of the administration after 40 days. At the beginning of the study, the rats were divided into control and nifedipine groups. Everyday, standard rat feed containing 125 mg/kg powdered nifedipine was given to the nifedipine group for one week. During the following three weeks, 250 mg/kg nifedipine was given to the rats with the same method. Histologic sections were obtained from the tissue samples of liver on the 30th and 70th days of the study. The histological changes occurring in the liver were evaluated under the light microscope. Glycogen content in hepatocytes was also evaluated in the sections stained with periodic-acid Schiff (PAS) method. Besides, Nukleolus Organizer Regions (NOR) in nucleus of hepatocytes were stained with silver and some of the AgNOR parameters (AgNOR number, AgNOR area, AgNOR area/nucleus area ratio) were determined. A statistically significant ($p<0.05$) increase was observed in the frequency of dikaryotic hepatocytes of the nifedipine-administered group. On the other hand, a significant ($p<0.05$) decrease was observed in the frequency of dikaryotic hepatocytes in the nifedipine-ceased group. A significant ($p<0.05$) increase was observed in one of the hepatocyte AgNOR parameters, AgNOR area/nucleus area ratio (%) in the nifedipine-administered group. This increase may be due to a rise in the synthesis of some enzymes and thus in the synthesis of protein.

Keywords: AgNOR, Calcium channel blocker, Liver, Nifedipine

Nifedipinin Karaciğer Histolojisi ve AgNOR Parametreleri Üzerine Etkileri

Özet

Bu çalışmada ratlara 30 gün süreyle verilen yüksek dozdaki kalsiyum kanal blokörü nifedipinin, karaciğer histolojisi üzerindeki etkileri çalışmanın 30. gününde ve ayrıca ilaç kesildikten sonraki 40. günde değerlendirilmiştir. Çalışma başlangıcında ratlar kontrol ve nifedipin grubu olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Nifedipin grubuna bir hafta süreyle toz formundaki 125 mg/kg nifedipin her gün standart rat yemine karıştırılarak verilmiştir. İkinci haftadan itibaren üç hafta boyunca her gün 250 mg/kg nifedipin aynı yöntemle verilmiştir. Çalışmanın 30 ve 70. günlerinde ratların karaciğer dokusu örneklerinden histolojik kesitler alınarak, karaciğerin histolojik yapısında meydana gelen değişiklikler ışık mikroskopunda değerlendirilmiştir. Periyodik-asit Schiff (PAS) yöntemiyle boyanan kesitlerde hepatositlerin glikojen içeriği de değerlendirilmiştir. Ayrıca hepatositlerin çekirdeklerindeki nukleolus organizatör bölgeleri (NOR) gümüşleme yöntemiyle boyanarak bazı AgNOR parametreleri (AgNOR sayısı, AgNOR alanı, AgNOR alanı/çekirdek alanı oranı) tespit edilmiştir. Nifedipin uygulanan grubun dikaryotik hepatosit oranında istatistiksel olarak önemli düzeyde ($p<0.05$) artış tespit edilmiştir. Nifedipin uygulaması kesilen grupta ise dikaryotik hepatosit oranında önemli düzeyde ($p<0.05$) azalma tespit edilmiştir. Hepatosit AgNOR parametrelerinden AgNOR alanı/çekirdek alanı oranı (%) nifedipin

uygulanan grupta önemli düzeyde ($p<0.05$) artış göstermiştir. Bu artışın, bazı enzimlerin sentezindeki dolayısıyla da protein sentezindeki bir artıştan kaynaklanması muhtemeldir.

Anahtar Kelimeler: AgNOR, Kalsiyum kanal blokörü, Karaciğer, Nifedipin

1. Giriş

Günümüzde piyasada bulunan bütün kalsiyum kanal blokörleri hücre membranındaki L-tipi voltaja bağımlı kalsiyum kanalları üzerinde bulunan özel bağlanma yerlerine yüksek afiniteli olarak bağlanır ve bu kanalları bloke ederler. Böylece hücre içine kalsiyum girişini azaltarak etki gösterirler. Bu etkileri damar düz kası ve kalp hücreleri düzeyinde oluşturmaktadır. Kalsiyum girişini azaltarak damarları gevşetirler, kalp kasını ve diğer kalp hücrelerini deprese ederler (Hedge, 2005). Nifedipin, dihidropiridin türevi ilaçların klinik kullanıma ilk gireni ve en fazla denenmiş olanıdır. Bu grup ilaçların prototipi olarak kabul edilmektedir. Nifedipin, kalsiyumun L-tipi veya diğer adıyla “yavaş kalsiyum kanallarından” geçişini inhibe eder. Damar düz kas ve kalp kası hücrelerindeki kalsiyum kanallarını inhibe ederek uyarılabılır membranlarda kalsiyum akışını önleyerek etki gösterir. Periferel arteriyollerde vazodilatasyon sağlar ve kan basıncının düşmesine sebep olur. Kan basıncını düşüren kısa etki süreli bir ilaçtır ve hemen salınan şekilleri hipertansiyon tedavisinde tercih edilmez. Nifedipinin kalsiyum blokajının iki önemli karakteristiği, reversibl olması ve ilaç bırakılınca sona ermesidir (Kayaalp ve 2005; Mangıroğlu, 2011).

Bu ilaçların terapötik endikasyonlarının çokluğu nedeniyle daha fazla hasta bu ilaçları günlük temelde kullanmakta ve buna bağlı olarak, kazara ve kasten aşırı doz riski artmaktadır. Hastalar akut doz aşımaları, kendi kendine ilaçla tedavi girişimleri sonucunda oluşan kazara doz aşımaları, ilaç toksisitesi ve ilaç-ilaç etkileşimleri ile oluşan toksisite sonucunda hastaneye başvurumaktadırlar. 2003 yılında kalsiyum kanal blokörlerine maruziyet nedeniyle 9650 vaka rapor edilmiştir. Bu maruziyetlerden 3554 vakada etki gözlenmemiş, 900 vakada minimal etkiler, 1142 vakada orta dereceli etkiler, 339 vakada başlıca büyük etkiler rapor edilmiş ve 57 vaka ölümle sonuçlanmıştır. Kalsiyum kanal blokörlerine maruziyetlerin %5.2'si öldürücü olmuştur (Watson ve ark., 2004).

Bazı kanserlerin teşhisinde, evrelerinin belirlenmesinde ve hastalığın seyri ile prognozun takibinde kullanılan interfazdaki hücre çekirdeğindeki nükleolus organizatör bölgelerinin (Nucleolar Organizatör Bölgeleri, NORs) gümüşleme yöntemiyle boyanması yöntemi, son yıllarda sitogenetik çalışmalarda kendine geniş yer bulan önemli, basit ve ucuz bir yöntemdir (Aydın, 2004). İnterfaz ya da mitoz sırasında transkripsiyonel olarak aktif olan AgNORs (Argyrophilic nucleolar organizatör bölgeleri) 'ların yerleşimi, gümüş boyama ile gösterilebilmektedir (Hubel, 1985; Platon ve ark., 1985; Jimenez ve ark., 1988). Ribozomal genlerin aktif transkripsiyonel bölgesi ile gümüş boyanırılığının arasında doğrudan ilişki vardır (Mikelsaar ve Schwarzscher, 1978; Platon ve ark., 1985; Payao ve ark., 1994; Sirri ve ark., 1997). Ancak mitotik AgNOR'ların gümüşle boyanabilmesi için, AgNOR kromatininin hücre döngüsünün bir önceki interfazında transkripsiyonel olarak aktif olması gerekmektedir (Hubel, 1985; Platon ve ark., 1985). Gümüş boyama tekniği, asidik bir ortamda gümüş nitratın AgNOR proteinleri tarafından metalik gümüş indirgenmesine dayanır. AgNOR boyama, DNAaz ya da RNAaz'lerden etkilenmez. Pronaz, tripsin ya da papain gibi proteolitik enzimlerden etkilenmektedir. Yani gümüş nitratı metalik gümüşe indirgeyen asıl madde rDNA ya da rRNA değildir. Bu bölgelere özgü AgNOR proteinleridir. Gümüş boyamaya neden olan materyalin, interfaz boyunca üretildiği ve profazda AgNOR'ların etrafında biriktiği ileri sürülmektedir (Schwarzscher ve ark., 1978).

Nifedipinin karaciğer üzerindeki fonksiyonel etkileriyle ilgili çeşitli araştırmalar bulunmaktadır (Ferzaan ve Rajagopalan, 1989; Hardy ve ark., 1995; Zanger ve ark., 1999). Dhar ve Farzan (1994) çalışmalarında ratlara verilen çok düşük dozdaki nifedipinin karaciğer, kalp, böbrek ve pankreas dokuları üzerine etkilerini incelemişlerdir. Bu çalışmada ise yüksek dozdaki nifedipinin karaciğer üzerindeki etkileri ışık mikroskopuyla histolojik düzeyde ilk kez değerlendirilmiştir. Ayrıca AgNOR parametreleri üzerindeki etkileri de ilk kez ortaya konmuştur. Böylece nifedipin ile yapılan deneysel çalışmalara ve bu maddenin etkileri hakkındaki literatür bilgilerine katkı sağlanması amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Yöntem

Çalışmada 20 günlük 32 adet Wistar albino rat kullanılmıştır. Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Deney Hayvanları Etik Kurulundan alınan onayla (2009/52) gerçekleştirilmiştir. Çalışma başlamadan önce ratlar kontrol (n=16) ve nifedipin (n=16) grubu olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Kontrol grubu olan ratlar deney süresi boyunca sadece standart rat yemi ve suyla beslenmiştir. Nifedipin grubuna ait ratlar ise yedi gün boyunca toz halindeki nifedipin (125 mg/kg) karıştırılan standart rat yemi ile beslenmiştir. Ratların öncelikle nifedipin karıştırılan yemi tüketmesi

sağlanmıştır. İkinci haftadan itibaren nifedipin (250 mg/kg) aynı yöntemle ratlara verilmiştir (Mangiroğlu, 2012). 30. gün sonunda her iki gruptan sekizer rat servikal dislokasyon ile ötanazi edilmiş ve doku örnekleri alınmıştır (Kontrol 30 ve nifedipin 30 grupları). Kalan 16 rat deneyin 70. gününe kadar sadece standart rat yemi ve su ile beslenmiş, 70. gün sonunda servikal dislokasyon ile ötanazi edilmiş ve doku örnekleri alınmıştır (Kontrol 70 ve nifedipin 70 grupları). Doku örnekleri %10'luk nötr formalin solüsyonunda tespit edilmiş, ardından parafin blokları hazırlanmış ve histolojik kesitler alınmıştır.

Dokuların genel histolojik yapılarını değerlendirmek ve dikaryotik hepatosit oranlarını tespit etmek amacıyla kesitlerin bir kısmına Hematoksilin-Eozin (H-E) ve bir kısmına Crossman üçlü boyası (Culling ve ark., 1985) uygulanmıştır. Karaciğer hücrelerindeki NOR (Nucleolus Organizer Region) parametrelerini belirlemek amacıyla diğer kısım kesitlere gümüşleme boyama yöntemi (Silver Staining Nucleolus Organizer Region, AgNOR) uygulanmıştır (Platon ve ark., 1986; Korek ve ark., 1991). Boyamalardan önce kesitler deparafinizasyon ve rehidrasyona tabi tutulmuş, boyamaların ardından dehidre edilen tüm kesitler ksilen serilerinden geçirilerek sentetik reçineyle kapatılmıştır.

Hazırlanan karaciğer preparatları dijital kameralı ışık mikroskopuyla (Olympus BX-51 Microscope with Olympus DP-71 Digital Camera System) incelenmiş ve gerekli görülen bölgelerin dijital görüntüleri kaydedilmiştir. Görüntüler, dijital görüntü analiz programıyla (DP2-BSW, Olympus corporation, Ver. 1.2, 2006) değerlendirilmiş ve aşağıda belirtilen parametrelerin sayısal verileri elde edilmiştir.

Preparatlarda her örnek için en az 50 hepatosit değerlendirilerek çekirdek alanı ve AgNOR alanı belirlenmiştir. Elde edilen verilerden AgNOR alanı/Çekirdek alanı oranı (AgNOR alanı x 100/Çekirdek alanı) hesaplanmıştır. AgNOR sayısını belirlemek için ise her örnekte en az 100 hepatosit değerlendirilmiştir. Karaciğer dokularında her örnekte 1,000 hepatosit değerlendirilerek dikaryotik hücre sayısı belirlenmiş ve yüzde olarak verilmiştir.

İstatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for the Social Sciences 13.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago 60606, USA) paket programı kullanılmıştır. Elde edilen verilere non-parametrik testler uygulanmıştır. Kontrol 30 grubu ve nifedipin 30 grubu ile kontrol 70 ve nifedipin 70 grupları arasındaki farkların belirlenmesi için Mann-Whitney U testi uygulanmıştır. Kontrol 30 grubu ve kontrol 70 grubu ile nifedipin 30 ve nifedipin 70 grupları arasındaki farkların belirlenmesi için ise bağımlı iki örneklem Wilcoxon testi uygulanmıştır.

3. Araştırma Bulguları

3.1 Karaciğer Dokusundan Elde Edilen Histolojik Bulgular

Kontrol gruplarında karaciğerin genel histolojisi öncelikle H-E boyamasında incelenmiştir. Hepatosit sitoplazmasının çoğunlukla pembe-açık mor renkte boyandığı, her bir lobülün santral ven çevresinde radyal olarak dizilmiş hücre kordonlarından oluştuğu gözlenmiştir. Bu hücre kordonlarının hepatik sinüzoidler tarafından ayrıldığı ve bunların santral venlere doğru açıldığı görülmüştür. Ayrıca karaciğer parankimal hücrelerini oluşturan hepatositlerin yuvarlak ve merkezi yerleşimli bir çekirdeğe sahipken bazı hepatositlerin dikaryotik olduğu gözlenmiştir (Şekil 1).

Kontrol gruplarına ait karaciğer dokularına uygulanan üçlü boyamayla santral ven ve portal ven çevresinde çok yoğun olmayan bağ dokusu saptanmıştır (Şekil 2 ve 3).

PAS reaksiyonu uygulanan kontrol grubuna ait karaciğer dokuları incelendiğinde glikojenin koyu kırmızimsı-mor renginde boyandığı ve dokunun birçok yerinde yoğun bulunduğu gözlenmiştir (Şekil 4 ve 5).

Ayrıca kontrol gruplarındaki karaciğer dokularına uygulanan AgNOR boyamada hepatositlere ait çekirdeklerin merkezi yerleşimli genellikle tek sayıda ve oval-yuvarlak şekilli olduğu gözlenmiştir. Çekirdeklerde gözlenen AgNOR'ların ise çoğunlukla 1-4 arasında değişen sayılarda, oval-yuvarlak şekilli kahverengi-siyah lekeler halinde ve genellikle en az birinin nükleer zarfa yakın yerleşimli olduğu tespit edilmiştir (Şekil 6 ve 7).

Nifedipin uygulanan grupların karaciğer dokularında üçlü boyama yapılan preparatlarda da fark edilebilir bir fibrozis tespit edilmemiştir (Şekil 8 ve 9).

Karaciğer dokularına uygulanan PAS reaksiyonunda nifedipin 30 grubuna ait karaciğer dokularında gözlenen glikojen yoğunluğunda ve glikojen alanlarında kontrol 30 grubuna kıyasla fark edilebilir bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 10). Ancak nifedipin 70 grubuna ait karaciğer dokularında gözlenen glikojen alanlarında kontrol 70 grubuna kıyasla artış olduğu tespit edilmiştir (Şekil 11).

Bunların yanı sıra nifedipin gruplarına ait karaciğer dokuları kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında karaciğerin genelinde olmamakla birlikte nifedipinli gruplarda kısmen mononükleer hücre infiltrasyon odakları gözlenmiştir (Şekil 12 ve 13).

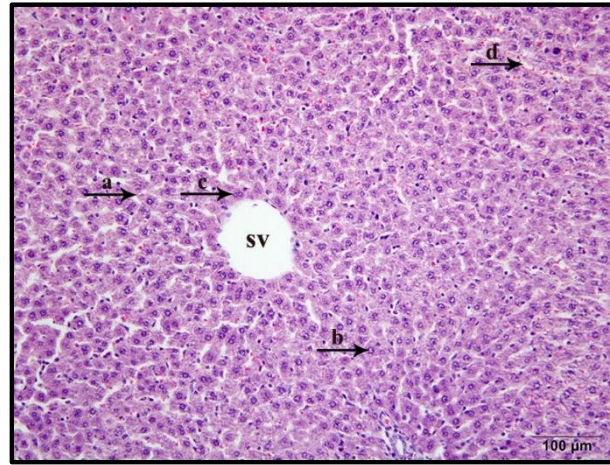
Nifedipinli karaciğer dokularındaki hepatosit çekirdeklerinde değerlendirilen AgNOR'ların şekil ve lokalizasyonlarında belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 14 ve 15).

3.2 Karaciğer Dokusundan Elde Edilen Histomorfometrik Bulgular

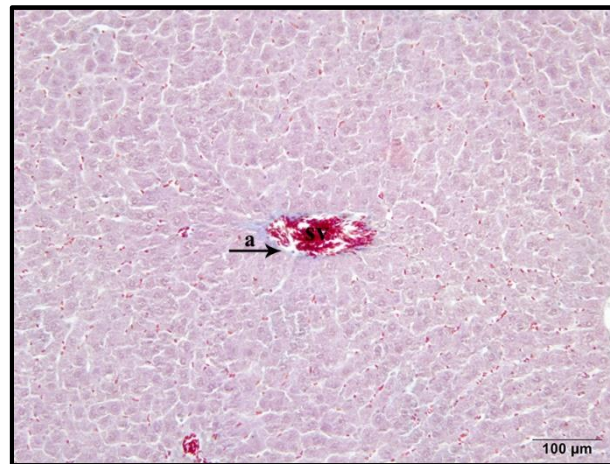
Kontrol 30 ve nifedipin 30 gruplarındaki ratların karaciğer dokularına ait dikaryotik hepatosit oranı Tablo 1’de ve histomorfometrik veriler de Tablo 2’de gösterilmiştir. Elde edilen dikaryotik hepatosit oranlarına göre nifedipin 30 grubunda kontrol 30 grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemli düzeyde ($p < 0.05$, Tablo 1) artış tespit edilmiştir.

Kontrol 30 ve nifedipin 30 gruplarındaki ratların hepatositlerinden elde edilen AgNOR verilerinden çekirdek alanları, gruplar arasında karşılaştırıldığında nifedipin 30 grubunda istatistiksel olarak önemli düzeyde ($p < 0.05$, Tablo 2) azalma belirlenmiştir. AgNOR alanı bakımından ise kontrol 30 grubuna kıyasla nifedipin 30 grubunda artış görülmekle birlikte istatistiksel olarak anlamlı ($p > 0.05$, Tablo 2) bulunmamıştır. AgNOR sayısında kontrol 30 grubuna kıyasla nifedipin 30 grubunda azalma gözlenirken istatistiksel olarak önemli ($p > 0.05$, Tablo 2) bir farklılık tespit edilmemiştir. Bununla birlikte gruplar arasında değerlendirilen AgNOR alanının çekirdek alanı içindeki oranının (AgNOR alanı/Çekirdek alanı (%)) kontrol 30 grubuna kıyasla nifedipin 30 grubunda istatistiksel olarak önemli düzeyde ($p < 0.05$, Tablo 2) arttığı tespit edilmiştir.

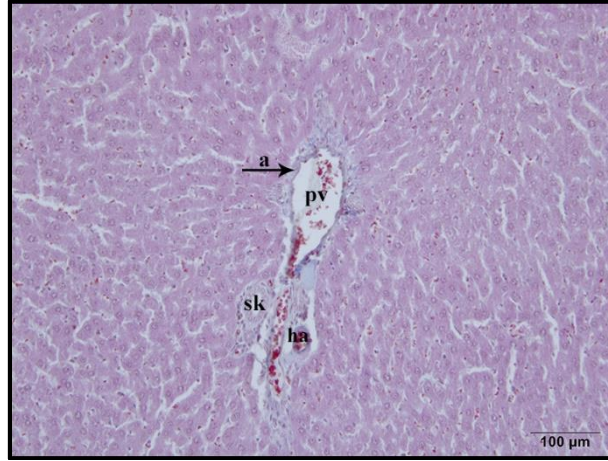
Nifedipin 70 grubu ile kontrol 70 grubu dikaryotik hepatosit oranı karşılaştırıldığında kontrol 70 grubuna kıyasla nifedipin 70 grubundaki dikaryotik hepatosit oranında azalma gözlenmiştir; ancak istatistiksel olarak önemli bir fark ($p > 0.05$, Tablo 3) tespit edilmemiştir.



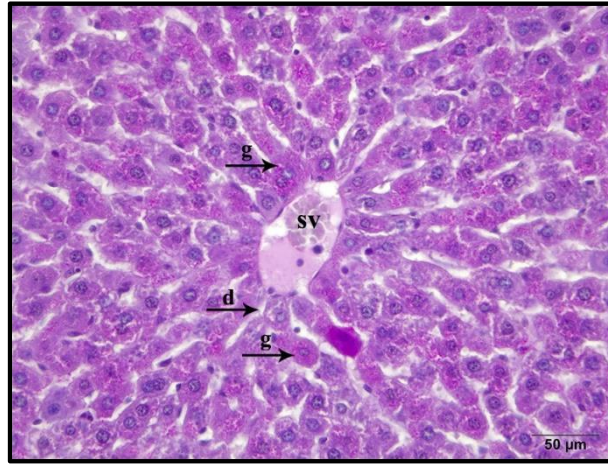
Şekil 1. Kontrol 30 grubunda karaciğer dokusunun görünümü. Santral venden (sv) ışınal olarak uzanan hepatositler (a), çekirdek (b), dikaryotik hepatosit (c), sinüzoidler (d) (H-E boyama. Büyütme çizgisi: 100 µm)



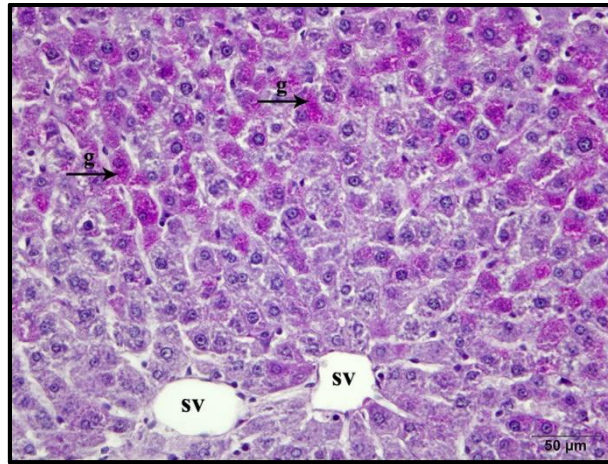
Şekil 2. Kontrol 30 grubunda karaciğer dokusunun görünümü. Santral ven çevresinde bağ doku (a), santral ven (sv) (Üçlü boyama. Büyütme çizgisi: 100 µm)



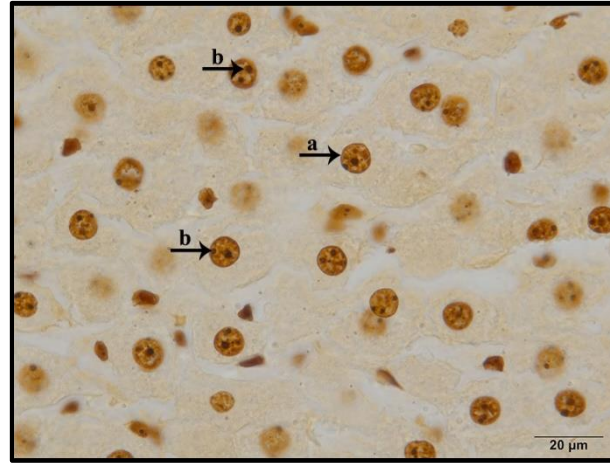
Şekil 3. Kontrol 70 grubunda karaciğer dokusunun görünümü. Portal ven çevresinde bağ doku (a), portal ven (pv), safra kanalı (sk), hepatik arter (ha) (Üçlü boyama. Büyütme çizgisi: 100 µm)



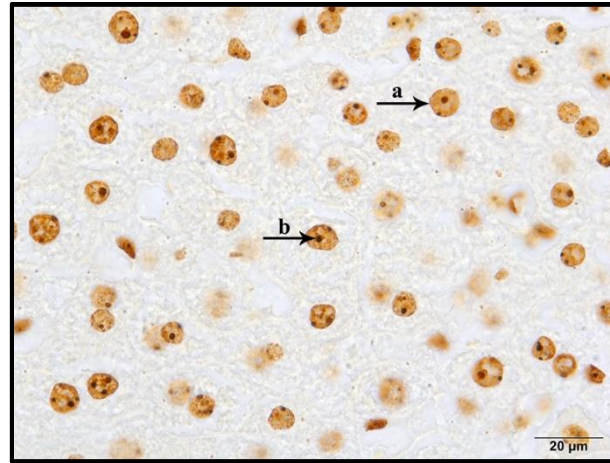
Şekil 4. Kontrol 30 grubunda karaciğer dokusunun görünümü. Bazı hepatositlerde daha yoğun gözlenen glikojen tanecikleri (g), santral ven (sv), sinüzoid (d) (PAS reaksiyonu. Büyütme çizgisi: 50 µm)



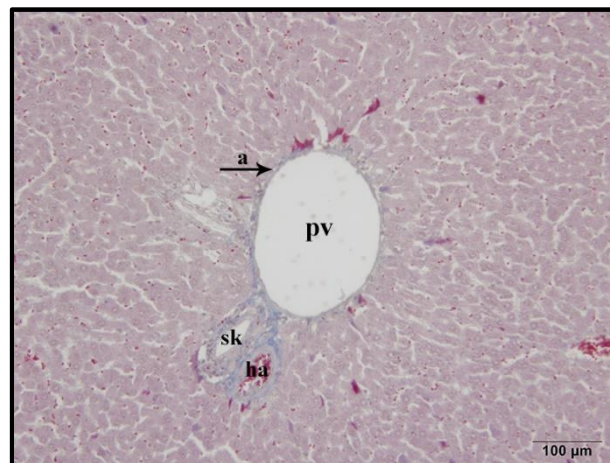
Şekil 5. Kontrol 70 grubunda karaciğerin görünümü. Bazı hepatositlerde daha yoğun gözlenen glikojen tanecikleri (g), santral ven (sv) (PAS reaksiyonu. Büyütme çizgisi: 50 µm)



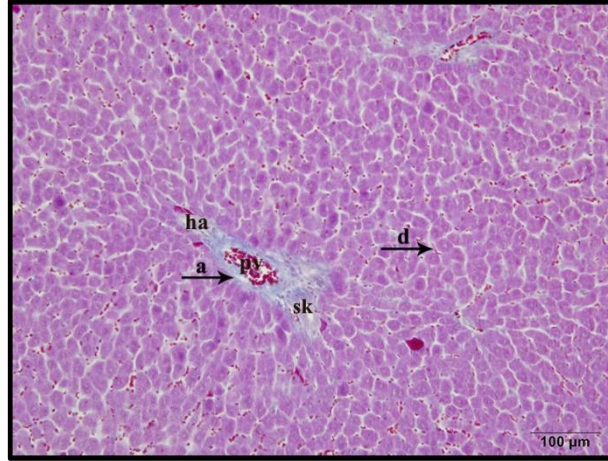
Şekil 6. Kontrol 30 grubu hepatositlerinde hücre çekirdeklerinde (a) kahverengi-siyah lekeler halinde AgNOR'lar (b) (AgNOR boyaması. Büyütme çizgisi: 20 µm)



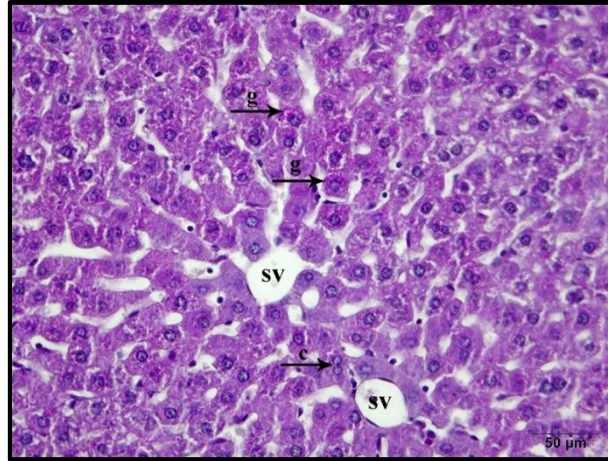
Şekil 7. Kontrol 70 grubu hepatositlerinde hücre çekirdeklerinde (a) kahverengi-siyah lekeler halinde AgNOR'lar (b) (AgNOR boyaması. Büyütme çizgisi: 20 µm)



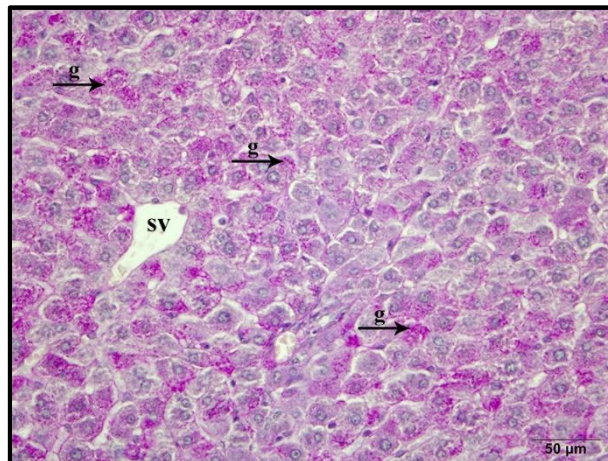
Şekil 8. Nifedipin 30 grubunda karaciğer dokusunun görünümü. Portal alanı çevreleyen bağ dokusu, portal ven (pv), hepatik arter (ha), safra kanalı (sk) (Üçlü boyama. Büyütme çizgisi: 100 µm)



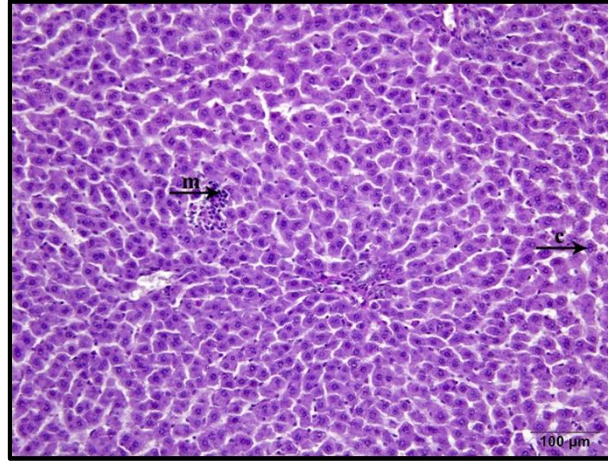
Şekil 9. Nifedipin 70 grubunda karaciğer dokusunun görünümü. Portal alanı çevreleyen bağ dokusu (a), portal ven (pv), hepatik arter (ha), safra kanalı (sk), sinüzoid (d) (Üçlü boyama. Büyütme çizgisi: 100 µm)



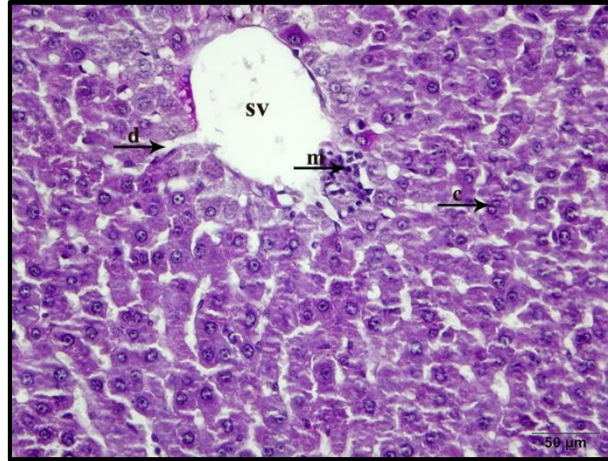
Şekil 10. Nifedipin 30 grubunda karaciğer dokusunun görünümü. Bazı hepatositlerde gözlenen glikojen tanecikleri (g), santral ven (sv), dikaryotik hepatosit (c) (PAS reaksiyonu. Büyütme çizgisi: 50 µm)



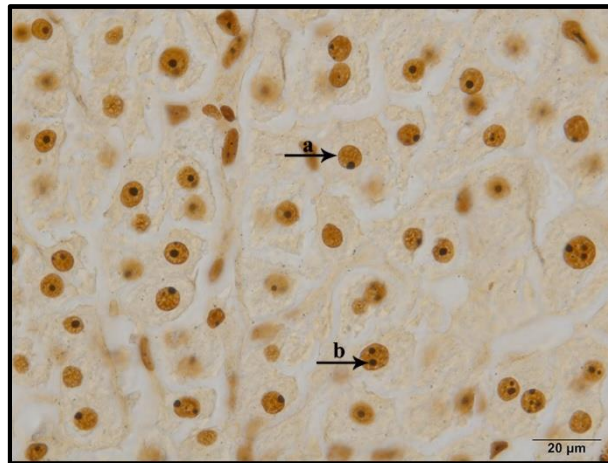
Şekil 11. Nifedipin 70 grubuna ait karaciğer dokusunun görünümü. Bazı hepatositlerde daha yoğun gözlenen glikojen tanecikleri (g), santral ven (sv) (PAS reaksiyonu. Büyütme çizgisi: 50 µm)



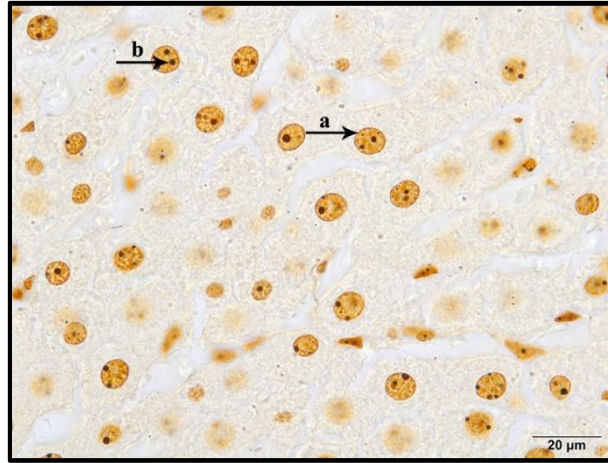
Şekil 12. Nifedipin 30 grubuna ait karaciğer dokusunun görünümü. Mononükleer hücre infiltrasyon odakları (m), dikaryotik hepatosit (c) (PAS reaksiyonu. Büyütme çizgisi: 100 µm)



Şekil 13. Nifedipin 70 grubuna ait karaciğer dokusunun görünümü. Santral ven (sv) etrafındaki mononükleer hücre infiltrasyon odakları (m), dikaryotik hepatosit (c), sinüzoid (d) (PAS reaksiyonu. Büyütme çizgisi: 50 µm)



Şekil 14. Nifedipin 30 grubu hepatositlerinde hücre çekirdeklerinde (a) kahverengi-siyah lekeler halinde AgNOR'lar (b) (AgNOR boyama. Büyütme çizgisi: 20 µm)



Şekil 15. Nifedipin 70 grubu hepatositlerinde hücre çekirdeklerinde (a) kahverengi-siyah lekeler halindeki AgNOR'lar (b) (AgNOR boyama. Büyütme çizgisi: 20 µm)

Kontrol 70 ve nifedipin 70 gruplarındaki ratların hepatositlerinden elde edilen AgNOR verilerinden çekirdek alanları, gruplar arasında karşılaştırıldığında nifedipin 70 grubunda artış görülmekle birlikte istatistiksel olarak önemli bir farklılık ($p>0.05$, Tablo 4) tespit edilmemiştir. AgNOR alanında ise nifedipin 70 grubunda istatistiksel olarak önemli düzeyde ($p<0.05$, Tablo 4) artış tespit edilmiştir. Ayrıca Kontrol 70 ile nifedipin 70 gruplarına ait AgNOR sayısı ile AgNOR alanı/Çekirdek alanı (%) karşılaştırıldığında nifedipin 70 grubunda artış görülmüştür; ancak istatistiksel olarak önemli bir fark ($p>0.05$, Tablo 4) belirlenmemiştir.

Ayrıca kontrol 30 ve 70 grupları ile nifedipin 30 ve 70 grupları kendi aralarında bağımlı örneklem testiyle karşılaştırılmıştır. Böylece 30 gün süreyle nifedipin verilen ve nifedipin kesildikten 40 gün sonraki ratlardan elde edilen veriler karşılaştırılmıştır. Kontrol 70 grubunda kontrol 30 grubuna kıyasla dikaryotik hepatosit oranında azalma görülmüştür; ancak istatistiksel olarak anlamlı ($p>0.05$, Tablo 5) bulunmamıştır.

Nifedipin 30 ve 70 gruplarındaki ratların karaciğer dokularından elde edilen histomorfometrik veriler de karşılaştırılmıştır. Dikaryotik hepatosit oranında yapılan karşılaştırmaya göre nifedipin 70 grubunda istatistiksel olarak önemli düzeyde ($p<0.05$, Tablo 6) azalma tespit edilmiştir.

Kendi aralarında bağımlı örneklem testiyle karşılaştırılan kontrol 30 ve kontrol 70 gruplarından elde edilen AgNOR parametrelerine göre kontrol 30 grubuna kıyasla kontrol 70 grubunda çekirdek alanı ve AgNOR alanında azalma tespit edilmiştir; ancak istatistiksel olarak önemli bir fark ($p>0.05$, Tablo 7) belirlenmemiştir. AgNOR alanı/Çekirdek alanı (%) oranında kontrol 70 grubunda artış görülürken istatistiksel olarak önemli bir farklılık ($p>0.05$, Tablo 7) tespit edilmemiştir. AgNOR sayısında ise kontrol 70 grubunda istatistiksel olarak önemli düzeyde ($p<0.05$, Tablo 7) azalma tespit edilmiştir.

Nifedipin 30 ve nifedipin 70 grupları arasında yapılan değerlendirmede ise nifedipin 70 grubunda çekirdek alanı, AgNOR alanı ve AgNOR alanı/Çekirdek alanı (%) oranında artış görülmekle birlikte istatistiksel olarak önemli bir fark ($p>0.05$, Tablo 8) tespit edilmemiştir. Bunun yanı sıra nifedipin 70 grubunda AgNOR sayısında azalma görülmüştür; ancak istatistiksel olarak farklılık ($p>0.05$, Tablo 8) tespit edilmemiştir.

4. Tartışma

Nifedipinin fonksiyonel özelliklerine yönelik karaciğer üzerine çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Ancak literatürde ratlara oral yolla verilen yüksek dozda nifedipinin karaciğer üzerindeki etkilerini histolojik olarak ışık mikroskopik düzeyde inceleyen bir çalışma dışında (Dhar ve Farzan, 1994) başka bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Dhar ve Farzan (1994) çalışmalarında ratlara 0.5 mg/kg nifedipini üç hafta boyunca vermişler ve nifedipinin karaciğer, kalp, böbrek ve pankreas dokuları üzerine histolojik etkilerini H-E boyamayla ışık mikroskopik düzeyde incelemiştir. Çalışmalarının sonucunda nifedipinin karaciğer, böbrek, kalp ve pankreas dokuları üzerine önemli bir etkisinin olmadığını gözlemlemiştir. Bu çalışmada da ratlara çok daha yüksek dozda verilen nifedipinin karaciğer dokuları üzerinde önemli bir histolojik değişikliğe sebep olmadığı gözlenmiştir.

Mangıroğlu (2011) yapmış olduğu çalışmada nifedipin verilen ratların dişetinden alınan kesitlerde periodontal dokuları incelemiş ve nifedipin verilen gruplarda gingival marjin (dişeti çizgisi) epitel yüksekliğinde, bağ dokusu genişliğinde ve bağ dokusu yüksekliği değerlerinde artış tespit etmiştir. Mangıroğlu'nun (2011) yapmış olduğu çalışmanın aksine, bu çalışmada nifedipin uygulanan grupların karaciğer dokuları incelendiğinde nifedipinin bağ dokusu artışına sebep olmadığı gözlenmiştir.

Üç nesil transgenik Bt (*Bacillus thuringiensis*) mısırla beslenen ratların karaciğer dokusuna etkisi üzerine yapılan bir çalışmada karaciğerde görülen odaksal hücre infiltrasyonunun minimal düzeydeki inflamasyondan ve dokunun buna karşı korunmaya yönelik yeni bir yapısal organizasyona geçmesinden kaynaklandığı belirtilmiştir (Kılıç, 2006). Bu çalışmada da nifedipin gruplarına ait karaciğer dokularında kısmen küçük hücre infiltrasyon odaklarına rastlanılmıştır. Nifedipin gruplarında kısmen görülen bu hücre infiltrasyon odakları karaciğerin yüksek dozdaki nifedipine karşı vermiş olduğu bir tepki olarak düşünülebilir.

Tablo 1. Kontrol 30 ve nifedipin 30 gruplarındaki ratların karaciğer dokularındaki dikaryotik hepatosit oranları

	KONTROL 30 (n=8)	NİFEDİPİN 30 (n=8)
Dikaryotik Hepatosit Oranı (%)	2.22±1.33 ^z	3.43±0.69*

^z \bar{X} ±SS; *Kontrol grubu ile arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05, Mann-Whitney U testi)

Tablo 2. Kontrol 30 ve nifedipin 30 gruplarındaki ratların hepatositlerine ait AgNOR verileri

	KONTROL 30 (n=8)	NİFEDİPİN 30 (n=8)
Çekirdek Alanı (µm ²)	59.27±7.75 ^z	48.44±7.36*
AgNOR Alanı (µm ²)	2.42±0.32	2.50±0.38
AgNOR Sayısı	2.61±0.49	2.34±0.37
AgNOR Alanı/Çekirdek Alanı (%)	3.99±1.05	5.32±1.27*

^z \bar{X} ±SS; *Aynı satırda kontrol grubu ile arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05, Mann-Whitney U testi)

Tablo 3. Kontrol 70 ve nifedipin 70 gruplarındaki ratların karaciğer dokularındaki dikaryotik hepatosit oranları

	KONTROL 70 (n=8)	NİFEDİPİN 70 (n=8)
Dikaryotik Hepatosit Oranı (%)	1.78±0.85 ^z	1.39±0.94

^z \bar{X} ±SS; Gruplar arasında istatistiksel olarak önemli fark yoktur (p>0.05, Mann-Whitney U testi)

Tablo 4. Kontrol 70 ve nifedipin 70 gruplarındaki ratların hepatositlerine ait AgNOR verileri

	KONTROL 70 (n=8)	NİFEDİPİN 70 (n=8)
Çekirdek Alanı (μm^2)	49.73±3.79 ^z	52.18±5.91
AgNOR Alanı (μm^2)	2.28±0.09	2.82±0.60*
AgNOR Sayısı	1.91±0.20	2.27±0.50
AgNOR Alanı/Çekirdek Alanı (%)	4.61±0.38	5.43±1.05

^z \bar{X} ±SS; * Aynı satırda kontrol grubu ile arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05, Mann-Whitney U testi)

Tablo 5. Kontrol 30 ve kontrol 70 bağımlı gruplarındaki ratların karaciğer dokularındaki dikaryotik hepatosit oranlarının karşılaştırılması

	KONTROL 30 (n=8)	KONTROL 70 (n=8)
Dikaryotik Hepatosit Oranı (%)	2.22±1.33 ^z	1.78±0.85

^z \bar{X} ±SS; Gruplar arasında istatistiksel olarak önemli fark yoktur (p>0.05, Wilcoxon testi)

Tablo 6. Nifedipin 30 ve nifedipin 70 bağımlı gruplarındaki ratların karaciğer dokularındaki dikaryotik hepatosit oranlarının karşılaştırılması

	NİFEDİPİN 30 (n=8)	NİFEDİPİN 70 (n=8)
Dikaryotik Hepatosit Oranı (%)	3.43±0.69 ^z	1.39±0.94*

^z \bar{X} ±SS; *Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05, Wilcoxon testi)

Tablo 7. Kontrol 30 ve kontrol 70 bağımlı gruplarındaki ratların hepatositlerine ait AgNOR verilerinin karşılaştırılması

	KONTROL 30 (n=8)	KONTROL 70 (n=8)
Çekirdek Alanı (μm^2)	59.27±7.75 ^z	49.73±3.79
AgNOR Alanı (μm^2)	2.42±0.32	2.28±0.09
AgNOR Sayısı	2.61±0.49	1.91±0.20*
AgNOR Alanı/Çekirdek Alanı (%)	3.99±1.05	4.61±0.38

^z \bar{X} ±SS; * Aynı satırda gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05, Wilcoxon testi)

Tablo 8. Nifedipin 30 ve nifedipin 70 bağımlı gruplarındaki ratların hepatositlerine ait AgNOR verilerinin karşılaştırılması

	NİFEDİPİN 30 (n=8)	NİFEDİPİN 70 (n=8)
Çekirdek Alanı (μm^2)	48.44±7.36 ^z	52.18±5.91
AgNOR Alanı (μm^2)	2.50±0.38	2.82±0.60
AgNOR Sayısı	2.34±0.37	2.27±0.50
AgNOR Alanı/Çekirdek Alanı (%)	5.32±1.27	5.43±1.05

^z $\bar{X} \pm \text{SS}$; Aynı satırda gruplar arasında istatistiksel olarak önemli fark yoktur ($p > 0.05$, Wilcoxon testi)

Kemirici karaciğerinde hepatositlerin yaklaşık %25'i çift çekirdekli. Çift çekirdekli hücreler, mitoz bölünmenin sitokinezis evresinin tamamlanamaması yani asitokinez sonucu meydana gelir. Doğumda oldukça sınırlı sayıda olan çift çekirdekli hepatosit sayısı yaşla birlikte artar ve doğumdan 4-7 hafta sonra tekrar azalma eğilimi gösterir (Styles, 1993; Guidotti ve ark., 2003; Fujji ve ark., 2004). Çift çekirdekli hepatositlerin bölünerek tek çekirdekli tetraploid (4n) özelliği gösteren hücreleri meydana getirdikleri de rapor edilmiştir (Guidotti ve ark., 2003). Gerek çift çekirdeklik, gerekse poliploidi rodent karaciğerinin normal morfolojik ve fizyolojik bir özelliğidir (Gandillet ve ark., 2003; Guidotti ve ark., 2003). Poliploidi bir hücrenin terminal farklılaşma ve yaşlanmasıyla ortaya çıkar (Sigal ve ark., 1999). DNA reaksiyonuna giren karsinojenler hepatositlerin sitokinezini sağlayarak çift çekirdekli hepatositlerin oranında azalmaya neden olur (Styles, 1993). Diğer taraftan, kurşun sitrat ve X ışınları çift çekirdekli hepatosit sayısında artışa yol açar (Albert ve ark., 1960; Melchiorri ve ark., 1993). Guryev (2005), Sharma ve Sharma (2005) ve Maharwal ve ark. (2005) çalışmalarında radyasyona maruziyet sonucu çift çekirdekli hepatosit oranlarının arttığını rapor etmişlerdir. Karahan ve ark. (2008) yapmış oldukları çalışmada iyonlaştırıcı radyasyona maruz bırakılan farelerde çift çekirdekli hepatosit sayısının arttığını ve bu hücrelerde proliferatif hücre çekirdek antijeni (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) ekspresyonunun genellikle her iki çekirdekte, daha az sıklıkla da tek çekirdekte olduğunu tespit etmişlerdir. Bahsedilen çalışmalarda görüldüğü gibi radyasyonun karaciğerdeki dikaryotik sayısında artışa sebep olduğu bilinmektedir. Ayrıca bir karaciğer hastalığı olan sirozun da karaciğerdeki dikaryotik çekirdek sayısında artışa yol açtığı bildirilmiştir (Bağcı, 2007). Bunların yanı sıra karaciğerde görülen tek çekirdekli hepatositlere kıyasla çift çekirdekli hepatositlerde görülen protein sentezinde, RNA sentezinde, mitokondri sayısında ve mitokondri içindeki protein sentezinde bir artış olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Nagata, 2003; Fabio ve Maurizio, 2007).

Bu çalışmada ise kontrol 30 grubuna kıyasla nifedipin 30 grubunda dikaryotik hepatosit oranında istatistiksel olarak önemli düzeyde artış tespit edilmiştir. Nifedipin 30 grubunda görülen dikaryotik hepatosit oranındaki bu artışın yüksek doz nifedipinin sebep olduğu toksik etkiye karşı karaciğer hücrelerinin vermiş olduğu bir tepki olarak düşünülebilir. Bununla birlikte nifedipin 30 grubuna kıyasla nifedipin 70 grubundaki dikaryotik hepatosit oranında görülen önemli düzeydeki azalma ilacın kesilmesinden sonra nifedipinin sebep olduğu olumsuz etkilerin gerilediğini teyit edebilir.

NOR'lar, rRNA'nın transkripsiyonunu kodlamak için RNA polimeraz I enzimini kullanan rDNA olarak adlandırılan spesifik DNA parçalarıdır. Ribozom içerisindeki rRNA'lar hücrenin protein sentezinden sorumludur. Protein sentezi hücre çoğalma süreci için gerekli bir basamaktır. Bu nedenle AgNOR proteinleri hücre çoğalmasının göstergesi olarak kullanılmaktadır (Underwood, 1995; Pich ve ark., 2004). İnterfaz çekirdeğinde gözlenen AgNOR proteinlerinin miktarlarındaki değişikliklerin tümör patolojisi ve farklı kanser türlerinin tanısal ve prognostik karakterizasyonu ile ilgili çeşitli çalışmalar yayımlanmıştır (Pich ve ark., 2000; Eroz ve ark., 2011). AgNOR düzeylerinde görülen değişiklikler protein sentezindeki değişiklikleri yansıtmaktadır. AgNOR proteinlerinin sayı ve hacmindeki artışların hücre çoğalması, farklılaşma ve salgı aktiviteleri gibi hücre aktivitesindeki artış ile ilişkili olduğunu gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Hall ve ark., 1988; Jan ve ark., 1989; Eroz ve ark., 2011). Ayrıca AgNOR proteinlerinin hücre çoğalmasına ilaveten, hücre metabolizması ile de ilişkili olduğu bildirilmiştir (Dayan ve ark., 2002).

Schmid ve ark. (1982), NOR'ların gümüşle boyanma özelliklerinin rRNA genlerinin transkripsiyonel aktivitesinin bir göstergesi olduğunu ve bu nedenle, farklı dokuları oluşturan hücrelerin AgNOR

sayılarının da farklılık gösterdiğini ileri sürmektedirler. Zaczek ve ark. (1992), sağlıklı sıçanların sindirim kanalı epitel hücrelerinin AgNOR parametrelerini inceledikleri çalışmalarında farklı sindirim kanalının farklı bölgelerindeki AgNOR sayıları ile bunların alanları ve çekirdek alanı AgNOR alanı oranları arasında önemli farklar tespit etmişler ve AgNOR parametrelerinin epitelin proliferasyon aktivitesiyle ilişkili olduğunu hücrenin lokalizasyonuna bağlı olarak tipik özellikler gösterdiğini ileri sürmüşlerdir. Bir çekirdekteki AgNOR sayısı ve her bir AgNOR'un alanının çekirdek alanıyla bağlantılı olduğu da saptanmıştır. Bir organizmanın farklı benzer hücrelerinin veya farklı organizmaların hücrelerinin genomlarında bulunan aktif NOR'ların sayıları arasında belirgin farklılıklar bulunduğu ve aktif NOR sayılarının hücrenin protein sentez ihtiyacı ve çevre şartlarına göre değişiklik gösterdiği belirtilmiştir (Goodpasture ve ark., 1976; Mikelsaar ve ark., 1977; Alberts ve ark., 1989). Mourad ve ark. (1997) çalışmalarında insan akciğer kanserinde ortalama AgNOR sayısının ve çekirdek başına beş ya da daha fazla sayıda AgNOR taşıyan hücre oranının tümör hücrelerinin proliferatif aktivitelerinden ziyade ilerleyici davranışları hakkında bilgi verebileceğini belirtmişlerdir. Xiu ve ark. (2003) ise AgNOR parametrelerindeki artışın astrosit tümörlerinin teşhisinde yarar sağladığı gibi bu tümörlerin nüksüyle de doğru orantılı olduğunu bildirmişlerdir. Godoy ve ark. (2001), deri yaralanmalarında epidermisin yara sınırına komşu bazal hücrelerindeki AgNOR aktivitesiyle, hücre çoğalmasının bir ölçütü olan çekirdeğe bromodeoksiüridin (BrdU) alımını karşılaştırmak suretiyle hücre çoğalma hızlarını karşılaştırmışlar ve her iki yöntemle de yaralanmadan hemen sonra ve yaralanmayı takip eden 36-70. saatler arasında hücre çoğalma hızlarının yüksek olduğunu ifade etmişlerdir. Benzer şekilde; Leek ve ark. (1991), aşırı hücre çoğalması ve yenilenmesi gözlenen dokulardaki AgNOR aktivitesi ile bromodeoksiüridin alımını ve S fazındaki hücre oranlarını karşılaştırmışlar ve çoğalan hücrelerde, AgNOR'ların sayılarından ziyade büyüklüklerinin arttığını saptamışlardır.

Yukarıda bahsedilen çeşitli çalışmalarda AgNOR sayısındaki artışın hücre proliferasyonu ile doğru orantılı olarak artabileceği ifade edilmiştir. Bu çalışmada kontrol 30 grubuyla kıyaslanan nifedipin 30 grubu hepatositlerinde AgNOR sayısında istatistiksel olarak önemli olmamakla birlikte azalma tespit edilmiştir.

Russel ve ark. (1991) AgNOR'un hücrelerin proliferatif aktiviteleri ile ilişkili olduğunu ve AgNOR'un sayısından ziyade boyutlarının daha anlamlı sonuçlar ifade edeceğini ileri sürmüşlerdir. AgNOR'ların yapısı ve boyutları başta protein sentezi olmak üzere pek çok hücresel aktivitenin işareti olarak değerlendirilmiştir. Aydın (2004), yumurtacı ve etçi piliçlerin bacak ve göğüs kasları üzerine yapmış olduğu çalışmada, 6 haftalık dönemde yumurtacı piliçlerin bacak kaslarındaki ortalama AgNOR alanı/Çekirdek alanı oranını %5.54 olarak bulurken; etçi piliçlerde bu oranı %9.54 olarak tespit etmiştir. Göğüs kaslarında ise elde ettiği değerleri yumurtacı piliçlerde %5.37, etçi piliçlerde ise %8.42 olarak belirtmiştir. Gündüz (2010) ise yemlerde üreyen en önemli mikotoksin olan aflatoksin B1'in etçi piliç embriyoları üzerindeki toksik etkisini araştırdığı çalışmasında, toksinin özellikle kuluçkanın 11 ve 13. günlerinde yüksek doz gruplarında göğüs kası dokularında AgNOR alanı/Çekirdek alanı oranını düşürdüğünü tespit etmiştir. Akbulut (2010) yapmış olduğu çalışmada sağlıklı gebelerin perifer kan lenfositlerindeki bazı AgNOR parametrelerini incelemiştir. Çalışmada perifer kan lenfositlerindeki AgNOR alanının çekirdek alanına oranının hamilelikle birlikte artışa geçtiğini özellikle II ve III. trimester grubunda AgNOR alanının çekirdek alanına oranında artış olduğunu tespit etmiştir. Bu artışların lenfositlerde bulunan bazı sitokinlerin (peptit ve glikoprotein yapıda) sentezindeki artışına dolayısıyla da bu artışın lenfositlerde meydana gelen protein sentezindeki artışın bir yansıması olduğunu belirtmiştir (Akbulut, 2010).

Bu çalışmada hepatositlerdeki AgNOR alanının çekirdek alanına oranı dikkate alındığında kontrol 30 grubuna kıyasla nifedipin 30 grubunda önemli düzeyde artış tespit edilmiştir. AgNOR alanının çekirdek alanına oranındaki bu artış hepatositlerde görülen bir protein sentezi artışına işaret edebilir. Çünkü Zanger ve ark. (1999) çalışmalarında ratlara 7 gün süreyle (25, 50, 100 mg/kg/gün) nikardipin ve nifedipin vermişlerdir. Bu ilaçların rat karaciğerinde CYP-450 2B ya da 3A enzimleri üzerine etkilerini western blot yöntemiyle değerlendirmişlerdir. Çalışmalarında nikardipinin (100 mg/kg/gün) CYP3A ekspresyonunun indükleyicisi olduğunu özellikle CYP3A23 ekspresyonunu 36 kat arttırdığını tespit etmişlerdir. Nifedipinin ise CYP3A ekspresyonunu değiştirmedikçe ancak CYP2B ekspresyonunu arttırdığını gözlemlenmişler ve nifedipin (100 mg/kg/gün) uygulamasından sonra CYP2B, CYP2B1 ve CYP2B2V ekspresyonunun 5-15 kat arttığını tespit etmişlerdir. CYP-450'nin alt tipleri olan bu enzimler protein yapısındadır ve nifedipin bu enzimlerin artışına sebep olmuştur. Enzimlerin artışı dolayısıyla protein sentezi artışının bir göstergesi olarak değerlendirilebilir.

Teşekkür: Bu çalışma Canan AKGÜL'ün Yüksek Lisans Tezinin bir kısmından üretilmiştir. Deneysel aşamadaki katkılarından dolayı Dr. Cem MANGIROĞLU'na teşekkür ederiz.

Kaynaklar

Albert, M. D. and Bucher, N. L. (1960). Latent injury and repair in rat liver induced to regenerate at intervals after X-radiation. *Cancer Research*. 20, 1514-1522.

Akbulut, B. (2010). *Sağlıklı gebelerin perifer kan lenfositlerinde bazı AgNOR parametreleri ve mikronükleus sıklığı ile alfa naftil asetat esteraz ve asit fosfataz aktivitelerinin belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J. D. (1989). *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing, Newyork.

Aydın, M. F. (2004). *Yumurta ve et tavuklarının farklı dokularında gümüşleme metoduyla boyanan nükleolus organizör bölgelerin (AgNOR) dağılımının belirlenmesi*. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.

Bağcı, P. (2007). *Fibrogeniz ile TGPβR-1 ve SSTR-1 ekspresyonları arasındaki ilişkinin kronik hepatit, siroz ve hepatoselüler karsinom olgularında değerlendirilmesi*. Uzmanlık Tezi, Patoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

Culling, C. F. A., Allison, R. T. and Barr, W. T. (1985). *Cellular pathology technique*. Butterworths and Co Ltd, London.

Dhar, H. L. and Farzan, K. (1994). Effect of nifedipine on histology of heart, liver, kidney and pancreas in rats. *Indian Journal Physiology and Pharmacology*. 38 (2), 148-149.

Dayan, D., Vered, M., Sivor, S., Hiss, Y. and Buchner, A. (2002). Age-related changes in proliferative markers in labial salivary glands: a study of argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) and Ki-67. *Experimental Gerontology*. 37 (6), 841-850.

Eroz, R., Cucer, N., Karaca, Z., Unluhizarci, K. and Ozturk, F. (2011). The evaluation of Argyrophilic Nucleolar Organizing Region Proteins in fine-needle aspiration samples of thyroid. *Endocrine Pathology*. 22 (2), 74-78.

Fabio, G. and Maurizio, C. I. (2007). Human binucleated hepatocytes: Are they a defence during chronic liver diseases. *Medical Hypotheses*. 69 (2), 258-261.

Fujji, E., Karasawa, Y., Kumano, E., Sakurai, T., Misawa, Y., Mori, T., Ito, T., Suzuki, M. and Sugimoto, T. (2004). Nuclearity and BrdU labeling of rat hepatocytes in cytocentrifuge preparations of freshly isolated hepatocytes with cumulative labeling of bromodeoxyuridine. *Journal Toxicology Pathology*. 17, 43-49.

Ferzaan, E. and Rajagopalan, S. (1989). Inhibition of rat heart and liver microsomal lipid peroxidation by nifedipine. *Biochemical Pharmacology*. 38 (8), 1279-1285.

Gandillet, A., Alexandre, E., Holl, V., Royer, C., Bischoff, P., Cinqualbre, J., Wolf, P., Jaeck, D. and Richert, L. (2003). Hepatocyte ploidy in normal young rat. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 134 (3), 665-673.

Godoy, A. P. R., Godoy, M. R., Meissner, C. and Oehmichen, M. (2001). Proliferative activity of epidermal basal cells after wounding AgNOR count compared with bromodeoxyuridine reactivity in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 53 (1), 65-69.

Goodpastuer, C., Bloom, S. E., Hsu, T. C. and Arrighi, F. E. (1976). Human nucleolus organizers the satellites or the stalks. *The American Journal Human Genetics*. 28, 559-566.

Guidotti, J. E., Brégerie, O., Robert, A., Debey, P., Brechot, C. and Desdouets, C. (2003). Liver cell polyploidization: a pivotal role for binuclear hepatocytes. *Journal Biological Chemistry*. 278 (21), 19095-19101.

- Guryev, D. V. (2005). Histologic assesment of regenerating rat liver under low-dose radiation exposure. *International Congress Series*. 1276, 181.
- Gündüz, N. (2010). *Yumurtaya verilen aflatoksin B1'in broiler civcivlerde kas gelişimi üzerindeki etkilerinin histolojik metotlarla incelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Hall, P., Crocker, J., Watts, A. and Stansfeld, A. (1988). A comparison of nucleolar organizer region staining and Ki 67 immunostaining in non Hodgkin's lymphoma. *Histopathology*. 12 (4), 373-381.
- Hardy, K. J., Tancheren, S. and Shulkes, A. (1995). Hepatic ischemia reperfusion injury modification during liver surgery in rats pretreatment with nifedipine or misoprostol. *Liver Transplantation and Surgery*. 1 (5), 302-310.
- Hedge, M. (2005). Calcium channel blocker toxicology. *Journal of Pharmacy Practice*. 18 (3), 169-174.
- Hubel, H. R. (1985). Silver staining as and indicator of active ribosomal genes. *Stain Technology*. 60 (5), 285-294.
- Jan, M. M., Armstrong, J., Crocker, J., Leyland, J. and Hulten, M. (1989). The relationship between number of interphase NOR and NOR bearing chromosomes in non Hodgkin's lymphom. *The Journal of Pathology*. 158 (1), 3-7.
- Jimenez, R., Burgos, M. and Diaz de la Guardia, R. A. (1988). Study of the Ag-staining significance in mitotic NOR's. *Heredity*. 60, 125-127.
- Karahan, S., Çavuşoğlu, K., Atmaca, H. T. ve Yalçın, E. (2008). Albino farelerde iyonlaştırıcı radyasyonun hepatosit morfolojisi ve proliferen hücre çekirdek antijeni (PCNA) ekspresyonu üzerindeki etkileri. *Erciyes Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*. 5 (2), 61-66.
- Kayaalp, S. O. (2005). *Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji*. 11. Baskı, Hacettepe Taş Yayıncılık, Ankara.
- Kılıç, A. (2006). *Üç nesil transgenik Bt (Bacillus thuringiensis) mısırla beslenen sıçanlarda histopatolojik ve biyokimyasal incelemeler*. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Korek, B. G., Martin, H. and Wenzelides, K. (1991). A modified method for the detection of nuclear organiser regions (AgNOR). *Acta Histochemica*. 90, 155-157.
- Leek, R. D., Alison, M. R. and Sarraf, C. E. (1991). Variations in the occurrence of silver-staining nucleolar organizer regions (AgNORs) in non-proliferating and proliferating tissues. *The Journal of Pathology*. 165 (1), 43-51.
- Maharwal, J., Samarth, R. M. and Saini, M. R. (2005). Antioxidative effect of Rajgira leaf extract in liver of Swiss albino mice after exposure to different doses of gamma radiation. *Phytotherapy Research*. 19 (8), 717-720.
- Mangiroğlu, C. (2011). *Nifedipine bağlı dişeti büyümesi oluşturulan ratların periodontal dokularında apoptozisin in situ olarak incelenmesi*. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Melchiorri, C., Chieco, P., Zedda, A. I., Coni, P., Ledda-Columbano, G. M. and Columbano, A. (1993). Ploidy and nuclearity of rat hepatocytes after compensatory regeneration or mitogeninduced liver growth. *Carcinogenesis*. 14 (4), 1825-1830.
- Mikelsaar, A. V., Schmid, M., Krone, W., Schwarzacher, H. G. and Schnedl, W. (1977). Frequency of Ag-stained nucleolus organizer in the acrocentric chromosomes of man. *Human Genetics*. 37, 73-77.
- Mikelsaar, A. V. and Schwarzacher, H. G. (1978). Comparision of silver staining of nucleolus organizer regions in human lymphocytes and fibroblasts. *Human Genetics*. 42, 291-299.
- Mourad, W. A., Vallieres, E., Chuen, J. and Alrobaish, A. (1997). Cell kinetics analysis of surgically resected nonsmall cell carcinoma of the lung using the AgNOR silver stain. *Annals of Saudi Medicine*. 17 (2), 161-166.

- Nagata, T. (2003). Light and electron microscopic radioautographic studies on macromolecular synthesis in amitotic hepatocytes of aging mice. *Cell Molecular Biology*. 49 (4), 591-611.
- Payao, S. L. M., Smith, M., Korman-Bortolotto, M. H. and Toniolo, J. (1994). Investigation of the nucleolar organizer regions in Alzheimer's disease. *Gerontology*. 40 (1), 13-17.
- Pich, A., Chiusa, L. and Margaria, E. (2000). Prognostic relevance of AgNORs in tumor pathology. *Micron*. 31 (2), 133-141.
- Pich, A., Chiusa, L. and Navone, R. (2004). Prognostic relevance of cell proliferation in head and neck tumours. *Annals of Oncology*. 15 (9), 1319-1329.
- Platon, D., Menager, M. and Adnet, J. J. (1985). Simultaneous ultrastructural localization of AgNOR (Nucleolar Organizer Region) proteins and ribonucleoproteins during mitosis, in human breast cancerous tissues. *Journal Cell Science*. 74, 239-256.
- Platon, D., Menager, M., Jeanesson, P., Himber, G., Pigeon, F. and Adnet, J. J. (1986). Improvement in the staining and in the visualisation of the argyrophilic proteins of the nucleolus organiser region at the optical level. *The Histochemical Journal*. 18 (1), 5-14.
- Russel, D. L., Aliso, M. R. and Sarraf, C. (1991). Variations in the occurrence of silver-staining nucleolar organizer regions (AgNORs) in non-proliferating and proliferating tissues. *The Journal of Pathology*. 165, 43-51.
- Schmid, M., Loser, C., Schmidtke, J. and Engel, W. (1982). Evolutionary conservation of a common pattern of activity of nucleolus organisers during spermatogenesis in vertebrates. *Chromosoma*. 86 (2), 149-179.
- Schwarzacher, H. G., Mikelsaar, A. V. and Schnedl, W. (1978). The nature of the Ag-staining of nucleolus organizer regions. *Cytogenetic Cell Genetics*. 20, 24-39.
- Sharma, R. and Sharma, J. (2005). Modification of gamma ray induced changes in the Mouse hepatocytes by Centella asiatica extract: *in vivo* studies. *Phytotherapy Research*. 19 (7), 605-611.
- Sigal, S. H., Rajvanshi, P., Gorla, G. R., Sokhi, R. P., Saxena, R., Gebhard, J. R., Reid, L. M. and Gupta, S. (1999). Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events. *American Journal Physiology*. 276, 1260-1272.
- Sirri, V., Roussel, P., Gendron, M. C. and Hernandez-Verdun, D. (1997). Amount of the two major AgNOR proteins, nucleolin, and protein B23 is cell-cycle dependent. *Cytometry*. 28, 147-156.
- Styles, J. A. (1993). Measurement of ploidy and cell proliferation in the rodent liver. *Environmental Health Perspectives*. 101 (5), 67-71.
- Underwood, J. C. (1995). AgNOR measurements as indices of proliferation, ploidy and prognosis. *Clinical Molecular Pathology*. 48 (5), 239-240.
- Watson, W. A., Litovitz, T. L. and Klein-Schwartz, W. (2004). Annual report of the American association of poison control centers toxic exposure surveillance system. *The American Journal of Emergency Medicine*. 22, 335-404.
- Xiu, C. L., Du, Z. W., Liu, Z. Y., Huang, Q. and Chan, W. Y. (2003). A2B5 lineages of human astrocytic tumors and their recurrence. *International Journal Oncology*. 23, 353-361.
- Zaczek, M., Maciejowski, J., Gil, K., Szot, W. and Chlap, Z. (1992). Silver-binding nucleolar organiser regions (AgNORs) in the normal epithelium of different parts of the digestive tract in rats. *Acta Pathology*. 42 (8), 573-578.
- Zanger, R. C., Okita, J. R., Kim, H., Thomas, P. E., Anderson, A., Edwards, R. J., Springer, D. L. and Okita, R. T. (1999). Effect of calcium channel antagonists nifedipine and nicardipine on rat cytochrom P-4502B and 3A forms. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 290, 1436-1441.