

**T.C**  
**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı**

**TİYOASETAMİD İLE İNDÜKLENMİŞ AKUT  
KARACİĞER HASARINDA HEPATOSELLÜLER HÜCRE  
ÖLÜMÜ ÜZERİNE MELATONİNİN ETKİSİ**

**Hazırlayan**  
**Meryem SAYAN**

**Danışman**  
**Dr. Öğretim Üyesi Derya KARABULUT**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Haziran-2019**  
**KAYSERİ**

**T.C**  
**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı**

**TİYOASETAMİD İLE İNDÜKLENMİŞ AKUT  
KARACİĞER HASARINDA HEPATOSELLÜLER HÜCRE  
ÖLÜMÜ ÜZERİNE MELATONİNİN ETKİSİ**

**(Yüksek Lisans Tezi)**

**Hazırlayan**  
**Meryem SAYAN**

**Danışman**  
**Dr. Öğretim Üyesi Derya KARABULUT**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından  
TYL-2018-8511nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Haziran-2019**

**KAYSERİ**

## BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı : Meryem SAYAN

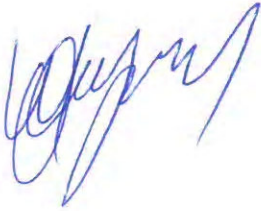
İmza :

**YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI**

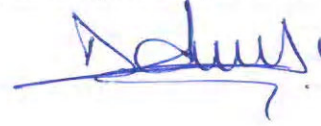
**"Tiyoasetamid İle İndüklenmiş Akut Karaciğer Hasarında Hepatosellüler Hücre Ölümü Üzerine Melatoninin Etkisinin Araştırılması"** adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

**Tezi Hazırlayan**

Meryem SAYAN

**Danışman**

Dr. Öğretim Üyesi Derya KARABULUT

**Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı**

Prof. Dr. Birkan YAKAN


**Dr. Öğretim Üyesi Derya KARABULUT** danışmanlığında **Meryem SAYAN** tarafından hazırlanan **“Tiyoasetamid İle İndüklenmiş Akut Karaciğer Hasarında Hepatosellüler Hücre Ölümü Üzerine Melatoninin Etkisi”** adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Histoloji-Embriyoloji** Anabilim Dalı **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

...../...../2019

### JÜRİ

### İmza

**Danışman** : Dr. Öğr. Üyesi Derya KARABULUT  
(Erciyes Üniv. Histoloji-Embriyoloji ABD)



**Üye** : Prof. Dr. Birkan YAKAN  
(Erciyes Üniv. Histoloji-Embriyoloji ABD)



**Üye** : Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR  
(Denizli Pamukkale Üniv. Histoloji-Embriyoloji ABD)



### ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun ...../...../..... tarih ve ..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../2019

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimime birlikte başladığım, bilimsel birikimi, engin tecrübeleri, anlayışı, sabrı, daima güler yüzlülüğü ve hoşgörüsü ile üzerimde emeği olan bana yol gösteren çok değerli hocam sayın Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR'a,

Yüksek lisans öğrenimime kaldığım yerden birlikte devam ettiğim, sadece dinamikliği, bilgi birikimi, engin bakış açısı, profesyonel düşünce tarzı, ileri görüşlülüğü, titiz ve ince çalışmaları ile kalmayıp sabrı, hoşgörüsü, empatisi, anlayışı ile içinde bulunduğum, benim için, oldukça meşakkatli olan bu süreçte bana yol gösteren, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, benim için yeni başlangıç kapılarının aralanmasına da vesile olan, çok değerli danışman hocam sayın Dr. Öğretim Üyesi Derya KARABULUT'a,

Engin tecrübeleri, engin bilgi birikimi, anlayışı, güler yüzlülüğü ile desteğini esirgemeyen çok değerli ana bilim dalı başkanımız Prof. Dr. Birkan YAKAN'a, değerli bölüm hocalarımız sayın Doç. Dr. Arzu YAY'a ve Dr. Öğr. Gör. Esra BALCIOĞLU'na,

Öğrenim sürecim ve çalışmalarım boyunca bilgi birikimi, anlayışı ve sabrı ile desteğini benden esirgemeyen kıymetli arkadaşım sevgili Arş. Gör. Emin KAYMAK'a

Bu süreçte maddi manevi desteğini her zaman hissettiren bilgi ve tecrübeleri ile de hep yanımda olan çok sevgili arkadaşım Öğr. Gör. Ayşe CEYHAN'a,

Yine en yoğun dönemimde yanımda olup desteğini ve yardımını esirgemeyen çok kıymetli sevgili dostum Dr. Leyla ÇİMEN'e

Yüksek Lisans öğrenimim süresince sıcak bir ortamda birlikte çalıştığımız ve tezimin deney aşamalarında bilhassa emeği geçen değerli arkadaşlarım Nurhan KULOĞLU, Ali Tuğrul AKIN, Betül YALÇIN ve Emel ÖZTÜRK'e ve diğer Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi/asistan olarak görev yapan, tıpta uzmanlık, yüksek lisans ve doktora öğrenimini yapan tüm kıymetli arkadaşlarıma,

Bu günlere gelebilmem için fedakarlıklarını, maddi manevi desteklerini esirgemeyen her zaman yanımda olan Can'ım sevgili babam Mulla DARI'ya, Can'ım annem Güzel DARI'ya, Can'ımdan can olan kız kardeşlerim; ablam Özlem, Arzu, Kısmet ve evimizin ışığı Münevver Helin DARI'ya,

Maddi manevi hep yanımda olan, tezimin çalışma aşamasında da fiilen emeklerini esirgemeyen, sabrı, sevgisi, desteği ile daima gücüme güç katan ardımdaki süper kahramanım, Can'ım çok sevgili eşim Halit SAYAN'a,

Sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

## **TİYOASETAMİD İLE İNDÜKLENMİŞ AKUT KARACİĞER HASARINDA HEPATOSELLÜLER HÜCRE ÖLÜMÜ ÜZERİNE MELATONİNİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

### **ÖZET**

Karaciğerde alkol, ilaçlar, virüsler, genetik bozukluklar ve toksisite yoluyla akut ya da kronik hasar oluşabilmektedir. Hasar sonucu karaciğerde doku bütünlüğü bozularak hücre ölüm mekanizmaları gerçekleşebilmektedir. Bu çalışmada Tioasetamid (TAA) ile karaciğerde hasar oluşturularak hepatosellüler hücre ölüm mekanizmaları üzerine melatonin(Mel)'in koruyucu ve tedavi edici etkisinin araştırılması planlanmıştır.

Çalışmada 35 adet Wistar albino türü yetişkin erkek sıçan kullanıldı. Grup I: Kontrol grubu (7 adet), Grup II: TAA (7 adet) 24 saat arayla 300 mg/kg 2 doz verildi, Grup III: Mel+TAA grubu (7 adet) TAA uygulamasından 24 saat önce 10 mg/kg i.p olarak tek doz Mel uygulandı, Grup IV: TAA+Mel grubu (7 adet) TAA 300 mg/kg ip olarak 24 saat arayla 2 doz uygulamasından sonra 10 mg/kg tek doz Mel uygulandı, Grup V: Mel grubu (7 adet) tek doz 10 mg/kg deneyin ilk günü uygulaması yapıldı. Deney sonunda karaciğer doku örnekleri H-E, PAS ve MT boyamaları yapıldı. Dokudaki apoptoz kaspaz-3 ile, nekroz reseptör-etkileşimli protein kinaz-3(RIP3) ile, otofaji mikrotübül-ilişkili protein hafif zincir-3 (LC3) proteinlerinin immunohistokimya boyaması ile belirlendi. Ayrıca kan serum örneklerinde AST, ALT ve ALP, karaciğer doku hasarını belirlemek amacıyla TGF- $\beta$  ve TNF- $\alpha$  miktarlarında Eliza yöntemiyle belirlendi.

Deney sonunda kontrol ve Mel grubu karaciğer doku örneklerinde anormal bir durum izlenmezken, TAA'in bulunduğu diğer gruplarda klasik lobül yapısında bozulma ve periferinde geniş bağ dokusu artışı gözlemlendi. Mel'nin ise dokudaki tedavi edici etkisinin koruyucu etkisinden daha fazla olduğu gözlemlendi. Kaspaz-3, RIP3 ve LC3 seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla diğer gruplarda daha fazla hücrede eksprese olduğu belirlendi. Ayrıca, AST, ALT ve ALP düzeylerinde ise önemli oranda değişiklik gözlenirken, aynı sonuçlar TGF- $\beta$  ve TNF- $\alpha$  seviyelerin de de izlendi.

Sonuç olarak, TAA dokuda önemli derecede hasar oluşturmakta ve hücre ölüm mekanizmalarında artışa neden olurken, Mel'nin ise dokudaki tedavi edici etkisi koruyucu etkisinden daha fazla olduğu kanaatine varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Tioasetamid, melatonin, karaciğer, kaspaz-3, RIP3, LC3

**INVESTIGATION THE EFFECT OF MELATONIN AGAINST  
HEPATOCELLULAR CELL DEATH THIOACETAMIDE-INDUCED IN  
ACUTE LIVER DAMAGE**

**ABSTRACT**

Acute or chronic damage to the liver through alcohol, drugs, viruses, genetic disorders and toxicity may occur. As a result of the damage, the tissue integrity of the liver can be impaired and cell death mechanisms can occur. In this study, it was planned to investigate the protective and therapeutic effects of melatonin (Mel) on hepatocellular cell death mechanisms by causing damage to the liver by thioacetamide (TAA).

In this study, 35 Wistar albino adult male rats were used. Group I: Control group (7 pieces), Group II: TAA (7 pcs) 300 mg / kg 2 doses 24 hours interval, Group III: Mel + TAA group (7 pcs) 10 mg / kg ip single dose Mel was applied before 24 hours from TAA application, Group IV: TAA + Mel grubu (7 pcs) single dose of 10 mg / kg Mel was administered after TAA (300 mg / kg) 2 doses at 24 hour intervals, Group V: Mel group (7 pcs) single dose the first day of the experiment was 10 mg / kg. Liver tissue samples H-E, PAS and MT were stained. Apoptosis, autophagy and necrosis in tissue was determined by immunohistochemistry staining with caspase-3 microtubule-associated protein light chain-3 (LC3) with, with receptor-interacting protein kinase-3 protein (RIP3), respectively. In addition, AST, ALT and ALP in blood serum samples, TGF- $\beta$  and TNF- $\alpha$  were determined by Eliza method to determine liver tissue damage.

At the end of the experiment, an abnormal condition wasn't observed in the control and Mel group liver tissue samples, but in other groups where TAA was present, deterioration in classical lobule structure and large connective tissue in the periphery were observed. It was observed that the therapeutic effect of Mel was higher than the protective effect on tissue. Caspase-3, RIP3 and LC3 levels were expressed in more cells in other groups than in the control group. In addition, significant changes were observed in AST, ALT and ALP levels, while TGF- $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels were also observed.

As a result, TAA caused significant damage to tissue and increased cell death mechanisms, whereas Mel was found to have more therapeutic effect than protective effect on tissue.

**Keywords:** Thioacetamide, melatonin, liver, caspase-3, RIP3, LC3

## İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI.....	ii
ONAY .....	iii
TEŞEKKÜR .....	iv
ÖZET .....	v
ABSTRACT .....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	ix
TABLolar LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	xii
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. KARACİĞER EMBRİYOLOJİSİ.....	5
2.2. KARACİĞER ANATOMİSİ .....	9
2.3. KARACİĞER HİSTOLOJİSİ .....	11
2.4. HÜCRE ÖLÜM MEKANİZMALARI .....	18
2.4.1. Apoptozis .....	19
2.4.2. NEKROZ .....	21
2.4.3. OTOFAJİ .....	22
2.5. KARACİĞER HASARI .....	24
2.6. TAA (Tioasetamid).....	25
2.7. MELATONİN .....	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	27
3.1. Dokuların Eldesi.....	27

3.2. İmmunohistokimya Uygulama .....	30
3.3. ELISA .....	30
3.4. BİYOKİMYASAL ANALİZ .....	32
3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ .....	32
4. BULGULAR .....	33
4.1. Histolojik Bulgular .....	33
4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular .....	37
4.2. ELISA Bulguları.....	42
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	44
6.KAYNAKLAR .....	52
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

**KISALTMALAR ve SİMGELER**

WHO	: Dünya sağlık örgütü
TAA/TA	: Tioasetamid
Mel	: Melatonin
RIP	: Reseptör etkileşimli protein
VCİ	: Vena Cava İnferior
PAS	: Periodik Asit Schiff
IR	: İskemi reperfizyon
PARP	: Poli ADP-riboz polimeraz
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
LC3	: Protein Hafif Zincir
Mel	: Melatonin
DEKAM	: Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
nm	: Nanometre
mg	: Miligram
gr	: Gram
kg	: Kilogram
L	: Litre
dk	: dakika
µm	: Mikrometre
ip	: intraperitenoel
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen Peroksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
RIPK3	: Reseptör etkileşimli protein kinaz-3
PBS	: Fosfat tampon
TNF	: Tümör nekrozis faktör
TGF	: Doku büyüme faktörü
ALT	: Alanin Amino Transferaz
AST	: Aspartat Amino Transferaz

ALP	: Alkalen Fosfataz
GGT	: Gama-glutamin transferaz
H&E	: Hemotoksilen-Eozin
GEN	: Genistein
MDAŞ4-HDA	: Malondialdehit ve 4-hidroksialkenal
TLC	: Taurolitokolik asit
TLR	: Toll-like reseptör
MHC	: Major histocompatibility complex
DILI	: Drug-induced liver injury
DAMP	: Damage-associated mollecular pattern
CCl <sub>4</sub>	: Karbon tetra klorür

**TABLolar LİSTESİ**

<b>Tablo 3.1.</b> Işık mikroskobu doku hazırlama tekniği .....	28
<b>Tablo 3.2.</b> Hematoksilen-Eozin boyama tekniği .....	29
<b>Tablo 3.3.</b> Periyodik asit shiff boyama tekniği.....	29
<b>Tablo 3.4.</b> İmmünohistokimya boyama tekniği.....	31
<b>Tablo 4.1.</b> Gruplar arası karaciğer skorlaması.....	33
<b>Tablo 4.2.</b> Kaspaz-3, RIPK3 ve LC3 ait immunohistokimya sonuçları. ....	37
<b>Tablo.4.3.</b> Tüm deney gruplarına ait karaciğer doku örneklerinde TNF- $\alpha$ ve TGF- $\beta$ düzeyleri verilmektedir. Değerlerortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. ....	42
<b>Tablo.4.4.</b> Tüm deney gruplarına ait serum AST, ALT ve ALP seviyeleri verilmektedir. Değerlerortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. ....	43

## ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 1. A.** 3 mm'lik embriyoda (yaklaşık 25 günlük) primitif gastrointestinal kanal ve karaciğer tomurcuğunun oluşumu. Karaciğer tomurcuğu önbarsağınendodermalepiteli tarafından oluşturulur. **B.** 5 mm'lik embriyo (yaklaşık 32 gün), epiteliyal karaciğer kordonları septumtransversummezenşiminin içine girmektedir (Langman's Medikal Embriyoloji'den alınmıştır). ..... 6
- Şekil 2. A.** 9 mm'lik embriyo (yaklaşık 36 gün). Karaciğer karın boşluğu içinde kaudal yönde genişlemektedir. Karaciğer ve perikard boşluğu arasındaki diaframınseptumtransversumun bir bölümünden oluşacağını belirtisi olan mezenşimal doku yoğunlaşmasına dikkat ediniz. **B.** Biraz daha büyük embriyo. Karaciğer ve karın ön duvarı arasında uzanan falsiformligamente ve karaciğer ve önbarsak (mide ve duodenum) arasında yer alan küçük omentuma dikkat ediniz. Karaciğer diyaframa temas ettiği bölge dışında tümüyle peritonla örtülmüştür. Bu bölgeye karaciğerin çıplak yüzü adı verilir (Langman's Medikal Embriyoloji'den alınmıştır). ..... 7
- Şekil 3.** Karaciğer ön yüzeyi (Frank H. Netter - İnsan Anatomisi Atlası'ndan alınmıştır). ..... 9
- Şekil 4.** Karaciğer Lobulasyonu (www. britannica. com'dan adapte edilmiştir). ..... 11
- Şekil 5.** Farklı kavramlardaki karaciğer lobül modelleri ..... 12
- Şekil 8.** Hepatositler ile karaciğer sinuzoidleri arasındaki ilişkiyi gösteren şematik çizim. (Michael H. Ross. Histology A TextAndAtlas'dan alınmıştır.) ..... 15
- Şekil 6.** Karaciğer sinüzoidlerinin elektron mikroskopunda görünümleri. **K.H;** Kupffer Hücresi, **İ.H;** İto hücresi, **E;** Eritrosit ..... 16
- Şekil 7.** Karaciğer hücre plakaları, sinüzoidler ile bunların kan damarları ile bağlantıları ve safra akışı ..... 18
- Şekil 4.1.** Hematoksilen-Eozin boyama. A-Kontrol grubu, B-Melatonin grubu, C-Tioasetamid grubu, D- Melatonin+Tioasetamid grubu, E-Tioasetamid+Melatonin grubu. Skala bar 200µm, X20 objektif. .... 35
- Şekil 4.2.** Periyodik asit shiff boyama. A-Kontrol grubu, B-Melatonin grubu, C-Tioasetamid grubu, D- Melatonin+Tioasetamid grubu, E-Tioasetamid+Melatonin grubu. Skala bar 200µm, X20 objektif. .... 36
- Şekil 4.3.** Deney gruplarına ait kaspaz-3 immunohistokimya boyaması. A-Kontrol grubu, B-Mel grubu, C- TAA grubu, D- Mel+TAA grubu, E-TAA+Mel grubu, F- Negatif kontrol grubu. Skala bar 100µm. .... 39

**Şekil 4.4.** Deney gruplarına ait RIP immunohistokimya boyaması. A-Kontrol grubu, B-Mel grubu, C- TAA grubu, D- Mel+TAA grubu, E- TAA+Mel grubu, F- Negatif kontrol grubu. Skala bar 100µm. .... 40

**Şekil 4.5.** Deney gruplarına ait LC3 immunohistokimya boyaması. A-Kontrol grubu, B-Mel grubu, C- TAA grubu, D- Mel+TAA grubu, E- TAA+Mel grubu, F- Negatif kontrol grubu. Skala bar 100µm. .... 41



## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

Son yıllarda ülkemiz sağlık gündeminin en önde gelen sorunlarından biri karaciğer ve buna bağlı hastalıklardır. Karaciğer hastalıklarında tedavi, erken dönemde hastalığı durdurabileceği gibi geri de döndürebilmektedir. Karaciğer hastalığında sebep ne olursa olsun karaciğer hücre kaybına bağlı olarak hastalar çeşitli şikayetlerle ya da rastlantısal tespit edilmiş karaciğer kan testleri bozukluğu ile hekime başvurmaktadır. Rahatsızlığın altında yatan temel etken karaciğer dokusunun fonksiyonel yapısının bozulmasıyla ilişkilendirilmektedir. Karaciğer vücudun en büyük organlarından biridir. Lokasyonu gereği portal ve genel dolaşım arasında dolayısıyla da gastrointestinal sistem organları ve kalp arasında ara istasyon vazifesi göstermektedir (Ramadori ve ark., 2008). Karaciğerin biyosentez, metabolizma, temizleme ve konakçı savunması gibi kompleks fonksiyonları vardır (Vollmar ve ark., 2009). Ayrıca albümin, makroglobulin, pıhtılaşma faktörleri, transferin, fibrinojen gibi birçok proteinin sentezlendiği yerdir. Safra sentezi ve salgılanmasından da sorumludur. Sindirim yoluyla absorbe edilen besin maddelerinin alınıp depolandığı, toksik maddelerin, steroidlerin ve hormonlarında elimine edilmesini de sağlamaktadır (Ergün ve ark., 2009).

Fibrozis organ ya da dokuda fibril ekstrasellüler matriksin artması sonucu oluşan temel bir bağ dokusu lezyonudur. Bu sıklıkla patolojik şartlarda (vasküler, metabolik, tümör patolojisi) meydana gelen kronik inflamatuvar bir süreçtir (Robert ve ark., 2016). Ekstrasellüler matriksin yapımı (fibrogenesis) ile yıkımı (fibrolizis) arasındaki dengenin bozulmuş olması sonucunda fibrozis oluşmaktadır (Sonsuz ve ark., 2002). Karaciğer fibrozisi kronik karaciğer hasarının en yaygınıdır ve özellikle de siroza dönüştükten sonra geri dönüştürülemez bir süreçtir (Ramadori ve ark., 2008). Karaciğer fibrozisine alkol, ilaçlar, virüsler ve genetik bozuklukları içeren çeşitli hastalıklar sebep olabilir ve özellikle kronik karaciğer hasarı sonucu oluşmaktadır (Roth ark., 2015; Özbilim ark., 1998). Karaciğerde toksisite yoluyla doğrudan hepatosellüler hasar

oluşturulabilmektedir. Tioasetamid karaciğeri etkileyen zayıf bir kanserojen madde olup, fibrozis ve siroz için indükleyici olarak kabul edilmiştir (Rekha ark., 2008; Al-Attar ark., 2011). Kronik karaciğer hasarı sonucunda meydana gelen ekstrasellüler matriksin artması ve kollajen birikimi sonucu portal dolaşım bozulmakta, hasar kaynaklı oluşan artmış oksidatif stres, serbest radikaller ve metabolitler fibrozis oluşumunu tetiklemektedir. Organizmada meydana gelen stres türleri çeşitli hücrel mekanizmaların kontrolü altında tutulmaktadır. Bu mekanizmalar reaktif oksijen radikalleri, hipoksik şartlar, pH değişikliği, ağır metaller, radyasyon, bakteriyel ve viral enfeksiyonların sebep olduğu hepatosellüler hasarı belirlemede önemli bir belirteçtir. Bozulmuş hücrel mekanizmaların onarımı ve bakımında ise çeşitli madde ve ilaçlar kullanılarak hastalıklara karşı dokuyu koruma ve tedavi edici yöntemler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Melatonin de güçlü bir antioksidan madde olarak son yıllarda sıkça kullanılmaktadır. Melatonin etkisini antioksidan enzim sentezinin uyarılmasını sağlayarak gerçekleştirirken (Reiter ve ark., 2005), çeşitli karaciğer hasarı modellerinde terapötik etkilerinin olabileceği sonucuna varılmaktadır.

Karaciğerin vücuttaki pozisyonu ve işlevi göz önünde bulundurulduğunda hayati bir organ niteliği taşımakta, bundan dolayı karaciğer hastalıklarının tüm dünyada neden bu kadar yoğun görülmesinin ve önemli bir yer tutmasının nedeni anlaşılmaktadır. Bu nedenle çeşitli deneysel ve klinik araştırma projelerinin odak noktası olmakta ve tedaviye yönelik araştırmalar gerçekleştirilmektedir. Bu çalışmada da tiyoasetamid uygulanarak karaciğer hücre hasarı oluşturulması hedeflenmekte, hücrelerin ölüm mekanizmalarının hangisinin daha etkin olacağının ortaya çıkarılması ve bu ölüm mekanizmaları üzerine melatoninin etkisinin araştırılması amaçlanmaktadır.

## 2. GENEL BİLGİLER

Kronik hastalıklar vücudun herhangi bir yerinde meydana gelen, tam olarak iyileşmeyen uzun süre devam edip bazen yaşam boyu süren, hatta iş görmezlik sınıfına dahil edecek derecede kalıcı sakatlık olarak nitelendirilebilen ve bulaşıcılık göstermeyen hastalıklardır. Dünya sağlık örgütü (WHO) 2005 yılında, tahmin edilen yaklaşık 58 milyon ölümün %60'ının kronik hastalık kaynaklı olduğunu bildirmiştir (WHO, 2003). Kronik karaciğer hastalıkları kronik hastalıklar grubunda yer alan bir rahatsızlıktır. Vücudun deriden sonraki en büyük organı olan karaciğer aynı zamanda salgısını safra kanalları yolu ile duodenuma boşaltmasından dolayı ekzokrin, sentezlediği bazı maddeleri de direkt kana vermesi sebebi ile endokrin bir bezdir. Yetişkin karaciğeri yaklaşık olarak 1500 gr ağırlığındadır. Vücutta arteriyel ve venöz kanın birbirine karıştığı tek organ olup yoğun bir sinir ve damar ağına sahip 2 lobdan oluşur (Mercanlıgil ve ark., 2008). Karaciğer; besinlerin işlenmesi, kanın depo edilmesi, lipid metabolizması, karbonhidrat metabolizması, protein metabolizması, safranin sentezlenip salgılanması, hormonların, ilaçların ve diğer zararlı toksik ajanların detoksifiye edilerek atılması gibi önemli görevlerde rol alan hayati bir organdır (Mercanlıgil ve ark., 2008).

Oksidatif stres, maruz kalınan toksinler aşırı alkol tüketimi, safrayolu tıkanıklılığı, viral enfeksiyonlar gibi birçok durum akut ve kronik karaciğer hasarı oluşumunda sebep olarak gösterilmektedir (Stehbens ve ark., 2003). Karaciğer hasarı sonucu meydana gelen hastalıklardan biri olan hepatik fibrozis geri döndürülebilir bir durum olup kronik karaciğer hasarına yanıt olarak oluşur. Vücudun onarım ve savunma mekanizmalarının yetersiz geldiği durumda karaciğer fonksiyonunda bozukluk oluşur. Oksidatif stresin indüklenmesi mitokondriyal disfonksiyon ve antioksidan statüsünün tükenmesinden kaynaklanır (Kitada ve ark., 2001). Karaciğer sirozu ise karaciğer yetmezliğine yol açan

kronik karaciğer hastalıklarının kritik bir aşamasıdır. Hepatikfibroz geri dönüşü olmayan siroza yol açabilir ve hepatik fonksiyonun azalmasında doğrudan sorumlu olan kollajen ve ekstraselülmatriks birikimi ile sonuçlanan çoklu hücrel ve moleküler olayları içerir (Friedman ark., 1993; Pinzani ark., 2004). Sirozda görülen hücre dışı matriks birikimi stellat hücreler gibi hücre öncüllerinin aktivasyonu ile üretilen fibroblastların aktivasyonundan kaynaklanmaktadır (Guyot ve ark., 2006). Karaciğer hastalıklarının bu kadar önemli bir yer tutması araştırma projelerinin de odak noktası olmasına sebep olarak gösterilebilir. Karaciğer yetmezliği modelleri geliştirmek için çeşitli araştırmalar yapılmakta, çoğunlukla da kimyasal ajanlar kullanılmaktadır. Cerrahi modeller hepatikiskemi ve subtotal veya total hepatektominin kullanımını içerirken (Makino ve ark., 2005), kimyasal modeller asetaminofen (Rahman ve ark., 2002), karbontetraklorür (Taniguchi ve ark., 2004), galaktozamin (Cuesta ve ark., 2006) ve tioasetamid gibi ilaç ve toksinlerin kullanımı ile gerçekleştirilir (Pallottini ve ark., 2006).

Tioasetamid (TAA) başlangıçta fungusit olarak kullanılmıştır (Vadi ve ark., 1981). TAA, esas olarak karaciğer ve böbrekleri etkileyen zayıf bir kanserojendir (Rekha ve ark., 2008) ve karaciğer fibrozu ve sirozun bir indükleyicisi olarak kabul edilmiştir (Al-Attar ve ark., 2011). TAA tarafından indüklenen karaciğer sirozu, aşırı peroksidasyonu (Muller ve ark., 1991) ve antioksidan durumun tükenmesi ile ilişkilidir (Abul ve ark., 2002). TAA hepatoselüler nekroza sebep olur ve reaktif oksijen türlerinin rolünü araştırmak için kullanılır. Oksidatif stresin azalması çeşitli hastalıklarda ve deneysel karaciğer hasarı modellerinde hücre hasarını, sirozu ve fibrozisi azaltmak için yararlı olabilir (Lieber ark., 2003; Shapiro ark., 2006). Antioksidanlar karaciğer hasarına sebep olan oksidatif stresi en aza indirebilirler (Pavanato ve ark., 2007). Melatonin (N-acetyl-5-metyoxytryptamine) güçlü bir endojen antioksidandır. Sirkadiyen ritimlerin düzenlenmesinde, uykuda bağışıklık sistemi aktivitesinde ve serbest oksijen radikallerinin eliminasyonunda çok önemli rol oynar (Allegra ve ark., 2003). Antioksidan etkisini antioksidan enzim sentezinin indüklenmesine yol açan G protein bağımlı reseptörleri aracılığı ile uygular (Abdel-Vahab ve ark., 2001). Ayrıca melatoninin peroksil radikalleri, tekli oksijen türleri ve hidrojen peroksit gibi birçok toksik serbest radikal ile etkileştiği gösterilmiştir (Reiter ark., 2008; Peyrot ark., 2006). Melatonin süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz gibi antioksidan ve antioksidan enzimlerin aktivitesinin düzenlenmesini tetikleyebilir (Reiter

ve ark., 2005). Melatonin glutamil sistein sentetaz aktivitesini indükler, böylece bir başka hücre içi antioksidan glutatyon üretimini uyarır (Winiarska ve ark., 2006). Son zamanlardaki çalışmalarda melatoninin çeşitli deneysel akut karaciğer hasarı modellerinde sitoprotektif etki gösterdiği ve fibroblast proliferasyonunu ve kollajen sentezini azalttığı gösterilmiştir (Tahan ve ark., 2004) bu da melatoninin antioksidan etkisi ile akut ve kronik karaciğer hasarı üzerinde terapötik etkileri olabileceğini göstermektedir (Tan ve ark., 2000).

Apoptoz, hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri, genlerle düzenlenen, programlı, RNA, protein sentezi ve enerjiye gereksinim duyan bir hücre ölümü şeklidir. Kalsiyum, seramid, Bcl-2 ailesi, p53, kaspazlar, sitokrom-c ve mitokondrionlar apoptozun düzenlenmesinde rol oynar (Coşkun ve Özgür, 2014). Nekroz, plazma membran bütünlüğünün geri dönüşümsüz kaybı olarak tanımlanabilir (Alvarez ve ark., 2010). En yaygın nedeni hipoksi iken, arsenik, siyanid gibi toksik maddeler ve ağır metaller de nekroza neden olmaktadır (Coşkun ve Özgür, 2014). Fas, TNF reseptörlerinin aktivasyonu veya hücrel stres sonucu RIP1 ve RIP3 (receptor interacting protein) serin/treoninkinaz reseptörü ile etkileşerek nekroz indüklenmektedir (Alvarez ve ark., 2010). Otofaji hücredeki enerji kaynaklarının dengelenmesi ve besinsel strese cevabın oluşturulmasında, yanlış katlanmış proteinlerin uzaklaştırılması, mitokondri gibi hasarlı organellerin temizlenmesinde rol oynar (Glick ve ark., 2010).

Karaciğerde toksisite yoluyla doğrudan hepatosellüler hasar oluşturulabildiğinden dolayı hücrelerin ölüme giderken hangi mekanizmayı kullandığının anlaşılması karaciğer hasarını düzeltmeye yönelik çalışmalarda önemlidir. Bu nedenle hepatosellüler hasarın oluşumunda oksidatif stresin neden olduğu hasar ile apoptoz, nekroz ya da otofajinin rolünün belirlenmesi ve melatoninin bu mekanizmalar üzerine etkisi bu çalışmanın ana konusunu oluşturmaktadır.

## **2.1. KARACİĞER EMBRİYOLOJİSİ**

Karaciğer primordiumu, önbarsağın distal ucunda bir endodermal epitel çıkıntısı şeklinde 3. hafta ortasında belirir (Şekil 1 ve 2).

tendinöz parçasını oluşturacaktır. Gelecekteki diyaframla temas eden karaciğerin bu yüzeyi peritonla hiçbir zaman örtülmez ve karaciğerin çıplak bölgesi olarak bilinir (Sadler, 2005).

İntrauterin yaşamın 10. haftasında karaciğerin ağırlığı toplam vücut ağırlığının %10 'u kadardır. Organın ağırlığındaki bu fazlalık, kısmen sinüzoid sayısının yüksekliğine atfedilirse de, bir başka önemli etken de, gördüğü hematopoietik fonksiyondur. Hepatik hücrelerle damar duvarları arasında, beyaz ve kırmızı kürelerin üretildiği, proliferasyonla karakterize geniş bir hücre ağı vardır. Hematopoietik aktivite, gebeliğin son iki ayında yavaş yavaş azalır ve doğumda geride ancak birkaç hematopoietik hücre adası kalır. Artık karaciğerin ağırlığı toplam vücut ağırlığının %5'i kadardır (Sadler, 2005).

Karaciğer hızlıca büyür ve 5. haftadan 10. haftaya kadar abdominal kavitenin büyük bölümünü doldurur. Başlangıçta, sağ ve sol loblar aynı hacimdedir fakat kısa süre sonra sağ lob daha fazla büyür. Karaciğerde kan yapımı 6. haftada başlar ve karaciğerin kırmızımsı görülmesine neden olur. Gelişimin 7-9. haftalarında karaciğerin nispeten hacminin artmasından esas sorumlu olan bu kan yapımı aktivitesidir (Özdamar ve Sorkun, 2002). Karaciğer hızlıca büyür ve 5. haftadan 10. haftaya kadar abdominal kavitenin büyük bölümünü doldurur. Başlangıçta, sağ ve sol loblar aynı hacimdedir fakat kısa süre sonra sağ lob daha fazla büyür. Karaciğerde kan yapımı 6. haftada başlar ve karaciğerin kırmızımsı görülmesine neden olur. Gelişimin 7-9. haftalarında karaciğerin nispeten hacminin artmasından esas sorumlu olan bu kan yapımı aktivitesidir (Özdamar ve Sorkun, 2002).

Karaciğerin bir başka önemli işlevi de 12. haftadan itibaren hepatik hücrelerin safra üretmeye başlamasıdır. Bu sırada safra kesesi ve sistik kanal da oluşmuş; sistik kanal hepatik kanalla birleşerek koledok kanalını meydana getirmiş olduğundan, üretilen safra barsağa akabilme imkânını bulur (Şekil 2). Sonuç olarak, sindirim kanalının içeriğinin rengi koyu yeşil bir hal alır. Duodenumun pozisyonunda meydana gelen değişiklikler sonucu, koledokun duodenuma giriş yeri başlangıçtaki anterior pozisyonundan posteriora doğru yer değiştirir ve sonuçta koledok duodenumun arkasından geçer duruma gelir (Sadler, 2005).

gösterir ve sağ böbrek, sağ böbrek üstü bezi, safra kesesi, mide, özofagusun bir kısmı, duodenum ve sağ kolik fleksura ile temas halindedir (Snell, 2012) bu yüzeye ise facies visceralis denir (Unur ve ark., 2009). Diyaframa bakan yüzün az bir kısmı peritonsuz olup diyaframa gevşek bağ dokusu ile bağlanır; bu alan areanuda olarak adlandırılır. Facies visceraliste 'H' harfi şeklinde oluk benzeri yapılar bulunur. Sağ kısımdaki oluk nispeten geniş olup sulcussagittalisdexter olarak isimlendirilir. Sol kısımdaki oluk ise yarık şeklinde olup fissura sagittalis sinister olarak isimlendirilir. Sulcus sagittalis dexterin ön yüzeyinde safra kesesi, arka yüzeyinde ise vena cava inferior (VCI) bulunur. İki oluk birleşiminde yer alan enine yarığa porta hepatis denir (Özbilim ve ark., 1998). Karaciğerde iki kenar bulunup facies diafragmatika ve facia viseralis arasında arka kısımda oluşan kenara; margo posterior, ön kısımda oluşan kenara ise margo inferior denir (Unur ve ark., 2009).

Karaciğere fasia diaframatika yüzeyi tarafından bakıldığında ligamentum falsiform denilen yapı ile birbirinden ayrılmış iki lobu bulunur. Fasya viseralis yüzeyinde bulunan 'H' harfi şeklindeki oluklar ise karaciğeri 4 loba ayırır. Sulcus sagittalis dexterin sağında kalan kısma; lobus hepatis dexter, fissura sagittalis sinisterin sol kısmında kalan bölüme ise lobus hepatis sinister denir. Bahsedilen bu iki lobun arasında ve porta hepatisin önünde kalan bölüme lobus quadratus, arada kalan bölüme ise lobus caudatus denir (şekil 4) (Unur ve ark., 2009).

Lobus hepatis dexter karaciğerde en geniş ve kalın olan lobdur. Önden arkaya doğru sırası ile impressio colica, impressio renalis ve biraz sola doğru impressio suprarenalis yer alır. Lobus hepatis sinisterin orta kısmında impressio gastrica, en arka kısımda ise impressio esophagea yer alır. Sağdaki loba göre daha dar ve incedir. Lobus caudatusun ön kısmında porta hepatis, sağ kısımda VCI, sol kısımda ise ligamentum venozum fissürü ile çevrelenmiştir (Kuran, 1983).

serbest anastomozlaşma gösterirler. Bu plakların arasında sinüzoid kapillerler yer alır ve burada kan akışı periferden merkeze doğru gerçekleşir, safra akışı ise tam tersi yöndedir (Kierszenbaum ve ark., 2006).

Portal lobül tipinde safra salgılanışı dikkate alınır. Portal kanal merkezde, üçgen şeklinde olan löbülün köşe kısımlarında birer santral ven bulunur (Basımoglu, 1996). Portal lobül denilen bu lobülde kan akımı merkezden perifere doğru iken safra akımı tam tersi yönde olup periferden merkeze doğrudur (Kierszenbaum ve ark., 2006).

Karaciğer asinüsü ise metabolik aktivite, yenilenme koşulları ve siroz oluşumunu tanımlamak için daha uygun görülür. Bu bölge iki adet portal triad ve interlobüler damarların ekseninde bulunan iki adet merkezi venarasınra bulunan oval şekilli bölgedir. Burada kan akımı asinüsün merkezinden vena centralise doğrudur (Terzi, 2008). Burada sınırlar hepatik arterin en son dalı ile belirlenebilir. Arterden akışı gerçekleşen kan venöz sinüzoidler boyunca akışı sonucu oksijenlenmesi ve beslenmesine göre zonI (periferikzon), zonII ve santral zon (zonIII) olarak isimlendirilen bir derecelendirme meydana getirir (Kierszenbaum ve ark., 2006).

Besin ve oksijen yönünden en zengin olan bölge periferikzon olarak da isimlendirilen zon I denilen bölgedir. Buradaki hücreler damarlara en yakın olan hücrelerdir. Burada kan akışı lobül merkezinden perifere doğru gerçekleşir bu yüzden besin ve oksijenden zengin kan ile karşılaşan zon I hücreleri sürekli aktiftir. İlk kez bu bölge kanla karşılaştığı için kanda bulunan olası bir toksik maddenin etkileyeceği ilk bölge yine burasıdır (Fawcett, 1994; Arslan 2008).

Zon II hem besin hem de oksijen bakımından orta durumdadır.

Zon III oksijen yönünden en fakir olan bölüm olup sentral vene en yakın bölümdür ve olası bir hipoksi durumunda etkilenecek ilk bölgedir (Kierszenbaum ve ark., 2006). Yine karaciğerde oluşabilecek yağlanmanın da görüldüğü ilk bölge bu bölgedir (Arslan, 2008).

Santral venden başlayıp perifere anastomozlaşarak uzanan hepatosit kordonlarının arasında sinozoid kapiller denilen kapillerler bulunur (Roose ark., 1995; Eşrefoğlu, 2009). Bu kapillerler düzensiz gelişmiş ve pencereci endotel tabakasından oluşmuştur. Endotel hücrelerin üzerinde bulunduğu bazal lamina kesintili bir yapıda olup sinozoidler ince tabakalı bir retiküler lifağı ile desteklenir (Junqueira ve ark., 1998).

Sinozoidler endotel hücrelerinin yanı sıra kupffer hücrelerini (yıldız hücreler) ve yağ depolayan ito hücrelerini bulundururlar (Basımoğlu, 1996). Endotel hücreleri heterokromatik çekirdekli, ince stoplazmalı olup sinozoid duvarında bulunur (Arslan, 2008). Sitoplazmasında çok sayıda porlar bulunduğu için pencereci görünümde (Basımoğlu, 1996).

Endotel hücreler altında yer alan hepatositler-sinozoid duvardan Disse aralığı denilen bir boşlukla (subendotelyal boşluk) ayrılmıştır. Disse aralığında hepatositlerin mikrovillusları yer alır. Bu şekilde sinozoid lümeni ile karaciğerin hücreleri arasındaki madde alışverişi kolaylaşmış olur. Bu alışveriş çok sayıdaki makromolekülün (fibrinojen, lipoproteinler, albumin v.b.) hepatositler aracılığı ile kana verilmesinden ziyade bu moleküllerin hepatositler tarafından katabolize edilmesi ile fizyolojik olarak da önemlidir (Junqueira ve ark., 1998). Hepatositler karaciğer hücrelerinin %65'ini ve karaciğer hacminin de %80'ini oluşturur. Çoğunluğu tek nükleuslu olsa da yaklaşık %25'i çift nükleus taşırlar (Junqueira ve ark., 1998). Karaciğerin yerine getirdiği fonksiyonların büyük bir çoğunluğu hepatositler ile yerine getirilir. Bu yüzden hücrelerin geniş kapsamlı bir fonksiyonel çeşitlilikleri mevcuttur ve bu durumu hücrenin sitolojik yapısıyla gösterirler. Enine alınan kesitlerde hepatositlerin altıgen şekilli ve altı yüzeye sahip oldukları görülür. Bu yüzlerden iki tanesi disse aralığına bakar ve bol mikrovillusludur. Diğer iki tanesi komşu olan hepatositler arasında tübüler aralık bırakan ve safra kanalliküllerinin oluşmasını sağlayan yüzlerdir ve mikrovillusları lümen içine uzanır. Diğer iki yüz ise zonula okludenslerle sıkı bir şekilde kapanmış olup komşu karaciğer hücreleri ile temas eden yüzeyler oluştururlar (Şekil 8).

İto hücreleri parankimal hücreler arasında bulunan oyuklara yerleşmiş olan yıldızlı hücrelerdir “stellat hücreler”, “perisinüzoidal hücreler” veya “yağ depolayıcı hücreler” olarak da isimlendirilir. Bu hücreler stoplazmalarında bol miktarda lipit damlacıkları bulundurlar (Junqueira ve ark., 1998). Bazı yönleri ile sitolojik olarak fibroblastlara benzerler, lobülün periferinde ve orta kısmında yoğun bulunurlar (Özdamar, 2002). Bu hücreler dışarıdan gelen A vitaminini lipit damlaları içerisinde retinil esterler halinde depolama kapasitesine sahiptir (Junqueira ve ark., 1998). Endotelyal hücreleri çevrelerler, uzun ve ince bir sitoplazmik yapıya sahiptir (Wake, 1995). Bu hücreleri çevreleyen bir taban membran bulunmaz. İto hücreleri mikrovasküler tonusun düzenlenmesine ve ekstrasellüler matriksin sentezine katılır (Sage ve ark., 1990).

Disse aralığı, sinozoid endotelleri ile hepatositler arasında kalan dar bölgedir (Özdamar, 2002). Lenf yapımında rol alır. Damarların periferinde ve portal aralıkta bulunan safra duktusunda yer alır (Ross ve ark., 2003). Burada kanın şekilli elemanları bulunmayıp kan plazması bu alana serbest olarak girip çıkabilir. Bu serbest giriş çıkış karaciğer hücreleri ve kan arasında metabolitlerin aktif değişimini kolaylaştırır. Fetal karaciğerdeki bu bölge kan yapan hücre adacıklarını içerir. Erişkin bir bireyde ise kronik anemi söz konusu olunca kan yapıcı hücreler bu bölgede tekrar görülebilir (Özdamar, 2002). Disse aralığı içerisinde hem kupffer hücrelerinden hem de endotelden türeyen peri sinüzoidal hücreler bulunur (Kerr ve ark., 1994).

Karaciğerin ekzokrin tip salgısı olan safranin hücreler arası iletimini sağlayan; safra kanalikülleri denilen kanalcıkları vardır (Junqueira ve ark., 1998) ve bu kanaliküller lobüller içerisinde üç boyutlu ağsı bir yapı oluşturur (Şekil 7). Safra kanalcıkları giderek genişleyen bir yapıya sahip olup salgılanan safra bu sistemle karaciğerden ince bağırsağa iletilir. Bu kanalcıkların çapı 0,5-1,5 µm aralığındadır (Junqueira ve ark., 1998). Bu çap salgı esnasında genişler. Bu alanı saran hücre membranları lümenin içine uzanan kısa mikrovilluslar taşırlar (Özdamar, 2002). Rutin inceleme esnasında bu kanalikülleri seçmek zordur, fakat gümüşleme ile veya alkalenfosfataz reaksiyonu ile görüntülenebilir. Karaciğer hücreleri de bu kanalcıkların duvarlarında bulunur (Tekelioğlu, 1998; Junqueira ark., 1998). Safra kanaliküllerinin safra duktusu ile olan bağlantısı kolay görüntülenemez (Özdamar, 2002). Safra kanalikülün duvarını oluşturan karaciğer hücreleri lobülün periferinde bulunur ve bu hücreler sitoplazmaları soluk görümlü boyanan, nukleusu koyu organel bakımından fakir olan kübik hücrelere

azalan hücre ölümünün karsinogenezisde rol aldığı düşünülmektedir (Kerr ve ark., 1994).

Hücre ölümü homeostazi ve immün sistemin düzenli işleyişi için önemli bir süreçtir. Hücre ölümünün tipik morfolojik özellikleri baz alındığında üç ana hücre ölümü mekanizması tanımlanmıştır: apoptotik, nekrotik ve otofajik hücre ölümü (Merker ve Schweichel, 1973 ).

#### **2.4.1. Apoptoz**

Apoptoz süreci, belirgin morfolojik özellikler ve enerjiye bağlı biyokimyasal mekanizmalarla karakterizedir. Normal hücre sirkülasyonu, hormon-bağımlı atrofi, bağışıklık sisteminin düzgün işleyişi ve gelişimi ve embriyonik gelişim için hayati önem taşır. Apoptotik sinyalin ve uygunsuz (olması gerekenden az veya fazla) düzensizliği nörodejeneratif hastalıklar, otoimmün bozukluklar ve birçok kanser türü dahil olmak üzere bir çok hastalıkta önemli bir faktördür. Bir hücrenin yaşamını veya ölümünü modüle etme kabiliyeti, kusursuz terapötik potansiyeli ile tanımlanır. Bu yüzden araştırmalar hücre döngüsü mekanizmalarının açıklanmasına, hücre döngüsünü durduran ve kontrol eden sinyal yollarının araştırılmasına odaklanmıştır (Sharma ve ark., 2016). Apoptoz genetik kod aktivasyonu ile veya çevreden gelen sinyaller ile aktive olur (Erdoğan, 2003).

Apoptoz embriyonik dönemde, postnatal hayatta ve patolojik durumlarda gerçekleşir. Embriyonik dönemde memelilerin üye oluşumu esnasında el ve ayak parmağı taslaklarının arasındaki dokuların ortadan kaldırılması, merkezi sinir sisteminin şekillenme sürecinde, cinsel gelişim esnasında duktus sistemindeki gerileme de apoptoz aracılığı ile gerçekleşir. Kurbağalar metamorfoz esnasında kuyruklarını apoptoz ile kaybederler. Buna ek olarak gözde bulunan lens hücreleri de gelişimin ilerleyen safhalarında apoptoz ile ölür ve içleri 'kristalin' adı verilen şeffaf protein ile dolar (Vaux, 1999; Franz ve Kidson 1997). Postnatal dönemde kan üretiminin dengede tutulması için kan hücrelerinin ömürleri dolduğunda uzaklaştırılması, menstrual döngüde korpus luteum involusyonu apoptoz ile meydana gelir. İnsan deri hücreleri de derinin bazal tabakasından en üst tabakaya doğru çeşitli farklılaşma özellikleri göstererek göç eder ve keratin tabakayı oluşturmak üzere ölürlür. Timusda olgunlaşan T-lenfositlerden aktif olmayanlar ya da canlının kendi dokusuna cevap verme potansiyelinde olanlar dolaşıma geçmeden apoptoz ile ölürlür. Dişi memeliler süten

kesildiklerinde meme bezlerinde ve kastrasyon yapılan erkek bireylerin prostatlarında apoptoz görülür (Marti ark., 2001; Ford, 2001). Alzheimer, Parkinson, diyabet, tümör oluşumu, foliküleratrezi, viral enfeksiyonlar, miyokard infarktüsü, aterosklerozis, organ nakli, alkolizm, radyasyon gibi durumlar apoptoza neden olur (Blanch ark., 1999; Hughes ve Gorospe, 1991; Kannan ve Jain, 2000).

Apoptoz hücrenin kendini yok etmesi için programlı metabolik ve fizyolojik faaliyetlerin devreye girmesi ile başlar. Apoptoz uyarısını alan hücre bulunduğu kendi ortamından uzaklaşıp çevresindeki diğer hücrelerle bağlantısını kopararak büzüşmeye başlar. Kromatini yoğunlaştırarak piknotik görünür. DNA nükleozomlardan kesilir. Ancak hücre organellerinin yapısal bütünlüğü korunur ve hücre zarı yapısındaki fosfolipidlerin iç yüzeyden zarın dış yüzeyine transloke olur. Çekirdek küçülerek 'apoptotik cisimler' olarak adlandırılan küçük parçalara ayrılır ve bu parçalar zarlı tomurcuklar şeklinde koparak ayrılırlar. Apoptotik cisimler makrofajlar tarafından tanınarak fagosite edilir fakat inflammatuar bir durum gözlenmez ( Bellamy ve ark., 1995).

Apoptozun düzenlenmesi genel olarak mitokondriyonlar, seramid, Bcl-2 ailesi gibi moleküller, p53, sitokrom-c, kaspazlar gibi proteinler rol alır. Apoptik süreçte hücre içerisine sürekli bir kalsiyum girişi gerçekleşir. Kalsiyum iyonları transglutaminaz, proteaz ve endonükleaz aktivasyonunda, hücre iskeleti organizasyonunda, gen regülasyonunda ve trans glutaminaz aktivasyonunda rol alır (Coşkun ve Özgür, 2014).

Kaspazlar aspartik asitten sonra peptid bağını kıran sistein proteazlardır. Hücrede inaktif olup birbirlerini proteolitik olarak aktive ederler. Yaklaşık olarak 100 farklı hedef proteini kesip apoptoza sebep olurlar ve 3 tip olarak sınıflandırılırlar:

I. Başlatıcı kaspazlar (Kaspaz 2, 8, 9, 10),

II. Efektör kaspazlar (Kaspaz 3, 6, 7),

III. İnflammatuar kaspazlar (1, 4, 5, 11, 12, 13, 14)

DNA replikasyonu ve DNA onarımı için gerekli enzimleri aktive ederler. Hücre iskelet proteinlerini kesip hücre zarında tomurcuklanmayı sağlarlar (Adams ark., 2001; Adrain ark., 2001; Spierings ark., 2004). Apoptoz tetiklendikten yaklaşık 1 saat ya da daha da uzun bir süre sonrasında DNA'nın tek ipliğinde bir çentik ile başlayıp karakterize ve geri dönüşümsüz bir parçalanma başlar (Curtin ve Cotter, 2003). Apoptozun mekanizması ele alınacak olursa iki yolla gerçekleştiğinden bahsedilebilir. Bunlar;

İnstrinsik (mitokondriyal) yol ve ekstrinsik yol'dur. Apoptoz hücre içi ve hücre dışı sinyallerle tetiklenir. Hücre içi sinyaller; kalsiyum iyonlarının artışı, pH azalışı, DNA hasarı, hücre siklusu veya metabolik bozukluklar ve hipoksidir. Hücre dışı sinyaller ise; üreme ve büyüme faktörlerinin yetersizlikleri, ölüm reseptörlerinin aktive olması, sitotoksik T lenfosit ve dışarıdan gelen faktörler (kemoterapötik ilaçlar, toksinler, iskemi, UV, radyasyon vb.) her iki sinyal yolunda da kaspazlar görev yaparlar. Hücre dışı faktörler ekstrinsik yol ile hücre içi faktörler instrinsik yol ile apoptozu başlatırlar (Danial, 2004; Kromer ark., 2007; Smaili ark., 2000).

#### **2.4.2. NEKROZ**

Uzun süredir, nekrozun, altta yatan sinyal olaylarından yoksun, tesadüfi ve kontrolsüz bir hücre ölümü biçimi olduğu düşünülmüştür. Çalışmaların sonuçlanması, kaspazlardan bağımsız düzenlenip kontrol edilen hücre ölüm yolunun varlığı desteklenmektedir (Levine ve Klionsky, 2004). Bu düzenlenmiş nekroz şekli hem fizyolojik hem de patolojik durumlarda dikkat çekici görünmektedir (Chautan ve ark., 1999). Nekroz, yumurtlama gibi fizyolojik olarak ilgili sinyalizasyon işlemlerinde (Murdoch ve ark., 1999), kemiklerin boyuna büyümesi ile ilişkili kondrositlerin ölümünde (Roach ve Clarke, 2000) ve ince ve kalın bağırsaklarda hücresel dönüşümde rol oynar (Barkla ve Gibson, 1999; Mayhew ark., 1999). Nekroz eksitotoksisite, iskemi-reperfüzyon hasarı, nörodejeneratif hastalıklar ve enfeksiyonel durumlarda da ortaya çıkar (Chautan ve ark., 1999). Örneğin İskemi-reperfüzyon (IR) hasarı, reperfüzyonun ardından bir dokuya kan akışının sağlanamamasından kaynaklanır. Endotel hücrelerinin ve çevredeki dokuların çoğalmayan hücrelerinin (örneğin nöronlar, kardiyo miyositler, böbrek hücreleri) nekrotik hücre ölümü, kalp, beyin, karaciğer, böbrek ve bağırsak dahil organların hasarlanmasına neden olabilir.

Son yıllarda yapılan araştırmalar nekrozun çeşitli sinyal olayları ve geniş bir aralığa sahip mediatörler arasındaki kapsamlı bir etkileşimden kaynaklandığını göstermektedir (Vercammen ve ark., 1997). Dışarıdan hücreye gelen kimyasal ve fiziksel uyarılar hücrenin iyonik dengesini bozarak DNA tamir mekanizmasından sorumlu nükleer enzim olan PARP (Poli ADP-ribozpolimeraz) NAD'ı ikiye böler ve NAD kaybına sebebiyet verir. Bu durumdaki ATP eksikliği iyon pompası eksikliğine yol açar. Hücre sıvı almaya başlar ve organellerle birlikte şişer, plazma-membran bütünlüğü bozularak

hücre patlar. Hücre ölümünün ardından hücre içeriğinin hücreler arası boşluğa salınması ile enflamasyon (yangı, iltihaplanma) oluşur. Bu durum neticesinde makrofajların ve nötrofillerin nekrotik dokuya göç ederek nekrotik dokuyu fagosite etmesi nekrozun karakteristik bir özelliği olup enflamasyon da nekrozun önemli bir işaretidir (Golstein ark., 2007; Nicotera ark., 2004). Kaspaz-8 aktivasyonu, çoğu hücre tipinde apoptotik hücre ölümüne yol açan bir sinyal kaskadı başlatır. Bu yoldaki kaspaz aktivasyonu engellenirse, bunun yerine nekrotik hücre ölümü meydana gelebilir (Devin ve ark., 2000).

Serin / treonin kinaz reseptörü etkileşimli protein 1 (RIP1), nekrotik hücre ölümünün merkezi bir başlatıcısıdır. Reaktif oksijen türleri (ROS) ve kalsiyum, nekrozun önemli araçlarıdır, ancak hepsi organellerin ve plazmanın bozulmasına katkıda bulunan fosfolipazlar, kalpainler, katepsinler, seramid ve metilglisokal gibi başka birçok araçtan da bahsedilmiştir (Devin ve ark., 2000). İmmün sistemde hücre ölümünü kontrol eden reseptörlerin (Fas, TNF) aktivasyonu veya sellüler stres sonucunda RIP1 ve RIP3 /Receptor interacting proteins) aktifleşir. RIP1 ve RIP3 mitokondriyonu ya direkt olarak ya da NADPH oksidazın oluşturmuş olduğu ROS ile indirekt olarak etkileyerek nekrozu tetikler. Nekrotik uyarı ayrıca PARP'ı aktive ederek kalpain aktivasyonunu, bu durum da RIP kinazların aktivasyonu yolu ile nekroza neden olur (Hengartner ve ark., 1992). RIP kinazlar ROS üretimini elektron transport zinciri ile sağlar. Biriken aşırı Ca iyonları ve ROS miktarının artışı mitokondriyal porların uzun süreli olarak açık kalmasına sebep olur. Bu durumda hücre oksidatif fosforilasyon ile ATP üretemez ve nekroz gerçekleşmiş olur (Baines,2010; Zong ark., 2006).

### **2.4.3. OTOFAJİ**

Otofaji hücrenin açlıkla karşı karşıya kaldığı durumlarda besin eldesi için hücre içerisindeki yapıların nasıl parçalandığını ifade etmek için kullanılan bir terimdir. Otofaji ile ilgili ilk yapılan çalışmalarda besin yokluğu durumunda hücre içindeki moleküllerin geri dönüşümleri sağlanarak hücrenin stresli ortama uyum sağlamasına yardımcı olarak homeostazinin korunmasına katkı sağladığı gösterilmiştir (Ohsumi, 2001; Shintani ark., 2004). Son yıllarda yapılan çalışmalar ise otofajinin; morfogenez, yaşlanma, metabolizmanın düzenlenmesi, hücre farklılaşması, immün sistemin bir

parçası olarak patojenlere müdahale edilmesinde ve hücre ölümünde etkili bir role sahip olduğu ortaya konmuştur (Shintani ark., 2004; Mizushima ark., 2008).

Otofaji üç farklı mekanizma ile gerçekleşir;

I. Makrootofaji,

II. Mikrootofaji,

III. Şaperon aracılıklı otofaji.

Makrootofaji birçok hücrede bazal düzeyde gerçekleşmekte olup protein parçacıkları ve hasarlı organellerin parçalanmasında önemli bir rol oynamaktadır. Mikrootofaji mekanizmasında lizozomun membranı içeri çökerek sitoplazmanın lizozom ile doğrudan sindirilip içeriğinin lizozom içine hazmedilmesi ile gerçekleşir. Şaperon aracılı otofajide; KFERQ motifli proteinler lizozom zarına seçici bir biçimde taşınır (Xie ve Klionsky, 2007). Bu çalışmada makrootofaji yolağında görev alan LC-3 proteini araştırma konusu olduğu için bahsedilecek otofaji makrootofajidir.

Otofaji mekanizmasında görev alan proteinlerin geneli “otofaji ile bağlantılı proteinler” (Autophagy-related proteins) kısaca Atg proteinleri, maya ile yapılan çalışmalar neticesinde bulunmuştur (Xie ve Klionsky, 2007). Bu proteinlerin bir kısmı ve başka protein kompleksleri “otofajik kesecik” ya da “izolasyon membranı” oluşumunda rol alırlar. Hücre içerisinde otofagozomlar “otofaji oluşum merkezi” (Preautophagosomal structure, PAS) denilen ve memelilerde golgi cisimciği ile endoplazmik retikulum yapıları arasına serpiştirilmiş gibi yer alan yapılarda ortaya çıkar. Otofajik keseciğin kaynağı tam olarak belli olmamış olsa da çoğunlukla yeni sentezlendiği ya da endoplazmik retikulum, mitokondri ve plazma membranı yapılarından kaynaklanabileceği düşünülmüştür (Kroemer ve ark., 2010). Kesecik oluşumunda rol alan proteinler ve protein grupları PAS’a yönlendirilerek çekirdeği oluşmuş olan otofagozom membranının uzaması ve kesecik halini alması gerçekleşir. Bu çalışmada bir otofaji belirteci olarak kullandığımız LC3 proteini aynı zamanda Atg8 olarak da isimlendirilmektedir. LC3 (Atg8) bir fosfotidil etanolamin (FE) yağ molekülüne bağlanır. Atg12-Atg5-Atg16 kompleksi de LC3’ün FE’ye bağlanması için gereklidir. LC3’ün FE’ye bağlanması, PAS’a zar taşınması ve zar uzaması için gerekli bir olaydır. Atg4 proteini kesecik oluştuktan sonra görevini tamamlayan LC3 proteinlerini yağdan

kopartıp yeniden kullanılmalarını sağlamaktadır (Ohsumi, 2001; Shintani ark., 2004; Xie ve Klionsky, 2007).

## 2.5. KARACİĞER HASARI

Kronik hastalıklar vücudun herhangi bir yerinde meydana gelen, tam olarak iyileşmeyen uzun süre devam edip bazen yaşam boyu süren, hatta iş görmezlik sınıfına dahil edecek derecede kalıcı sakatlık olarak nitelendirilebilen ve bulaşıcılık göstermeyen hastalıklardır. Dünya sağlık örgütü (WHO) 2005 yılında, tahmin edilen yaklaşık 58 milyon ölümün %60'ının kronik hastalık kaynaklı olduğunu bildirmiştir (WHO, 2003).

Kronik karaciğer hastalıkları kronik hastalıklar grubunda yer alan bir rahatsızlıktır. Vücudun deriden sonraki en büyük organı olan karaciğer aynı zamanda salgısını safra kanalları yolu ile duodenuma boşaltmasından dolayı ekzokrin, sentezlediği bazı maddeleri de direkt kana vermesi sebebi ile endokrin bir bezdir. Yetişkin karaciğeri yaklaşık olarak 1500 gr ağırlığındadır. Vücutta arteriyel ve venöz kanın birbirine karıştığı tek organ olup yoğun bir sinir ve damar ağına sahip 2 lobdan oluşur (Mercanlıgil ve ark., 2008). Karaciğer; besinlerin işlenmesi, kanın depo edilmesi, lipid metabolizması, karbonhidrat metabolizması, protein metabolizması, safranin sentezlenip salgılanması, hormonların, ilaçların ve diğer zararlı toksik ajanların detoksifiye edilerek atılması gibi önemli görevlerde rol alan hayati bir organdır (Mizushima ve ark., 2008).

Oksidatif stres, maruz kalınan toksinler aşırı alkol tüketimi, safra yolu tıkanıklılığı, viral enfeksiyonlar gibi birçok durum akut ve kronik karaciğer hasarı oluşumunda sebep olarak gösterilmektedir (Stehbens ve ark., 2003). Hepatikfibrozis geri döndürülebilir bir durum olup kronik karaciğer hasarına yanıt olarak oluşur. Vücudun onarım ve savunma mekanizmalarının yetersiz geldiği durumda karaciğer fonksiyonunda bozukluk oluşur. Oksidatif stresin indüklenmesi mitokondriyaldisfonksiyon ve antoksidan statüsünün tükenmesinden kaynaklanır (Kitada ve ark., 2001). Karaciğer sirozu karaciğer yetmezliğine yol açan kronik karaciğer hastalıklarının kritik bir aşamasıdır. Hepatik fibrozis geri dönüşü olmayan siroza yol açabilir ve hepatik fonksiyonun azalmasında doğrudan sorumlu olan kollajen ve ekstraselüler matriks birikimi ile sonuçlanan çoklu hücresel ve moleküler olayları içerir (Friedman ark., 1993; Pinzani ark., 2004). Sirozda görülen hücre dışı matriks birikimi stellat hücreler gibi hücre öncüllerinin aktivasyonu ile üretilen fibroblastların aktivasyonundan kaynaklanmaktadır (Guyot ve ark., 2006).

Karaciğer yetmezliği modelleri geliştirmek için birçok çalışma yapılmıştır. Cerrahi modeller hepatikiskemi ve subtotal veya total hepatektominin kullanımını içerirken (Makino ve ark., 2005), kimyasal modeller asetaminofen (Rahman ve ark., 2002), karbontetraklorür (Taniguchi ve ark., 2004), galaktozamin (Cuesta ve ark., 2006) ve tioasetamid gibi ilaç ve toksinlerin kullanımı ile gerçekleştirilir (Pallottini ve ark., 2006).

## **2.6. Tioasetamid (TAA)**

Tioasetamid (TAA) başlangıçta fungusit olarak kullanılmıştır (Vadi ve ark., 1981). TAA, esas olarak karaciğer ve böbrekleri etkileyen zayıf bir kanserojendir (Rekha ve ark., 2008). TAA, karaciğer fibrozu ve sirozun bir indükleyicisi olarak kabul edilmiştir (Al-Attar ve ark., 2011). Tioasetamid tarafından indüklenen karaciğer sirozu, aşırı peroksidasyonu ile (Muller ve ark., 1991) ve antioksidan durumun tükenmesi ile ilişkilidir (Abul ve ark., 2002). TAA hepatoselüler nekroza sebep olur ve reaktif oksijen türlerinin rolünü araştırmak için kullanılır. Oksidatif stresin azalması çeşitli hastalıklarda ve deneysel karaciğer hasarı modellerinde hücre hasarını, sirozu ve fibrozisi azaltmak için yararlı olabilir (Lieber ark., 2003; Shapiro ark., 2006). Antioksidanlar karaciğer hasarına sebep olan oksidatif stresi en aza indirebilirler (Pavanato ve ark., 2007).

## **2.7. MELATONİN**

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) güçlü bir endojen antioksidandır. Sirkadiyen ritimlerin düzenlenmesinde, uykuda bağışıklık sistemi aktivitesinde ve serbest oksijen radikallerinin eliminasyonunda çok önemli rol oynar (Allegra ve ark., 2003). Antioksidan etkisini antioksidan enzim sentezinin indüklenmesine yol açan G protein bağımlı reseptörleri aracılığı ile uygular (Abdel-Vahab ve ark., 2001). Ayrıca melatoninin peroksil radikalleri, tekli oksijen türleri ve hidrojen peroksit gibi birçok toksik serbest radikal ile etkileştiği gösterilmiştir (Reiter ark., 2008; Peyrot ark., 2006). Melatonin süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz gibi antioksidan ve antioksidan enzimlerin aktivitesinin düzenlenmesini tetikleyebilir (Reiter ve ark., 2005). Melatonin glutamil sistein sentetaz aktivitesini indükler, böylece bir

başka hücre içi antioksidan glutatyon üretimini uyarır (Winiarska ve ark., 2006). Son zamanlardaki çalışmalarda melatoninin çeşitli deneysel akut karaciğer hasarı modellerinde sitoprotektif etki gösterdiği ve fibroblast proliferasyonunu ve kollajen sentezini azalttığı gösterilmiştir (Tahan ve ark., 2004) bu da melatoninin antioksidan etkisi ile akut ve kronik karaciğer hasarı üzerinde terapötik etkileri olabileceğini göstermektedir(Tan ve ark., 2000).

Karaciğerde toksisite yoluyla doğrudan hepatosellüler hasar oluşturulabildiğinden dolayı hücrelerin ölüme giderken hangi mekanizmayı kullandığının anlaşılması karaciğer hasarını düzeltmeye yönelik çalışmalarda önemlidir. Bu nedenle hepatosellüler hasarın oluşumunda oksidatif stresin neden olduğu hasar ile apoptoz, nekroz ya da otofajinin rolünün belirlenmesi ve melatoninin bu mekanizmalar üzerine etkisi bu çalışmanın ana konusunu oluşturmaktadır.

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. Dokuların Eldesi**

Bu çalışmada Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinde (DEKAM) yetiştirilen 35 adet 150-250 gr ağırlığındaki 6-8 aylık Wistar albino türü erkek sıçanlar kullanılmıştır. Kafesler içinde tutulan sıçanlara günün normal düzeninde 21 °C ve 12 saatlik aydınlık/karanlık ortamında su ve besin ihtiyaçları sağlanmıştır. Bu projetik kuruldun 15.08.2018 tarihli etik kurul onay belgesi ile bilimsel araştırma projeleri tarafından TYL-2018-8511kodlu proje ile desteklenmiştir. Tüm prosedürler etik kurallara uygun bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Denekler tartılıp, ağırlıkları birbirine yakın olanlar bir araya getirilerek deney grupları oluşturuldu.

Grup I: Kontrol grubu (7 adet),

Grup II: Melatonin grubu (Mel grubu) (7 adet)

Grup III: Tiyoasetamid (TAA grubu) (7 adet)

Grup IV: Melatonin + Tiyoasetamid grubu (Mel+TAAgrubu ) (7 adet)

Grup V: Tiyoasetamid + Melatonin grubu (TAA+ Mel grubu) (7 adet)

#### **Deney prosedürü**

Grup I: Kontrol grubuna ait deneklere ip olarak serum fizyolojik verildi.

Grup II: Melatonin tek doz 10 mg/kg deneyin ilk günü uygulandı.

Grup III: Deney grubuna ait deneklere karaciğerde akut hasar oluşturmak amacıyla 24 saat arayla 300 mg/kg 2 doz tiyoasetamid verildi.

Grup IV: Melatonin, tiyoasetamid uygulamasından 24 saat önce 10 mg/kg i.p olarak tek doz uygulandı. TAA melatonin uygulamasından sonra 24 saat arayla 300 mg/kg 2 doz verildi.

Grup V: Tiyoasetamid 300 mg/kg ip olarak 24 saat arayla 2 doz uygulamasından sonra 10 mg/kg tek doz melatonin uygulandı.

Deney sonunda denekler tartılıp ağırlıkları kaydedildi, ketamin+ksilazin anestezisi altında kanları alınıp, hayatlarına son verilen erkek sıçanlardan alınan karaciğer dokuları %4'lük formaldehit solüsyonunda tespit edildi. Tespit solüsyonlarında 72 saat bekleyen testis dokuları aşağıdaki tabloda ayrıntılı olarak verilmiş olan doku hazırlama metodu ile bloklandı (Tablo 3.1).

**Tablo 3.1.** Işık mikroskobu doku hazırlama tekniği

Sıra	Yapılan İşlem	Süre	Sıra	Yapılan İşlem	Süre
1	Musluk suyu	1 gece	9	%50 Ksilen- Alkol	10 dakika
2	%50 Alkol	1 saat	10	%70 Ksilen-Alkol	10 dakika
3	%70 Alkol	1 saat	11	Ksilen	20 dakika
4	%80 Alkol	1 saat	12	Ksilen	20 dakika
5	%96 Alkol	1 saat	13	Ksilen	20 dakika
6	Absolü Alkol	1 saat	14	Eriyik parafin	1 gece
7	Absolü Alkol	1 saat	15	Bloklama	
8	Absolü Alkol	1 saat			

Artan alkol serilerinden geçirilerek sudan kurtarılan dokular ksilen ile şeffaflandırdıktan sonra parafine gömülerek bloklandı. Alınan 5 µm'luk kesitler polilizin kaplı lamlara yayıldı. Hazırlanan lamlar standart histolojik yöntemler kullanılarak ksilol ile parafini uzaklaştırıldı ve % 100'den başlayarak inen alkol serilerinden geçirilip sulandırıldı. Genel histolojik yapıyı görmek amacıyla kesitler Hematoksilen-Eozin (H+E) (Tablo3.2), Periyodik Asit Schiff (PAS) (Tablo3.3) ile boyanarak önce artan alkol serilerinden daha sonra ksilenden geçirilerek incelendi

**Tablo 3.2.** Hematoksilen-Eozin boyama tekniği

Sıra	Yapılan İşlem	Süre	Sıra	Yapılan İşlem	Süre
1	Etüv (60 °C)	1 saat	13	Akarsu	5 dakika
2	Ksilen I	20 dakika	14	Eozin	3-5 dakika
3	Ksilen II	20 dakika	15	Akarsu	5 dakika
4	Ksilen III	20 dakika	16	%50 Alkol	10 dakika
5	Absolu Alkol I	20 dakika	17	%70 Alkol	10 dakika
6	Absolu Alkol II	20 dakika	18	%80 Alkol	10 dakika
7	%96 Alkol	20 dakika	19	%96 Alkol	10 dakika
8	%80 Alkol	20 dakika	20	Absolu Alkol I	10 dakika
9	%70 Alkol	20 dakika	21	Absolu Alkol II	10 dakika
10	%50 Alkol	20 dakika	22	Ksilen I	20 dakika
11	Akarsu	5 dakika	23	Ksilen II	20 dakika
12	Hematoksilen	5-8 dakika	24	Kapatma	

**Tablo 3.3.** Periyodik asit shiff boyama tekniği

Sıra	Yapılan işlem	Süre
1	Deparafinizasyon ve rehidratasyon	
2	Periodik Asit	5 dakika
3	Distile suda yıkama (3kez)	2 dakika
4	Shiff solüsyonu	15 dakika
5	Suda yıkama	5-10 dakika
6	Harris Hematoksilen	5 dakika
7	Asit alkol	1-2 saniye
8	Suda yıkama	5 dakika
9	Absolü alkol	10-15 saniye
10	Ksilen	30 dakika
	Entellan ile kapatma	

### 3.2. İmmunohistokimyasal Uygulama

Deneydeki karaciğere ait dokularda kaspaz-3 (*Anti-Caspase-3 antibody, Abcam*) reseptör-etkileşimli protein kinaz-3 (RIPK3) (*Anti-RIP3 antibody, Abcam*) ve mikrotübül-ilişkili protein hafif zincir-3 (LC3) (*LC3B antibody, Novus*) molekülünü belirlemek için avidin-biotin-peroksidaz yöntemi ile immunohistokimya uygulandı. Bir gece 60°C'de tutulan önce ksilen sonra dereceli alkol serilerinden geçirilerek rehidrate edilen kesitler daha sonra fosfat tampon (PBS) ile 3 defa 5'er dakika yıkandı. Daha sonra antijen geri kazanımı için %5'lik sitrat tamponu ile mikrodalga fırında 600W'de 3X5 defa kaynatılan kesitler 20 dakika oda ısısında aynı tampon solüsyon içinde bekletildi. PBS ile tekrar yıkanan kesitler endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için 5 dakika %3 hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile muamele edildi. Bundan sonraki aşamalar için (*LabVision, Ultra Vision Detection System Large Volume Anti-Polyvalent, HRP TP-125-HL*) boyama kiti kullanıldı. Tekrar tamponla yıkanan kesitlere antijenik alanların dışında kalan bölgelerin kapatılmasını sağlamak için oda sıcaklığında 20 dakika Blok serum uygulandı. Hemen ardından kesitler primer antikor ile 1 gece +4°C'de bekledikten sonra 20 dakika inkübe edildi. Negatif kontrol olarak, birincil antikor yerine PBS kullanıldı. Yıkama işleminden sonra kesitler fare dokularına bağlanabilen biotin-sekonder antikor ile 30 dakika inkübe edildi ve ardından yıkama işlemi tekrarlandı. Daha sonra AB enzim ayracı ile 30 dakika muamele edilen kesitler yıkanarak immun reaktiviteleri görünür hale getirmek için diamin benzidin (DAB) (*DAB Plus SubstrateSystem, TA-125-HDX, thermoscientific*) ile 1-10 dakika muamele edildikten sonra 5 dakika deiyoinze H<sub>2</sub>O ile yıkandı. Gill hematoksilen ile karşıt boyanan kesitler birkaç kez deiyoinze H<sub>2</sub>O ile yıkandı. Son olarak artan alkol serileri ile suyu uzaklaştırılarak ksilenden geçirilen kesitler kapatma ortamı (*Entellan®, Merck*) ile kapatılarak ışık mikroskopunda incelendi. Primer antikorların dilüsyonları (*Labvision, antibodydiluent OP QUANTO (ThermoScientific, TA-125-ADQ)*) solüsyonu ile antikor üretici firmanın direktifleri doğrultusunda hazırlanmıştır. Boyama metodu aşağıdaki tabloda ayrıntılı olarak verilmiştir (Tablo 3.4).

### 3.3. ELISA

Deneklerden alınan karaciğer dokularında tissue growth factor-beta (TGF-β1) (*Transforming Growth Factor Beta1 ELISA Kit E-EL-R0084*) ve tumor necrosis factor-

alpha (TNF- $\alpha$ ) (*Tumor Necrosis Factor Alpha ELISA Kit, E-EL-R0019*) ELISA yöntemiyle analiz edildi. Deneklerden alınan karaciğer dokuları -80 °C'de saklandı. Analizi yapılmak üzere alınan dokuların homojenatları çıkarıldıktan sonra sitrat içermeyen tüplere alındı ve 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen serumlardan ELISA kitleri ile serum TGF- $\beta$  ve TNF- $\alpha$  seviyeleri belirlendi. Sıçan elisa kit protokolüne göre testler yapıldı. Kitten çıkan bütün ürünler kullanmadan önce 30 dakika oda ısısında tutuldu. Kitten çıkan 15 ml yıkama solüsyonu distile su ile 300 ml'ye tamamlanarak yıkama solüsyonu hazırlandı. Her bir kuyucuğa 50  $\mu$ l standart veya örneklerin serumları eklendi. Kör kuyucuk hariç diğerlerine 50  $\mu$ l HRP konjugatı ve 50  $\mu$ l antikor eklenerek 37 °C'de bir saat inkübe edildi. Daha sonra plate alınarak otomatik washing cihazında yıkama solüsyonu ile üç kez yıkandı. Kuyucuklara 50  $\mu$ l substrat A ve B eklendi. Karıştırılıp 37 °C 15 dakika inkübe edildi. Daha sonra 50  $\mu$ l sonlandırma solüsyonu eklendi ve 450 nm mikroplate'de okutuldu.

**Tablo 3.4.** İmmünohistokimya boyama tekniği

1	Etiv (60 °C)	1 saat
2	Ksilen I	5 dakika
3	Ksilen II	5 dakika
4	Ksilen III	5 dakika
5	Absolü Alkol	10 dakika
6	%96 Alkol	10 dakika
7	%80 Alkol	10 dakika
8	%70 Alkol	10 dakika
9	Distile Su	3 kez yıka
10	%5 SitratBuffer	10-20 dakika
11	PBS	2x5 dakika
12	%3 H2O2	5 dakika
13	PBS	3x5 dakika
14	Normal Serum	20 dakika (sıcak uygulama)
15	Primer Antikor	Bir gece +4 derecede sonra 20 dakika sıcak uygulama
16	PBS	3x5 dakika
17	Sekonder Antikor	30 dakika (sıcak uygulama)
18	PBS	3x5 dakika
19	StreptavidinHorseRadishPeroxidaz	10 dakika (sıcak uygulama)
20	PBS	3x5 dakika

21	Kromojen	DAB (3-5 dakika) (sıcak uygulama)
22	Distile su	Yıka
23	Hematoksilen	3-4 dakika
24	Musluk suyu	5 dakika
25	Distile su	Yıka
26	%70 Alkol	5 dakika
27	%80 Alkol	5 dakika
28	%96 Alkol	5 dakika
29	Absolü Alkol	5 dakika
30	Ksilen I	5 dakika
31	Ksilen II	5 dakika
32	Ksilen III	5 dakika
33	Kapatma	

### 3.4. BİYOKİMYASAL ANALİZ

Biyokimyasal analizler denekler anestezi maddeleri ile uyutulduktan sonra sırt üstü yatırıldı ve karın ön duvarından V harfi şeklinde kesi yapılarak karın boşluğuna girildi. Hayvanların iç organları sola doğru alınarak abdominal vena cava inferior'dan enjektör yardımıyla kan alındı ve kan serumunda Alanin Amino transferaz (ALT), Aspartat amino transferaz (AST) ve Alkalen fosfataz (ALP) değerleri Erciyes Üniversitesi Merkez Biyokimya Laboratuvarında hizmet alımı yapılarak analiz edildi.

### 3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Tüm istatistiksel analizler SPSS.22 Analitik programında yapıldı. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak belirlendi. Sonuçlar ANOVA yöntemiyle değerlendirildi. *Post hoc* analiz için Tukey Testi kullanıldı. İstatistiksel analiz  $p < 0.05$  olarak değerlendirildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Histolojik Bulgular

Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu boyamalarının hepsinde vena sentralisten ışınsal bir şekilde organize olmuş düzenli hepatosit hücre kordonları gözlemlendi. Sinüzoidler ise hücre kordonlarının arasında düzenli bir şekilde gözlenirken, portal alanlar düzenli bir yerleşime sahipti. Hepatosit hücre çekirdeklerinin nukleolusları belirgin olacak şekilde gözlemlendi (Şekil 4.1.A). PAS boyama sonrası hepatositlerin kuvvetli PAS+ reaksiyon verdiği gözlemlendi (Şekil 4.2.A).

Mel grubuna ait karaciğer dokularının genelinde normal karaciğer dokusuna benzer yapılanmalar gözlemlendi (Şekil 4.1.B). Hepatositlerdeki PAS+ reaksiyonu kontrol grubuyla kıyaslandığında aynı oranlarda olduğu belirlendi (Şekil 4.2.B).

TAA grubuna ait karaciğer dokularının genelinde klasik lobül yapılanmasında küçülme izlendi. Merkezde bulunan vena sentralisten ışınsal uzanan hücre kordonlarında bozulma, sinüzoidlerde daralma gözlemlendi. Bazı vena sentralislerin çevresinde bağ dokusu artışı gözlenirken, çoğunlukla portal alanların bulunduğu bölgelerde yoğun bir bağ dokusu artışı vardı. Tüm deneklere ait karaciğer dokularının genelinde öbekler halinde bağ dokusu yapıları bulunmaktaydı. Bağ dokusu yoğunluğu bulunan bölgelerde yoğun lökosit infiltrasyonu gözlemlendi. Üstelik bu bağ dokusu alanlarında birbirinden ayrılmış daha asidofil boyanan hepatositlerde dikkat çekiciydi. Klasik lobül yapılanmasını oluşturan hücrelerin bazılarında yoğun asidofil gözlemlendi. Ayrıca vena sentralis yakınlarında bulunan bazı hepatositlerde mikroveziküler yağlanma da gözlemlendi (Şekil 4.1.C). Ayrıca kontrol grubuna ait preparatlarla kıyaslandığında hepatositlerdeki PAS+ boyanma yoğunluğu neredeyse hiç gözlenmezken, bağ dokusu artışı bulunan bölgelerde daha kuvvetli bir PAS+ reaksiyonu söz konusuydu (Şekil 4.2.C).

Mel+TAA grubuna ait karaciğer dokuları incelendiğinde TAA grubuna ait karaciğer dokularına benzerlik gösterdiği belirlendi. Portal alanlarda oluşan artmış bağ dokusu artışı bu grupta da devam ederken bazı alanlar kıyaslandığında bağ dokusunda bir miktar azalma olduğu gözlemlendi. Fakat bu azalma önemli bir farklılık derecesine sahip değildi (Şekil 4.1.D). Fakat PAS boyanmış preparatlar incelendiğinde kontrol grubuna göre PAS+ reaksiyon veren hepatosit sayısı önemli miktarda azalırken, TAA grubu ile kıyaslandığında bir miktar artış olduğu belirlendi (Şekil 4.2.D).

TAA+Mel grubuna ait karaciğer dokuları incelendiğinde, TAA ve Mel+TAA grubuna kıyasla portal alanlardaki bağ dokusunda önemli miktarda azalma belirlendi. Bunun yanı sıra hepatosit dizilimi ve sinüzoidlerde de daha uyumlu bir görünüm izlendi (Şekil 4.1.E). Ayrıca PAS+ reaksiyon veren hepatosit hücre sayısında da artış gözlemlendi. Bu artış TAA ve Mel+TAA grubuna kıyasla daha belirgindi (Şekil 4.2.E). Histolojik değerlendirmelere ait bulgular aşağıdaki tabloda da ayrıntılı şekilde verilmektedir (Tablo 3.5.). Değerlendirme negatif (-), hafif (+), orta (++) ve yoğun (+++) derecede olacak şekilde yapılmıştır.

**Tablo.4.1.** Gruplar arasındaki karaciğer skorlaması.

	Kontrol	TAA	Mel	Mel+TAA	TAA+Mel
<b>Hepatosit hücre dejenerasyonu</b>	-	++	-	+	+
<b>Steatozis</b>	-	-	-	-	-
<b>Lobüler infiltrasyon</b>	-	++	-	++	+
<b>Portal infiltrasyon</b>	-	+++	-	+++	++
<b>Glikojen depolanması</b>	+++	-	+++	+	+

## 4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular

TAA'in karaciğer dokusunda oluşturduğu hasar ve Mel'nin tedavi ve koruyucu etkisi ışık mikroskopik olarak incelendi. Karaciğer dokusu hücrelerinde meydana gelen hasar sonucu oluşan hücre ölümlerinden apoptoz, nekroz ve otofajiden hangisinin dokuda daha fazla bulunduğu belirlenmesi amacıyla, apoptotik hücre ölüm mekanizmasından efektör bir kaspaz olan kaspaz-3, nekroz hücre ölüm mekanizmasından RIP3, otofajik hücre ölüm mekanizmasından da LC3'ün dokudaki miktarları belirlendi. Elde edilen veriler aşağıdaki tabloda ayrıntılı olarak verilmiştir (Tablo 4.1.).

**Tablo.4.2.** Kaspaz-3, RIPK3 ve LC3 ait immunohistokimya sonuçları.

Grup	Kontrol	Mel	TAA	Mel+TAA	TAA+Mel	<i>p</i>
<b>Kaspaz-3</b>	34.44±13.04 <sup>a</sup>	41.60±7.31 <sup>b</sup>	43.76±5.95 <sup>b</sup>	44.68±15.07 <sup>b</sup>	44.17±5.42 <sup>b</sup>	0.001
<b>RIP3</b>	42.56±7.82 <sup>a</sup>	43.06±13.57 <sup>a</sup>	50.26±5.82 <sup>b</sup>	51.05±8.03 <sup>b</sup>	48.02±8.37 <sup>b</sup>	0.001
<b>LC3</b>	38.13±5.31 <sup>a</sup>	44.82±5.31 <sup>b</sup>	46.83±6.55 <sup>b</sup>	46.08±6.55 <sup>b</sup>	44.23±4.98 <sup>b</sup>	0.001

Veriler  $\pm$ standart sapma olarak gösterilmiştir.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edilmiştir. Aynı harfi içeren (a ve b) gruplar arasında anlamlı fark bulunmamaktadır.

Kaspaz-3; Kontrol grubu ile diğer gruplar arasında kaspaz-3 pozitif hücre sayısı yüzdelik olarak hesaplandığında istatistiksel olarak anlamlı olarak bir artış olduğu gözlemlendi. Bu artış Mel grubunda en yüksek seviyede olduğu belirlenmiş olup, diğer TAA, Mel+TAA ve TAA+Mel gruplarında azalma olmasına rağmen istatistiksel yönden anlamlı bir farklılık bulunmadı (Şekil 4.3). Kaspaz-3 pozitif hücreler çoğunlukla vena sentralis çevresinde bulunan ve yakın komşuluğunda olan hepatosit kordonlarında bulunurken, daha az miktarda da klasik lobül periferinde yer aldıkları gözlemlendi. Kaspaz-3 boyamasına ait negatif kontrol preparatında herhangi bir boyanma gözlenmedi (Şekil 4.3.F).

RIP3; Kontrol ve Mel grubunda pozitif hücre yüzdesi arasında anlamlı bir farklılık bulunmazken, diğer gruplar ile aralarında istatistiksel yönden anlamlı bir artış olduğu belirlendi. TAA, Mel+TAA ve TAA+Mel grupları arasında RIP3 pozitif hücre yüzdesinde istatistiksel olarak herhangi bir farklılık gözlenmedi (Şekil 4.4). RIP3 pozitif hücreler TAA, Mel+TAA ve TAA+Mel gruplarında klasik lobülü oluşturan hepatosit

dizilimin her yerinde dağınık olarak yerleştiği belirlendi. RIP3 boyamasına ait negatif kontrol preparatında herhangi bir boyanma gözlenmedi (şekil 4.4.F).

LC3; Kontrol grubuna ait pozitif hücre yüzdesi diğer gruplarla karşılaştırıldığında LC3 pozitif hücre yüzdesinin tüm gruplarda anlamlı derecede artmış olduğu belirlendi. Mel, TAA, Mel+TAA ve TAA+Mel gruplarına ait dokularda gözlenen LC3 pozitif alan yüzdesinde anlamlı bir farklılık gözlenmedi (şekil 4.5). LC3 pozitif hücreler TAA, Mel+TAA ve TAA+Mel gruplarında klasik lobülü oluşturan hepatosit dizilimin her yerinde dağınık olarak yerleştiği belirlendi. LC3 boyamasına ait negatif kontrol preparatında herhangi bir boyanma gözlenmedi (şekil 4.5.F).



## 4.2. ELISA Bulguları

Deney sonunda deneklerden alınan karaciğer dokularında TNF- $\alpha$  ve TGF- $\beta$  düzeyleri belirlendi. TNF- $\alpha$  düzeyi kontrol grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında sadece TAA+Mel grubunda anlamlı bir artış olduğu belirlendi. Ayrıca TAA+Mel grubu TGF- $\beta$  düzeyi, kontrol grubuna göre TAA grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi. TAA grubu ile diğer gruplar arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmedi (Tablo 4. 2).

**Tablo.4.3.** Tüm deney gruplarına ait karaciğer doku örneklerinde TNF- $\alpha$  ve TGF- $\beta$  düzeyleri verilmektedir. Değerler ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir.

Grup	Kontrol	Mel	TAA	Mel+TAA	TAA+Mel	<i>p</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	46.25 $\pm$ 10.84 <sup>ab</sup>	50.47 $\pm$ 13.80 <sup>ab</sup>	50.96 $\pm$ 22.78 <sup>ab</sup>	32.67 $\pm$ 10.07 <sup>a</sup>	70.62 $\pm$ 20.63 <sup>b</sup>	0.004
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	45.96 $\pm$ 9.90 <sup>a</sup>	39.56 $\pm$ 10.27 <sup>ab</sup>	24.02 $\pm$ 9.45 <sup>b</sup>	28.62 $\pm$ 15.15 <sup>ab</sup>	29.22 $\pm$ 19.72 <sup>ab</sup>	0.040

Veriler  $\pm$  standart sapma olarak gösterilmiştir.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edilmiştir. Aynı harfi içeren (a ve b) gruplar arasında anlamlı fark bulunmamaktadır.

### 4.3. Biyokimyasal Bulgular

Deney sonucu alınan kan serum örneklerinde AST, ALT ve ALP seviyeleri değerlendirildi. Kontrol grubu AST seviyesi Mel ve TAA+Mel grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu belirlendi. ALT seviyesi kontrol grubu Mel ve TAA+Mel grubuyla kıyaslandığında anlamlı bir artış olduğu belirlendi. ALP seviyesinde ise kontrol grubuna kıyasla Mel+TAA grubunda azalma olduğu belirlenirken, Mel grubu ile arasında anlamlı bir artış olduğu belirlendi (Tablo 4. 3).

**Tablo.4.4.** Tüm deney gruplarına ait serum AST, ALT ve ALP seviyeleri verilmektedir. Değerler ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir.

Grup	Kontrol	Mel	TAA	Mel+TAA	TAA+Mel	<i>p</i>
AST	150.14 $\pm$ 61.65 <sup>a</sup>	4853.42 $\pm$ 3692.94 <sup>b</sup>	1478.40 $\pm$ 535.42 <sup>ab</sup>	84.42 $\pm$ 17.32 <sup>a</sup>	5645.50 $\pm$ 4436.86 <sup>b</sup>	0.001
ALT	73,14 $\pm$ 13.50 <sup>a</sup>	3117.00 $\pm$ 1187.11 <sup>b</sup>	903.60 $\pm$ 176.36 <sup>a</sup>	51.42 $\pm$ 6.37 <sup>a</sup>	4480.66 $\pm$ 2180.70 <sup>b</sup>	0.001
ALP	260.71 $\pm$ 54.08 <sup>ab</sup>	342.71 $\pm$ 71.63 <sup>a</sup>	250.60 $\pm$ 67.25 <sup>a</sup> <sup>b</sup>	205.14 $\pm$ 47.86 <sup>b</sup>	299.16 $\pm$ 72.06 <sup>ab</sup>	0.005

Veriler  $\pm$  standart sapma olarak gösterilmiştir.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edilmiştir. Aynı harfi içeren (a ve b) gruplar arasında anlamlı fark bulunmamaktadır.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Karaciğer; vücudun savunması, besinlerin işlenmesi, lipid ve protein metabolizması, bilirubinin uzaklaştırılması, safra yapımı, glikojenin depo edilmesi, üre sentezi, kan yapımı, kanın filtrasyonu, zehirli maddelerin ve ilaçların detoksifiye edilmesi gibi pek çok önemli görevleri olan hayati bir organdır. Bu durumda karaciğerin çevre kirliliği etkenlerine, toksik maddelere, kemoterapotik ajanlara maruz kalması kaçınılmazdır. Bu durumda da karaciğer rejenerasyon yeteneği sayesinde bu ajanların verdiği hasarları onarmaya çalışır (Wang ve ark., 2005). Karaciğerin kendini yenileme mekanizması yıkıcı ajanların etkilerini yeterli şekilde ortadan kaldıramazsa karaciğerin normal yapısı bozulmaya başlar. Ekstrasellüler matriks proteinleri ve kollajen “Disse aralığı”nda birikmeye başlayarak bağ dokusu artışına sebebiyet verebilir (Wang ve ark., 2005). Vücuda giren toksik ajanların metabolize edilememesi sonucu hücrelerde oluşan serbest radikaller karaciğer hasarına sebebiyet verir (Naziroğlu ve ark., 1999). Karaciğerde oluşan hasar erken dönemde kendi kendini onarabilir fakat ilk evrelerde belirlenip tedavi başlatılmazsa fibrozis, hatta takiben siroza kadar uzanan geridönüşümsüz hasar söz konusu olabilmektedir. Bu sebeptendir ki karaciğer üzerine koruyucu ve tedavi edici etkileri olan maddeler halen araştırılıp üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Bu sebeplerden biri de karaciğerin tedavisi için kullanılan ilaçların yetersizliği ve ilaçların yan etkileridir (Özbek ve ark., 2004). Bu bilgiler göz önünde bulundurularak, bu çalışmada da bir toksik ajan olan TAA ile oksidatif hasar oluşturulması, melatoninin de bu hasar karşısında koruyucu ve tedavi edici etkisinin araştırması amaçlanmıştır.

TAA fungusit olarak, kauçuk maddesinin vulkanizasyon işleminin hızlandırılmasında, organik çözücülerde, kağıt, deri, tekstil sanayisinde ve motor yağı stabilizasyonunda da kullanılır. TAA'in hipotoksitesi ilk olarak 1948 yılında Fitzhug ve Nelson tarafından bildirilmiş olup TAA'in tek doz ile hayvanlarda sentralobüler biçimde nekroz

oluşturduğu ve yanıt olarak da hücresel bir yenilenmenin gerçekleştiği gösterilmiştir (Mangipudy ark., 1995; Okuyama ark., 2003). TAA'in düzenli bir şekilde kullanımı ise karaciğerde siroza ve kanser oluşumuna sebebiyet vermektedir (Low ark., 2004; Moreira ark., 1995; Natarajan ark., 2006). TAA ile indüklenmiş karaciğer hasarında oksidatif stresin önemli bir rolü olduğu belirtilmiş fakat TAA indüklü hasarda oksidatif stres mekanizması hala açıklanamamıştır. Ancak taurin, Butea monosperma özütü, melatonin gibi antioksidanların TAA ile indüklenmiş hasarlara karşı koruyucu etkileri rapor edilmiştir (Bruck ark., 1999; Abbasoğlu ark., 2001; Sanz ark., 2002; Cruz ark., 2005; Sehravat ark., 2006; Tunez ark., 2005). Daha önce tanımlanan akut karaciğer hasarlı sıçan modellerinde TAA, fulminan karaciğer yetmezliğini indüklemek için intra peritoneal olarak uygulanmış ve yüksek bir ölüm oranına neden olmuştur (Shapiro ark., 2006; Belanger ark., 2005). Bu çalışmada da TAA, Mel+TAA ve TAA+Mel gruplarında TAA enjeksiyonu deneklerden bir kaçının ölümüne neden olmuştur. Bu nedenle yeniden hayvan alımı gerçekleştirilerek grup sayısı tamamlanmıştır. Bir çalışmada, tek doz TAA ile birlikte karnosin uygulamasından 24 saat sonra sakrifiye edilen sıçanların TAA grubunda hepatosit dejenerasyonu, hepatositlerin sentralobüler nekrozu, inflamatuvar hücre infiltrasyonu olduğu, AST ve ALT değerlerinde anlamlı bir artış olduğu gözlenmiştir. Bu değişikliklerin karnosin ve TAA ile tedavi edilen sıçanların karaciğer dokularında neredeyse yok olduğu gözlenmiştir (Mehmetçik ve ark., 2008). Saleh ve arkadaşları (2014) yaptıkları çalışmada tiyoasetamid ile indüklenen karaciğer hasarı üzerindeki bir fitoöstrojen olan genisteinin (GEN) sıçanlarda olası koruyucu etkilerini incelediklerinde, TAA kaynaklı karaciğer hasarının, karaciğer biyobelirteçleri, oksidatif stres belirteçleri ve karaciğer enflamatuvar sitokinlerinin serum seviyelerinde büyük değişiklikler ortaya çıkardığı gözlenmiştir. Sıçanlarda TAA kaynaklı karaciğer hasarının tedavisinde AST, ALT, total ve direkt bilirubinin serum seviyelerini düşürdüğü, albümin serum seviyesini arttırdığı, karaciğer hasarını azalttığı ve bu hepatoprotektif rolün, anti-enflamatuvar ve antioksidan özelliklerine atfedildiği sonucuna varılabileceğini bildirilmişlerdir. Çalışmamızda kontrol ve Mel grubuna ait karaciğer doku örneklerinde herhangi bir anormalliğe rastlanmamış olup, doku ve hücre bütünlüğü yapısının devam ettiği gözlemlendi. TAA uygulanan gruba ait karaciğer doku örneklerinde hepatosit dejenerasyonu, klasik lobül yapılanmasının periferinde ve çoğunlukla portal alan bölgelerinde artmış bağ dokusu ve hücre infiltrasyonu olduğu gözlenmiştir. Bağ dokusu artışı klasik lobül yapılarının periferinde kalan hepatositlerde

değişikliğe neden olduğu, bu bağ dokusu artışında kalan hepatositlerin daha asidofilik boyandığı gözlemlendi. Yukarıda bahsedildiği üzere yapılan çalışmalarda olduğu gibi çalışmamızda da AST, ALT ve ALP değerlerinde önemli derecede artış söz konusuydu. Sadece histolojik bulgularla kıyaslandığında Mel'nin tedavi edici etkisinin histolojik olarak koruyucu etkisinden dokuda daha fazla düzelme olduğunu gözlemlerken, biyokimyasal analizlerde AST, ALT değerlerinin Mel+TAA grubunda kontrole daha yakın bir sonuç elde ettik. TAA+Mel grubunda ise histolojik düzelmeye paralel bir AST, ALT sonucuna rastlanmadı. Bu çalışmada hem koruyucu hem de tedavi edici etkisinin araştırılması üzerine melatonin tercih edilmiştir.

Melatonin in vitro ve in vivo çalışmalar ile hücre koruyucu ve antioksidan etkiye sahip bir hormon olup Melatoninin kanser ve yaşlanma karşıtı olabileceği de öne sürülmektedir (Shulman ve ark., 2000). Melatonin sentezlendikten sonra pineal bezden direkt dolaşıma verilir. Lipofilik özellikte olduğu için hücrelerin bütün bölümlerine ulaşabilen melatonin için sitozolik bölgeler ve nükleer bağlanma bölgeleri tanımlanmıştır (Lemieux ve ark., 2000). Bu şekilde melatonin; çekirdeği, organelleri ve hücre zarını etkili bir şekilde serbest radikallerin hasarlarına karşı koruyabilmektedir. Melatonin hücre membranına temas edince, fosfolipid tabakanın dış yüzeyine tutunarak serbest radikaller ile membrandan önce temasa geçer ve onları detoksifiye ederek membranı korur. Melatoninin çekirdeğe kadar ulaşabilmesi ve DNA'nın oksidatif hasara karşı korunmasını sağlaması melatonine ayrı bir üstünlük sağlamaktadır (Lemieux ve ark., 2000; Kozirog ve ark., 2011). Yapılan çeşitli çalışmalarda melatoninin oksidatif karaciğer hasarına karşı da etkili olduğuna işaret edilmiştir. Melatoninin karbon tetraklorür uygulanan farelerde karaciğer lipid peroksidasyonunu azalttığı gösterilmiştir. Alkol kaynaklı karaciğer hasarında oksidatif stresi, inflamatuvar yanıtı ve apoptozisi de azalttığı yönünde bulgular bildirilmektedir (Tran ve ark., 2009).

Ohta ve arkadaşları (2000) Melatoninin tedavi edici etkisini araştırmak için karbontetraklorür kullanarak oluşturdukları karaciğer hasarında ciddi bir şekilde iyileşme olduğu sonucuna varmışlardır. Başka bir çalışmada formaldehit indüklü karaciğer hasarı üzerine yaptıkları çalışmada toksik grupta portal alanda bulunan hepatositler PAS- iken melatonin uygulanan grupta tüm alanda PAS+ boyanma görülmüştür (Le ve Tappy, 2006). Bizim çalışmamızda ise kontrol ve Mel grubunda PAS boyama sonrası hepatositlerin kuvvetli PAS+ reaksiyon verdiği gözlemlendi. TAA

grubu kontrol grubuna ait preparatlarla kıyaslandığında hepatositlerdeki PAS+ boyanma yoğunluğu neredeyse hiç gözlenmezken, bağ dokusu artışı bulunan bölgelerde daha kuvvetli bir PAS+ reaksiyonu söz konusuydu. Mel+TAA grubunda PAS+ reaksiyon veren hücre sayısı azalmıştı, fakat TAA grubuna kıyasla sayılabilecek ölçüde PAS+ reaksiyon veren hücreler gözlendi. TAA+Mel grubunda ise PAS+ reaksiyon veren hepatosit hücre sayısında da artış gözlendi. Bu artış TAA ve Mel+TAA grubuna kıyasla daha belirgindi. PAS boyama sonuçlarına göre TAA'in önemli ölçüde karaciğer glikojen depolamasını etkilediği Mel'nin ise bu durumu az miktarda da olsa düzelttiği sonucuna varılmıştır. Bir çalışmada sıçanlara 12 hafta boyunca TAA, başka bir gruba ise günlük 4 hafta boyunca melatonin uyguladıktan sonra takip eden 12 hafta boyunca TAA uygulamışlardır. Serum analizlerinin sonuçları, TAA uygulanan grupta AST, ALT ve ALP'nin etkinliği, melatonin+tioasetamid alan grupla karşılaştırıldığında daha yüksek olduğunu göstermiştir. Melatoninin proinflamatuvar sitokinlerin konsantrasyonu üzerindeki etkisine ilişkin immünoenzimatik bulgular bu verileri doğrulamıştır. Karaciğer homojenatlarındaki biyokimyasal incelemelerde melatonin alan TAA indüklü karaciğer hasarı bulunan hayvanlarda istatistiksel olarak anlamlı iyileşme olduğu görülmüştür (Czechowska ve ark., 2015).

Bizim çalışmamızda Mel hem TAA öncesi hem de TAA sonrası uygulanarak hasara karşı koruyucu ve tedavi edici etkisinin hepatosellüler ölüm mekanizmalarının da incelenmesiyle ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. Sonuçlarımıza göre Mel TAA uygulaması öncesinde dokuda histolojik olarak az miktarda iyileşme sağladığı sonucuna varılırken, TAA uygulaması sonrası dokuda oluşan hasarı önemli ölçüde azalttığı sonucuna varılmıştır. Doku klasik lobül yapılanması, TAA tarafından önemli ölçüde hasar görmüş, dokuda ciddi bağ dokusu oluşumu gözlenmiştir. Hepatosit hücre yapısında ve hücre kordonlarında dağılmalar, sinüzoid yapılanmasında bozulmalar izlenmiştir. TAA öncesi verilen Mel'nin dokuda bu yapılanmanın bozulmasına sınırlı oranda engel olduğu sonucuna varılmıştır. Fakat TAA sonrası uygulanan Mel'nin ise dokuda oluşmuş bağ dokusunda azalma sağladığı, hücre yapısında ve kordon oluşumunda ise düzelmelere neden olduğu gözlenmiştir. Bu şekilde bu çalışmada Mel'nin koruyucu etkisinden ziyade tedavi edici etkisinin daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Çalışmamızda dokudaki hasar, koruma ve tedavi etme sürecinin yanı sıra hem TAA'in hem de Mel'nin hepatosellüler ölüm mekanizmalarını nasıl etkilediği de değerlendirilmeye alınmıştır. Yapılan immünohistokimya boyama sonucunda apoptoz

hücre ölüm mekanizmasında bir belirteç olan kaspaz-3, nekroz belirteci olarak RIP3 ve otofaji belirteci olarak da LC3 proteinleri tercih edilerek dokudaki pozitif hücre oranları hesaplanmıştır. Çalışmamızda kaspaz-3 boyama sonucu dokuda kontrol grubu ile kıyaslandığında diğer grupların tamamında kaspaz-3 pozitif hücre yüzdesinde artış olduğu tespit edilmiştir. Diğer gruplar kendi aralarında kıyaslandığında istatistiksel yönden herhangi bir farklılık olmadığı sonucuna varılmıştır. Yapılan bir çalışmada TAA ile indüklenmiş hepatosellüler karsinoma üzerine D vitamini etkisi araştırılmış ve TAA'in dokuda TGF- $\beta$  seviyesinde azalma, uygulanan tedavinin ise kaspaz-3 seviyesinde artışa neden olduğu gözlenmiştir (Ebrahim ve ark., 2018). Başka bir çalışmada da TAA ile indüklenen karaciğer hasarında silostazolun etkisi araştırılmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre TAA uygulanan grupta TNF- $\alpha$  ve kaspaz-3 seviyesinde bir artış olduğu, silostazolünde bunu önemli derecede azalttığı sonucuna varılmıştır (El Awdan ve ark., 2018). Bizim çalışmamızda da bu sonuçlara benzer yönde TAA kaspaz-3 oranında artışa neden olurken, TGF- $\beta$  seviyesinde azalmaya neden olduğu belirlendi. Ayrıca TNF- $\alpha$  seviyesinde Mel+TAA grubunda azalma, TAA+Mel grubunda ise de bir artış olduğu belirlendi. Çalışmada kullanılan tek doz Mel (10 mg/kg)'nin hem TNF- $\alpha$  hem de TGF- $\beta$  seviyelerinin düzenlenmesinde kısmi derecede düzelmeye sağladığı kanısına varıldı. TAA ile indüklenmiş karaciğer hasarı oluşturulan başka bir çalışmada ise sonuçlarımıza benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre AST, ALT, TNF- $\alpha$  ve TGF- $\beta$  ve kaspaz-3 seviyelerinde artış olduğu gözlenmiştir. Fakat bu çalışmada koruyucu olarak kullanılan mesalazin dokuda ve yukarıda bahsi geçen parametrelerde düzelmeye sebep olmuştur (Ramadan ve ark., 2018).

Nekroz belirteci olarak kullandığımız RIP3 belirtecinin ifadesi dikkate alındığında kontrol ve Mel grubunda pozitif hücre yüzdesi arasında anlamlı bir farklılık bulunmadığı gözlenmiştir. Fakat TAA, Mel+TAA ve TAA+Mel grupları kontrol grubu ile kıyaslandığında bir artış olduğu ve bu artışın istatistiksel yönden anlamlı olduğu tespit edildi. TAA+Mel grubunda bir miktar RIP3 pozitif hücre yüzdesinde azalma gözlemlendi fakat bu azalma istatistiksel yönden anlamlı bulunmadı. Cruz ve arkadaşları (2005) ratlar üzerinde TAA ile indükledikleri karaciğer hasarı çalışmalarında hayvanları gruplara ayırarak bir gruba 1 ay boyunca TAA, başka bir gruba 3 ay boyunca TAA, başka bir gruba da 1 ay melatonin ve TAA' birlikte, diğer gruba ise TAA ve melatonin hayvanlara 3 ay boyunca uygulamışlardır. H&E boyamalarda TAA uygulanan ratlarda gözle görülür derecede hasar oluşumu bildirmişlerdir. TAA uygulanan hayvanlarda

melatonin uygulanan hayvanlara kıyasla anlamlı derecede apoptozis ve nekrozis artışı olduğu ve melatonin uygulamasının bu artışı anlamlı derecede azalttığı, melatoninin koruyucu etkisi olduğu bildirilmiştir. Bir çalışmada, CCl<sub>4</sub> indüklü karaciğer hasarı üzerinde *Dioscorea nipponica* bitkisinin etkilerini araştırmak için kullandığı parametrelerden olan apoptozisin CCl<sub>4</sub> verilen gruplarda diğer gruplara kıyasla anlamlı bir derecede arttığı gözlenmiştir (Yu ve ark., 2014). Zhao ve arkadaşları (2012) asetoaminofenin karaciğerdeki hasarını değerlendirmek için apoptozis seviyesine baktıklarında asetoaminofenin verildiği gruplarda kontrol grubuna kıyasla apoptotik indeks oranının anlamlı şekilde arttığını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da bu çalışmaya paralel olarak hem kaspaz-3 hem de RIP3 belirteci taşıyan hücre yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir. Yapılan bir çalışmada TAA ile karaciğer hasarı oluşturularak demirin koruyucu etkinliğine bakılmıştır. Ayrıca hücre ölüm mekanizma belirteçleri western blot yöntemiyle belirlenmiş, kaspaz-3 ve RIP3 ekspresyonları incelenmesi sonucu TAA grubunda kaspaz-3 ve RIP3 proteinlerinde azalma olduğu demir uygulamasının kaspaz-3 seviyesini bir miktar düşürdüğü RIP3 seviyesini ise bir miktar artırdığı gözlenmiştir (Atarashi ve ark., 2018).

Melatoninin bir takım akut karaciğer hasarlarında (Chen ve ark., 2003) safra kanalı ligasyonu (Montilla ark., 2001; Padillo ark., 2004) ve toksisiteye (Jahovic ark., 2003; Bruck ark., 2004; Sener ark., 2003) karşı koruyucu etkileri bildirilmiştir. Bunlara ek olarak melatoninin deneysel akut pankreatitiste (Jaworek ve ark., 2003) ve nefrotoksistide de (Jahovic ark., 2003) koruyucu etkisi olduğu bildirilmiştir. Gu ve arkadaşlarının (Gu ve ark., 2006) çalışmasında hepatikstellat hücre kültürü ile melatoninin hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile oluşturulan hasar üzerine tedavi edici etkisini incelemiş ve kayda değer şekilde iyileşme olduğunu bildirmişlerdir.

Fuentes-Broto ve arkadaşları (2010), melatoninin hepatoprotektif rolünü TLC (Tauroolithocholicacid) ile indüklenen lipid ve protein oksidasyonu üzerinden, sıçan karaciğer homojenatlarında ve hepatik membranlarda araştırmışlardır. Lipid peroksidasyon ürünleri, malondialdehit ve 4-hidroksialkenal (MDA<sub>4</sub>-HDA), ve karbonil seviyeleri sırasıyla hepatik lipid ve proteinlerin oksidatif hasar indeksleri olarak ölçülmüştür. Bu çalışmada, TLC'nin indüklediği MDA<sub>4</sub>-HDA düzeylerindeki artış, hem karaciğer homojenatlarında hem de hepatik membranlarda melatonin tarafından inhibe edilmiştir. Melatonin ayrıca, membranlarda TLC'nin indüklediği

proteinlerin yapısal hasarına karşı koruyucu etkilere sahip olduğunu ve bu sonuçların indoleamin melatoninin, safra asidi toksisitesini içeren hastalıkların tedavisinde potansiyel olarak koruyucu bir madde olabileceğini bildirmişlerdir. Bizim bulgularımıza göre Mel'i koruyucu olarak verdiğimiz gruptaki hasar oranında tedavi edici gruba kıyasla histolojik olarak kısmi bir oranda etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Aksine, biyokimyasal analizlerde Mel'nin koruyucu olarak verildiği gruplarda daha pozitif yönde sonuçlar elde edilmiştir. Sonuçların bu şekilde olmasının nedenini deney süresinin kısalığından dolayı biyokimyasal iyileşmedeki düzelmelerin henüz morfolojiye yansımamasından kaynaklanabileceğinin sonucu çıkarılabilmektedir.

Kuramochi ve arkadaşları (2017) çalışmalarında TAA ile indüklenmiş sıçan karaciğeri hasarında TLR'lerin (Toll-likereceptors) ve MHC sınıf II'nin (major histocompatibility complex), DILI (Drug-induced liver injury-ilaç indüklü karaciğer hasarı) ve DAMPs (damage-associated molecular patterns-hasar ilişkili moleküler desenler) ile ilişkisini incelemişlerdir. İlk aşamada tek doz TAA verilen sıçanlarda sentralobüler nekroz, mononükleer hücre infiltrasyonu gözlenip paralel olarak AST, ALT ve ALP seviyelerinde de artış görülmüştür. İki gün sonra iki ve üç katına çıkarılarak TAA enjekte edilen sıçanlarda bu parametrelerin düştüğü gözlenmiş bu düşüşün otofajiden olabileceğinden şüphelenilirken otofaji ve T hücrelerinin regülasyonunun da kayda değer bir artış gözlenmemiştir. Kashima ve arkadaşları (2014) çalışmalarında steatotik karaciğer üzerinden otofajiden sorumlu p62 geni ve otofajimarkerı olarak tanımlanan bir otofagozom belirteci olarak belirtilen LC3 immünohistokimyasal olarak karşılaştırılmıştır. Normal karaciğerde p62, LC3'ün aksine zayıf bir boyanma göstermiştir. Hafif steatotik karaciğerde, LC3 ve p62, kısmen agregat benzeri bir görünüme sahip, benzer boyama sergilerken, ciddi derecede steatotik karaciğerde, p62 dikkat çekici derecede boyanmış iken, aksine LC3 boyanmasının çok daha az ve soluk olduğunu bildirmişlerdir. Farklı steatoz şiddeti olan karaciğerlerin LC3 immünohistokimyası, artan steatoz şiddeti ile LC3-pozitifliğinin azaldığını göstererek, bu sonucu artan steatozdan dolayı otofajinin azalması olarak yorumlamışlardır. Çalışmamızda otofajiye giden hücreleri belirlemek amacıyla LC3 proteini boyanmıştır. Bunun sonucunda kontrol ile kıyaslandığında diğer grupların tamamında LC3 pozitif hücre yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışın olduğu tespit edilmiştir. Otofajiye bağlı morfolojik değişikliklerin izlenmesi için LC3'ün ifadesi hayvanlarda ve hücre kültürlerinde kullanılmasına rağmen insan dokusunda LC3'ün

immünohistokimyasal analizinde başarılı olunamadığı çünkü LC3'ün aşırı ekspresyonunun imkansız olduğu bildirilmiştir (Martinet ve ark., 2006). Bu çalışmada ise kontrol grubu LC3 pozitif hücre yüzdesi diğer gruplarla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir artışın olduğu sonucuna varıldı. TAA verilen gruplarda artan LC3 pozitif hücre yüzdesi TAA+Mel grubunda bir miktar azalmış olsa da bu azalma istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmedi.

Sonuç olarak, çalışmada kullandığımız TAA karaciğer dokusunda önemli ölçüde hasar oluşturdu. Histolojik olarak incelendiğinde önemli ölçüde bağ dokusu oluşumu karaciğer dokusunun normal yapısının bozulduğunu gösterdi ve biyokimyasal olarak AST, ALT ve ALP, ayrıca TGF- $\beta$  ve TNF- $\alpha$  seviyelerindeki değişikliklere bu bozulmanın yansıdığı gözlemlendi. Mel ise dokuda koruyucu etkisinden ziyade tedavi edici ajan olarak daha etkili olduğu kanısına varıldı. Mel'nin koruyucu etkisinde ortaya çıkan biyokimyasal düzelmelerin histolojik görüntülere yansımamasını, deney süresinin kısalığından dolayı morfolojiye bu etkinin yansımadağı sonucu çıkarılabilmektedir. Karaciğer dokusu hücre ölümleri incelendiğinde TAA kaspaz-3, RIP3 ve LC3 pozitif hücre yüzdesinde artışa neden olarak hücrelerde apoptozun, nekrozun ve otofajinin her üçünün de kullanıldığını göstermektedir. Mel'nin deney süresinin kısalığına rağmen ortaya çıkardığı iyileştirici etkisi göz önünde bulundurularak, karaciğer bozukluklarına sebebiyet veren ajanlara karşı Mel'nin terapotik etkisinin olabileceği kanısına varılmıştır.

## 6.KAYNAKLAR

- Abbasoğlu S, Kanbağlı O, Balkan J, C, et al. The protective effect of taurine against thioacetamide hepatotoxicity of rats. *Human Exp Toxicol* 2001; 20: 23-7.
- Abdel-Wahab MH, Abd-Allah ARA. Possible protective effect of melatonin and/or desferrioxamine against streptozotocininduced hyperglycaemia in mice, *Pharmacological Research* 2001; 41: 533–537.
- Abul H, Mathew TC, Dashti HM, et al. Level of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and uric acid in thioacetamide-induced cirrhotic rats, *Anatomia, Histologia, Embryologia* 2002; 31: 66–71.
- Adams JM, Cory S. Life or death decions by the Bcl-2 family. *Trends. Biochem Sci* 2001; 26: 61-6.
- Adrain C, Martin SJ. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochromes. *Trends Biochem Sci* 2001; 26: 390-7.
- Al-Attar AM. Hepatoprotective influence of vitamin C on thioacetamide-induced liver cirrhosis in Wistar male rats, *Journal of Pharmacology and Toxicology*. 2011; 6 : 218–233.
- Allegra M, Reiter RJ, Tan DX, et al. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species, *Journal of Pineal Research* 2003; 34: 1–10.
- Alvarez A, Lacalle J, Canavate ML, et al. Cell death. A comprehensive approximation. *Necrosis. Microscopy: Science, Technology, Applications and Education* Formatex 2010; 1017-1025.
- Arslan G. Yüksek dozda Simvastatin`in ratlarda olusturdugu hepatotoksisite üzerine nasetilsistein` in etkisi. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, *Histoloji ve Embriyoloji Yüksek Lisans Tezi*, Konya 2008.
- Atarashi M, Izawa T, Mori M, et al. Dietary Iron Overload Abrogates Chemically-Induced Liver Cirrhosis in Rats. *Nutrients*. 2018; 2: 10-10.

- Baines CP. Role of the mitochondrion in programmed necrosis. *Front Physiol.* 2010; 29: 1-156.
- Barkla DH, Gibson PR. The fate of epithelial cells in the human large intestine. *Pathology*1999; 31: 230–8.
- Basımoğlu Koca Y. Sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan duktus koledok tıkanıklığı ve tıkanıklığın giderilmesi sonrası karacigerin histolojik yapısı, Doktora Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sivas 1996.
- Belanger M, Butterworth RF. Acute liver failure: a critical appraisal of available animal models. *Metab. Brain Dis.* 2005; 20: 409–423.
- Bellamy COC, Malcomson RDG, Harrison DJ, et al. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Seminar in Cancer Biol.* 1995; 6: 3-16.
- Blanch A, Liu H, Goodyer C. Caspase-6 role in apoptosis of human neurons, amyloidogenesis and Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 1999; 274: 23426-23436.
- Bruck R, Aeed H, Avni Y, et al. Melatonin inhibits nuclear factor kappa B activation and oxidative stress and protects against thioacetamide induced liver damage in rats. *J Hepatol* 2004; 40: 86–93.
- Bruck R, Aeed H, Shirin H, et al. The hydroxyl radical scavengers dimethylsulfoxide and dimethylthiourea protect rats against thioacetamideinduced hepatic failure. *J Hepatol* 1999; 31. 27-38.
- Chautan M, Chazal G, Cecconi F, et al. Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway. *Curr Biol* 1999; 9: 967–70.
- Chen JC, Ng CJ, Chiu TF, et al. Altered neutrophil apoptosis activity is reversed by melatonin in liver ischemia-reperfusion. *J Pineal Res* 2003; 34: 260–264.
- Coşkun, G, Özgür, H. Apoptoz ve Nekrozun Moleküler mekanizması. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, Adana 2014; 20: 145-158.
- Cruz A, Padillo FJ, Torres E, et al. Munoz-Castaneda JRM, Caballero FJ, et al. Melatonin prevents experimental liver cirrhosis induced by thioacetamide in rats. *J Pineal Res* 2005; 39: 143-50.
- Cruz A, Padillo FJ, Torres E, et al. Melatonin prevents experimental liver cirrhosis induced by thioacetamide in rats. *Journal of pineal research*, 2005; 39: 143-

150.

- Cuesta E, Boada J, Calafell R, et al. Fructose 1,6-bisphosphate prevented endotoxemia, macrophage activation and liver injury induced by D-galactosamine in rats, *Critical Care Medicine* 2006; 34: 807–814.
- Curtin JF, Cotter TG. Live and let die: regulatory mechanism in Fas mediated apoptosis. *Cell Signal* 2003; 15: 983-92.
- Czechowska G, Celinski K, Korolczuk A, et al. Protective effects of melatonin against thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. *J Physiol Pharmacol*, 2015; 66: 567-579.
- Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004; 116: 205-219.
- Devin A, Cook A, Lin Y, et al. The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. *Immunity* 2000; 12: 419–29.
- Ebrahim RA, El-Mesery M, El-Karef A, et al. D Vitamini, sıçanlarda hepatoselüler karsinomun indüklediği kaspaz-3 ve TGF-1 ekspresyonunu modüle ederek 5-flüorourasil anti-tümör aktivitesini kuvvetlendirir. *J Physiol Pharmacol*. 2018; 96: 1218-1225.
- El Awdan SA, Amin MM, Hassan A. Cilostazol attenuates indices of liver damage induced by thioacetamide in albino rats through regulating inflammatory cytokines and apoptotic biomarkers. *Eur J Pharmacol*. 2018; 822: 168-176.
- Ellis RE, Yuan J, Horvitz HR. Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. CellBiol*. 1991; 7: 663-698.
- Erdoğan BB. Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde fas-fasl bağımlı apoptozis. *Akciğer Arşivi*, 2003; 4: 165-174.
- Ergün Y, Ergün Y. Karaciğer sirozu ve Nitrik oksit Arşiv, 2009; 18:91-131.
- Esrefoglu M. Özel Histoloji, Medipres Matbaacılık Yayıncılık, Malatya, 2009; 106-120.
- Fawcett DW. Bloom and Fawcett A Textbook of Histology. Chapman and Hall, 1994; 652-677.
- Ford WCL. Biological mechanisms of male infertility. *The Lancet*. 2001; 357: 1223-1224.
- Franz TA, Kidson SH. Mapping of interdigital apoptosis in the chick and duck hindlimb. *Embryology*. 1997; 93: 85-94.

- Friedman SL. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis: mechanisms and treatment strategies, *New England Journal of Medicine* 1993; 328: 1828–1835.
- Fuentes-Broto L, Miana-Mena FJ, Piedrafita E, et al. Melatonin protects against taurothiocholic-induced oxidative stress in rat liver. *Journal of cellular biochemistry*, 2010; 110: 1219-1225.
- Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of pathology*, 2010; 221: 3-12.
- Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* 2007; 32: 37-43.
- Gu J, Zhuang L, Huang GC. Melatonin prevents H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced activation of rat hepatic stellate cells. *Journal of pineal research*, 2006; 41: 275-278.
- Guyot C, Lepreux S, Combe C, et al. Hepatic fibrosis and cirrhosis: the (myo) fibroblastic cell subpopulations involved, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2006; 38: 135–151.
- Hengartner MO, Ellis RE, Horvitz HR. *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* 1992; 356: 494-499.
- Hughes Fm, Gorospe WC. Biochemical identification of apoptosis in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology*. 1991; 129: 2415- 2422.
- Jahovic N, Cevik H, Sehirli AO, et al. Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. *J Pineal Res* 2003; 34: 282–287.
- Jaworek J, Leja-Szpak A, Bonior J, et al. Protective effect of melatonin and its precursor L-tryptophan on acute pancreatitis induced by caerulein overstimulation or ischemia/reperfusion. *J Pineal Res* 2003; 34: 40–52.
- Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. *Temel Histoloji*, 15, Aytekin Y, Barış Kitapçılık, İstanbul, 1998: 307-319.
- Kalaycı Ş. *Histoloji (1.baskı)*, Uludağ Üniversitesi Basımevi, Bursa, 1986: 72-361.
- Kannan K, Jain Sk. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology*. 2000; 7:153-163.
- Kashima J, Shintani-Ishida K, Nakajima M, et al. Immunohistochemical study of the autophagy marker microtubule-associated protein 1 light chain 3 in normal and steatotic human livers. *Hepatol. Res*. 2014; 44: 779–787.

- Kayalı H. Özel Histoloji (2. Baskı), Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul, 1992: 140-151.
- Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV, Apoptosis; its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, 1994; 73: 2013-2026.
- Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş. Ed: Demir R, Palme Yayıncılık, Ankara, 2006; 459-472.
- Kitada T, Seki S, Iwai S, et al. In situ detection of oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in chronic human liver disease, *Journal of Hepatology* 2001; 35: 613–618.
- Kozirog M, Poliwczak AR, Duchnowicz P, et al. Melatonin treatment improves blood pressure, lipid profile, and parameters of oxidative stress in patients with metabolic syndrome. *Journal of Pineal Research*, 2011; 50: 261-266.
- Kroemer G, Galluzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev.* 2007; 87: 99-163.
- Kroemer G, Marino G, Levine B. Autophagy and integrated stress response. *Mol Cell* 2010; 40: 280-293.
- Kuramochi M, Izawa T, Pervin M, et al. Attenuation of thioacetamide-induced hepatocellular injury by short-term repeated injections associated with down-regulation of metabolic enzymes and relationship with MHC class II-presenting cells. *Experimental and toxicologic pathology*, 2017; 69: 589-597.
- Kuran O. Sistematik Anatomi, Filiz Kitabevi, İstanbul, 1983: 429-443.
- Kuyucu Y. Sindirim Sistemi Anatomisi, Erzurum, 1980: 1-45.
- Le KA, Tappy L. Metabolic effects of fructose. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 2006; 9: 469-475.
- Lemieux I, Pascot A, Couillard C, et al. Hypertriglyceridemic waist: a marker of the atherogenic metabolic triad (hyperinsulinemia; hyperapolipoprotein B; small, dense LDL) in men *Circulation*, 2000; 102: 179–184.
- Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: Molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 2004; 6: 463–77.
- Lieber CS, Leo MA, Cao Q. Silymarin retards the progression of alcohol-induced hepatitis in baboons, *Journal of Clinical Gastroenterology* 2003; 37: 336–339.

- Low TY, Leow CK, Salto-Tellez M, et al. A proteomic analysis of thioacetamide-induced hepatotoxicity and cirrhosis in rat livers. *Proteomics* 2004; 4: 3960-3974.
- Makino H, Togo S, Kubota T, et al. A good model of hepatic failure after excessive hepatectomy in mice, *Journal of Surgical Research* 2005; 127: 171–176.
- Mangipudy RS, Chanda S, Mehendale HM, Tissue repair response as a function of dose in thioacetamide hepatotoxicity. *Environmental Health Perspectives* 1995; 103: 260-267.
- Marti A, Ritter PM, Jager R. Mouse mammary gland involution is associated with cytochrome-c release and caspase activation. *Mech Dev.* 2001; 104: 89-98.
- Martinet W, Meyer GRD, Andries L, et al. Detection of autophagy in tissue by standard immunohistochemistry: possibilities and limitations. *Autophagy* 2006; 2: 55-57.
- Mayhew TM, Myklebust R, Whybrow A, et al. Epithelial integrity, cell death and cell loss in mammalian small intestine. *Histol Histopathol* 1999; 14: 257–67.
- Mehmetçik G, Özdemirler G, Koçak-Toker N, Role of carnosine in preventing thioacetamide-induced liver injury in the rat. *Peptides*, 2008; 29: 425-429.
- Mercanlıgil SM. Karaciğer, safra kesesi ve pankreas hastalıklarında beslenme. *Diyet el kitabı*. Hatipoğlu Yayınları:116, Yükseköğretim Dizisi: 36, 5. Baskı , s. 179-213, Ankara.(2008).
- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 2008; 451: 1069-75.
- Montilla P, Cruz A, Padillo FJ, et al. Melatonin versus vitamin E as protective treatment against oxidative stress after extra-hepatic bile duct ligation in rats. *J Pineal Res* 2001; 31: 138–144.
- Moreira E, Fontana L, Periago JL, et al. Changes in fatty acid composition of plasma, liver microsomes, and erythrocytes in liver cirrhosis induced by oral intake of thioacetamide in rats. *Hepatology* 1995; 21: 199- 206.
- Mottillo S, Filion K, Genest J, et al. The Metabolic Syndrome and Cardiovascular Risk: A Systematic Review and Meta-analysis. *Journal of the American College of Cardiology*, 2010; 56: 1113-1132.

- Muller D, Sommer M, Kretzschmar M, et al. Lipid peroxidation in thioacetamide-induced macronodular cirrhosis, *Archives of Toxicology* 1991; 65: 199–203.
- Murdoch WJ, Wilken C, Young DA. Sequence of apoptosis and inflammatory necrosis within the formative ovulatory site of sheep follicles. *J Reprod Fertil* 1999; 117: 325–9.
- Naito M, Hasegawa G, Ebe Y, et al. Differentiation and function of Kupffer cells. *Med Electron Microsc* 2004; 37: 16-28.
- Natarajan SK, Thomas S, Ramamoorthy P, et al. Oxidative stress in the development of liver cirrhosis: a comparison of two different experimental models. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2006; 21: 947-957.
- Naziroğlu M, ay M, Üstündağ B, et al. Protective effect of vitamin E on carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. *Cell Biochemistry and Function* 1999; 17: 253-259.
- Nicotera P, Bernassola F, Melino G. Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene* 2004; 23: 2757-2765.
- Ohsumi Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 211-6.
- Ohta Y, Kongo M, Sasaki E, et al. Therapeutic effect of melatonin on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. *Journal of pineal research*, 2000; 28: 119-126.
- Okuyama H, Nakamuro H, Shimahara Y, et al. Overexpression of thioredoxin prevents acute hepatitis caused by thioacetamide or lipopolysaccharide in mice. *Hepatology* 2003; 37: 1015-1025.
- Özbek H, Uğraş S, Dülger H, et al. Karbon Tetraklorürle Oluşturulan Akut Karaciğer Toksisitesinde *Foeniculum Vulgare* (Rezene) Uçucu Yağının Hepatoprotektif Etkisi, 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, Eskişehir, 2004; 975: 2-8.
- Özbilim G, Gelen T, Cantürk Z, et al. Deneysel olarak oluşturulan karaciğer sirozunda ve normal karaciğer dokusunda immunohistokimyasal olarak İto hücrelerinin değerlendirilmesi. *Türk J Gastroenteral* 1998; 1: 5-9.
- Özdamar S, Sorkun H. Genel Embriyoloji, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, Kayseri, 2002: 2-28.

- Özdamar S. Sindirim Sistemi Histolojisi, Erciyes Üniversitesi Tıp fakültesi Yayınları, Kayseri, 2002:
- Padillo FJ, Cruz A, Navarrete C et al. Melatonin prevents oxidative stress and hepatocyte cell death induced by experimental cholestasis. *Free Radic Res* 2004; 38: 697–704.
- Pallottini V, Martini C, Bassi AM, et al. Rat HMGC<sub>o</sub>A reductase activation in thioacetamide-induced liver injury is related to an increased reactive oxygen species content, *Journal of Hepatology* 2006; 44: 368
- Pavanato A, Marroni N, Marroni CA, et al. Quercetin prevents oxidative stress in cirrhotic rats, *Digestive Diseases and Sciences* 2007; 52: 2616–2621.
- Peyrot F, Houee-Levin C, Ducrocq C. Melatonin nitrosation promoted by NO<sub>2</sub>: comparison with the peroxynitrite reaction, *Free Radical Research* 2006; 40: 910–920.
- Pinzani M, Rombouts K. Liver fibrosis: from the bench to clinical targets, *Digestive and Liver Disease* 2004; 36: 231–242.
- Rahman TM, Selden AC, Hodgson HJ. A novel model of acetaminophen-induced acute hepatic failure in rabbits, *Journal of Surgical Research* 2002; 106: 264–272.
- Ramadan A, Afifi N, Yassin NZ, et al. Mesalazine, an osteopontin inhibitor: The potential prophylactic and remedial roles in induced liver fibrosis in rats. *Chem Biol Interact.* 2018; 289: 109-118.
- Ramadori G, Moriconi F, Malik I, et al. Physiology and pathophysiology of liver inflammation, damage and repair. *Journal of physiology and pharmacology* 2008, 59: 107-117.
- Reiter RJ, Tan DX, Jou MJ, et al. Biogenic amines in the reduction of oxidative stress: melatonin and its metabolites, *Neuro Endocrinology Letters* 2008; 29: 391–398.
- Reiter RJ, Tan DX, Maldonado MD. Melatonin as an antioxidant: physiology versus pharmacology, *Journal of Pineal Research* 2005; 39: 215–216.
- Rekha RD, Amali AA, Her GM, et al. Thioacetamide accelerates steatohepatitis, cirrhosis and HCC by expressing HCV core protein in transgenic zebrafish *Danio rerio*, *Toxicology* 2008; 243: 11–22.

- Roach HI, Clarke NM. Physiological cell death of chondrocytes in vivo is not confined to apoptosis. New observations on the mammalian growth plate. *J Bone Joint Surg Br* 2000; 82: 601–13.
- Robert S, Gicquel T, Victoni T, et al. Involvement of matrix metalloproteinases (MMPs) and inflammasome pathway in molecular mechanisms of fibrosis. *Bioscience reports* 36. 4 2016: e00360.
- Roose MH, Romrell LJ, Kage GI. *Histology. A text and atlas*. Third edition, 1995; 496-507.
- Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. *Histology A Text and Atlas, Fourth Edition*, Lippincott Williams & Wilkins, USA, 2003: 532-548.
- Roth K J, Copple BL. Role of Hypoxia-Inducible Factors in the Development of Liver Fibrosis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2015;1: 589–597.
- Sadler TW. *Langman Medikal Embriyoloji (9.baskı)*, Basaklar AC. Palme Yayın, Ankara 2005: 288-294.
- Sage P, Lafon ME, Saric J, et al. Nerves and perisinusoidal cells human liver. *J Hepatol* 1990; 10: 105-12.
- Saleh DO, Abdel Jaleel GAR, El-Awdan SA, et al. Thioacetamide-induced liver injury: protective role of genistein. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 2014; 92: 965-973.
- Sanz N, Diez-Fernandez C, Andres D, et al. Hepatotoxicity and aging: endogenous antioxidant systems in hepatocytes from 2-, 6-, 12-, 18- and 30-month- old rats following a necrogenic dose of thioacetamide. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1587: 12-20.
- Schweichel JU, Merker HJ. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 1973; 7: 253–66.
- Sehrawat A, Khan TH, Prasad L, et al. *Butea monosperma* and chemomodulation: protective role against thioacetamide-mediated hepatic alterations in Wistar rats. *Phytomedicine* 2006; 13: 157-63.
- Sener G, Sehrlı AO, Ayanoglu-Dulger G. Protective effects of melatonin, vitamin E and N-acetylcysteine against acetaminophen toxicity in mice: a comparative study. *J Pineal Res* 2003; 35: 61–68.

- Shapiro H, Ashkenazi M, Weizman N, et al. Curcumin ameliorates acute thioacetamide- induced hepatotoxicity. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2006; 21: 358–366.
- Sharma HP, Jain P, Amit P. Apoptosis (programmed cell death A Review Laboratory of Biotechnology and Plant Physiology, 2016; 2277 – 7105.
- Sherlock S, Dooley J. Diseases of the Liver and Biliary System (11.baskı), Blackwell Science, Milan, 2002: 4-16.
- Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* 2004; 306: 990-5.
- Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 2000; 106: 171-176.
- Smaili S, Hsu Y, Youle RJ, et al. Mitochondria in Ca<sup>2+</sup> signaling and apoptosis. *J. Bioener and Biomem.* 2000; 32: 35-46.
- Snell SR. Snell Clinical Anatomy By Regions. Ninth Edition: 2012;196-9.
- Sonsuz A. Karaciğer sirozunun etyolojisi ve patogenezi. *Hepato-Bilier Sistem ve Pankreas Hastalıkları Sempozyum Dizisi* 2002; 28: 87-91.
- Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E, et al. Tissue distribution of the death ligand trail and its receptors. *J Histochem Cytochem* 2004; 52: 821-831.
- Stehbens WE. Oxidative stress, toxic hepatitis, and antioxidants with particular emphasis on zinc, *Experimental and Molecular Pathology* 2003; 75: 265–276.
- Tahan V, Ozaras R, Canbakan B, et al. Melatonin reduces dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats, *Journal of Pineal Research* 2004; 37: 78–84.
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, et al. Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation, *Free Radical Biology and Medicine* 2000; 29: 1177–1185.
- Taniguchi M, Takeuchi T, Nakatsuka R, et al. Molecular process in acute liver injury and regeneration induced by carbon tetrachloride, *Life Science* 2004; 75: 1539–1549.
- Tekelioğlu M. Özel Histoloji, (3.baskı), Antıp A.Ş. Yayınları, Ankara, 2002: 53-54.
- Terzi EH. Deneysel safra ligasyonuna bağlı oluşan karaciger fibrozisine n-asetil sistein, askorbik asit ve sirolimusun etkilerinin ışık, elektron mikroskopik,

- immunohistokimyasal ve biyokimyasal olarak incelenmesi. ABÜ Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Uzmanlık Tezi, Bolu 2008.
- Tran LT, Yuen VG, McNeill JH. The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2009; 332: 145-159.
- Tunez I, Munoz MC, Villavicencio MA, et al. Hepato- and neurotoxicity induced by thioacetamide: protective effects of melatonin and dimethylsulfoxide. *Pharmacol Res* 2005; 52: 223-8.
- Unur E, Ülger H, Ekinçi N. *Anatomi, Kuvülcüm Kitabevi, Kayseri*, 2009: 153-155.
- Vadi HV, Neal RA. Microsomal activation of thioacetamide-Soxide to a metabolite(s) that covalently binds to calf thymus DNA and other polynucleotides, *Chemico-Biological Interactions* 1981; 35: 25–38.
- Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell*. 1999; 96: 245-254.
- Vercammen D, Vandenabeele P, Beyaert R, et al. Tumour necrosis factor-induced necrosis versus anti-Fas-induced apoptosis in L929 cells. *Cytokine* 1997; 9: 801–8.
- Vollmar B, Menger MD. The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair. *Physiol Rev*. 2009; 89:1269-339.
- Wake K. Structure of the sinusoidal Wall in the liver, In: E, Wisse DL, Knook K, Wake (Ed). *Cells of the Hepatic Sinusoid*. Leiden: Kupffer Cell Foundation, 1995: 241-246.
- Wang H, Weit W, Wang NP, et al. Melatonin Ameliorates Carbon Tetrachloride-Induced Hepatic Fibrogenesis In Rats Via Inhibition Of Oxidative stres. *Life Sciences* 2005; 77: 1902–1915.
- Winiarska K, Fraczyk T, Malinska D, et al. Melatonin attenuates diabetes-induced oxidative stress in rabbits, *Journal of Pineal Research* 2006; 40: 168–176.
- World health organization statistical data (2003) Erişim: <http://www.who.gov.tr>, Erişim tarihi: şubat 2018.
- Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptaion. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 1102-9.
- Yu H, Zheng L, Yin L, et al. Protective Effects of The Total Saponins From *Dioscorea Nipponica* Makino Against Carbon Tetrachloride-Induced Liver

Injury in Mice Through Suppression of Apoptosis and Inflammation, *International Immunopharmacology*, 2014; 19: 233-244.

Zhao X, Cong X, Zheng L, et al. Dioscin, A Natural Steroid Saponin, Shows Remarkable Protective Effect Against Acetaminophen-Induced Liver Damage in Vitro and in Vivo, *Toxicology Letters*, 2012; 214: 69-80.

Zong WX, Thompson CB. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev.* 2006; 20: 1-15.





T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU  
(EÜHADYEK)



Tarih: 15.08.2018

Toplantı Sayısı: 07

Karar No:18/105

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 15.08.2018 tarihinde Prof. Dr. Fahri OĞUZKAYA 'nın başkanlığında toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Ünvanı	Bölümü	İmza
Fahri OĞUZKAYA	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Coşkun TEZ	Prof. Dr.	Fen Fakültesi	
Gültekin ATALAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi	
Fusun Ferda ERDOĞAN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Serpil SARIÖZKAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi	KATILMADI
Yusuf KONCA	Prof. Dr.	Ziraat Fakültesi	KATILMADI
Ahmet ÖZTÜRK	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Zühal HAMURCU	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi	KATILMADI
M. Betül AYCAN	Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi	
Sezer DEMİRBUĞA	Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi	
Nalan Hakime NOĞAY	Doç. Dr.	Sağlık Bilimleri Fakültesi	KATILMADI
Çağrı Çağlar SİNMEZ	Yard.Doç. Dr.	Veteriner Fakültesi	
Burcu ÜNLÜ ENDİRLİK	Yard.Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi	
Zeynep SOYER SARICA	Dr.	Deneyel Araştırmalar Uygulama ve Arş.Mrkz.	
Özge AL	Arş. Gör. Dr.	Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK)	
Ali KOÇ	Kurumla İlişkisi Olmayan Üye	Sivil Üye	
Mehmet TAV	Dernek Üyesi (Avukat)	Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi	KATILMADI

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A.D.'dan Dr. Öğr. Üyesi Derya KARABULUT tarafından sunulan "Tiyoasetamid İle İndüklenmiş Akut Karaciğer Hasarında Hepatosellüler Hücre Ölümü Üzerine Melatoninin Etkisi" başlıklı proje incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verildi.

Tarih

: 15.08.2018

Etik Kurul Başkanı

: Prof. Dr. Fahri OĞUZKAYA

İmza

:

# TİYOASETAMİD İLE İNDÜKLENMİŞ AKUT KARACİĞER HASARINDA HEPATOSELLÜLER

## TİYOASETAMİD İLE İNDÜKLENMİŞ AKUT KARACİĞER HASARINDA HEPATOSELLÜLER HÜCRE ÖLÜMÜ ÜZERİNE MELATONİNİN ETKİSİ

### ORJİNALLİK RAPORU

% **15**

BENZERLİK  
ENDEKSİ

% **10**

İNTERNET  
KAYNAKLARI

% **4**

YAYINLAR

% **9**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

### BİRİNCİL KAYNAKLAR

**1**

[docplayer.biz.tr](http://docplayer.biz.tr)

İnternet Kaynağı

% **4**

**2**

[acikerisim.aku.edu.tr](http://acikerisim.aku.edu.tr)

İnternet Kaynağı

% **2**

**3**

AKKUŞ, Derya and SÖNMEZ, Mehmet Fatih. "Investigation of nectin-2 expression in the Rat thymus during organogenesis in the embryo", Erciyes Üniversitesi, 2012.

Yayın

% **1**

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı Soyadı** : Meryem SAYAN  
**Doğum Yeri ve Tarihi** : KIRŞEHİR 09.02.1988  
**Telefon** : 0538 835 6538  
**Mail** : [darimeryem@gmail.com](mailto:darimeryem@gmail.com)  
**Adres** : Beyazşehir mah. Gesi Cad. No:0007 Kat:1 No:8  
Kocasinan/KAYSERİ

### EĞİTİM BİLGİLERİ

- **ÜNİVERSİTE (YÜKSEK LİSANS)**  
Erciyes Üniversitesi - Tıp Fakültesi, Histoloji - Embriyoloji Anabilim Dalı  
Bitiş Tarihi : 2019
- **ÜNİVERSİTE (LİSANS)**  
Erciyes Üniversitesi - Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü  
Bitiş Tarihi : 2012
- **Lise**  
Kızılırmak lisesi  
Bitiş Tarihi : 2006

### İŞ TECRÜBESİ

Erciyes Üniversitesi – Veteriner Fakültesi ZOOTEKNİ/ Genetik gönüllü stajyer, Yarı zamanlı Öğrenci statüsünde çalışan (2012- 2014)

M.E.B Özel Melikgazi Mesleki ve Teknik Anadolu Lisesi Sözleşmeli Öğretmen (2016-2018)

### YABANCI DİL

- İngilizce

### SERTİFİKALAR VE BELGELER

- DENEY HAYVANLARI KULLANIM SERTİFİKASI – 2013/2014
- 3. ULUSAL LABORATUVAR HAYVANLARI BİLİMİ KONGRESİ (Uluslararası Katılımlı) - EYLÜL 2013