T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Patoloji Anabilim Dalı

RATLARDA KARBON TETRAKLORÜR İLE OLUŞTURULAN AKUT VE KRONİK KARACİĞER HASARI ÜZERİNE KETEN TOHUMU VE NAR ÇEKİRDEĞİ YAĞININ ETKİSİ VE KASPAZ AKTİVİTESİ İLE HEPATİK APOPTOZİSİN BELİRLENMESİ

Hazırlayan
Görkem EKEBAŞ

Danışman
Prof. Dr. Ayhan ATASEVER

Doktora Tezi

Ocak 2019
KAYSERİ

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Patoloji Anabilim Dalı

RATLARDA KARBON TETRAKLORÜR İLE OLUŞTURULAN AKUT VE KRONİK KARACİĞER HASARI ÜZERİNE KETEN TOHUMU VE NAR ÇEKİRDEĞİ YAĞININ ETKİSİ VE KASPAZ AKTİVİTESİ İLE HEPATİK APOPTOZİSİN BELİRLENMESİ

(Doktora Tezi)

Hazırlayan
Görkem EKEBAŞ

Danışman
Prof. Dr. Ayhan ATASEVER

Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TDK-2016-6790 kodlu proje ile desteklenmiştir.

Ocak 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.

Görkem EKEBAŞ

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

"**Ratlarda Karbon Tetraklorür ile Oluşturulan Akut ve Kronik Karaciğer Hasarı Üzerine Keten Tohumu ve Nar Çekirdeği Yağının Etkisi ve Kaspaz Aktivitesi ile Hepatik Apoptozisin Belirlenmesi**" adlı Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan
Görkem EKEBAŞ

Danışman
Prof. Dr. Ayhan ATASEVER

Patoloji Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Ayhan ATASEVER

Prof. Dr. Ayhan ATASEVER danışmanlığında **Görkem EKEBAŞ** tarafından hazırlanan **"Ratlarda Karbon Tetraklorür ile Oluşturulan Akut ve Kronik Karaciğer Hasarı Üzerine Keten Tohumu ve Nar Çekirdeği Yağının Etkisi ve Kaspaz Aktivitesi ile Hepatik Apoptozisin Belirlenmesi"** adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Patoloji Anabilim Dalı'nda **Doktora tezi** olarak kabul edilmiştir.

21/01/2019

JÜRİ: **İmza**

Danışman : Prof. Dr. Ayhan ATASEVER .....
(Veteriner Patoloji AD)

Üye : Prof. Dr. Nihat TOPLU .....
(Veteriner Patoloji AD)

Üye : Prof. Dr. Bilal Cem LİMAN .....
(Veteriner Farmakoloji AD)

Üye : Prof. Dr. Meryem EREN .....
(Veteriner Biyokimya AD)

Üye : Doç. Dr. Mustafa ÖZKARACA .....
(Veteriner Patoloji AD)

ONAY:

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

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

Prof. Dr. Aykut DARENDELİ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmamın bütün aşamalarında bilgi ve deneyimi ile gelişimime katkıda bulunan ve her zaman destek olan Sayın Danışman Hocam Prof. Dr. Ayhan ATASEVER'e, çalışmalarım sırasında desteklerini esirgemeyen eşim Cansu EKEBAŞ'a ve Sayın hocalarım Prof. Dr. Meryem EREN, Dr. Öğretim Üyesi Murat ABAY, Dr. Öğretim Üyesi Duygu YAMAN GRAM, Dr. Öğretim Üyesi Meryem ŞENTÜRK ve Doç. Dr. Aytaç AKÇAY'a

Tez projemin (TDK-2016-6790) gerçekleştirilmesinde maddi destek sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne,

Hayatımın her anında yanımda olan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Görkem EKEBAŞ

RATLARDA KARBON TETRAKLORÜR İLE OLUŞTURULAN AKUT VE KRONİK KARACİĞER HASARI ÜZERİNE KETEN TOHUMU VE NAR ÇEKİRDEĞİ YAĞININ ETKİSİ VE KASPAZ AKTİVİTESİ İLE HEPATİK APOPTOZİSİN BELİRLENMESİ

Görkem EKEBAŞ

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Veteriner Patoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi, Ocak 2019

Danışman: Prof.Dr. Ayhan ATASEVER

ÖZET

Bu çalışmada, karbon tetraklorür (CCl_4) ile akut ve kronik karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda keten tohumu yağı (KTY) ve nar çekirdeği yağının (NÇY) karaciğer dokusunda oluşabilecek lezyonlar üzerine koruyucu etkisi, hücresel apoptozda kaspaz 3, 8 ve 9 aktivasyonları, serum Alanin Amino Transferaz (ALT) aktivitesi, trigliserit, total protein, albümin, total kolesterol düzeyleri ve karaciğer malondialdehit (MDA) ile total antioksidan kapasitesi değerlendirildi.

Çalışmada 96 adet (200-250 gr) Wistar albino ırkı erkek rat, her grupta 8 hayvan olmak üzere 12 gruba ayrıldı. Akut ve kronik dönemde ilk grup kontrol olarak belirlendi.İkinci ve üçüncü gruplara akut dönemdekilere 4 hafta, kronik dönemdekilere 12 hafta her gün sırası ile 4 ml/kg/canlı ağırlık dozunda KTY ve 2 ml/kg/canlı ağırlık dozunda NÇY gavaj ile verildi. Dördüncü grupta akut olana ilk hafta 3 gün ara ile 1,0 mL/kg/canlı ağırlık iki doz, kronik dönemde olana ise 12 hafta boyunca intraperitoneal 0,2 ml/kg/canlı ağırlık haftada iki doz intraperitoneal CCl_4 enjekte edildi. Beşinci ve altıncı gruplardan akut dönemlerdekine sırasıyla 4 ml/kg/canlı ağırlık KTY ve 2 ml/kg/canlı ağırlık NÇY 4 hafta her gün, gavaj ile verilirken, ilk hafta 3 gün ara ile intraperitoneal 1,0 ml/kg/canlı ağırlık dozunda, kronik dönemdeki gruplara ise sırasıyla 4 ml/kg/canlı ağırlık KTY ve 2 ml/kg/canlı ağırlık NÇY 12 hafta her gün gavaj ile haftada 2 defa intraperitoneal 0,2 ml/kg/canlı ağırlık dozunda CCl_4 uygulandı.

Kontrol gruplarında normal karaciğer doku yapısı gözlenirken; CCl_4 grubu hepatositlerinde yoğun makro ve mikroveziküler yağlanma, portal bölgede ve parankimde çoğunluğu lenfositlerden oluşan mononüklear hücre infiltrasyon alanları ile nekrotik değişiklikler, portal bölgelerde hafif fibrozis ile parankim de tam olmayan lobulasyon formasyonları görüldü. Akut ve kronik karaciğer hasarı oluşturulan ratlara KTY uygulamaları sonunda oluşan histopatolojik değişiklikler CCl_4 grubu ile benzerlik gösterirken, NÇY uygulamalarında histopatolojik değişiklikler kısmen azalttı. Karaciğer hasarı oluşan gruplarda NÇY ve KTY uygulamaları kaspaz 3 ve 9 aktivitesini sınırlı sayıda azalttı. Akut dönemde CCl4 ile artış gösteren ALT aktivitesi NÇY uygulaması ile önemli düzeyde düşüş ($P<0,01$), serumtotal protein değerlerinde artış ($P<0,01$) gözlendi. Kronik olarak CCl4 uygulanan tüm gruplarda ise serum ALT aktivitesinde görülen önemli düzeyde artış ($P<0,001$), KTY ve NÇY'nın verilmesi ile düşmedi. Hem akut hem de kronik olarak CCl_4 uygulanması karaciğer MDA düzeyleri önemli düzeyde arttı ($P<0,001$), ancak bu artışlar gerek KTY gerekse NÇY'nın uygulamalarından istatistiki önemde etkilenmedi. Karaciğer TAK düzeyleri yönünden akut dönemdeki gruplar arasında istatistiki anlamda bir fark bulunamazken ($P>0,05$), KTY ve NÇY'nın gerek tek başına gerekse CCl_4'lü gruplara kronik olarak verilmesi karaciğer TAK'inde önemli artışlara neden oldu ($P<0,001$).

Sonuç olarak; akut ve kronik CCl_4 ile birlikte KTY ve NÇY verilen deney gruplarında karaciğer hasarı üzerinde her iki bitkinin antioksidan özelliklerinin biyokimyasal veriler ve histopatolojik lezyonlar üzerine iyileştirici yönden anlamlı bir etkisi gözlenmedi. Karbon tetraklorür ile birlikte NÇY verilen akut ve kronik çalışma gruplarında biyokimyasal parametreleri kontrol grubu değerlerine kısmen yaklaştırdığından, NÇY'nın kısmen iyileştirici etkilerinin olabileceği belirlendi. Keten tohumu yağı ve NÇY'nın farklı sürelerde ve yan etki oluşturmaksızın en iyi sonucu verecek yüksek dozlarda kullanılarak, kesin etkilerinin belirlenmesine yönelik yeni araştırma sonuçlarına ihtiyaç olduğu kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Histopatoloji, İmmunhistokimya, Karbon tetraklorür, Keten tohumu yağı, Nar çekirdeği yağı, Rat.

THE EFFECTS OF FLAXSEED OIL AND POMEGRANATE SEED OIL ON ACUTE AND CHRONIC LIVER DAMAGE INDUCED CARBONTETRACHLORIDE IN RATS AND DETERMINATION OF HEPATIC APOPTOSIS AND ACTIVITY OF CASPASE

Görkem EKEBAŞ

Erciyes University, Graduate School of Health Sciences

Department of Veterinary Pathology

PhD. Thesis, January 2019

Supervisor: Prof. Dr. Ayhan ATASEVER

ABSTRACT

The present study determined the possible protective effects of flax seed oil (FSO) and pomegranate seed oil (PSO) on lesions and cellular apoptosis detection by with activation of caspase 3, 8 and 9, serum Alanine Amino Transferase (ALT) activity, triglyceride, total protein, albumin, total cholesterol levels along with total antioxidant capacity of liver malondialdehyde (MDA) on acute and chronic liver injury induced by carbon tetrachloride (CCl_4) in rats.

In the study, 96 male (200-250 g) Wistar albino male rats were divided into 12 groups, 8 animals in each group. In the acute and chronic period, the first group was defined as control. The second and third groups were given respectively 4 ml/kg/body weight FSO and 2 ml/kg/body weight PSO for 4 weeks in the acute period, 12 weeks in the chronic period through gastric gavage each day. In the fourth group, first week two doses of 1.0 ml/kg/bodyweight with an interval of 3 days for 4 week in acute period, in the chronic period is 0.2 ml/kg/bodyweight two times per week for 12 weeks, CCl_4 was injected intraperitoneally. From the fifth and sixth groups, respectively 4 ml/kg/body weight FSO and 2 ml/kg/body weight PSO through gastric gavage each day and two doses of 1.0 ml/kg/bodyweight with an interval of 3 days given CCl_4 was injected intraperitoneally for 4 weeks in the acute period, in the chronic period is respectively 4 ml/kg/body weight FSO and 2 ml/kg/body weight PSO through gastric gavage each day,

0.2 ml/kg/bodyweight two times per week for 12 weeks CCl_4 was injected intraperitoneally.

Normal liver tissue structure was observed in the control groups; while an intensive macro and micro vesicular steatosis, mononuclear inflammatory cell infiltrations mostly lymphocytes in portal area and parenchyma with necrotic alterations, mild to severe fibrosis with lobulation formation were observed in the CCl_4 treated group. Histopathological changes at the end of FSO in rats with acute and chronic liver damage while similar to CCl_4 group, PSO applications partially reduced changes. The activity of caspase 3 and 9 was reduced by a limited depending on the FSO and PSO applications to groups of liver damage. Increased ALT activity with CCl_4 in acute period decreased significantly with PSO application ($P<0.01$) and serum total protein values were increased ($P<0.01$). In all groups treated with carbon tetrachloride, serum ALT activity was significantly increased ($P <0.001$), whereas the administration of FSO and PSO did not decrease the increase in the activity of this enzyme. Both acute and chronic carbon tetrachloride administration significantly increased liver MDA levels ($P<0.001$) however, these increases were not affected statistically by both FSO and PSO applications. There was no statistically significant difference in liver TAC levels between groups in acute period ($P>0.05$), the chronic administration of FSO and PSO to both groups alone or to CCl_4 groups resulted in significant increases in liver TAC ($P<0.001$).

Inconclusion, while when given with acute and chronic CCl_4, both FSO and PSO, no significant effect was observed on biochemical data and histopathological lesions of antioxidant properties of both plants on liver damage in groups. Since biochemical parameter values were close to normal values in groups which received acute and chronic PSO along with CCl_4, PSO compound may have healing effects. Therefore, new research strategies and approaches where both compounds may be tried with different periods with high doses are needed to evaluate their effects.

Keywords: Carbon tetrachloride, Flax seed oil, Histopathology, Immunohistochemistry, Pomegranate seed oil, Rat.

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI ii
KABUL VE ONAY iii
TEŞEKKÜR iv
ÖZET v
ABSTRACT vii
İÇİNDEKİLER ix
KISALTMALAR xiii
TABLOLAR LİSTESİ xiv
ŞEKİLLER LİSTESİ xv
1. GİRİŞ / AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 2
2.1. KARACİĞER 2
2.1.1. Karaciğerin Yapısı 2
2.1.1.1 Karaciğerin Anatomisi 2
2.1.1.2. Karaciğer Histolojisi 3
2.1.2.Karaciğerin Fizyolojisi 4
2.1.3. Karaciğer Dejenerasyonları 4
2.1.3.1 Bulanık Şişkinlik ve Hidropik Dejenerasyon 4
2.1.3.2 Yağlı Karaciğer 5
2.1.4. Karaciğer Nekroz Şekilleri 5
2.1.4.1. Periasiner Nekroz 6
2.1.4.2. Midzonal Nekroz 6
2.1.4.3. Periportal Nekroz 6
2.1.4.4. Parasantral Nekroz 6
2.1.4.5.Masif Nekroz 6
2.1.5. Hepatitis 7
2.1.6. Karaciğerde Fibrozis 7
2.1.7. Siroz 7
2.2. APOPTOZİS 7
2.2.1. Kaspaz Aktivitesi 8

2.3. KARBON TETRAKLORÜR (CCl_4) 9
2.3.1. Karbon Tetraklorür'ün Yapı Ve Özellikleri 9
2.3.2. Karbon Tetraklorür'ün Etki Mekanizması 10
2.4. SERBEST RADİKALLER 11
2.5. LİPİD PEROKSİDASYON 13
2.5.1. Malondialdehit 14
2.6. ANTİOKSİDANLAR 15
2.6.1.Keten (*Linum usitatissimum*) 16
2.6.2. Nar (*Punica granatum*) 17
2.7. TOTAL ANTİOKSİDANLARIN KAPASİTESİ 17
3. GEREÇ VE YÖNTEM 16
3.1. GEREÇ 18
3.1.1. Keten Tohumu Yağı 18
3.1.2. Nar Çekirdeği Yağı 18
3.1.3. Deneyde Kullanılan Hayvanlar 19
3.2. YÖNTEM 20
3.2.1. Deney Planı 20
3.2.2. Dozların Belirlenmesi 23
3.2.3. Doku ve Kan Örneklerinin Alınması 24
3.2.4. Histopatolojik İnceleme 25
3.2.5. İmmunohistokimyasal İnceleme 27
3.2.6. Karaciğer Hasar Skorlama Yöntemi 27
3.2.7. Serum/Plazma Biyokimyasal Analizleri 28
3.2.8. Karaciğer Dokusu MDA ve TAK Analizleri 28
3.2.9. İstatistiksel Analizler 29
4. BULGULAR 30
4.1. KLİNİK BULGULAR 30
4.2. MAKROSKOBİK BULGULAR 30
4.2.1. Kontrol Grubu 30
4.2.1. Karbon Tetraklorür Grubu 30
4.3. HİSTOPATOLOJİK VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR 31
4.3.1. Akut Grup 31
4.3.1.1. Kontrol Grubu 31

4.3.1.1.1. Keten Tohumu Yağı Grubu 34
4.3.1.1.2. Nar Çekirdeği Yağı Grubu 37
4.3.1.2. Karbon Tetraklorür Grubu 40
4.3.1.2.1. Karbon Tetraklorür+KTY Grubu 48
4.3.1.2.2. Karbon Tetraklorür+NÇY Grubu 56
4.3.2. Kronik Grup 64
4.3.2.1. Kontrol Grubu 64
4.3.2.1.1. Keten Tohumu Yağı Grubu 67
4.3.2.1.2. Nar Çekirdeği Yağı Grubu 70
4.3.2.2. Karbon tetraklorür Grubu 73
4.3.2.2.1. Karbon Tetraklorür+KTY Grubu 81
4.3.2.2.2. Karbon Tetraklorür+NÇY Grubu 89
4.4. KARACİĞER HASAR SKORLAMASI 98
4.5. BİYOKİMYASAL ANALİZ BULGULARI 98
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 104
6. KAYNAKLAR 121
EKLER
ÖZGEÇMİŞ

KISALTMALAR

A. hepatica	: Arteria hepatica
ALA	: Alfa-linoleik asit
ALT	: Alanin amino transferaz
APAF-1	: Apoptotik protez aktive eden faktör 1
CAT	: Catalase
CCl_3	: Trichloromethane
CCl_3O_2	: Trichloromethane peroxyl
CCl_4	: Carbon tetrachloride
GST	: Glutatyon transferaz
H_2O_2	: Hidrojen peroksit
HxE	: HematoksilenxEozin
İP	: İntraperitoneal
KTY	: Keten tohumu yağı
MDA	: Malondialdehit
NaCl	: Sodium chloride
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NÇY	: Nar çekirdeği yağı
PBS	: Phosphate buffered saline
SDG	: Sekoisolarikiresinol diglukosid
SDH	: Sorbitol dehidrogenaz
SOD	: Süperoksit dismutaz
TAK	: Total antioksidan kapasitesi
TNF	: Tümör nekroz faktörü
TOK	: Total oksidan kapasitesi
V. hepatica	: Vena hepatica

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Keten tohumu yağı, yağ asitleri kompozisyonu. 18
Tablo 2. Nar çekirdeği yağı, yağ asitleri kompozisyonu. 19
Tablo 3. Akut çalışmada oluşturulan deney grupları ve bu gruplara yapılan uygulamalar. 21
Tablo 4. Kronik çalışmada oluşturulan deney grupları ve bu gruplara yapılan uygulamalar. 22
Tablo 5. Doku takip yöntemi. 25
Tablo 6. Hematoksilen-Eozin boyama yöntemi. 26
Tablo 7. Karaciğerde hasar skorlama tablosu. 28
Tablo 8. Akut deneme gruplarına ait doku hasar parametre skorlarının istatistiksel önem kontrolü. 100
Tablo 9. Kronik deneme gruplarına ait doku hasar parametre skorlarının istatistiksel önem kontrolü. 101
Tablo 10. Akut karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda kontrol ve deneme gruplarının serum biyokimyasal parametreleri. 102
Tablo 11. Akut karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda kontrol ve deneme gruplarının karaciğer MDA ve TAK parametreleri. 102
Tablo 12. Kronik karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda kontrol ve deneme gruplarının serum biyokimyasal parametreleri. 103
Tablo 13. Kronik karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda kontrol ve deneme gruplarının karaciğer MDA ve TAK parametreleri. 103

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Hayvanların kafeslerdeki görüntüsü. 20

Şekil 2. Gavaj ve intraperitoneal uygulamalar. 23

Şekil 3. Karbon tetraklorür grubundaki ratlarda karaciğerlerinde **(A)** diyaframa yapışma ve **(B)** sarımtrak renk değişimlerinin görünümü. 31

Şekil 4. Kontrol grubu; karaciğerin normal histolojik görünümü. Karaciğer, HxE 32

Şekil 5. Kontrol grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 3 pozitif görünümü. ABC-P..... 33

Şekil 6. Kontrol grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 9 pozitif görünümü. ABC-P..... 34

Şekil 7. Keten tohumu yağı grubu; karaciğerin normal histolojik görünümü. Karaciğer, HxE 35

Şekil 8. Keten tohumu yağı grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 3 pozitif görünümü. ABC-P. 36

Şekil 9. Keten tohumu yağı grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 9 pozitif görünümü. ABC-P. 37

Şekil 10. Nar çekirdeği yağı grubu; karaciğerin normal histolojik görünümü. Karaciğer, HxE 38

Şekil 11. Nar çekirdeği yağı grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 3 pozitif görünümü. ABC-P. 39

Şekil 12. Nar çekirdeği yağı grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 9 pozitif görünümü. ABC-P. 40

Şekil 13. Karbon tetraklorür grubu ratların hepatositlerinde yoğun makro (oklar) ve mikro (ok başları) veziküler yağ vakuolleri görünümü. Karaciğer, HxE 41

Şekil 14. Karbon tetraklorür grubu ratların makro (siyah oklar) mikro (siyah ok başları) veziküler yağ vakuolleri gözlenen hepatosit alanlarında, lenfosit (beyaz oklar) ve eritrositlerin (beyaz ok başları) görünümü. Karaciğer, HxE. 42

Şekil 15. Karbon tetraklorür verilen ratlarda yağ vakuolleri taşıyan hepatositler ve nekrotik alanlarda lenfositten zengin mononüklear hücre infiltrasyonu (ok başları) ile kupffer hücrelerinde sayıca artış (beyaz ok) ve fokal kanama alanlarının (oklar) görünümü. Karaciğer, HxE. 43

Şekil 16. Karbon tetraklorür verilen gruptaki ratlarda, karaciğer parankiminde pembe homojen renkli geniş nekroz alanlarının görünümü. Karaciğer, HxE 44

Şekil 17. Karbon tetraklorür verilen gruptaki ratların, hepatosit sitoplazmalarında makro mikro yağ vakuollerinin siyah renkte görünümü. Karaciğer, (OsO_4 fikse edilmiş) HxE. 45

Şekil 18. Karbon tetraklorür grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 3 pozitif görünümü. ABC-P 46

Şekil 19. Karbon tetraklorür grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 8 pozitif görünümü. ABC-P 47

Şekil 20. Karbon tetraklorür grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 9 pozitif görünümü. ABC-P. 48

Şekil 21. Karbon tetraklorür+KTY grubu ratlarda, hepatositlerde yoğun makro ve mikroveziküler yağ vakuollerinin görünümü. Karaciğer, HxE 49

Şekil 22. Karbon tetraklorür+KTY grubu ratların karaciğer parankimlerinde **(A)** makro-mikro (oklar) yağ vakuolleri arasında **(B)** yoğun lenfositten zengin mononüklear hücre infiltrasyonları (ok başları). Karaciğer, HxE... 50

Şekil 23. Karbon tetraklorür+KTY grubu ratlarda, karaciğerde nekrotik alanlar ve bu alanlarda mikro yağ vakuollerinin görünümü. Karaciğer, HxE 51

Şekil 24. Karbon tetraklorür verilen gruptaki ratların, hepatosit sitoplazmalarında makro-mikro yağ vakuollerinin siyah renkte görünümü. Karaciğer, (OsO4 fikse edilmiş) HxE 52

Şekil 25. Karbon tetraklorür+KTY grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 3 pozitif görünümü. ABC-P 53

Şekil 26. Karbon tetraklorür+KTY grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 8 pozitif görünümü. ABC-P 54

Şekil 27. Karbon tetraklorür+KTY grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 9 pozitif görünümü. ABC-P 55

Şekil 28. Karbon tetraklorür+NÇY grubu ratlarda, **(A, B)** hepatositlerde yoğun makro (oklar) ve mikroveziküler (ok başları) yağ vakuollerinin görünümü. Karaciğer, HxE. 57

Şekil 29. Karbon tetraklorür+NÇY grubu ratlarda, karaciğerde **(A, B)** yağlanma bölgelerinde daha yoğun olmak üzere tüm parankim dokuda lenfositten zengin mononüklear hücre infiltrasyonunun (ok başları) görünümü. Karaciğer, HxE 58

Şekil 30. Karbon tetraklorür+NÇY grubu ratlarda, hepatositlerde daha küçük yağ vakuolleri ve parankimde geniş nekroz alanlarının görünümü. Karaciğer, HxE 59

Şekil 31. Karbon tetraklorür+NÇY grubu ratlarda, karaciğerde **(A)** damarlarda hiperemi (oklar) ve **(B)** nekroz alanları içerisinde daha belirgin lenfositten zengin mononüklear hücre infiltrasyon alanlarının (ok başları) görünümü. Karaciğer, HxE 60

Şekil 32. Karbon tetraklorür+NÇY verilen gruptaki ratların, hepatosit sitoplazmalarında makro mikro yağ vakuollerinin siyah renkte görünümü. Karaciğer, (OsO_4 fikse edilmiş) HxE. 61

Şekil 33. Karbon tetraklorür+NÇY grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 3 pozitif görünümü. ABC-P 62

Şekil 34. Karbon tetraklorür+NÇY grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 8 pozitif görünümü. ABC-P. 63

Şekil 35. Karbon tetraklorür+NÇY grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 9 pozitif görünümü. ABC-P 64

Şekil 36. Kontrol grubu; karaciğerin normal histolojik görünümü. Karaciğer, HxE. 65

Şekil 37. Kontrol grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 3 pozitif görünümü. ABC-P..... 66

Şekil 38. Kontrol grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 9 pozitif görünümü. ABC-P..... 67

Şekil 39. Keten tohumu yağı grubu; karaciğerin normal histolojik görünümü. Karaciğer, HxE 68

Şekil 40. Keten tohumu yağı grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 3 pozitif görünümü. ABC-P. 69

Şekil 41. Keten tohumu yağı grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 9 pozitif görünümü. ABC-P. 70

Şekil 42. Nar çekirdeği yağı grubu; karaciğerin normal histolojik görünümü. Karaciğer, HxE 71

Şekil 43. Nar çekirdeği yağı grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 3 pozitif görünümü. ABC-P. 72

Şekil 44. Nar çekirdeği yağı grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 9 pozitif görünümü. ABC-P 73

Şekil 45. Karbon tetraklorür grubu rat karaciğerlerinde damarlarda hiperemi (beyaz oklar), sinuzoidler (beyaz ok başları) içerisinde eritrosit yığınları ile hepatositlerde makro-mikroveziküler yağ vakuolleri (siyah oklar) ve bu alanlarda lenfositten zengin mononüklear hücre infiltrasyonlarının (siyah ok başları) görünümü. Karaciğer, HxE..... 74

Şekil 46. Karbon tetraklorür grubu ratların karaciğerinde makro-mikro yağ vakuolleri (oklar) ile V. centralis periferinde yer yer artmış fibröz bağ dokunun (ok başları) görünümü. Karaciğer, HxE 75

Şekil 47. Karbon tetraklorür grubu ratlarının karaciğer kesitlerinde mikroveziküler yağ vakuolleri (siyah oklar), Kupffer hücre hiperplazisi (siyah ok başları) ve lenfosit hücre infiltrasyonlarının (beyaz oklar) görünümü. Karaciğer, HxE. 76

Şekil 48. Karbon tetraklorür grubu ratlarının hepatositlerinde makro ve mikroveziküler yağ vakuollerinin siyah renkte görünümü. Karaciğer, (OsO_4fikse edilmiş) HxE..... 77

Şekil 49. Karbon tetraklorür grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 3 pozitif görünümü. ABC-P 78

Şekil 50. Karbon tetraklorür grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 8 pozitif görünümü. ABC-P 79

Şekil 51. Karbon tetraklorür grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 9 pozitif görünümü. ABC-P 80

Şekil 52. Karbon tetraklorür+KTY grubu ratlarının karaciğer kesitlerinde fibröz doku artışı (beyaz oklar) **(A)** ile küçük gruplar oluşturmuş makro-mikro veziküler yağ vakuollerinin (siyah oklar) **(B)** görünümü. Karaciğer, HxE 82

Şekil 53. Karbon tetraklorür+KTY grubu ratlarının karaciğer kesitlerinde küçük gruplar oluşturmuş yağ vakuolleri arasında ve periferlerinde fibröz doku artışıyla parankimde tam olmayan pseudolob görünümü (beyaz oklar) **(A)** ile lenfositten zengin mononüklear hücre infiltrasyon alanları (siyah oklar) **(B)**. Karaciğer, HxE 83

Şekil 54. Karbon tetraklorür+KTY grubu ratlarının karaciğer kesitlerinde parankimde geniş nekroz alanları ve içerisinde lenfositler (ok başları) ile küçük yağ vakuollerinin (oklar) görünümü. Karaciğer, HxE. 84

Şekil 55. Karbon tetraklorür+KTY grubu ratlarının hepatositlerinde makro ve mikro veziküler yağ vakuollerinin siyah renkte görünümü. Karaciğer, (OsO_4 fikse edilmiş) HxE 85

Şekil 56. Karbon tetraklorür+KTY grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 3 pozitif görünümü. ABC-P 86

Şekil 57. Karbon tetraklorür+KTY grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 8 pozitif görünümü. ABC-P 87

Şekil 58. Karbon tetraklorür+KTY grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 9 pozitif görünümü. ABC-P 88

Şekil 59. Karbon tetraklorür+NÇY grubu ratlarının karaciğer kesitlerinde **(A)** makro-mikro veziküler yağ vakuolleri (siyah oklar) küçük gruplar oluşturmuş, **(B)** hafif fibröz doku artışı (siyah ok başları) ve lenfoid hücre (beyaz oklar) infiltrasyonunun görünümü Karaciğer, HxE. 90

Şekil 60. Karbon tetraklorür+NÇY grubu ratlarının karaciğer kesitlerinde parankimde **(A)** az sayıda yağ vakuolleri (siyah oklar), lenfositten zengin mononüklear hücre infiltrasyonları (siyah ok başları) ile **(B)** bu alanlanlar ve periferlerinde fibröz doku artışı (beyaz oklar) ile şekillenen tam olmayan pseudolobların görünümü. Karaciğer, HxE 91

Şekil 61. Karbon tetraklorür+NÇY grubu ratlarının karaciğer **(AB)** kesitlerinde içerisinde mikroveziküler yağ vakuollerinin olduğu geniş nekroz alanlarının görünümü. Karaciğer, HxE 92

Şekil 62. Karbon tetraklorür+NÇY grubu ratlarının karaciğer kesitlerinde geniş nekroz alanları içerisinde çoğunluğu mikroveziküler ve az sayıda makroveziküler yağ vakuolleri (oklar), damarlarda hiperemi ile az sayıda lenfosit hücre infiltrasyonun (ok başları) görünümü. Karaciğer, HxE 93

Şekil 63. Karbon tetraklorür+NÇY grubu ratlarının hepatositlerinde makro ve mikroveziküler yağ vakuollerinin siyah renkte görünümü. Karaciğer, (OsO_4 fikse edilmiş) HxE 94

Şekil 64. Karbon tetraklorür+NÇY grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 3 pozitif görünümü. ABC-P 95

Şekil 65. Karbon tetraklorür+NÇY grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 8 pozitif görünümü. ABC-P 96

Şekil 66. Karbon tetraklorür+NÇY grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 9 pozitif görünümü. ABC-P 97

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Karaciğer hastalıkları dünyada önemli bir oranda problem yaratırken, toksik maddelere maruz kalan ve karşılaştıkları etkenlerle hasara uğrayabilen bir organdır (1, 2). Akut ve kronik hepatotoksisite oluşturmak amacıyla kullanılan CCl_4'ün toksisitesi biyokimyasal ve hücre organelleri düzeyinde kendini gösterirken, oksidatif stres ve bunu takiben ortaya çıkan serbest radikallerle oluştuğu bilinmektedir (3, 4). Oluşan serbest radikal türevleri, hücre membranındaki doymamış yağ asitlerine etki ederek lipid peroksidasyonu oluşturarak etki göstermektedirler (3, 4, 5, 6).

Açlık, şeker hastalığı, adrenalin salgısı bozukluğu ve özellikle esansiyel amino asit yetersizliğinin yanında, etanol, karbon tetraklorür, kloroform gibi maddelerin protein sentezini, özellikle apolipoprotein sentezini engellediğinden karaciğer yağlanması meydana gelir (1, 4, 7, 8).

Lipid peroksidasyon sürecini yavaşlatan antioksidan içeriği bilinen bitkilerin ekstrakt ve yağı; ucuz ve kolay ulaşılabilir olması, toksik ve yan etkilerinin az olmasından dolayı, toksik kimyasal maddeler ile oluşturulan karaciğer hasarına karşı, karaciğer koruyucu etkilerinin belirlenmesi amacıyla hayvan modellerinde yapılan deneysel çalışmalar son zamanlarda popüler hale gelmiştir (9, 10, 11).

Bu çalışmada, karbon tetraklorür (CCl_4) ile akut ve kronik karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda Keten Tohumu Yağı (*Linum usitatissimum Oleum*) (KTY) ve Nar Çekirdeği Yağı (*Punica granatum Oleum*)'nın (NÇY) karaciğer dokusunda oluşabilecek lezyonlar üzerine mümkün olan koruyucu etkisi, hücresel apoptozun immunohistokimyasal yöntemle [anti kaspaz 3 (aktif), 8 ve 9 antikorları] değerlendirilmesi ve serum Alanin Amino Transferaz (ALT) aktivitesi, trigliserit, total protein, albümin ve kolesterol analizleri, karaciğer Malondialdehit (MDA) ve Total Antioksidan Kapasitesi (TAK) düzeylerinin aktivitelere etkileri belirlenmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KARACİĞER

2.1.1. Karaciğerin Yapısı

Karaciğer (hepar), vücudun en büyük metabolik merkezidir (2). Kıvamı elastiktir, rengi; kapsadığı kan miktarına, tür ve yaşa ayrıca beslenme şekline göre değişir (12). Tek tırnaklılar, etçiller, büyük ruminant, domuz, küçük ruminant koyu kırmızı rengindedir. Ağırlığı ve hacmi kapsadığı yağ ve glikojen oranına göre değişirken, ortalama olarak sığır ve atta 5 kg, koyun ve keçide 1 kg, köpekte 130 gr-1,25kg, kedide 68 gram, ratda 10 gramdır (13, 14).

2.1.1.1 Karaciğerin Anatomisi

Karaciğer karın boşluğunun sağında ve ön tarafında bulunur (12, 13, 14). Karaciğerin iki yüzü vardır; diaframagma konveks olan yüzüne facies diaphragmatica ve iç organlara dönük damarların girdiği, safra kanalının çıktığı, porta hepatisin bulunduğu yüzü facies visceralis adı verilmektedir (12, 13). Karaciğerin lenf yumruları facies visceralis yüzünde bulunur. Organın dorsal kenarı (margo obtutus) küt olup, burada özafagus ve V. cava caudalis'in izleri bulunur (13).

Karaciğerin damarları A. hepatica, V. hepatica ile V. porta'dır. A. hepatica karaciğeri besleyen damardır. V. porta ise karaciğerin fonksiyonel damarıdır. Mide, bağırsak yanında pankreas ve dalaktan gelen kanı karaciğere iletir. Karaciğerin sinirleri de damarlar gibi porta hepatisten girip organa dağılır. Bunlardan Nervus vagustan gelen parasempatiktir ve safra kanallarını genişletip safra salgısını artırarak safranın duedonuma akmasını sağlar. Sempatik sinirleri ise Nervus splachnisiden kök alır (12, 13, 14, 15).

2.1.1.2. Karaciğer Histolojisi

Karaciğer, kollagen ve elastik iplikler içeren bağ dokudan bir kapsülle sarılıdır. Glisson kapsülü adı verilen bu yapıyı dıştan peritonun viseral yaprağı sarar. Bağ doku, organın içlerine girerek organı loplara ve lopçuklara ayırır (16). Hepatosit olarak adlandıran karaciğer epitel hücrelerinin anastomozlaşarak meydana getirdiği ışınsal remark kordonlarını ve bu kordonların aralarında yerleşmiş olan sinüzoidlerin, merkezi bir vena (Vena centralis) çevresinde, radiyer bir biçimde yerleşmesiyle meydana gelen lopçuktur. Kan akışı klasik lopçuğun periferinden merkezindeki vena sentralise doğrudur (2, 16). Hekzagonal şekilli olan klasik lopçukların aralarında bulunan bağ doku alanı Kiernan aralığı veya Glisson üçgeni olarak adlandırılır (16). Bu bölge içerisinde, karaciğer üçlüsü olarak adlandırılan, Vena porta ile Arteria hepatikanın kolları ve Duktus biliferus yerleşmiştir (2, 15, 16).

Hepatositler ile sinüzoidler arasında Disse aralığı denilen perisinüzoidal boşluk bulunur. Hepatositlerin bu boşluğa bakan yüzündeki mikrovilluslar bu aralığa girer, kan plazması da sinüzoidlerden bu aralığa geçer. Böylece Disse aralığı, kan ile hepatositler arasında madde alışverişine olanak sağlar (15, 16).

Portal aralığı periportal hepatositler 1. bölge, daha sonra midzonal, 2. bölge ve periasiner hepatositlerin olduğu 3. bölge olarak tanımlanır. Periasiner hücreler V.centralis'lere yakın olarak bulunur (2, 17).

Sinuzoidleri döşeyen hücreler karaciğerin önemli bir bölümünü oluşturur. Bunların en iyi bilineni Kupffer hücreleri olup monosit-makrofaj sistemi içinde yer alırlar (16). Kupffer hücreleri sinuzoid lumenlerinde bulunurlar ve kandaki mikropartiküller ile anormal makro-molekülleri uzaklaştırırlar; eritrosit, safra pigmenti, hemosiderin ya da mikroorganizmaları kapsadıklarında belirginleşirler (2, 16).

Perisinüzoidal alanda bulunan ve ito hücreleri olarak adlandırılan hücreler, Disse aralığının sinüzoidlere bitişik olan kısmında yerleşmiştir. Yağ ve vitamin A depolayan bu hücreler, patolojik durumlarda kollagen üreten hücrelere dönüşürler. Tip I kollagene ilave olarak laminin, proteoglikanlar ve büyüme faktörlerini de üretirler. Bu maddelerin artması karaciğerde progresif fibrozise neden olur (15, 16).

2.1.2.Karaciğerin Fizyolojisi

Organizmadaki en büyük bez olan karaciğer, çok çeşitli görevleri vardır. Glukoz homeostazı ve kan şeker düzeyinin korunması karaciğerin ana görevidir. Glikojenoliz ve glukoneojenez ile kan şekeri düzeyini ayarlar ve besinlerle alınan galaktoz, mannoz ve fruktoz gibi şekerleri glukoza dönüştürür (2, 13, 16, 18, 19). Diğer görevleri ise; safra yapmak, metabolizma sonucu oluşan atıkların dışarı verilmesi, depolama (yağlar, vitamin A ve B ile glikojen), sentez yapma (fibrinojen, globulinler, albümin, protrombin), fagositoz (yabancı partiküller), detoksifikasyon (fenobarbital gibi yağda çözünen ilaçlar), esterleştirme (serbest yağ asitlerini trigliseritlere), metabolizma (protein, karbonhidrat, hemoglobin, ilaçlar),tiroid hormonları olan triiyodotironin ve tetraiyodotironinden iyotun ayrılması ve embriyolarda kan yapımı şeklindedir (2, 16, 18, 19).

Karaciğer oldukça yüksek diferensiyasyonuna karşın, embriyonik ölçüde rejenerasyon yeteneğine sahiptir (2, 19). Normal ömrünü tamamlayan hücrelerin yerini büyük oranda periportal hepatositlerin mitoz etkinliğiyle yeni hücreler doldurur. Karaciğer parenkiminin büyük bir kısmı yıkımlandığında ya da operasyonla alındığında, karaciğerin rejenerasyon yeteneği belirgin olarak ortaya çıkar (18, 19).

2.1.3. Karaciğer Dejenerasyonları

2.1.3.1 Bulanık Şişkinlik ve Hidropik Dejenerasyon

Bulanık şişkinlik mitokondrium değişikliklerini ve sitoplazmik boşluk sisteminin genişlemesini tanımlar; değişik tip zedelenmede ya da hastalıklarda spesifik olmayan bir bulgu olup iskemik, toksik ve diğer tip etkilerle oluşur. Bu değişiklikler otolizisin erken dönemlerinde de şekillenir. Hidropik dejenerasyon, bulanık şişkinliğin daha şiddetli hali olup, hücre sitoplazmasında aşırı miktarda sıvı artışı ile tanımlanmaktadır. Hafif intoksikasyonlarda hipoksiye kadar bir çok durumda hepatositlerde hidropik dejenerasyon şekillenebilir (1, 2, 4).

2.1.3.2 Yağlı Karaciğer

Biyokimyasal olarak lipid miktarı ağırlıkça % 5'ten fazla ve histolojik olarak da fazla miktarda görünür lipid bulunan hücreleri içeren karaciğere "yağlı karaciğer" olarak adlandırılır (1, 2, 8).

İntoksikasyon'a bağlı olarak karaciğerde yağ dejenerasyonuna yaygın şekilde rastlanır. Değişik toksinler karaciğerde lipid metabolizmasınm farklı dönemlerinde etkili olarak karaciğerde yağ dejenerasyonuna yol açar. Doğal koşullarda, karaciğerde yağ dejenerasyonuna yol açan toksinler aynı zamanda az çok hepatohücresel nekroza da neden olur. Toksinler membran yıkımlanmasına yol açarak ve protein sentezini bozarak etkilerini gösterir. Bu durumda lipoproteinlerin sentezi ve hücre dışına çıkışı engellenir ve sonuçta hepatositlerde lipid birikimi olur (1, 2).

Lipidoziste asinusların kenar kısımlarında yağ sitoplazmada küçük globüller şeklinde görülür ve çekirdek normal yerleşimindedir. Toksinlerden ya da akut anoksiden ileri gelen akut hücre zedelenmelerinde yağ dejenerasyonu şekillenmeyebilir. Bu gibi durumlarda hücre ya normal duruma döner ya da nekroza uğrar (2).

Şiddetli ve uzun süren karaciğer lipidozisinde parenkim hücrelerinin çoğunda yağlanma görülür. Hücre içindeki yağ damlacıkları birbirleriyle birleşerek büyük bir globül oluşturur; çekirdek yer değiştirir ve hücrenin şekli bozulur (1, 2).

Karaciğer uzun bir süre yağlı durumda kaldığında, kronik değişiklikler ortaya çıkar. Hepatositlerde ya da yağ depo eden sinüzoidal hücrelerde uzun süre fazla miktarda yağın bulunması sonu fibrozis, pigment birikimi ve nodüler hiperplazi şekillenir (2, 8).

2.1.4. Karaciğer Nekroz Şekilleri

Toksik maddeler, mikroorganizmalar, nutrisyonel yetersizlikler ve şiddetli metabolik bozukluklar ile yangısal hücre infiltrasyonları hepatositlerde nekroza yol açar. Nekrozun şekillenmesinde serbest radikallerin büyük önemi vardır. Serbest radikaller, lipoprotein membranlar üzerinde zararlı etkiye sahiptir. Karaciğer nekrozunun birçok morfolojik şekli vardır (1, 2).

2.1.4.1. Periasiner Nekroz

Periasiner bölgelerde bulunan portal ve arteriyel kanın ulaştığı son noktalarda bulunan hepatositlerde görülen nekroz şeklidir. Nekroz çoğunlukla pıhtılaşma tipinde olur ve vena sentralisler çevresindeki hepatositler ile sınırlıdır (2).

2.1.4.2. Midzonal Nekroz

Fokal ya da diffuz dağılım gösteren, asinusun orta bölgesindeki midzonal nekrozlar bazı intoksikasyonlarda şekillenir (2).

2.1.4.3. Periportal Nekroz

Asinusların periportal bölgelerinde oluşan bu nekroz tipidir, midzonal nekrozlardan daha yaygındır (2).

2.1.4.4. Parasantral nekroz

Parasantral nekroz kimi asinuslarda görülen ve asinusun tümünü içine alan pıhtılaşma nekrozudur. Terminal portal venülün tıkanmasıyla oluşan iskemik bir lezyona ya da infarktüse bağlı olarak şekillenir (2).

2.1.4.5.Masif Nekroz

Masif nekroz çok asinusta görülürse de, bütün karaciğeri içine almaz. Etkilenen asinusların içindeki hücrelerin hemen hepsi nekroza uğrar. Bu nedenle, bu nekroz şeklinde rejenerasyon oluşmaz. Bu gibi nekroz odakları çevresinde parasantral ve periasiner nekroza yakalanmış asinuslar da görülür Fibrin özellikle lobları birbirinden ayıran fissürlerde toplanır. Karaciğer mozaik görünümde olup, görünüm geniş bir alana yayılabilir (2, 4).

Masif nekroz üç şekilde oluşur: ya periasiner nekrozların genişlemesiyle olur, ya akut vasküler değişiklikler masif nekroza yol açar ve bu arada stroma da nekrozlaşır ya da diyetetik bir kökene bağlı olarak gelişir (2).

2.1.5. Hepatitis

Hepatitis terimi bakteriyel, viral ve paraziter etkenlerden ileri gelen fokal ya da diffuz karaciğer lezyonları için kullanılmaktadır (2, 20).

2.1.6. Karaciğerde Fibrozis

Karaciğer fibrozisi, karaciğerin kronik zedelenmeye karşı gösterdiği bir reaksiyondur. Karaciğer nekrozlarının sonrasında gelişen rejeneratif odaklarla birlikte yersel fibrogenezis de şekillenir. Kollagen başlangıçta Disse aralıklarında birikir; aynı zamanda sinuzoid endoteli delikli yapısını kaybeder. Eğer neden ortadan kalkarsa, olgunlaşmamış kollagen enzimatik parçalanmayla ortadan kaldırılır, ancak lezyona yol açan neden varlığını sürdürürse progresif fibrozis şekillenir ya da başlangıçta oluşan parenkim yıkımlanması çok şiddetli olur ve progresif sklerozis gelişir. Fibrozis yavaş gelişerek portal aralıkları V.centralis'ler ile birleştirir ve klasik lobulusları bölerek psödolobülleşmeye yol açabilmektedir (1, 2, 20).

2.1.7. Siroz

Siroz, batı dünyasındaki insanlarda önde gelen 10 ölüm nedeni arasında yer alır. Viral enfeksiyonlar, alkolik ya da non-alkolik steatohepatit, hepatositleri ve/veya safra kanallarını etkileyen otoimmün hastalıklar ve aşırı demir yüklenmesi; sirozun başlıca nedenleri arasındadır. Karaciğerde siroz dejeneratif-nekrotik, rejeneratif-reperatif ve fibrotik olayları içine alan bir seri değişiklik sonu şekillenir (2, 20). Patogenezinde; hepatositlerin ölmesi, ekstrasellüler matriks depolanması ve vasküler reorganizasyon olmak üzere temel üç süreç yer alır(1).

2.2. APOPTOZİS

Apoptozis, embriyonik gelişim ve doku homeostazının korunmasında temel bir rol oynayan sıkı kontrollü bir fizyolojik hücre ölüm sürecidir. Süreç, kendinden geçme için stereotipik bir hücresel program ile karakterizedir. Çeşitli endojen ve eksojen sinyaller ile başlatılabilir. Apoptozun uygulanması, hücre döngüsü kontrolü, DNA (Deoksiribonükleik Asit) onarımı, hücre sinyali verme ve yapısal bütünlük gibi işlemler için nonapoptotik hücrelerde gerekli olan "ölüm substratlarını" bölen kaspazların ardışık aktivasyonu ile tetiklenir. Kaspazlar, hücrelerde aktif olmayan proenzimler olarak

bulunan ve bir hücre apoptotik intihar etmeye karar verdiğinde proteolitik bölünme ile aktive hale gelen bir sistein proteazı grubunu temsil eder (21, 22, 23).

Fizyolojik apoptozis; deri, gastrointestinal sistem ve immün sistem gibi dokularda devamlılık için hücre yenilenmesidir. Diyabet, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, bağışıklık sistemi hastalıkları, folliküler atrezi, viral enfeksiyonlar, tümör oluşumu, AIDS, aterosklerozis, miyokard infarktüsü, organ transplantasyonları, oksidatif stres, alkolizm, X ışınları ve radyasyon canlıda patolojik apoptoza neden olur. Bir hücrenin apoptoza eğilimli olup olmaması Bcl-2 ailesi genlerinin heterodimer ya da homodimer formuna bağlıdır. Bcl-2 ailesi birbirine zıt 2 gruptan oluşur; Proapoptotik üyeler ve Antiapoptotik üyelerdir. Hücrede proapoptotik proteinler fazla ise hücre apoptoza eğilimlidir. Antiapoptotik proteinler fazla ise hücre apoptoza daha az eğilimlidir. Proapoptotik üyeler Bad, Bax, Bid, BclXs, Bak, Bim, Puma ve Noxa'dır. Bu proteinler sitozolde yer alırlar. Sitokrom-c salınımını artırarak apoptozu indüklerler. Antiapoptotik üyeler ise Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1'dir (22, 23) . Nekroz ise hipoksi, fiziksel hasar, hipertermi, kompleman aktivasyonu, ultraviyole ışık gibi zararlı hücre dışı uyaranlar sonucu oluşan istenmeyen bir süreçtir. Genel olarak apoptozun düzenlenmesinde kalsiyum, seramid, Bcl-2 ailesi gibi moleküller, p53 geni, kaspazlar, sitokrom-c gibi proteinler ve mitokondriyonlar rol oynar. Apoptozis, kaspaz adı verilen enzimlerin aktivasyonuyla gerçekleşir (24).

2.2.1. Kaspaz Aktivitesi

a.Mitokondrial (İçsel) Yol ile ilgili Apoptozis: Mitokondrilerde apoptozu başlatabilen çeşitli proteinler vardır. Bunlar Bcl-2 geni tarafından kodlanan proteinler ve sitokrom-c dir (21, 24).

- Hücreler büyüme faktörlerinden ve diğer yaşam sinyallerinden yoksun kaldıklarında
- DNA'ya zarar verecek etkenlerle karşılaştıklarında
- Hatalı katlanmış proteinleri çok miktarda biriktirdiklerinde çok sayıda sensor aktif duruma geçer.

Mitokondriyal porlardan salınan sitokrom-c, APAF-1 (Apoptotik proteaz aktive eden faktör) ve ATP'nin katılmasıyla sitozolde Apoptozom denen bir kompleks oluşturur.

Apoptozom prokaspaz 9'u kaspaz 9'a aktifleştirir. Kaspaz 9 da prokaspaz 3'ü aktif kaspaz 3 haline getirir (22, 24).

b.Ölüm Reseptörü (Dışsal) Yol ile ilgili Apoptozis: Birçok hücrenin yüzeyinde, ölüm reseptörleri adı verilen ve apoptozisi tetikleyen moleküller vardır. Bunların büyük bölümü, Tümör Nekroz Faktörü (TNF) reseptör ailesinin üyesidir. Tümör nekroz faktörü birçok hücre tipi tarafından salgılanan insanlarda 7. kromozom da yer alan gen tarafından sentezelenen bir sitokindir. İnsanlarda 10. kromozom da yer alan gen tarafından sentezlenen CD95 antijeni (Fas) ölüm reseptörlerinin prototipidir. Fas ligandı (FasL), aktive T lenfositlerinin yüzeyinde eksprese edilen bir membran proteinidir. Söz konusu T hücreleri Fas-taşıyan hedefleri tanıyınca, Fas molekülleri FasL ile çapraz bağlar yapar ve ölüm bölgesi aracılığı ile adaptör proteinlere bağlanır. Bu bağlanma, kaspaz 8 enzimini bölgede toplayarak aktive eder (21, 24).

Apoptozisin içsel yolunda kaspaz 9, dışsal yolunda ise kaspaz 8 aracılığı ile ortak yoldaki kaspaz 3 aktive edilerek hücre apoptoza götürülür (22, 24).

Apoptozda mitokondrinin anahtar rolünü oynadığı, karaciğer toksikasyonu oluşturmak için verilen CCl_4'ün histopatolojik olarak kaspaz 3 aktivasyonunun artışı görülür (21, 25, 26).

2.3. KARBON TETRAKLORÜR (CCl_4)

Karbon tetraklorür, hepatotoksik özellikleri nedeniyle karaciğerde toksisite oluşturmak amacıyla yaygın olarak kullanılan bir ksenobiyotiktir (3, 6, 27, 28). Kuru temizleme, cila, vernik gibi maddelerin çözücüsü, pestisit ya da tahıl dezenfektanı gibi yaygın kullanım alanı olan CCl_4; yangın söndürücü veya soğutucuların yapımına giren floroklorokarbon sentezinde de kullanılmıştır (28).

Karbon tetraklorür (CCl_4) saydam, yanıcı olmayan ve kolayca buharlaşabilen renksiz bir sıvıdır (3, 6, 27, 28). Sanayi Endüstrisinde makine ve ekipman temizliğinde çözücü olarak kullanılan alifatik bir hidrokarbondur. Veteriner Hekimlikte uzun yıllar antihelmintik olarak da kullanılmıştır (3, 29). Birleşik Devletler Çevre Koruma Dairesi hayvan deneylerinden elde edilen sonuçlara dayanarak, CCl_4'ü insan için olası kanserojen (grup B2) sınıfına dahil etmiştir (29, 30).

2.3.1. Karbon Tetraklorür'ün Yapı Ve Özellikleri

Karbon tetraklorür uçucu ve berrak bir sıvı olup, genellikle çevrede gaz halinde bulunmakla birlikte kolay yanmaz ve belirgin bir kokusu vardır (5, 31). CCl_4'ün molekül ağırlığı, 153,82 g/mol; ve 0ºC'deki dansitesi, 1,5940 g/ml'dir. Suda çok az çözünen CCl_4; alkol, benzen, kloroform ve yağlarla kolaylıkla karışabilir (28, 31).

CCl_4 vücuda, büyük oranda soluma yoluyla alınmasının yanında yutma ve deri yoluyla da alınabilir. Soluma yolu ile % 30-40'ın üzerinde alınan CCl_4 vücutta yağ dokuda birikir. Alınan CCl_4'ün bir kısmı böbrek, karaciğer, beyin, akciğer ve iskelet kaslarına dağılabilir. Yapılan hayvan çalışmaları farklı koşullar altında vücuda alınan CCl_4'ün % 34-75'i solunan hava ile % 20-62'si ise dışkı ile vücuttan atıldığını göstermiştir (28, 31).

2.3.2.Karbon Tetraklorür'ün Etki Mekanizması

Karbon tetraklorür deneysel hayvan çalışmalarında akut ve kronik hepatotoksisite oluşturmak amacıyla sıklıkla kullanılan bir ksenobiyotiktir (3, 4, 25). Ratlarda CCl_4 ile deneysel olarak oluşturulan siroz, insanlardaki karaciğer sirozuna benzemektedir (5). Reaktif bileşiklerin veya metabolitlerinin toksisitesi, DNA, protein, lipid ve karbohidrat gibi önemli hedef moleküllerle kovalent olarak bağlanmaları (primer) veya sekonder ilişki yoluyla (lipid peroksidasyonu, reaktif oksijen türevleri oluşumu) hedef moleküllerde değişiklik oluşturmaları sonucunda ortaya çıkar (25, 27). Karbon tetraklorür toksisitesi biyokimyasal ve endoplazmik retikulum, plazma membranı, mitokondri ve golgi aygıtı etkilenen temel hücresel yapılardır (3, 6,25, 27).

Karbon tetraklorür'ün karaciğer hasarı oluşturma mekanizması, karaciğer mikrozomlarında sitokrom P450-2E1 vasıtasıyla metabolize edildikten sonra triklorometil serbest radikaline (CCl_3) dönüştürülmesi ile başlar (3, 25, 27, 32). Bu serbest radikal O_2 varlığında oldukça yüksek reaktif derivatı olan triklorometilperoksi radikaline (CCl_3OO) dönüşür. Bu radikal, CCl_3 radikalinden daha reaktiftir ve yarı ömrü daha kısadır. CCl_3OO poliansatüre yağ asitleri ile reaksiyona girerek son ürünü malondialdehit (MDA) olan lipid peroksidasyonunu başlatır (3, 33). Lipid peroksidasyonu sonucu açığa çıkan ürünlerden olan reaktif aldehitler toksik etkili olmakla birlikte enzim inhibisyonu, DNA hasarı ve lipoprotein salgılanmasının engellenmesine neden olarak karaciğer hasarının ilerlemesine katkıda bulunurlar (3, 4,

5, 6, 25, 27, 28, 31). Karbon tetraklorür; karaciğerde hidropik dejenerasyon, yağlanma ile hepatosellüler zon 3 nekrozu yapar (27, 28, 32). Yüksek doz veya uzun süreli CCl_4 uygulamalarında, steatozis (yağlı dejenerasyon), fibrozis, siroz ve hatta kanser gibi daha ciddi ve kalıcı etkiler ortaya çıkar (3, 4, 5, 25, 27, 28, 31, 32).

Karaciğerde özellikle sentrolobüler bölgede neden olduğu nekrozdan sorumlu olan CCl_4, granülsüz endoplazmik retikulumda sitokrom P450 elektron transport zincirini kullanan sitokrom oksidaz kompleksi tarafından dayanıklı olmayan triklorometil (CCl_3) serbest radikaline dönüşür. Dayanıksız olan triklorometil (CCl_3) serbest radikali oksijenle birleşerek daha aktif bir metabolit olan triklorometilperoksi (CCl_3OO) dönüşür. Bu radikal lipid perosidasyonun temel başlatıcısıdır. Hücredeki antioksidan savunma sistemlerini aşan serbest radikaller, yağ asitleri ile reaksiyona girerek peroksidasyon ürünlerini oluştururlar. Triklorometilperoksi (CCl_3OO), doymamış yağ asitlerinde çok sayıda bulunan metil gruplarından bir hidrojen atomu koparır ve onunla birleşir. Bu reaksiyon sonucu bir taraftan kloroform oluşurken, diğer taraftan da MDA (malondialdehit) düzeyinin artmasına neden olur (34, 35).

Karbon tetraklorürün neden olduğu karaciğer hasarındaki histolojik değişiklikler, hem lobuler alanda hem de portal septada apoptoz, nekroz, steatoz ve mononükleer hücre infiltrasyonu olarak bilinir (36). Deneysel olarak yapılan çalışmalarda CCl_4'ün karaciğerde, mitotik aktiviteyi artırarak; hepatositlerde dejenerasyon, hepatik yağ dejenerasyonu, mononüklear hücre infiltrasyonu, fibrozis, siroza ve kansere neden olduğu gösterilmiştir (6, 36, 37, 38).

Karbon tetraklorür (CCl_4), sadece hepatik nekrozu değil aynı zamanda böbrek, kalp, akciğer, testis, beyin ve kanda serbest radikal oluşumuna neden olduğu bilinen bir endüstriyel toksiktir. Reaktif oksijen türleri hücresel membranları, hücresel proteinleri ve nükleik asitleri yok edebilir. CCl_4'ün toksik etkileri, hücre hasarını başlatan serbest radikallerin üretiminin sonuçlarıdır (39).

2.4. SERBEST RADİKALLER

Serbest radikaller bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküller olarak tanımlanır. Çoğu olayda serbest

radikal üretimi, patomekanizmanın bir parçasıdır ve pek çok ksenobiyotiğin toksisitesi ile ilgilidir. Serbest radikaller, hücrelerde endojen ve ekzojen kaynaklı oluşurlar (40).

Serbest radikaller hücrede lipid, protein, DNA ve karbonhidrat gibi önemli hücresel yapı ve bileşikler üzerine etkilidir. Membran oluşturun fosfolipidler, glikolipidler, gliseritler, doymamış yağ asitleri ve transmembran proteinleri radikaller için oldukça çekici hedeflerdir. Radikaller yoğun olarak üretildiklerinde, aerobik solunumu ve kapillar permeabiliteyi bozar; hücresel potasyum kaybını ve kapillar trombosit agregasyonunu hızlandırırlar (41).

Serbest radikaller; hidroksil, süperoksit, nitrik oksit ve lipid peroksit radikalleri gibi kimyasal yapılara sahiptir (42).

Radikal olmayan bir atom veya molekülden bir elektron çıkmasıyla veya ilavesiyle oluşan ve başka moleküler ile çok kolayca elektron alışverişine girip onların yapısını bozan atom veya moleküllere serbest radikaller veya reaktif oksijen türleri adı verilir (43, 44). Serbest radikaller vücutta sürekli olarak oluşturulan ve antioksidan savunma sistemleri tarafından ortadan kaldırılan moleküllerdir. Bu dengenin bozulması durumunda artan serbest radikaller hücre hasarı oluştururlar ve bu olaya oksidatif stres adı verilir (44). Oksidatif stresin miyokard enfarktüsü gibi kardiyolojik hastalıklar, nörolojik hastalıklar, astım, diabetes mellitus, romatoid artrit, kanser ve yaşlanma dahil birçok hastalığın oluşumunda etkili olduğu gösterilmiştir (44, 45). Serbest radikaller normal metabolik olaylar sırasında meydana gelebildikleri gibi çesitli dış etkenlere bağlı olarak da oluşabilirler (46). Ekzojen kaynaklar; endüstri artıkları, güneş ışınları, ağır metaller, ilaçlar, alkol, patojenik bakteri ve viruslardır (47). Endojen kaynaklar ise; mitokondriyal elektron transport zinciri, endoplazmik retikulum, redoks döngüsü, araşidonik asit metabolizması, fagositik hücreler (monosit ve makrofaj, nötrofil, eozinofil) ve endotel hücreler gibi hücrelerdeki oksidatif reaksiyonlar, ksantofil oksidaz, NADPH (Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat) oksidaz gibi oksidan enzimler ve otooksidasyon reaksiyonlarıdır (44, 46).

Biyolojik sistemlerdeki radikaller; oksijen kaynaklı serbest radikaller (süperoksit radikali, hidrojen peroksit, hidroksil, hipokloröz asit, singlet oksijen), karbon kaynaklı serbest radikaller (triklorometilperoksil radikali), nitrojen kaynaklı serbest radikaller (nitrik oksit, fenil hidrazin radikali, sülfür kaynaklı serbest radikaller (tiyol bileşikleri),

geçiş metal kompleksleri, fosfor kaynaklı radikaller (lipid peroksidasyonuna sebep olarak hepatotoksik etki gösterirler) olmak üzere sınıflandırılabilirler (48).

En önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Oksijen, süperoksit grubuna (O_2) bazı demir-kükürt içeren yükseltgenme-indirgenme enzimleri ve flavoproteinlerin etkisiyle indirgenir. Hücre hasarına yol açan süperoksit grubu, süperoksit dismutaz (SOD) aracılığında hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene çevrilir. Süperoksit grubundan daha zayıf etkili olan H_2O_2 de, dokularda bulunan katalaz, peroksidaz ve glutatyon peroksidaz gibi enzimlerle su ve oksijen gibi daha zayıf etkili ürünlere dönüştürülerek etkisiz kılınır (49, 50, 51).

2.5. LİPİD PEROKSİDASYON

Membranda bulunan yağ asitleri ve kolesterolün doymamış bağları serbest radikallerle reaksiyona girip peroksidasyona neden olur. İlk önce yağ asidi hidrojen ve kendi üzerinde birer elektron kalacak şekilde parçalanır ve lipid radikalini oluşturur. Lipid radikali de oksijenle reaksiyona girerek lipid peroksil radikalini oluşturur. Lipid peroksil radikali de diğer doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girer. Böylece zincirleme bir reaksiyon başlamış olur (52, 53).

Lipid peroksidasyonu serbest radikaller tarafından başlatılan membran yapısındaki yağ asitleri zincirinden bir hidrojen atomu uzaklaştırılması ile başlayarak membran lipid yapısını değiştiren ve reaktif aldehitler üreterek diğer hücre bileşenlerinin yapı ve fonksiyonlarına zarar veren zararlı kimyasal bir zincir reaksiyonudur (53, 54). Bu reaksiyon otokatalitik olarak bir kez başladığında zincirleme olarak devam eder ve eğer engellenmezse hücre membranını harap eder ve organelleri parçalayarak lizozomal enzimlerin salınmasına neden olur (54, 55). Lipid peroksidasyonun en önemli göstergelerinden biri üç karbonlu bir dialdehid olan molondialdehit (MDA) oluşur (54). Oluşan MDA; deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi zar özelliklerinin değişmesine yol açar (55).

Serbest radikallerin üretiminin artması, antioksidanların yetersiz olması oksidatif stres oluşturarak, hücresel yapıyı bozarak çeşitli fizyolojik olayların aksamasına neden olur. Serbest radikallerin açığa çıkması sonucu, organizmada bunların oluşturduğu hasarı

önlemek için, radikal oluşumunu engelleyen ve oluşan zararı azaltan, antioksidan olarak bilinen çeşitli savunma mekanizmaları gelişmiştir (53).

Antioksidanlar hedef molekülün oksidasyonunu geciktirir ya da inhibe eder (54). Antioksidan enzimler serbest radikalleri indirgeyerek oluşacak hasarı önlemede rol oynar (55). Bunlar serbest radikalleri tutarak veya daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürerek aktivitelerini azaltır veya serbest radikalleri kendilerine bağlayıp reaksiyon kırma şeklinde etki gösterirler (53, 55, 56).

2.5.1. Malondialdehit

Lipid peroksidasyonun en önemli ürünü malondialdehittir (40). Lipid peroksidasyonu ürünleri olan lipid peroksitleri, hidroperoksitleri ve aldehitleri membran yapısını doğrudan, diğer hücresel bileşenleri ise aldehid üreterek dolaylı yoldan zarara uğratır ve membran yapısının bozulması sonucu malondialdehit (MDA) oluşur (57). Üç karbonlu bir ketoaldehid olan MDA normal metabolik şartlarda, önce asetat veya malonata kadar okside olur, daha sonra krebs siklusu ile CO_2'e indirgenerek atılır. Fakat aşırı lipid peroksidasyonunda MDA konsantrasyonu artar ve dokulara hasar verir (58). Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA doku reaksiyon zincir hızının bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. Plazma MDA konsantrasyonu enzimatik olmayan oksidatif lipid peroksidin parçalanması sonucu oluşur (59). Prostaglandin biyosentezinin bir ürünü ya da oksidatif stres esnasında bazı makromoleküllerin iyonizan radyasyon ile invivo yıkımlanması ile oluşan MDA, çeşitli doku elemanları ile kompleks halde ya da serbest bir formda bulunabilir (57, 60).

Moleküler oksijene maruz kalan hücreler oksijenden türeyen serbest radikaller (süperoksit iyon radikali ve hidroksil radikal) ve lipit peroksidasyon ürünleri tarafından hasara uğrama riskindedir. E vitamini, süperoksit dismutaz, glutatiyon peroksidaz (selenyum içeren), katalaz, vitamin C ve β-karoten gibi antioksidanlar, hücre hasara uğramadan önce serbest radikalleri tutarlar. E vitamini, özellikle hücre membranları için, yağda eriyebilen en önemli antioksidandır. Oksijenle temasta bulunan çoklu doymamış yağ asitleri bir hidrojen atomu atarak lipid radikalini oluştururlar. E vitamini bu radikali tutamazsa, bu radikal oksijenle reaksiyona girerek hidroperoksit radikali oluşturur. Bu radikal de E vitamini tarafından engellenmezse, hidroperoksit radikalleri hidroperoksitler oluşturmak üzere diğer lipidlerden (muhtemelen öncelikle çoklu

doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu başlatarak) hidrojen atomu ayırabilir ve böylece hücre membranları hasara uğrar (19).

2.6. ANTİOKSİDANLAR

Serbest radikal zincir reaksiyon oluşumunu engelleyerek lipid peroksidasyonu sürecini yavaşlatan antioksidanların tanımlanması son yıllarda önem kazanmıştır. Antioksidan mekanizmaların çeşitliliği reaktif oksijen türleri ile savaşmada önemli rol oynamaktadır (61). Antioksidan savunma katalaz (CAT), süperoksit dismütaz (SOD) gibi enzimler aracılığıyla olursa enzimatik antioksidan savunma; tokoferol (vitamin E), askorbik asit vb. madddelerle olursa nonenzimatik antioksidan savunma olarak tanımlanır (62).

Doğal antioksidantların en önemli gruplarını oluşturan fenolik maddeler; flavonoidler, sinnamik asit türevleri, kumarinler, tokoferoller ve fenolik asitlerdir (63, 64). Lipid oksidasyonun geciktirilmesi bakımından sentetik antioksidanlara eşit veya onlardan daha yüksek aktiviteye sahip olan biberiye, adaçayı, kekik, keten tohumu yağı, sarımsak, zeytin yaprağı, nar çekirdeği ve çay ekstraktları bileşimlerindeki fenolik bileşiklerden dolayı doğal antioksidan olarak kullanılmaktadırlar (65, 66).

Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önlemek amacıyla, serbest radikal oluşumunu önleyen, serbest radikalleri metabolize eden veya serbest radikallerin temizlenmesini arttıran maddelere antioksidan denir. Organizma, endojen veya eksojen nedenlerle oluşan serbest radikaller ve bunlara bağlı oluşan oksidatif stres ile mücadele eden kompleks bir antioksidan sistemine sahiptir (65, 67). Antioksidanlar endojen (enzimler ve enzim olmayanlar) ve eksojen kaynaklı olarak ikiye ayrılır. Endojen enzim olan antioksidanlar; süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz, katalaz (CAT), glutatyon transferaz (GST), glutatyon redüktaz ve mitokondrial oksidaz sistemidir (65, 66, 67). Süperoksit Dismutaz (SOD); süperoksit radikalinin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimidir.

Enzimatik olmayan endojen antioksidanlar; serbest radikalleri, radikal olmayan ve toksik olmayan moleküllere dönüştüren serbest radikal toplayıcılarıdır. Çoğu serbest radikal toplayıcısı, bir hidrojen atomu vererek serbest radikali nötralize eden antioksidan bileşiklerdir. Dolayısıyla antioksidanlar, serbest radikalleri indirgerler ve

kendileri de oksidize olurlar. Enzim olmayan endojen antioksidanlara örnek olarak, bilirubin, albümin, ürik asit, serüloplazmin, transferrin, ferritin ve glutatyon gibi maddeler verilebilir. Bunlar oksijen radikallerine karşı ilk savunma sistemini oluşturmaktadırlar (65, 66, 67,68). Ekzojen antioksidan olarak da allopurinol, folik asit, A, B, C ve E vitamini, flavinoidler, asetil sistein, mannitol, adenozin, kalsiyum kanal blokerleri, non-steroid antienflamatuar ilaçlar ve demir şelatörleri sayılabilir (67, 68). Plazmada antioksidanlar birbiri ile etkileşim içinde bulunurlar. Genel olarak bu maddeler sinerjist olarak çalışmaktadırlar. Bu etkileşimden dolayı, bileşenlerin tek başlarına yaptıkları etkinin toplamından daha fazla bir etki yaparak total antioksidan kapasiteyi oluşturur. Bu sinerjizme örnek glutatyonun askorbatı, askorbatın da tokoferolün yeniden aktifleşmesini sağlaması gösterilebilir. Ayrıca bir antioksidandaki azalma diğerindeki artış ile kompanse edilebilmektedir (68).

2.6.1.Keten (*Linum usitatissimum*)

Günümüzde antioksidan olarak kullanılan keten tohumunu (Linum usitatissimum), 30-100 cm boyunda, mavi çiçekli ve tek yıllık bir kültür bitkisidir. Keten tohumu yağı, yağ asitlerinin yaklaşık %55'ini oluşturan omega 3 (n-3) yağ asitlerinden alfa-linolenik asidin (ALA) en zengin kaynaklarından birisidir (69, 70, 71). Tokoferoller, yağda çözünebilen en güçlü doğal antioksidanlardır. Keten tohumu yağı α, β, γ ve δ tokoferolleri içermekte ve toplam tokoferol içeriği 40-50 mg/100 g arasında değişmektedir (72). Keten tohumu fitoostrojenik etkisi olan lignan açısından en zengin bitkilerden biridir. Yapılan çalışmalarda memeli lignan ön maddesi olan sekoisolarikiresinol diglukosid (SDG) açısından en zengin kaynaktır. Bağırsakta bakteriler tarafından memeli lignanları olan enterediol ve enterolaktona dönüştürülür. Keten tohumunda bulunan diğer önemli antioksidanlardan biri, flavonoidlerden flavan C- ve O-glikositleridir. Flavonoidler; hepatotoksinlere, serbest radikallere karşı biyolojik aktiviteye sahipken, lipid perosidasyona karşı enzim aktivitesini inhibe etmektedir. Keten tohumunu yapısındaki, tokoferoller ve flavonoidler; lipid oksidasyonunu geciktirerek; antioksidan, lignanlar; membran ATPaz aktivitesini bastırabildiğinden ve hücre çoğalması ile ilişkili enzimleri inhibe edebildiğinden tümör hücrelerinin çoğalmasını engelleyerek, antikanserojenik ve kardiovasküler hastalıklarda koruyucu olduğu bildirilirken oksidatif stresi azalttığı düşünülmektedir (72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79).

2.6.2. Nar *(Punica granatum)*

Punicaceae familyasında yer alan nar (*Punica granatum*) orta doğudaki birçok kültürün halk hekimliğinde hastalıklardan korunmak için kullanılmaktadır (80). Narın suyunun, kabuğunun ve yağının, değişik mekanizmalarla çok sayıda terapötik yarar sağlaması ile birlikte birçok araştırmacı hücre siklusunu, invazyon ve anjiyogenezi engelleyerek antikarsinojen, antioksidan ve anti-inflamatuvar özelliklere odaklanmıştır (81, 82, 83). Nar suyundaki temel antioksidanlardan fenolik yapıdaki hidrolize edilebilir antosiyaninler, polifenoller, kateşinler, gallik ve ellagik asitler olup, bu antioksidanlar nitrik oksidin oksidatif yıkımını önleyerek etki ederken, anti-inflamatuvar etkilerinin de olduğu görülmüştür. Nar antosiyanidinler en önemlisi delphinidin-3,5-diglucoside olup, H_2O_2 lipid peroksidasyonunu önleyici etkisine katkıda bulunan asıl bileşeni olduğu bildirilmiştir (84, 85). Ayrıca kabuk ve kökünün antihelmentik özellikte olduğu da mevcut çalışmalar ile desteklenmiştir (84, 85).

2.7. TOTAL ANTİOKSİDAN KAPASİTESİ

Plazma ve serumda antioksidanlar etkileşim halindedirler. Vücut sıvılarında bulunan bütün antioksidanların toplam etkisini total antioksidan kapasite (TAK), oksidanların toplam etkisini ise total oksidan kapasite (TOK) yansıtır ve genel antioksidan/oksidan durum TAK ve TOK ölçümü ile daha kolay değerlendirilebilmektedir (52, 53).

Normalde vücudumuzda oksidanlar ve antioksidanlar arasında bir denge vardır. Total oksidan düzeyinin (TOS) total antioksidan kapasiteyi (TAK) aştığı durumlarda oksidatif stres ve doku hasarı gelişir (52, 53).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Keten Tohumu Yağı

Çalışmada kullanılan keten tohumu yağı (KTY), ticari olarak BÜKAŞ firmasından temin edilmiş olup, bileşenleri Tablo 1'de gösterildi.

3.1.2. Nar Çekirdeği Yağı

Çalışmada kullanılan nar çekirdeği yağı (NÇY), ticari olarak BÜKAŞ firmasından temin edilmiş olup, bileşenleri Tablo 2'de gösterildi.

Tablo 1. Keten tohumu yağı, yağ asitleri kompozisyonu.



Kompozisyonu (%)	
Doymuş Yağ Asitleri	
	Palmitik Asit 5,11
	Palmitoleik Asit 0,07
	Margarik Asit 0,07
	Stearik Asit 3,19
Doymamış Yağ Asitleri	
	Oleik Asit 16,33 (Omega 9)
	Linoleik Asit 16,04 (Omega 6)
	Linolenik Asit 58,86 (Omega 3)
	Araşidik Asit 0,11
	Ekosenoik Asit 0,10
	Behenik Asit 0,05
	Erusik Asit 0,07

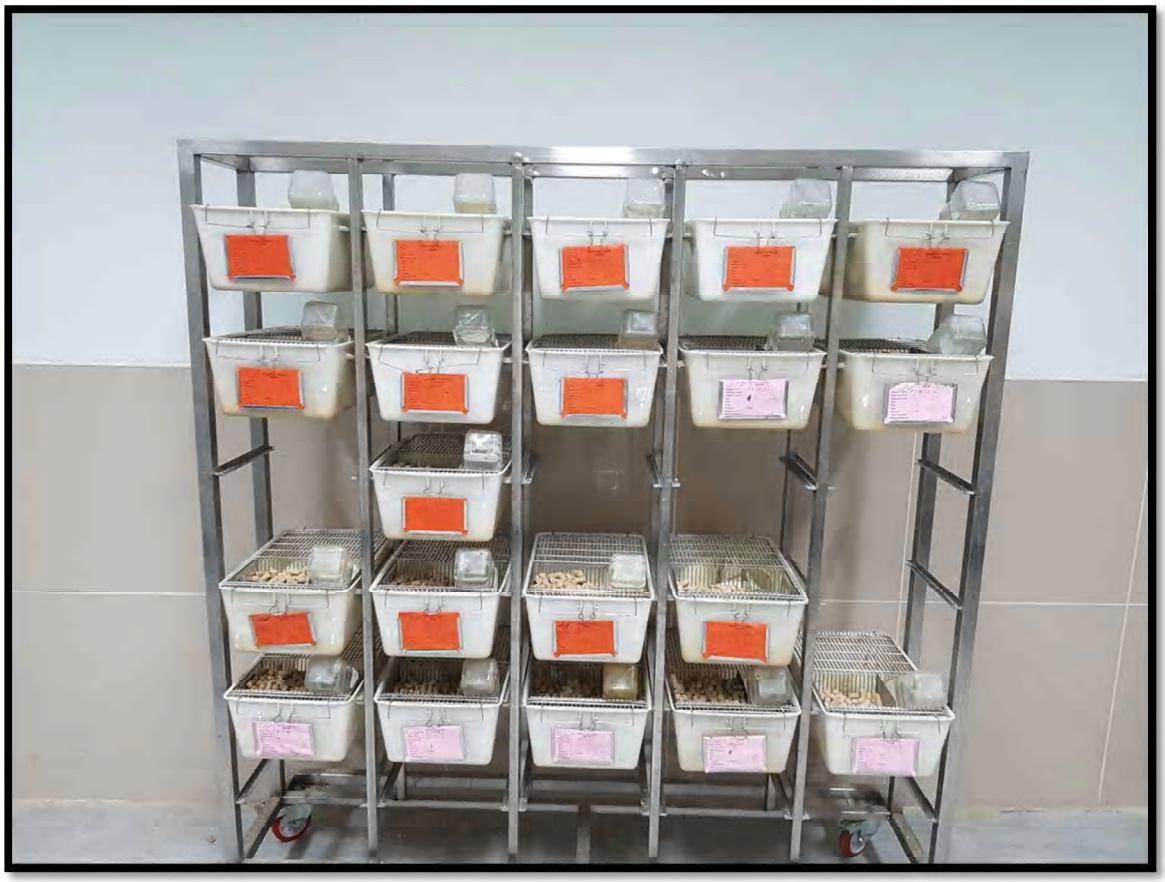
Tablo 2. Nar çekirdeği yağı, yağ asitleri kompozisyonu.



Kompozisyonu (%)	
Doymuş Yağ Asitleri	
Miristik Asit	0,09
Palmitik Asit	3,29
Palmitoleik Asit	0,12
Margarik Asit	0,05
Stearik Asit	2,13
Doymamış Yağ Asitleri	
Oleik Asit	8,66 (Omega 9)
Linoleik Asit	5,81 (Omega 6)
Linolenik Asit	0,06 (Omega 3)
Araşidik Asit	0,42
Ekosenoik Asit	0,70
Pucinic Asit	78,67

3.1.3. Deneyde Kullanılan Hayvanlar

Araştırma için Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Komitesinden 13.01.2016 tarihinde 16/008 sayı ile onay alındı. Çalışmada Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi (DEKAM)'nden temin edilen 200-250 g ağırlığında, 96 adet Wistar albino ırkı erkek rat kullanıldı. Ratlar, her kafeste beş rat olacak şekilde, pelet yem ile *ad libitum* olarak beslenerek araştırma merkezinin sahip olduğu uygun şartlar altında [(kontrollü sıcaklık (21 ±2°C), nem (%50±5), hava değişimi (saatte 12 devir), sıcaklık (12 saat aydınlık, 12 saat karanlık)] barındırıldı (Şekil 1).



Şekil 1. Hayvanların kafeslerdeki görüntüsü.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Deney Planı

Hayvanlar akut ve kronik olmak üzere 2 gruba ayrıldı.

Akut çalışmada, her grupta 8 hayvan olmak üzere 6 grup oluşturuldu. İlk grup kontrol olarak belirlendi ve % 0,9 NaCl (1ml/kg/canlı ağırlık); ikinci ve üçüncü gruplara 4 hafta her gün sırası ile 4 ml/kg/canlı ağırlık dozunda KTY ve 2 ml/kg/canlı ağırlık dozunda NÇY gavaj ile verildi. Dördüncü gruba 1:1 oranında mısır yağı ile dilüe edilen 1,0 ml/kg/canlı ağırlık iki doz CCl_4 ilk hafta 3 gün ara ile intraperitoneal (ip) olarak enjekte edildi. Beşinci ve altıncı gruplara 4 ml/kg/canlı ağırlık dozunda KTY ve 2 ml/kg/canlı ağırlık dozunda NÇY 4 hafta her gün, gavaj ile verilirken ilk hafta 3 gün ara ile 2 doz intraperitoneal (ip) 1 ml/kg/canlı ağırlık, 1:1 oranında mısır yağı ile dilüe edilen CCl_4 uygulandı (Tablo 3).

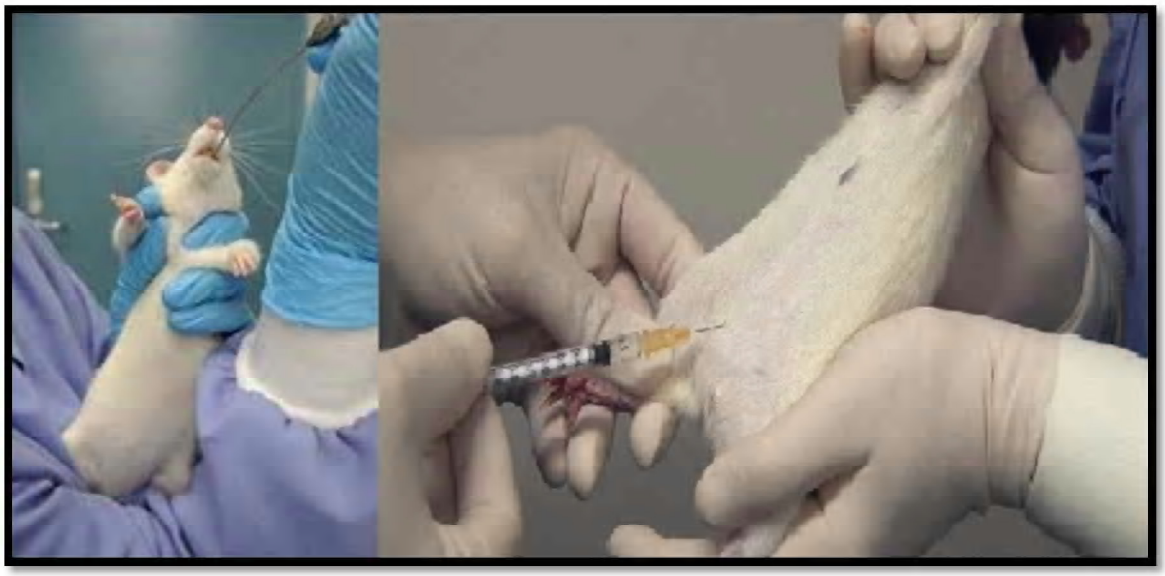
Tablo 3. Akut çalışmada oluşturulan deney grupları ve bu gruplara yapılan uygulamalar.

GRUPLAR	Uygulanan maddeler	Uygulanan Doz*	Uygulama	
			Şekli	Süresi (hafta)
Grup 1 (Kontrol)	% 0,9 NaCl	1ml/kg	*İP*	4
Grup 2	Keten Tohumu Yağı	4 ml/kg	*GAVAJ*	4
Grup 3	Nar Çekirdeği Yağı	2ml/kg	*GAVAJ*	4
Grup 4	CCl_4	1ml/kg	*İP*	3 gün ara ile iki doz/4 Hafta
Grup 5	CCl_4 /KTY	1ml/kg / 4 ml /kg	*İP/GAVAJ*	İlk hafta 3 gün ara ile iki doz/4 Hafta
Grup 6	CCl_4 /NÇY	1ml/kg / 2 ml/kg	*İP/GAVAJ*	İlk hafta 3 gün ara ile iki doz/4 Hafta
*: mg (ml) madde/ml çözücü/kg rat ağırlığı/gün				

Kronik çalışma, her grupta 8 hayvan olmak üzere 6 grup oluşturuldu. İlk grup kontrol olarak belirlendi ve % 0,9 NaCl (0,2 ml/kg/canlı ağırlık); ikinci ve üçüncü gruplara 12 hafta boyunca her gün sırası ile 4 ml/kg/canlı ağırlık dozunda KTY ve 2 ml/kg/canlı ağırlık dozunda NÇY gavaj ile verildi. Dördüncü gruba 12 hafta boyunca intraperitoneal (ip) 0,2 ml/kg/canlı ağırlık, 1:1 oranında mısır yağı ile dilüe edilen haftada iki doz CCl_4 enjekte edildi. Beşinci ve altıncı gruplara 4 ml/kg/canlı ağırlık dozunda KTY ve 2 ml/kg/canlı ağırlık dozunda NÇY 12 hafta her gün, gavaj ile verilirken, haftada 2 defa intraperitoneal (ip) 0,2 ml/kg/canlı ağırlık dozunda, 1:1 oranında mısır yağı ile dilüe edilen CCl_4 uygulandı (Tablo 4).

Tablo 4. Kronik çalışmada oluşturulan deney grupları ve bu gruplara yapılan uygulamalar.

GRUPLAR	Uygulanan maddeler	Uygulanan Doz*	Uygulama	
			Şekli	Süresi (hafta)
Grup 1 (Kontrol)	% 0,9 NaCl	0,2ml/kg	*İP*	12
Grup 2	Keten tohumu yağı	4 ml/kg	*GAVAJ*	12
Grup 3	Nar çekirdeği yağı	2 ml/kg	*GAVAJ*	12
Grup 4	CCl_4	0,2 ml/kg	*İP*	Haftada 2 kez/12 Hafta
Grup 5	CCl_4/KTY	0,2 ml/kg /4 ml/kg	*İP/GAVAJ*	Haftada 2 kez/12 Hafta
Grup 6	CCl_4/NÇY	0,2 ml/kg /2ml/kg	*İP/GAVAJ*	Haftada 2 kez/12 Hafta
*: mg (ml) madde/ml çözücü/kg rat ağırlığı/gün				



Şekil 2. Gavaj ve intraperitoneal uygulamalar.

3.2.2. Dozların belirlenmesi

Ratlarla yapılan çalışmalarda kullanılan CCl_4'ün tek doz (86, 87, 88, 89), iki doz (90), haftada üç gün (91), elli gün ve üç ay süreyle haftada iki kez (92) gibi uygulandığı süre bakımından farklılıklar gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarda CCl_4, deney hayvanlarına intragastrik sonda (87, 92), ip (89, 90) veya subkutan (91, 93) enjeksiyon gibi farklı şekillerde uygulanmıştır. Bu uygulamalar; zeytinyağı (87, 90), ayçiçek yağı (93), mısırözü yağı (89, 92) gibi farklı çözücülerle yapılmıştır. Akut çalışmalarda Arosio et al. (94) ratlara karbon tetraklorürü tek doz olarak 3 mg/kg, Kodai (95) 2 ml/kg, Ma et al. (96) 10 ml/kg, Ravikumar et al. (97) 2 ml/kg, Ali et al. (98) 1 ml/kg, Arhoghro et al. (99) 0,5 ml/kg, Ozenirler ve ark. (100) 2 ml/kg dozunda vermişlerdir. Shenoy et al. (101), Chidambara et al. (102) 0,5 ml/kg ve Singhal et al. (103) 1 ml/kg dozunda yedi gün, Shankar et al. (104), Karthikeyan et al. (105) ve Kumar et al. (106) 15 gün boyunca 72 saatte bir 1 ml/kg dozunda, Das et al. (107) 0,6 ml/kg dozunda 2 hafta boyunca haftada üç kez, Abdelaziz and Ali (108) 4 hafta boyunca haftada iki kez 0,5 ml/kg dozunda CCl_4 uygulayarak karaciğer toksisite oluşturmuşlardır.

Kronik karaciğer toksikasyonu oluşturmak amaçlı verilen CCl_4 çalışmalarında ise, Lv et al. (109) ratlara sekiz hafta boyunca haftada üç kere, Yehia et al. (86) on hafta boyunca haftada bir kere, Ochenashko et al. (110) on iki hafta boyunca haftada iki kere 0,2 ml/kg dozunda, Özaslan ve ark. (111) 0,5 ml/kg, Tan et al. (112) 0,5 µL/g CCl_4'ü 6 hafta boyunca haftada bir kez, Tantawy et al (113) 0,4 ml/kg, Huang et al. (114) 2 ml/kg, Yim

et al. (115) ve Liu et al. (116) 1 ml/kg CCl_4'ü altı hafta üzeri, haftada 2 kez verdiklerini bildirmişlerdir.

Yapılan çalışmalar dikkate alınarak, akut çalışmada (90) 1:1 oranında mısır yağı ile dilüe edilen iki doz CCl_4, rat başına 1 ml/kg olacak şekilde ip olarak uygulanırken, kronik çalışmada ise 1:1 oranında mısır yağı ile dilüe edilen CCl_4 haftada iki kere üç ay süre ile rat başına 0,2 ml/kg olacak şekilde (91, 110), ip olarak uygulandı ve daha önce yapılan çalışma sonuçları (90, 91, 110) ile uyumlu olarak hepatotoksisite oluşturuldu.

Keten tohumu yağı ile yapılan çalışmalarda, karaciğer toksikasyonuna karşın etki sınırlı sayıda makalede yer almaktadır (117, 118, 119, 120). Bu çalışmalarda CCl_4 toksikasyonuna karşı 3 ml/kg (117), keten tohumu yağı dozu kullanılmıştır. Karbon tetraklorür dışında toksikasyon çalışmalarında ise 2, 4, 6, 8 ml/kg (118), 0,1 ml/kg (119) ve 500 mg/kg (120) keten tohumu yağı verilmiştir.

Nar çekirdeği yağı ile yapılan çalışmalarda, karaciğer toksikasyonuna karşın etki, sınırlı sayıda makalede yer almaktadır (121, 122, 123, 124, 125). Karbon tetraklorür karaciğer toksikasyonuna karşı nar suyu 1,5 ml/kg (126), 6 ml/kg (86), 30 ml/kg (127), nar çekirdeği ekstraktı 100 mg/kg (128), 300 mg/kg (129), 200, 400, 600 mg/kg (130), nar çekirdeği yağı 3 ml/kg (124), 0,15 ml/kg (125) şeklinde kullanılmıştır. CCl_4 dışında toksikasyon çalışmalarında ise 0,15ml/kg (121), 0,4□ml/kg-0,8□ml/kg (122), 0,16, 0,32 ve 0,64 mg/kg (123) nar çekirdeği yağı verilmiştir.

Çalışma ile ilgili keten tohumu yağı (117, 118, 119, 120) ve nar çekirdeği yağı (121, 122, 123, 124, 125) dozu belirlemede bu konuda yapılmış çalışmalardaki sonuçlara göre seçilmiştir.

3.2.3. Doku ve Kan Örneklerinin Alınması

Çalışma gruplarındaki ratların son uygulamadan 24 saat sonra intramuskuler 80 mg/kg ketamin (alfamine, 100 mg/ml, Ata-Fen) ve 12 mg/kg ksilazin (alfazyne, 20 mg/ml, Ata-Fen) (131) ile ip anestezi sağlandıktan sonra göğüs ve karın boşlukları açılıp, intrakardiyak kan örnekleri antikoagulantlı ve antikoagulantsız tüplere alınarak nekropsileri yapıldı. Alınan kan örnekleri 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek plazma ve serumları ayrıldı. Alınan tüm doku örnekleri ışık mikroskobik incelemeler için % 10'luk tamponlu nötral formalin solüsyonuna konuldu (132). Karaciğer dokusunun bir

kısmı MDA ve TAK'nin belirlenmesi amacıyla çalışma gününe kadar -80°C'de saklandı.

3.2.4. Histopatolojik İnceleme

Tamponlu nötral formalin ile tespit edilen karaciğer ve diğer organlara (beyin, akciğer, kalp, böbrek, dalak, mide, ince ve kalın bağırsaklar) ait doku örnekleri 48 saat sonunda trimleme işlemini takiben çeşme suyunda yıkandıktan sonra Leica TP 1020 otomatik doku takip cihazında aşağıdaki doku takip basamaklarından geçirildi (Tablo 5).

Tablo 5. Doku takip yöntemi.

Sıra	Yapılan işlem	Süre
1	% 70 alkol	1 saat
2	% 80 alkol	1 saat
3	% 96 alkol	1 saat
4	% 96 alkol	1 saat
5	% 96 alkol	1 saat
6	Absolü alkol	1 saat
7	Absolü alkol	1 saat
8	Absolü alkol	1 saat
9	Ksilen	1 saat
10	Ksilen	1 saat
11	Parafin I	2 saat
12	Parafin II	2 saat

Doku takip işlemleri tamamlanan karaciğer ve diğer organlara (beyin, akciğer, kalp, böbrek, dalak, mide, ince ve kalın bağırsaklar) ait doku örnekleri parafine gömüldü. Hazırlanan parafin bloklardan mikrotom yardımıyla 5 µm kalınlığında kesitler lamlara alındı. Kesitler 1 saat 60°C etüvde bekletilerek parafinin erimesi sağlandıktan sonra Hematoksilen-Eosin (HxE) boyama yöntemleri (132) uygulandı (Tablo 6).

Tablo 6. Hematoksilen-Eozin boyama yöntemi.

Sıra	Yapılan İşlem	Süre
1	Ksilen-I	15 dakika
2	Ksilen-II	15 dakika
3	Absolu alkol-I	10 dakika
4	Absolu alkol-II	10 dakika
5	% 96 Alkol	10 dakika
6	% 80 Alkol	10 dakika
7	% 70 Alkol	10 dakika
8	% 50 Alkol	10 dakika
9	Akarsu	5 dakika
10	Hematoksilen	7-8 dakika
11	Akarsu	5 dakika
12	Eozin	4-5 dakika
13	Akarsu	5 dakika
14	% 50 Alkol	10 dakika
15	%70 Alkol	10 dakika
16	% 80 Alkol	10 dakika
17	% 96 Alkol	10 dakika
18	Absolu alkol-I	10 dakika
19	Absolu alkol-II	10 dakika
20	Ksilen-I	15 dakika
21	Ksilen-II	15 dakika
22	Kapatma	

Yağ boyası için % 10'luk tamponlu nötral formalin solüsyonunda saklanan karaciğer dokuları, Osmium tetroksit (OsO_4)solüsyonuna aktarıldı. 8 saat bu solüsyonda bekletilerek yağ dokusunun tespit olması sağlandıktan sonra rutin doku takibi işlemlerinden geçirilerek HxE boyama yapıldı (132).

Gruplardaki her bir ratın karaciğer ve diğer organlarından oluşturulan bloklardan kesitler alındı. Hazırlanan preparatlar Olympus BX51 ışık mikroskobunda incelenerek,

hasar dereceleri skorlandı. Hazırlanan preparatların fotoğrafları Olympus marka fotoğraf makinası ile çekilerek kaydedildi.

3.2.5. İmmunohistokimyasal İnceleme

Dokulardaki kaspaz aktivitesini göstermek için Avidin Biotin Peroksidaz Kompleks (ABC) tekniği, ticari kitte (Zymed, Histostain Plus Kit, California, USA) öngörülen standart prosedüre göre yapıldı. Primer antikor olarak anti caspase-3 (aktif) (Novus NB100-56113) (sulandırma oranı 1/2000), anti caspase-8 (Abcam ab25901) (sulandırma oranı 1/100) ileanti caspase-9 (Abcam ab25758) (sulandırma oranı 1/100) kullanıldı. Negatif kontrol olarak dokulara PBS (pH 7,4), pozitif kontrol olarak primer antikorların üretici firmalarının önerdiği kontrol dokularına primer antikorlar uygulandı. Hazırlanan parafin bloklardan mikrotom yardımıyla 5 µm kalınlığında kesitler adezivli lamlara alındı. Kesitler deparafinizasyon ve dehidrasyondan sonra, içerisinde sitrat buffer solüsyonu (pH 6) bulunan mikrodalgaya dayanıklı özel şalelerde sıralanarak LG marka mikrodalga fırında 500 watt 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra oda ısısına alınarak 30-35 dakika soğumaya bırakıldı. Soğumuş olan kesitler pH 7,2-7,4 PBS (0,01M Phosphate Buffer Saline)'de 3-5 dakika yıkandı ve non-spesifik antijenik bölgeleri bloke etmek için 10 dakika %3'lük H_2O_2 solüsyonunda tutuldu. PBS'de 3-5 dakika yıkandı. Doku çevresi silinerek dokular nemli bir ortamda yatay konularak üzerine primer antikor damlatıldı. Bir saat inkubasyona bırakıldı. PBS'de 3-5 dakika yıkandı. Kesit çevresi silindikten sonra sekonder antibody (biotinli) damlatılarak 30 dakika oda ısısında inkübe edildi. PBS'de 3-5 dakika yıkandı. Kesit çevresi silindikten sonra Peroxidase-streptavidin damlatılarak 30 dakika oda ısısında inkübe edildi. PBS'de 3-5 dakika yıkandı. Kesit çevresi silindi. Daha sonra DAB kromojen ile pozitif hücreler tespit edilirken, Mayer Hematoksilen ile 1-3 dakika zemin boyaması yapıldı. Daha sonra entellan ile kapatıldı.

3.2.6. Karaciğer Hasar Skorlama Yöntemi

Hematoksilen-Eozin ile boyanan kesitlerde hepatositlerde yağlanma, yangı, nekroz ve fibrozis semikantitatif olarak değerlendirildi. Semikantitatif yöntemde, her karaciğer için her bir kesitte 10 farklı alanda 10'luk ve 20'lik objektifte sayılıp sözü edilen her bir hasar parametresi ikişer patolog tarafından ortalama değer alınarak skorlandı ve yüzdelik değerler hesaplandı. Yağlanma eğer karaciğer hücrelerinin % 33'ünden az ise

1 (hafif), % 33-66 arası ise 2 (orta) ve % 66'dan fazla ise 3 (şiddetli) olarak kabul edildi. İnflamasyon, nekroz ve fibrozis 0-3 arasında derecelendirildi (yok=0, hafif=1, orta=2, şiddetli=3) (Tablo 7). Her bir grupta elde edilen değerler istatiksel olarak değerlendirildi ve gruplar arasındaki istatiksel önem kaydedildi.

Tablo 7. Karaciğerde hasar skorlama tablosu.

SKORLAMA TABLOSU				
	Yok	**Hafif**	**Orta**	**Şiddetli**
Yangı	0	1	2	3
Yağlanma	0	1	2	3
Nekroz	0	1	2	3
Fibrozis	0	1	2	3

3.2.7. Serum/Plazma Biyokimyasal Analizleri

Alınan kan örnekleri 1 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek plazma ve serumları ayrıldı. Analiz için -20°C'de saklandı. Serum ALT aktivitesi, trigliserit, total protein, albümin ve kolesterol düzeyleri Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri Merkez Laboratuvarı, Klinik Biyokimya bölümünde Roche Cobas 8000 marka otoanalizatörde ticari kitler (Roche Cobas Kit-İsviçre) kullanılarak belirlendi.

3.2.8. Karaciğer Dokusu MDA ve TAK Analizleri

Karaciğer MDA ve TAK analizleri için doku örnekleri ölçüm prosedürüne göre homojenize edildi. Süpernatantları ayrılarak analizler gerçekleşinceye kadar -80°C'de saklandı.

Karaciğer dokusu MDA düzeyleri ticari kit (Cayman, USA) kullanılarak ELISA cihazında (µQuant Bio-Tek) belirlendi. Standart için hazırlanan tüplere 100'er µl standartlardan, örnekler için hazırlanan tüplere de 100'er µl örneklerden konuldu. Tüplerin tamamına 100 µl SDS ilave edildikten sonra vorteks ile karıştırıldı. Ardından her bir tüpe 4 ml renk reaktifi eklendikten sonra tüplerin ağzı kapatılarak kaynayan

suda bekletildi. Bir saat sonunda tüpler kaynar sudan alınarak 10 dakika buz içerisinde tutuldu. İnkubasyon sonrası +4° de 1600 x g'de 10 dakika santrifüj edilip 30 dakika oda ısısında bekletildi. Hazırlanan süpernatantlardan 150'şer µl alınarak ELISA plakalarının üzerine standartlar ve örnekler için belirlenen ikişer kuyucuğa aktarıldı. Elde edilen organik fazların absorbansları 530-540 dalga boyunda ölçüldü, standart absorbansları ölçülerek standart eğrisi çizildi. Örneklerin absorbansları standart eğrisi ile karşılaştırılarak MDA düzeyleri belirlendi.

Karaciğer dokusu TAK (Total Antioksidan Kapasitesi) düzeyleri ticari kit (Rel Assay, Türkiye) kullanılarak ELISA cihazında (µQuant Bio-Tek) belirlendi. Örnekler ELISA plakları üzerinde standart ve örneklerin yerleri belirlendi. Belirlenen kuyucuklara örnek ve standart 18'er µl konuldu. Kuyucukların her bir gözüne reagent 1 eklendi. İlk absorbans 660 nm de okundu ve A1 olarak tanımlandı. Daha sonra kuyucuklara 45 µl reagent 2 eklenerek oda ısısında 5 dakika inkubasyona bırakıldı. Bir kez daha 660 nm de absorbanslar belirlenerek A2 olarak tanımlandı. Absorbanslar arasındaki fark alınarak, kit prosedürüne göre hesaplamalar yapıldı.

3.2.9. İstatistiksel Analizler

Biyokimyasal verilerin istatistiki analizleri ve karaciğer yangı yağlanma nekroz ve fibrozis skor değerleri gruplar arasında karşılaştırıldığında Kruskal Wall's test, farklılığın önemli çıktığı durumlarda Bonferoni düzeltmeli Mann Whitney U testi ile yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. KLİNİK BULGULAR

Akut ve kronik gruplarda; kontrol, KTY ve NÇY gruplarındaki ratlarda herhangi bir klinik bulgu görülmezken, CCl_4, CCl_4+KTY ve CCl_4+NÇY gruplarındaki ratlarda en belirgin olarak halsizlik, iştahsızlık, kilo kaybı, sendeleyerek yürüme ve aşırı tükürük salgısı gibi klinik bulgular gözlendi.

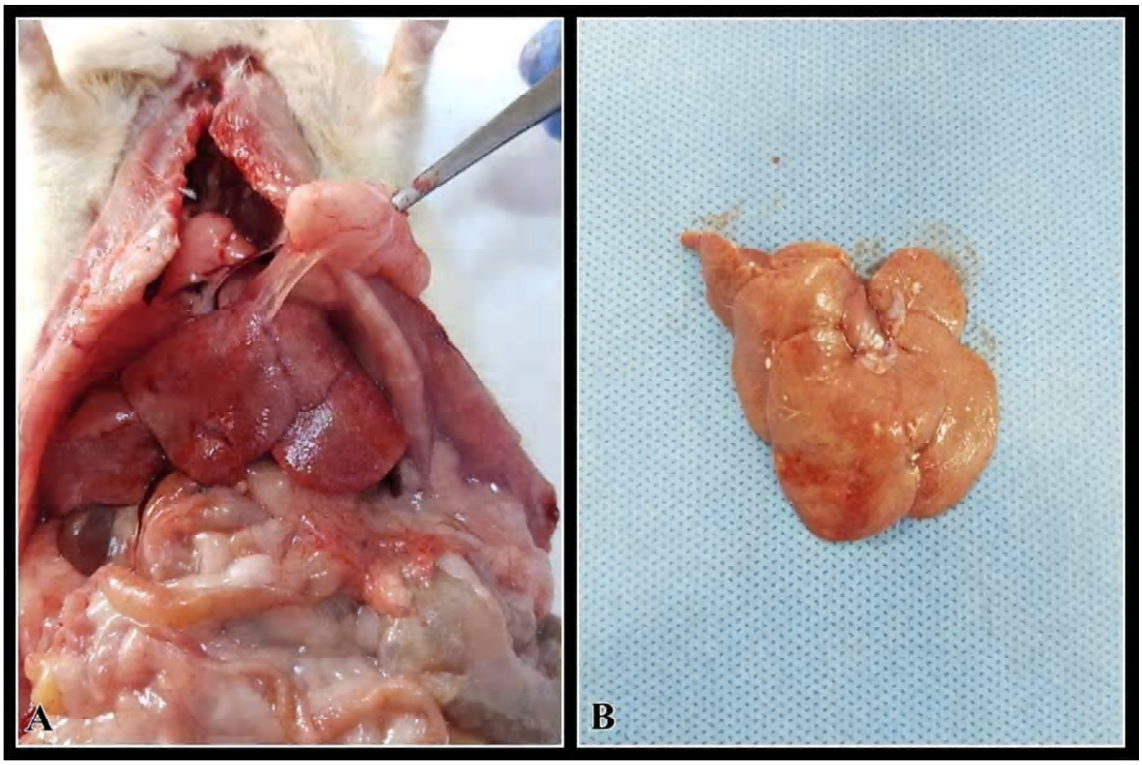
4.2. MAKROSKOBİK BULGULAR

4.2.1. Kontrol Grubu

Çalışma sonunda akut ve kronik; kontrol, KTY ve NÇY gruplarındaki ratlara yapılan nekropsilerde karaciğerler normal görünümde olup, sistemik olarak alınan diğer organ numunelerinde de patolojik lezyona rastlanılmadı.

4.2.1. Karbon Tetraklorür Grubu

Çalışma sonunda akut ve kronik; CCl_4, CCl_4+KTY ve CCl_4+NÇY deney gruplarındaki ratlara yapılan sistemik nekropsilerde karaciğerlerden bazıları koyu kırmızı, bazılarında ise beyazımsı sarımtırak renk değişimleri, hacimce artış, bazılarının ise diyaframa yapıştığı görüldü (Şekil 3AB). Ratlardan CCl_4 grubundakilerden 2 adedinde asites şekillenmişti.



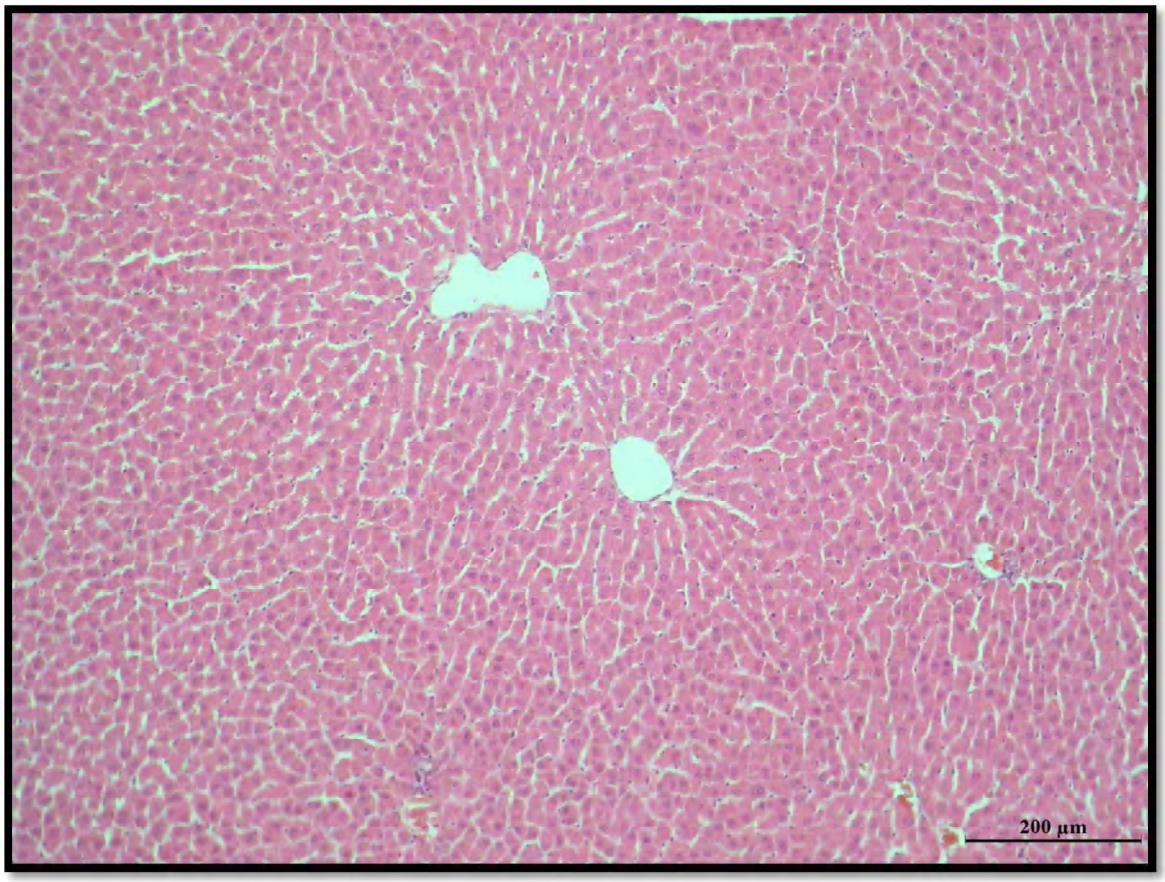
Şekil 3. Karbon tetraklorür grubundaki ratlarda karaciğerlerinde **(A)** diyaframa yapışma ve **(B)** sarımtrak renk değişimlerinin görünümü.

4.3. HİSTOPATOLOJİK VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

4.3.1. Akut Grup

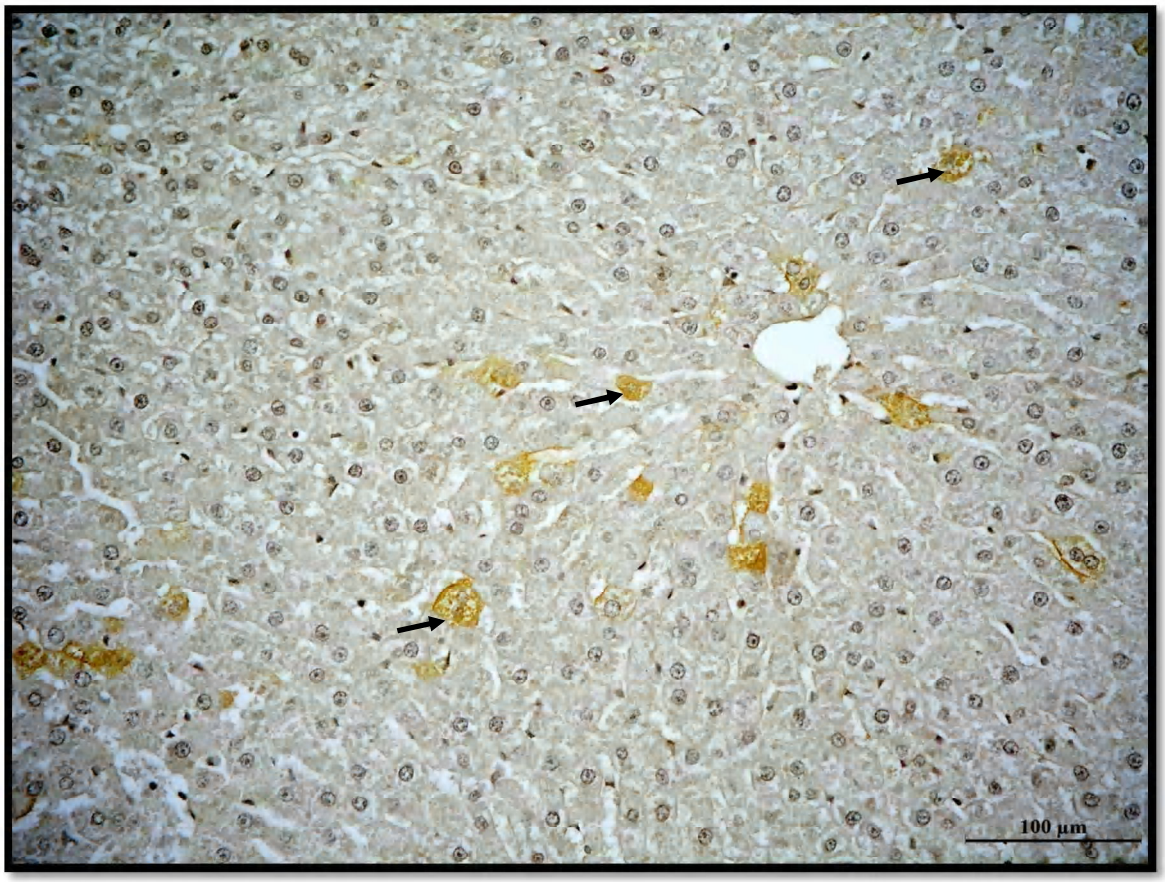
4.3.1.1. Kontrol Grubu

Çalışma sonunda bu gruptaki 8 adet ratın hepsinin histopatolojik muayenesinde karaciğer doku örneklerinin normal yapıda oldukları görüldü (Şekil 4). Aynı doku kesitlerine osmium tetroksit ile yapılan boyamada hepatositlerde yağ belirlenemedi. Sistemik olarak alınan diğer organların histolojik değerlendirmesinde herhangi patolojik bir lezyon bulunmayıp normal yapıda oldukları görüldü. Gruba ait karaciğer doku kesitlerinden yapılan histolojik hasar skorlamasında; fibrozis, yağlanma, yangı ve nekroz parametreleri açısından hasar skoru sıfırdı (Tablo 8).

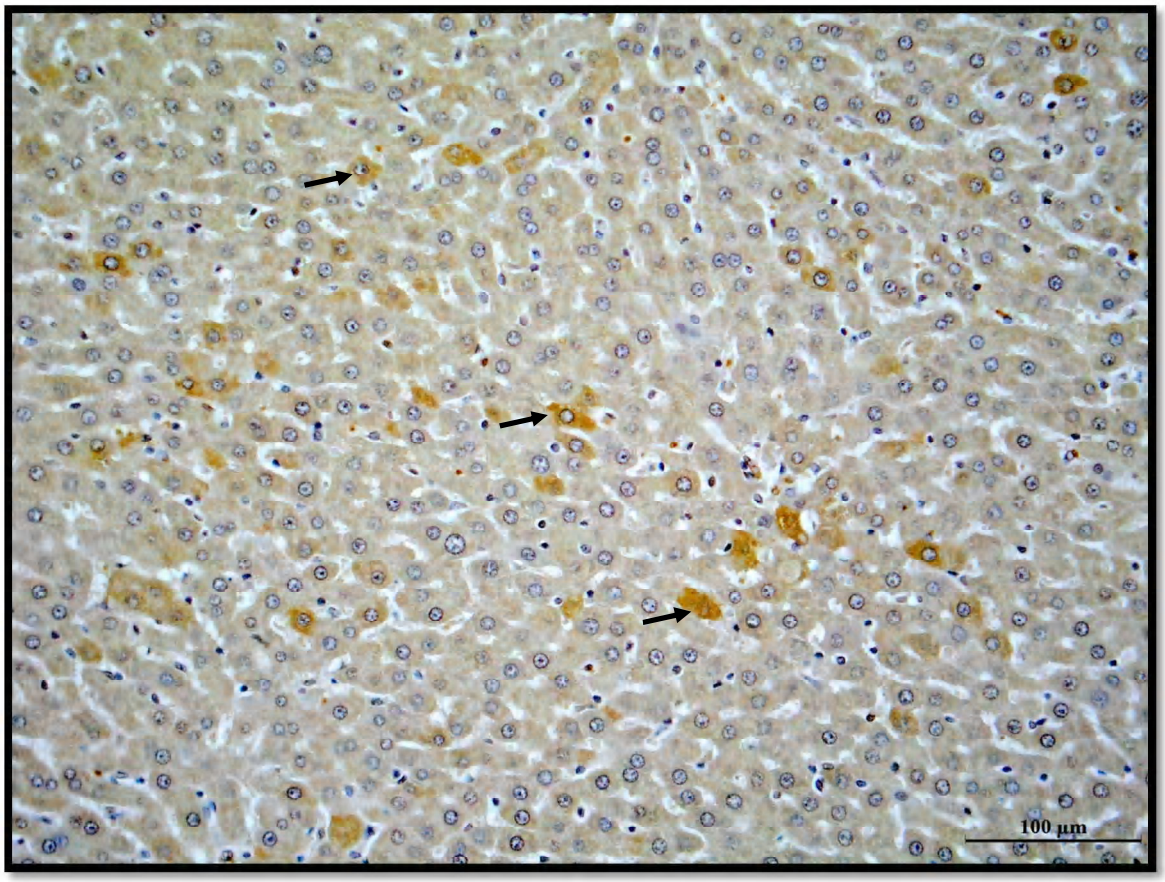


Şekil 4. Kontrol grubu; karaciğerlerin normal histolojik görünümü. Karaciğer, HxE.

Çalışma sonunda bu gruptaki 8 adet ratın hepsinin karaciğerlerinden hazırlanan doku kesitlerine kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 antikorları ile immunohistokimyasal boyama yapıldı. Kaspaz 8'de boyanma negatifti. Ancak normal apoptoza maruz kalan az sayıda hepatositte kaspaz 3 ve kaspaz 9'da pozitiflik tespit edildi. Pozitif hücrelerde sitoplazma kahverengi boyanmış olduğu görüldü (Şekil 5, 6).



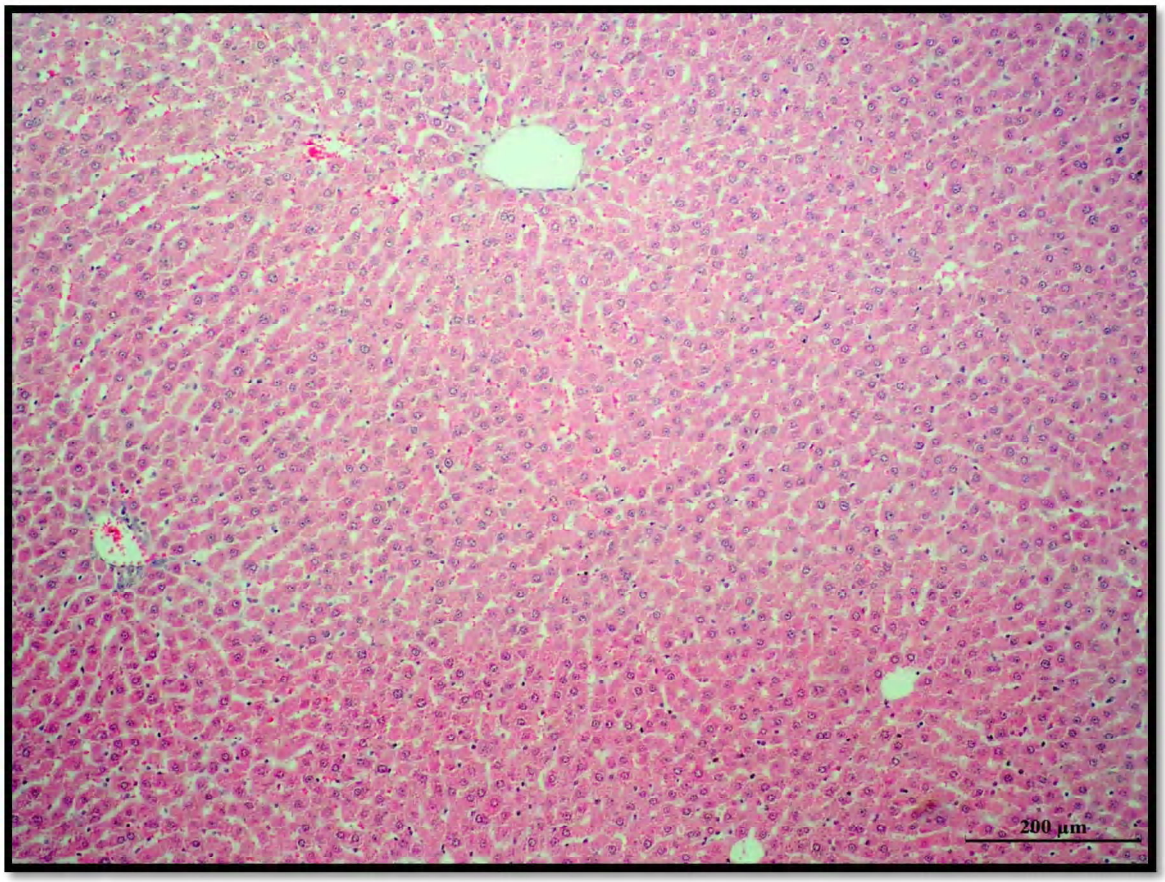
Şekil 5. Kontrol grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 3 pozitif görünümü. ABC-P.



Şekil 6. Kontrol grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 9 pozitif görünümü. ABC-P.

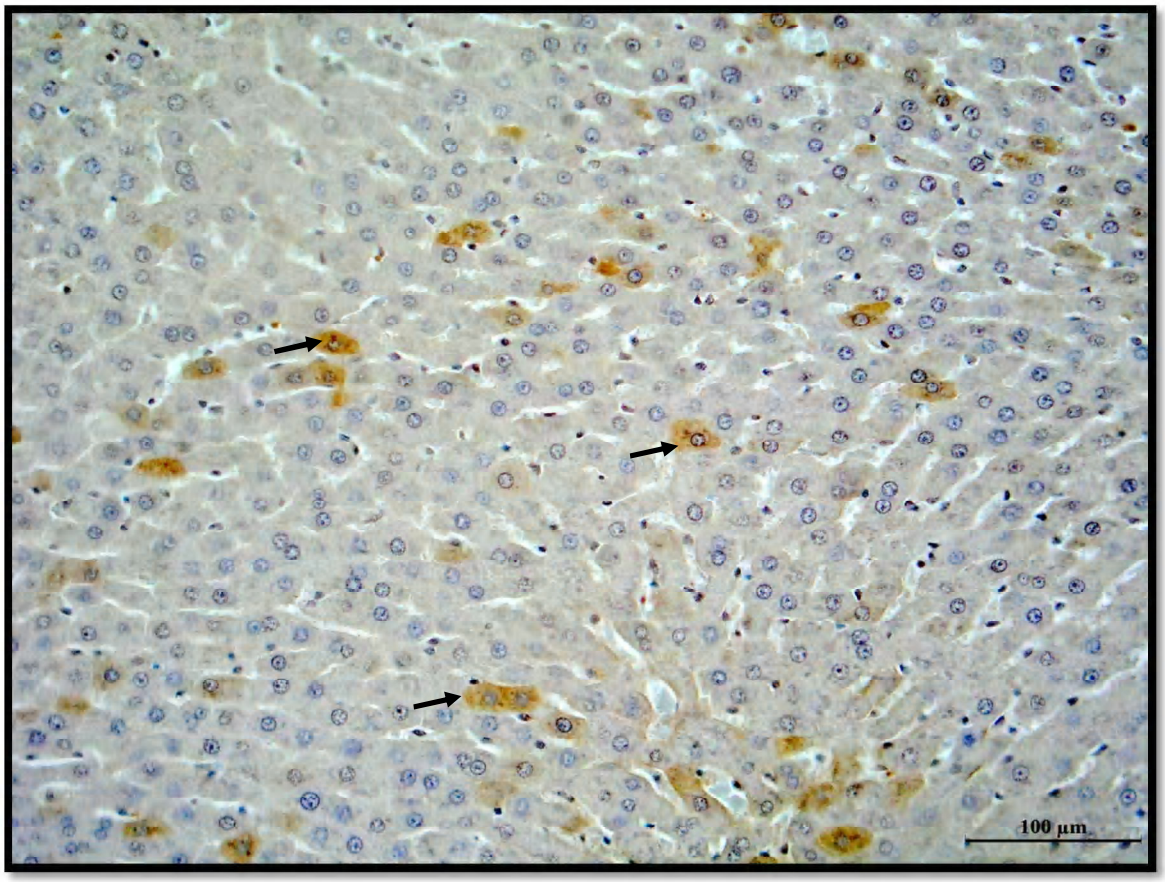
4.3.1.1.1. Keten Tohumu Yağı Grubu

Çalışma sonunda bu gruptaki 8 adet ratın karaciğer doku kesitlerinin histopatolojisinde normal yapıda oldukları görüldü (Şekil 7). Aynı doku kesitlerine osmium tetroksit ile yapılan boyamada hepatositlerde yağ belirlenemedi. Sistemik olarak alınan diğer dokuların histolojik değerlendirmesinde herhangi patolojik bir lezyona rastlanılmadı. Gruba ait tüm hayvanların karaciğer doku kesitlerinden yapılan histolojik hasar skorlaması kontrol grubu ile benzerdi (Tablo 8).

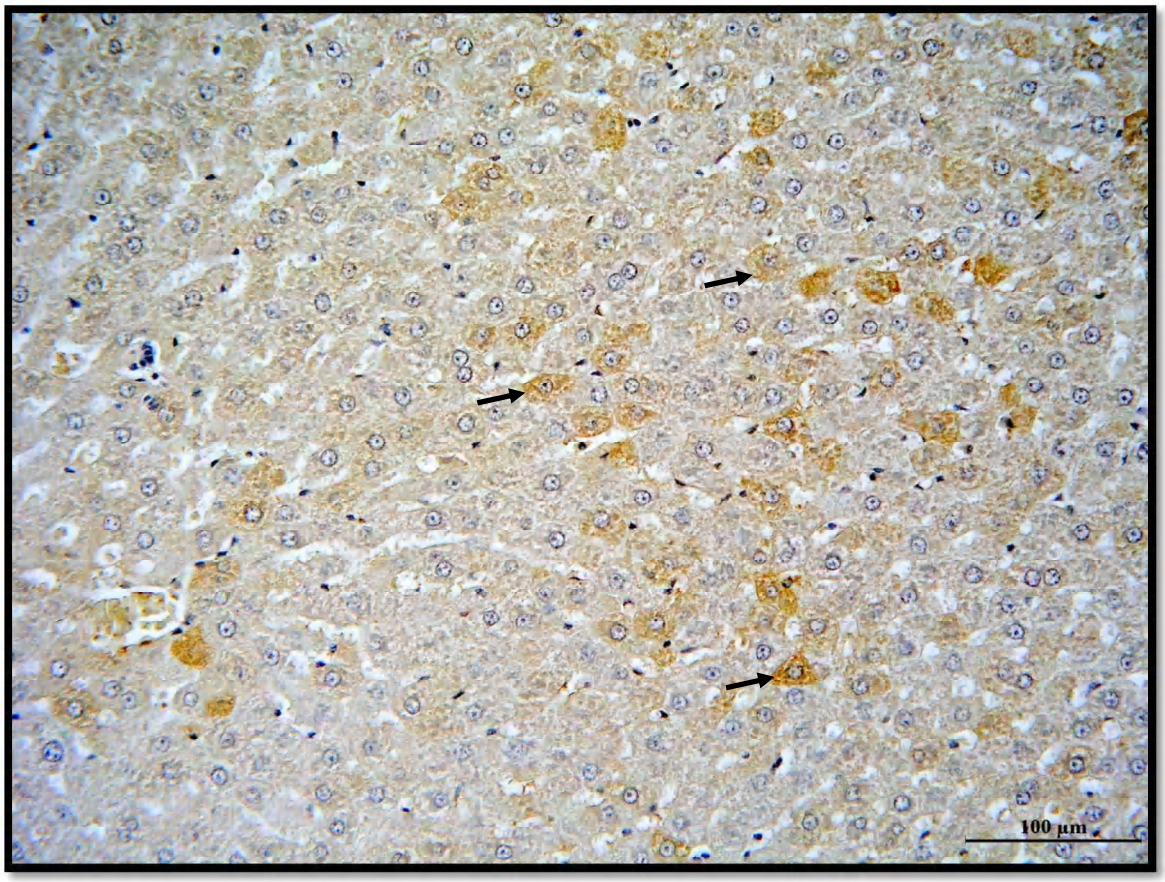


Şekil 7. Keten tohumu yağı grubu; karaciğerin normal histolojik görünümü. Karaciğer, HxE.

Çalışma sonunda bu gruptaki 8 adet ratın hepsinin karaciğer doku kesitlerine yapılan immunohistokimyasal boyamalarda; kaspaz 8'de boyanma negatifti. Ancak normal apoptoza maruz kalan az sayıda hepatositte kaspaz 3 ve kaspaz 9'da pozitiflik tespit edildi. Pozitif hücrelerde sitoplazmaların kahverengi boyandığı gözlendi (Şekil 8, 9).



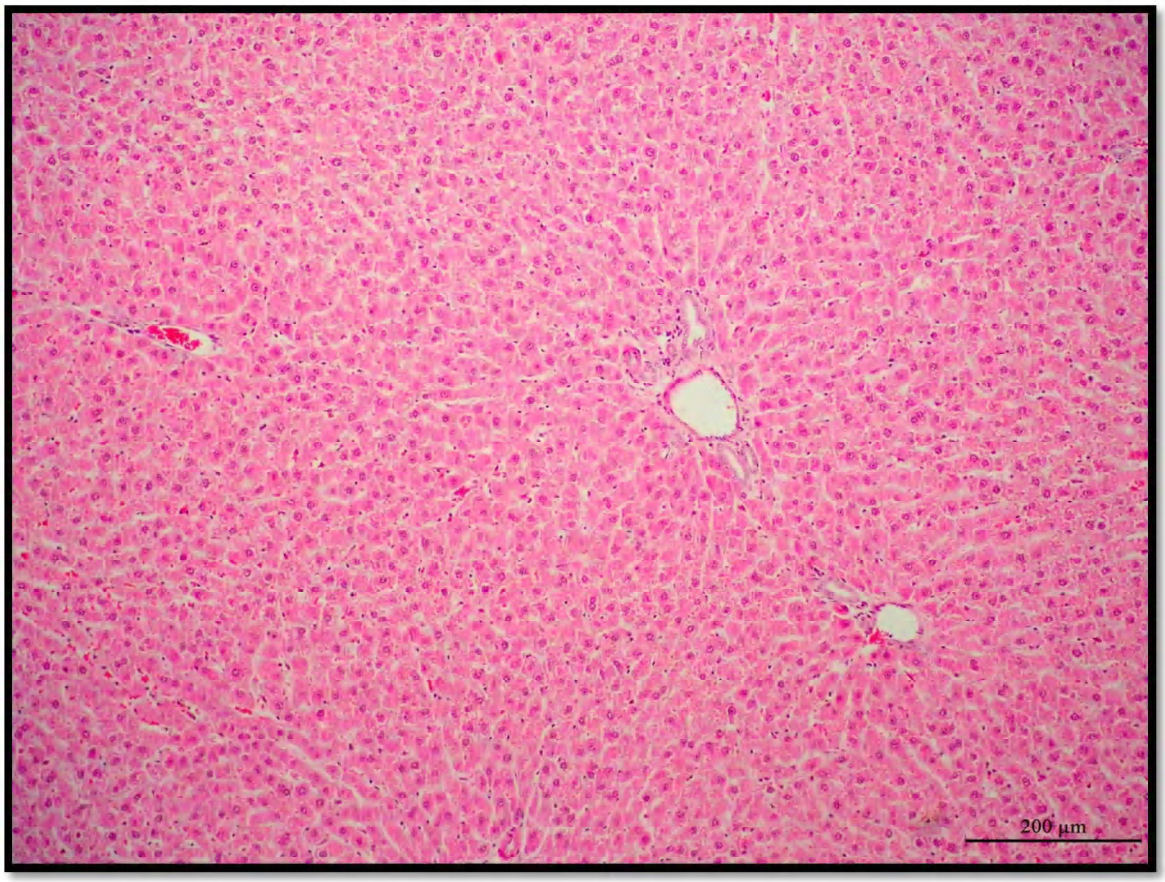
Şekil 8. Keten tohumu yağı grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 3 pozitif görünümü. ABC-P.



Şekil 9. Keten tohumu yağı grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 9 pozitif görünümü. ABC-P.

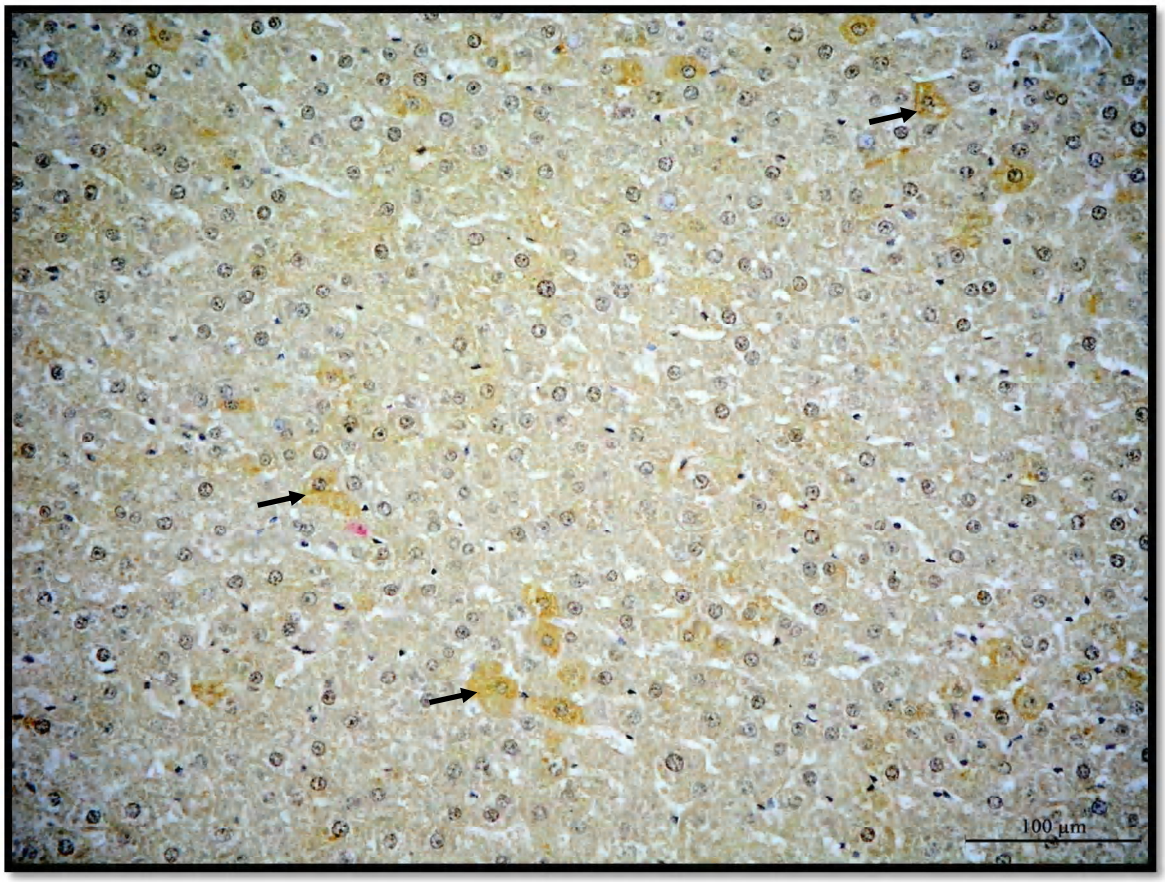
4.3.1.1.2. Nar Çekirdeği Yağı Grubu

Çalışma sonunda bu gruptaki 8 adet ratın hepsinin karaciğer doku kesitlerinin histopatolojik incelenmesinde normal yapıda oldukları görüldü (Şekil 10). Aynı doku kesitlerine osmium tetroksit ile yapılan boyamada hepatositlerde yağ belirlenemedi. Sistemik olarak alınan diğer dokuların histolojik değerlendirmesinde herhangi patolojik bir lezyon bulunmayıp normal yapıda oldukları görüldü. Gruba ait karaciğer doku kesitlerinden yapılan histolojik hasar skorlaması kontrol grubu ile benzerdi (Tablo 8).

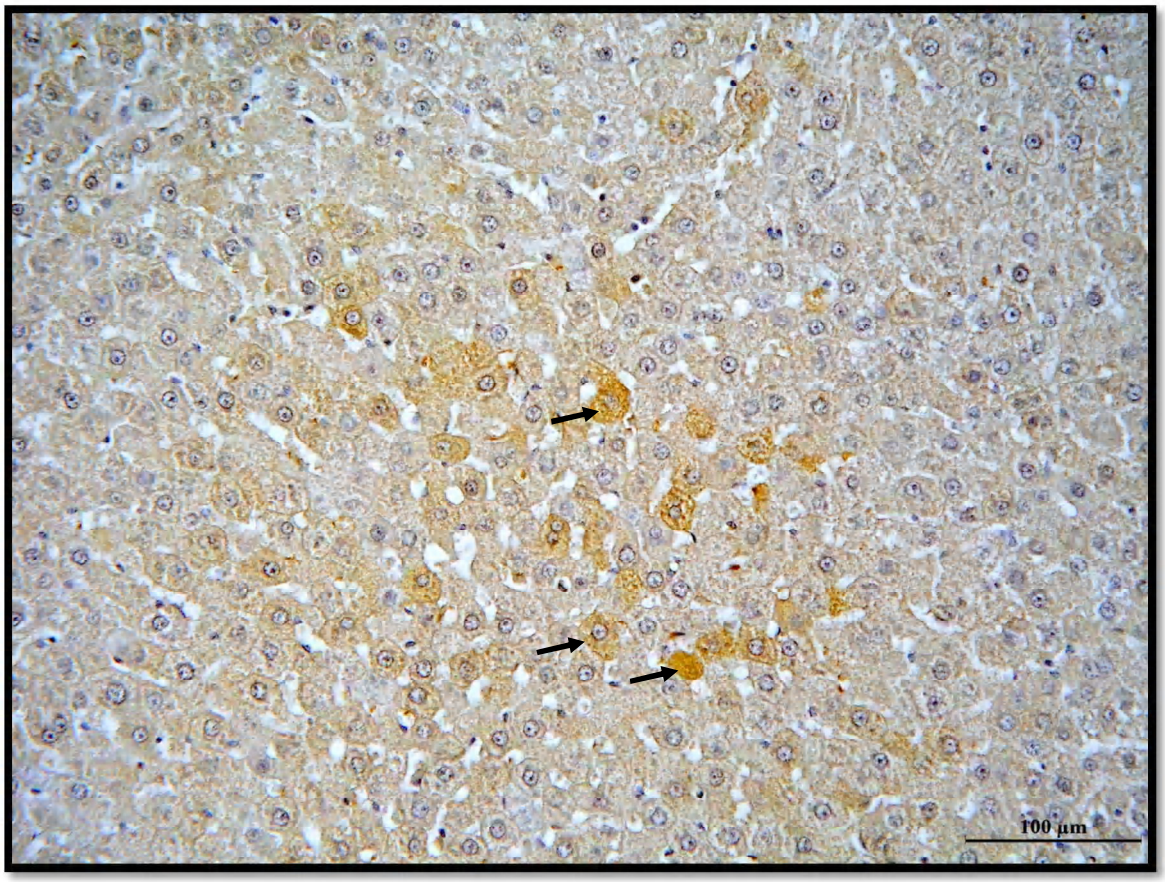


Şekil 10. Nar çekirdeği yağı grubu; karaciğerin normal histolojik görünümü. Karaciğer, HxE.

Çalışma sonunda bu gruptaki 8 adet ratın hepsinin karaciğer doku kesitlerine yapılan immunohistokimyasal boyamalarda; kaspaz 8'de boyanma negatifti. Ancak normal apoptoza maruz kalan az sayıda hepatositte kaspaz 3 ve kaspaz 9'da pozitiflik tespit edildi. Pozitif hücrelerde sitoplazmaların kahverengi boyandığı gözlendi (Şekil 11, 12).



Şekil 11. Nar çekirdeği yağı grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 3 pozitif görünümü. ABC-P.

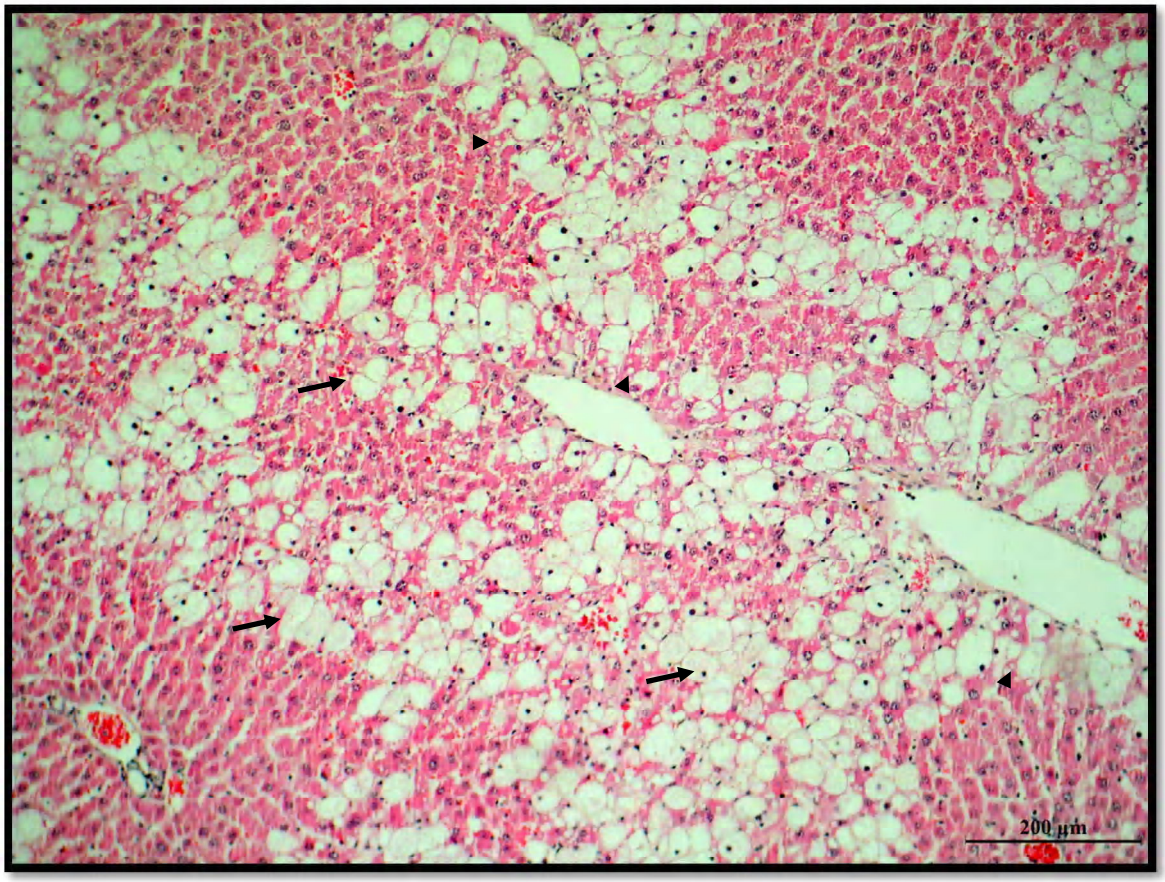


Şekil 12. Nar çekirdeği yağı grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 9 pozitif görünümü. ABC-P.

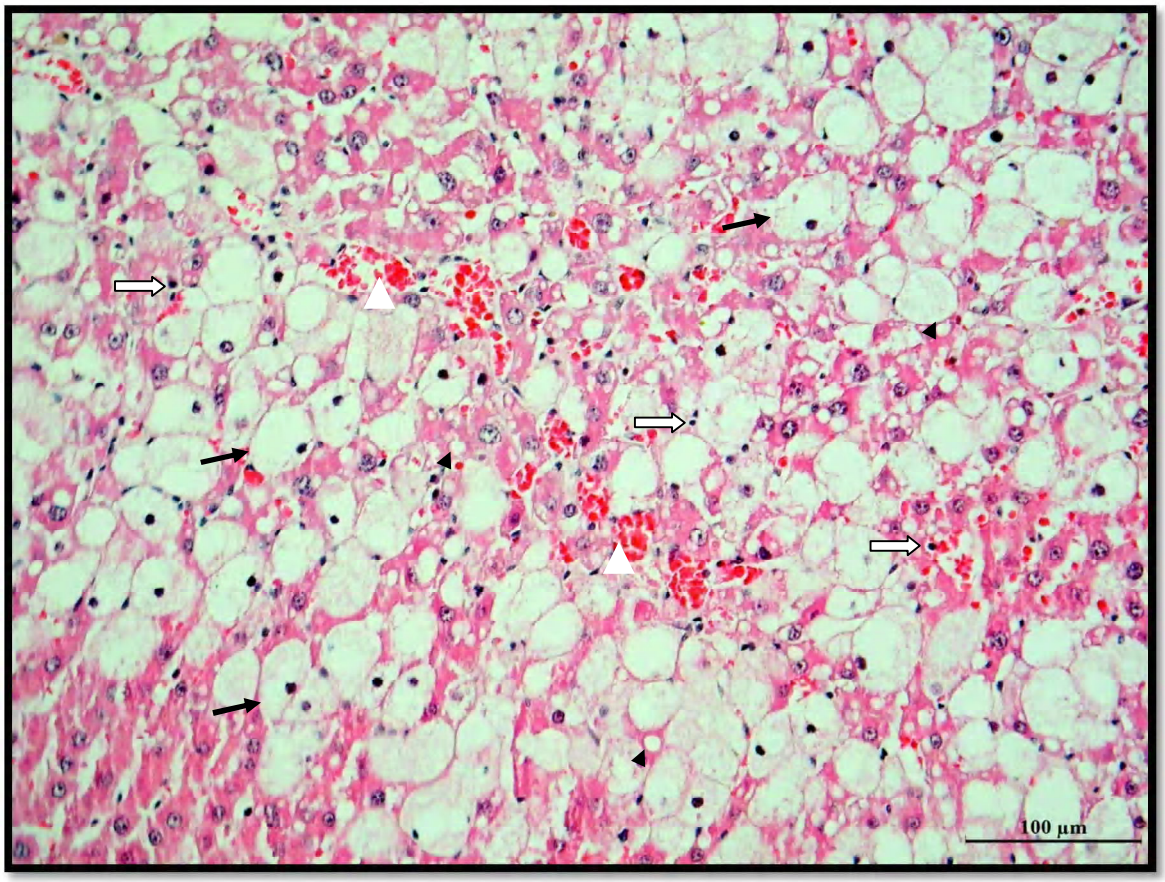
4.3.1.2. Karbon Tetraklorür Grubu

Çalışma sonunda bu gruptaki 8 adet ratın hepsinin karaciğer doku kesitlerinin histopatolojik incelemesinde hepatositlerde yoğun makro ve mikroveziküler yağ vakuolleri görüldü (Şekil 13). Bu vakuoller parankimdeki hepatositlerin çoğunda saptandı. Bu alanlarda remark kordonları yapısı bozulmuştu. Özellikle portal bölgelere yakın alanlarda, lenfositten zengin mononüklear hücre infiltrasyonları ile kupffer hücrelerinde sayıca artış ve fokal kanama alanları görülürken (Şekil 14, 15), seyrek olarak benzer yapının parankimde net olarak sınıflandırılamayan yerleşim gösteren geniş nekrotik alanların tüm parankime yayıldığı dikkati çekti. Nekrotik değişiklikler ile alan pembe homojen bir kitleye dönüşmüştü, bu alanda hepatositlerin stoplazmalarında mikroveziküler yağ vakuolleri belirgin olarak görülmekteydi (Şekil 16).

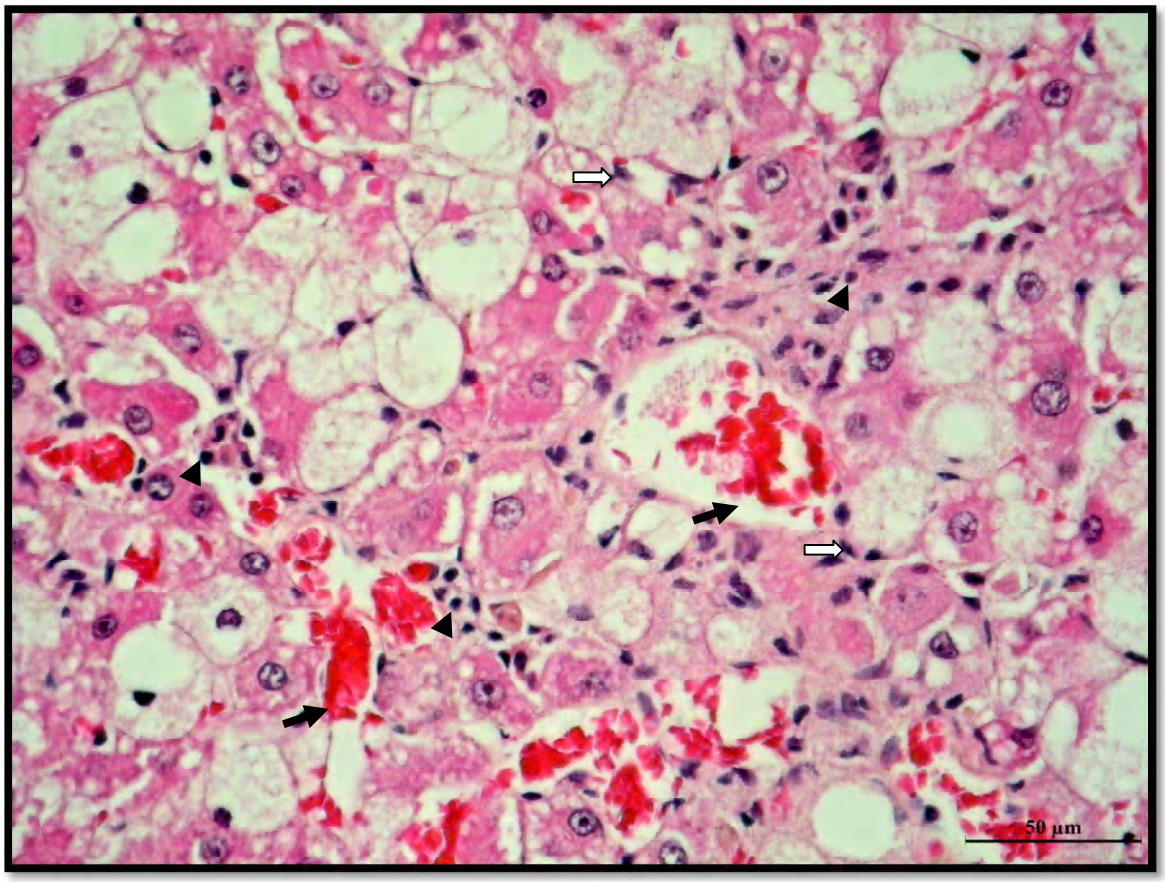
Karaciğer doku kesitlerinde CCl_4'e bağlı olarak oluşan yağlanma, yangı ve nekroz parametreleri skorlandı. Bu gruba ait hasar skorunun kontrol, KTY ve NÇY gruplarından şiddetli ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (Tablo 8). Diğer dokuların histolojik değerlendirmesinde herhangi patolojik bir lezyona rastlanmadı.



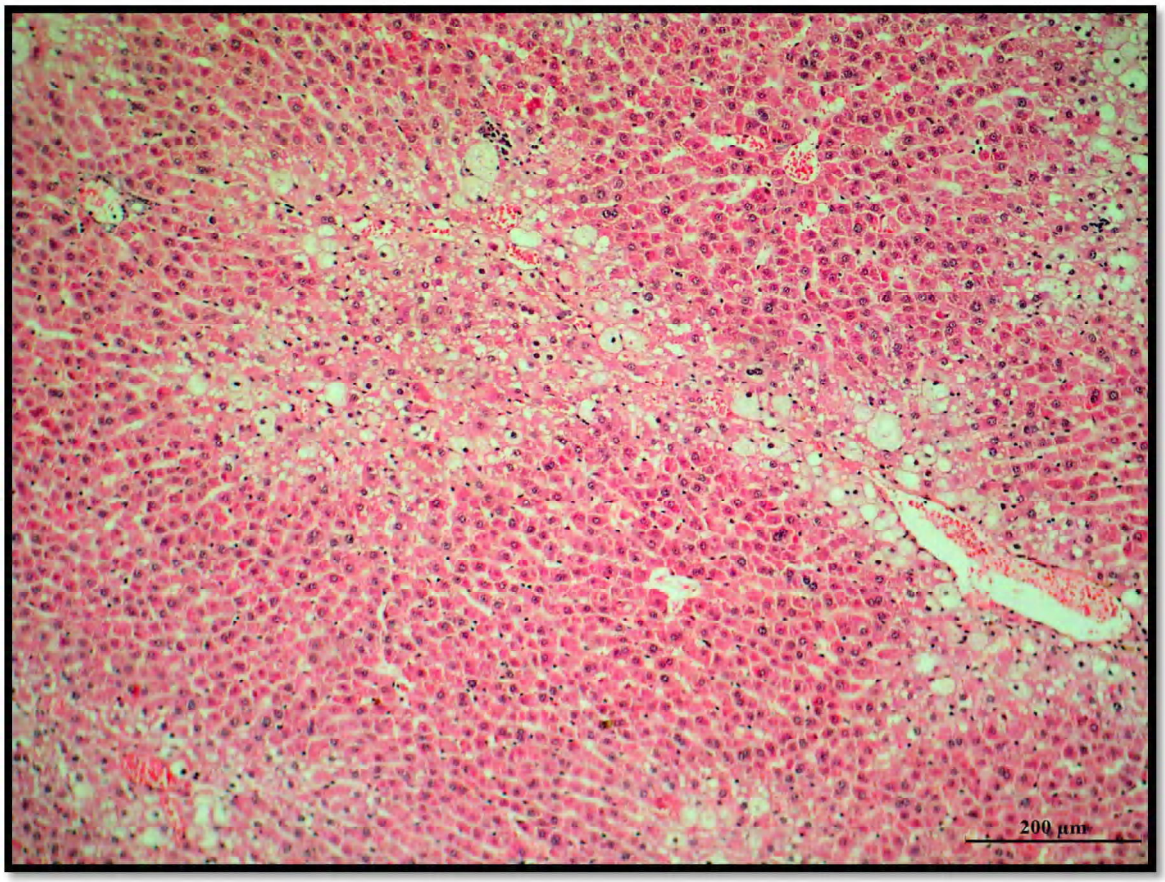
Şekil 13. Karbon tetraklorür grubu ratların hepatositlerinde yoğun makro (oklar) ve mikro (ok başları) veziküler yağ vakuolleri görünümü. Karaciğer, HxE.



Şekil 14. Karbon tetraklorür grubu ratların makro (siyah oklar) mikro (siyah ok başları) veziküler yağ vakuolleri gözlenen hepatosit alanlarında, lenfosit (beyaz ok) ve eritrositlerin (beyaz ok başları) görünümü. Karaciğer, HxE.

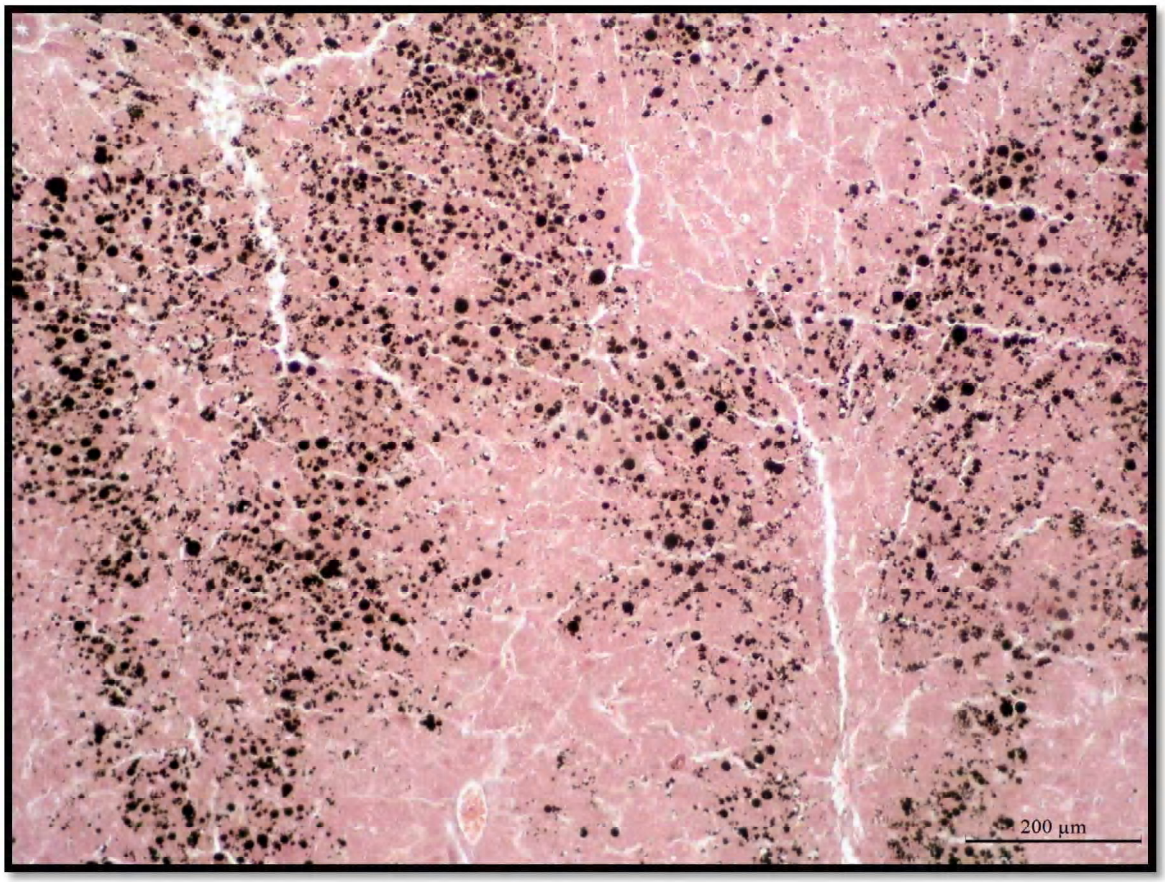


Şekil 15. Karbon tetraklorür verilen ratlarda yağ vakuolleri taşıyan hepatositler ve nekrotik alanlarda lenfositten zengin mononüklear hücre infiltrasyonu (ok başları) ile kupffer hücrelerinde sayıca artış (beyaz ok) ve fokal kanama alanlarının (oklar) görünümü. Karaciğer, HxE.



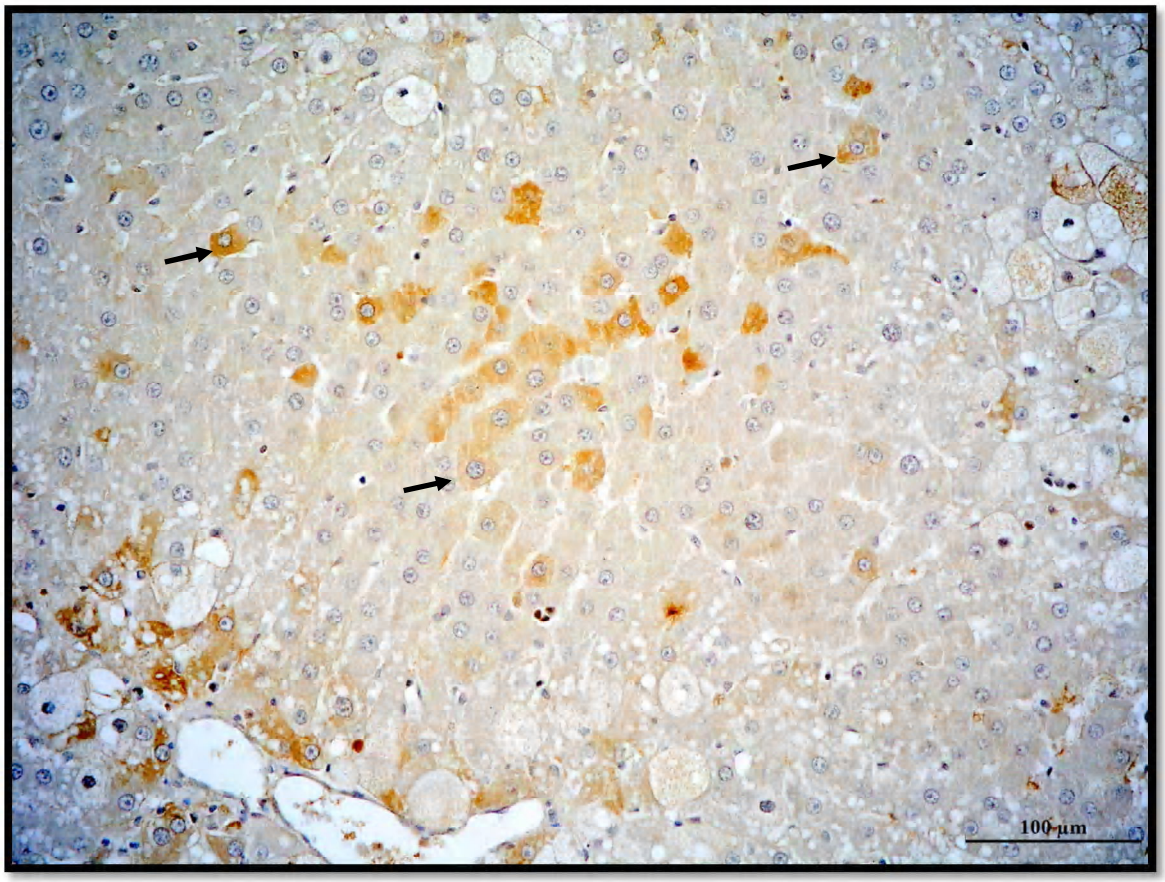
Şekil 16. Karbon tetraklorür verilen gruptaki ratlarda, karaciğer parankiminde pembe homojen renkli geniş nekroz-yağlanma alanlarının görünümü. Karaciğer, HxE.

Karaciğerden doku kesitlerinden bazılarına osmium tetroksit yağ boyası yapıldıktan sonra hepatosit sitoplazmalarında makro-mikro yağ vakuollerinin siyah renkte boyandığı dikkati çekti (Şekil 17).

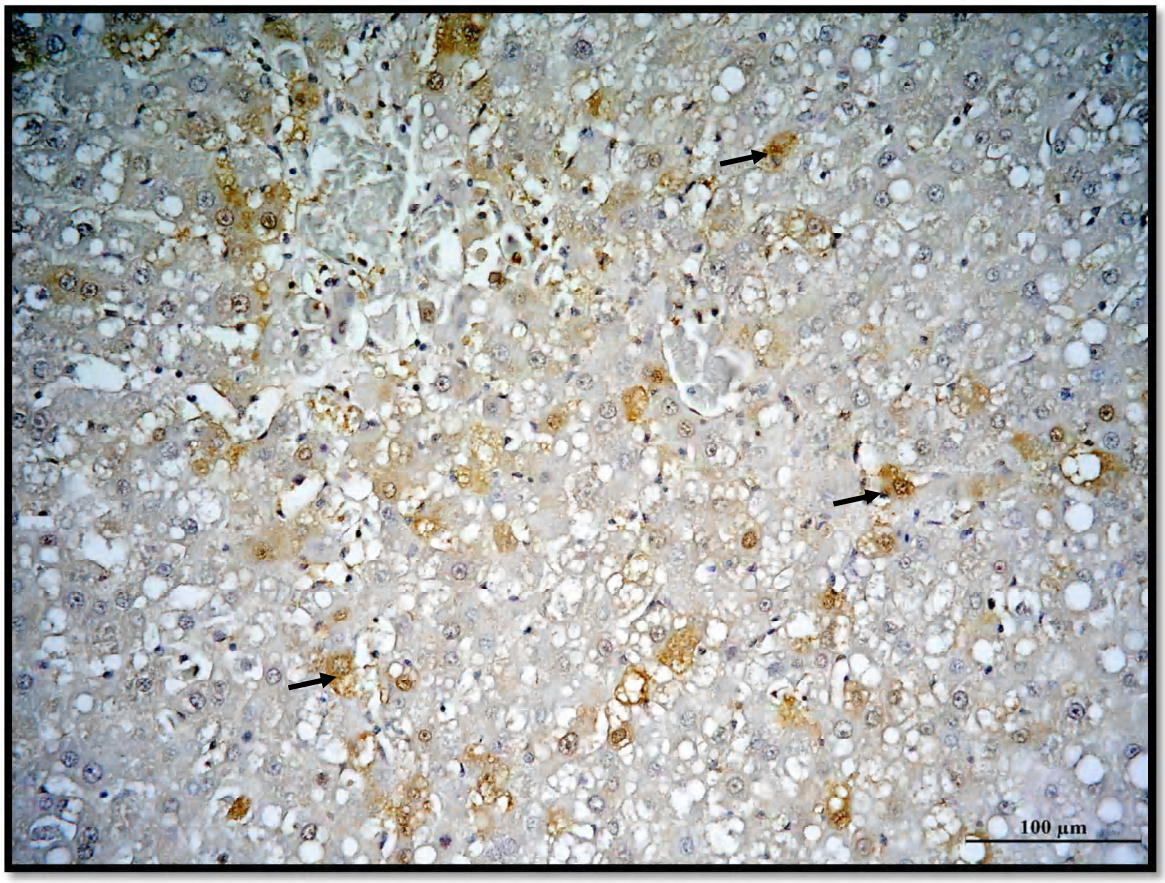


Şekil 17. Karbon tetraklorür verilen gruptaki ratların, hepatosit sitoplazmalarında makro mikro yağ vakuollerinin siyah renkte görünümü. Karaciğer, (OsO_4 fikse edilmiş) HxE.

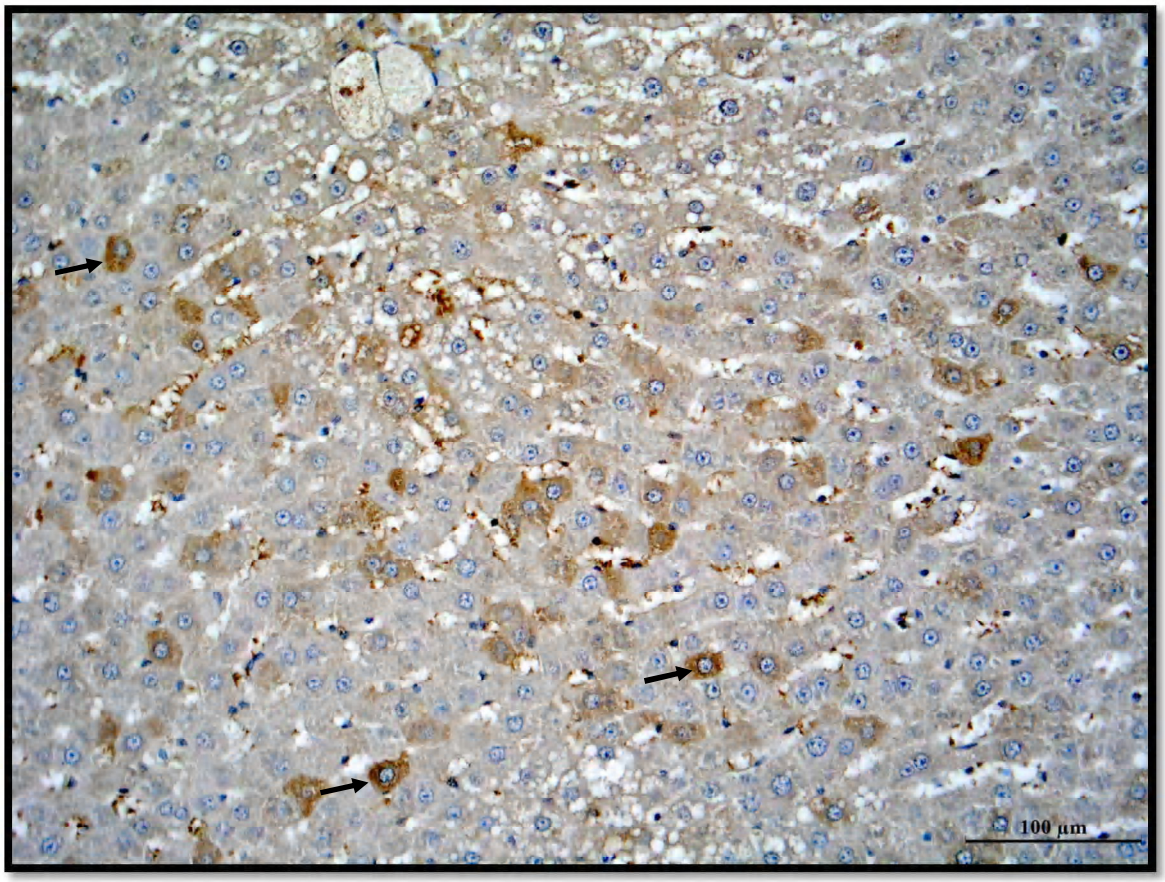
Çalışma sonunda bu gruptaki 8 adet ratın hepsinin karaciğer dokusundan hazırlanan kesitlerinin immunhistokimyasal boyanmasında; yağ vakouolleri bulunan hepatositlerin periferinde kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 pozitif hepatositler tespit edildi. Pozitif hücrelerde sitoplazmanın kahverengi boyandığı gözlendi (Şekil 18, 19, 20).



Şekil 18. Karbon tetraklorür grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 3 pozitif görünümü. ABC-P.



Şekil 19. Karbon tetraklorür grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 8 pozitif görünümü. ABC-P.

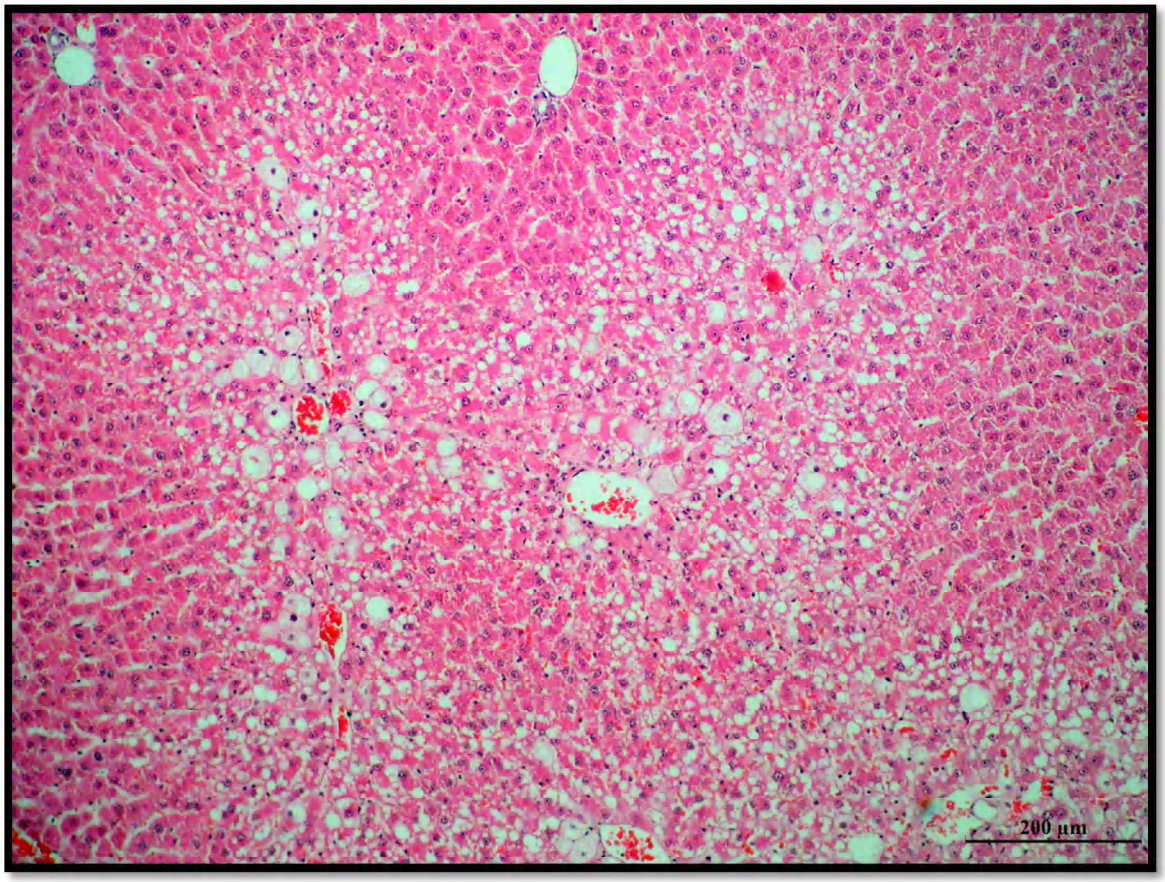


Şekil 20. Karbon tetraklorür grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 9 pozitif görünümü. ABC-P.

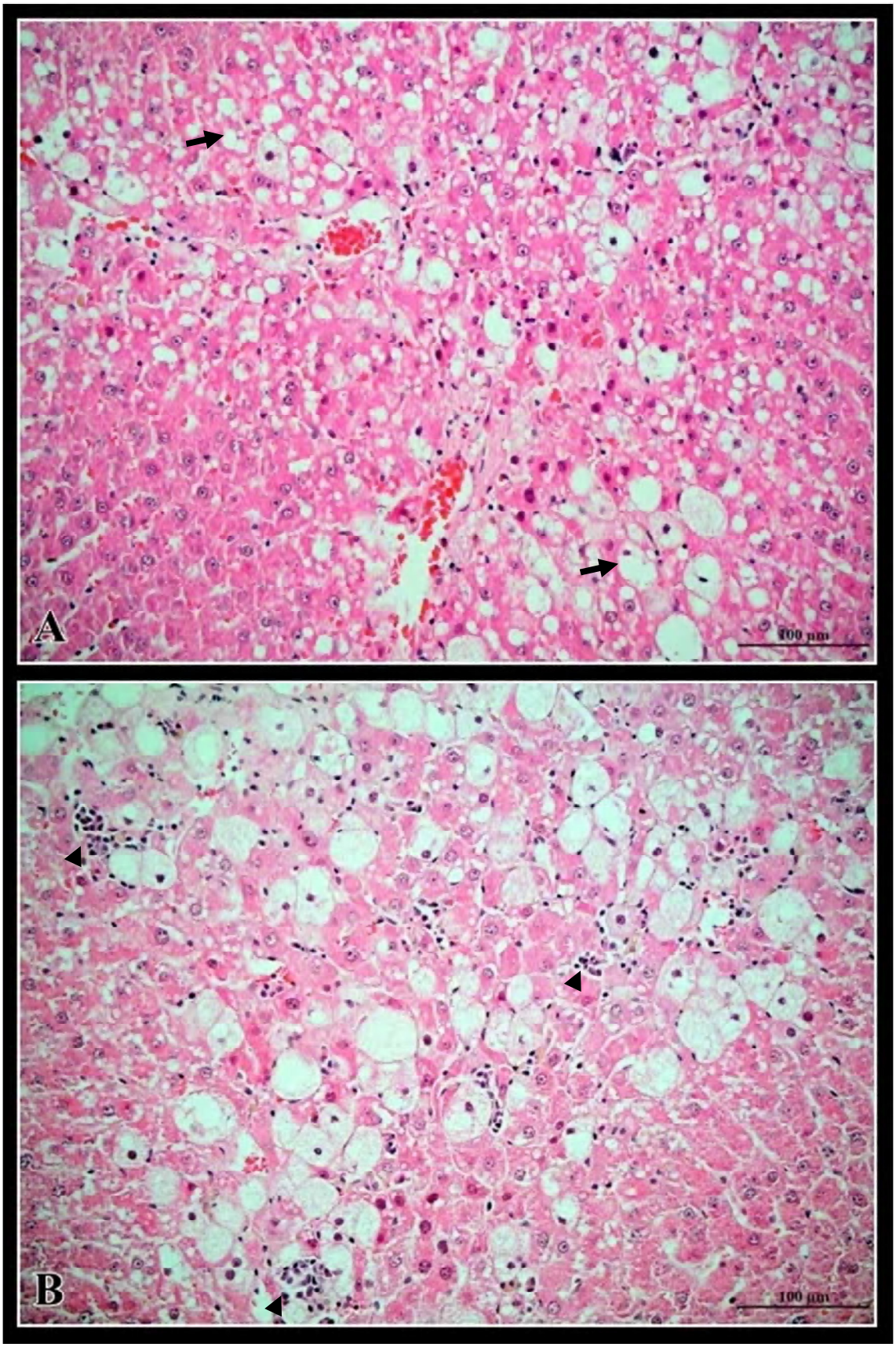
4.3.1.2.1. Karbon Tetraklorür+Keten Tohumu Yağı Grubu

Çalışma sonunda bu gruptaki 8 adet ratın hepsinin karaciğer dokularının histolojik incelemesinde hepatositlerin çoğunda yoğun şekilde makro ve mikroveziküler yağ vakuolleri görüldü (Şekil 21). Bu vakuoller parankimdeki hepatositlerin çoğunda saptandı. Bu alanlarda remark kordon yapıları bozulmuştu. Damarlar hiperemikti. Özellikle yağlanma bölgelerinde daha yoğun olmak üzere tüm parankim dokuda lenfositten zengin mononüklear hücre infiltrasyon alanları görüldü (Şekil 22AB). Parankimde net olarak yerleşim sınıflandırılması yapılamayan geniş nekroz alanlarının varlığı dikkati çekti. Bu alanlar içerisinde küçük yağ vakuolleri gözlenmekte olup, alan pembe homojen bir kitleye dönüşmüştü (Şekil 23). Histopatolojik değerlendirmede lezyonların görünümü, CCl_4 grubu ile örtüşmekteydi.

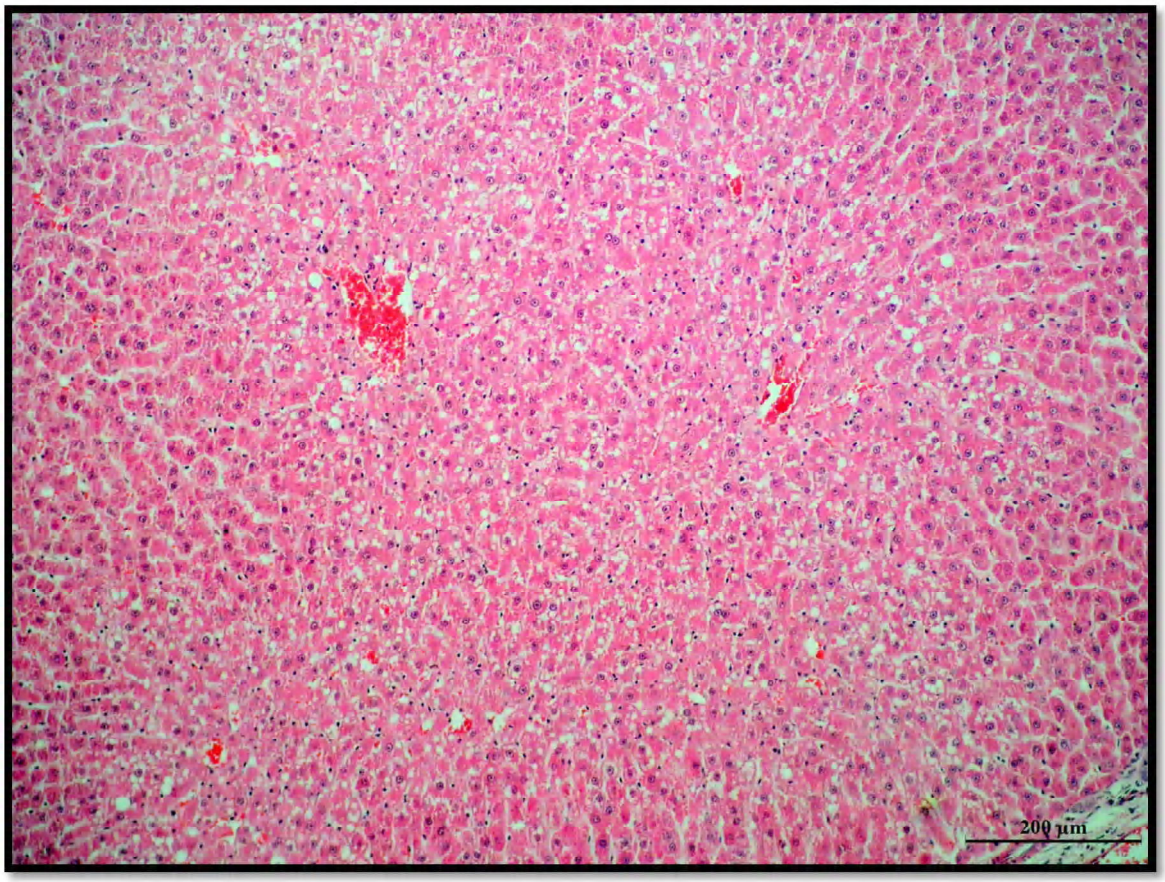
Karaciğer doku kesitlerinde CCl_4'e bağlı olarak oluşan yağlanma, yangı ve nekroz parametreleri skorlandı. Bu gruba ait hasar skorunun kontrol, KTY ve NÇY gruplarından yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (Tablo 8). Diğer dokuların histolojik değerlendirmesinde herhangi patolojik bir lezyona rastlanmadı.



Şekil 21. Karbon tetraklorür+KTY grubu ratlarda, hepatositlerde yoğun makro ve mikroveziküler yağ vakuollerinin görünümü. Karaciğer, HxE.

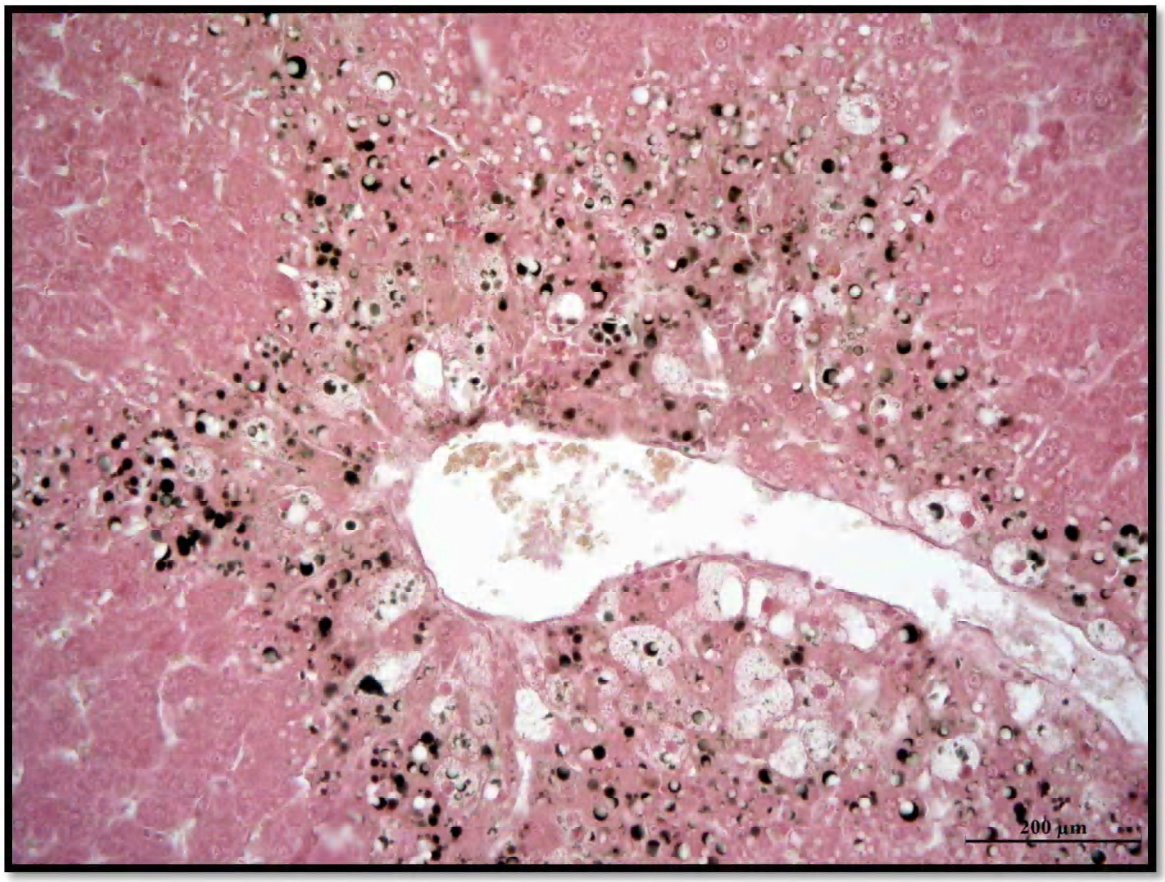


Şekil 22. Karbon tetraklorür+KTY grubu ratların karaciğer parankimlerinde **(A)** makro-mikro (oklar) yağ vakuolleri arasında **(B)** yoğun lenfositten zengin mononüklear hücre infiltrasyonları (ok başları). Karaciğer, HxE.



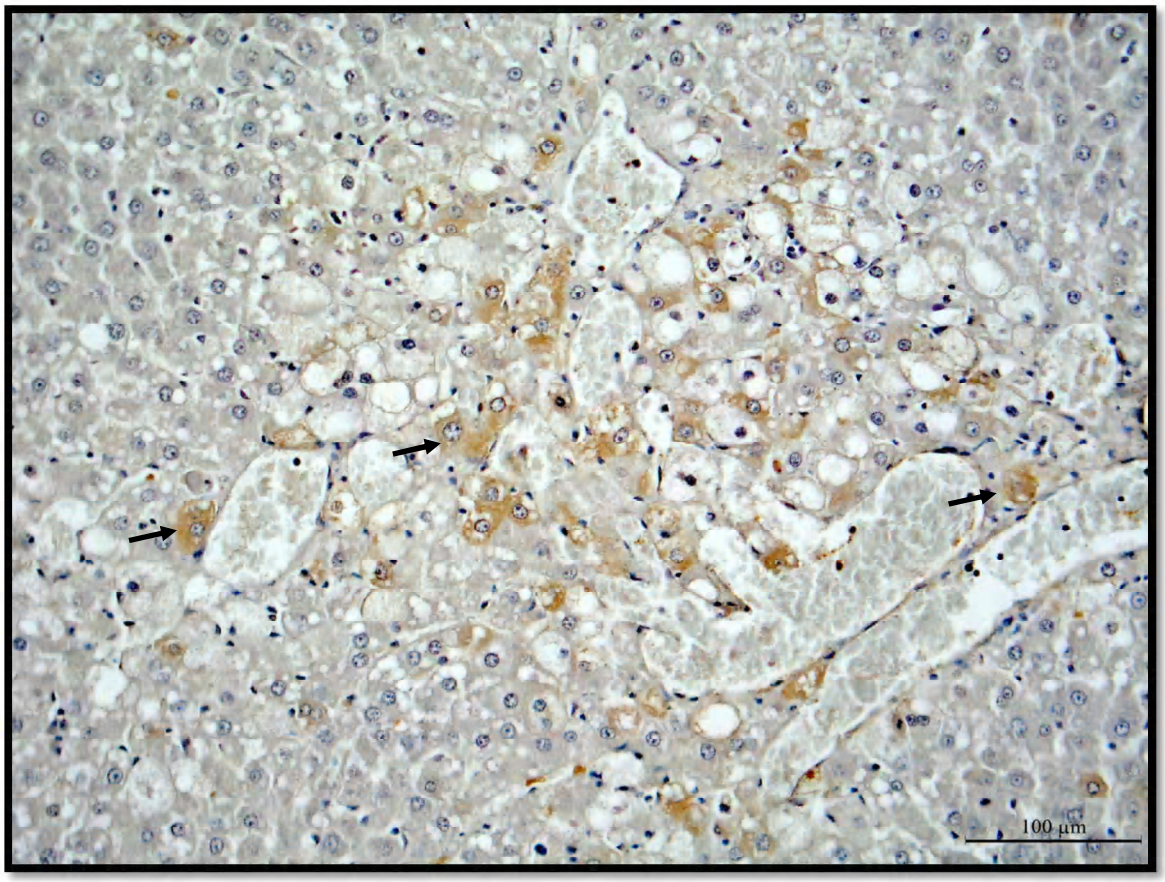
Şekil 23. Karbon tetraklorür+KTY grubu ratlarda, karaciğerde nekrotik alanlar ve bu alanlarda mikro yağ vakuollerinin görünümü. Karaciğer, HxE.

Karaciğerden alınan kesitlerden bazılarına osmium tetroksit boyaması yapıldıktan sonra özellikle makro-mikro yağ vakuollerinin olduğu alanlarda yağın siyah renkte boyandığı dikkati çekti (Şekil 24).

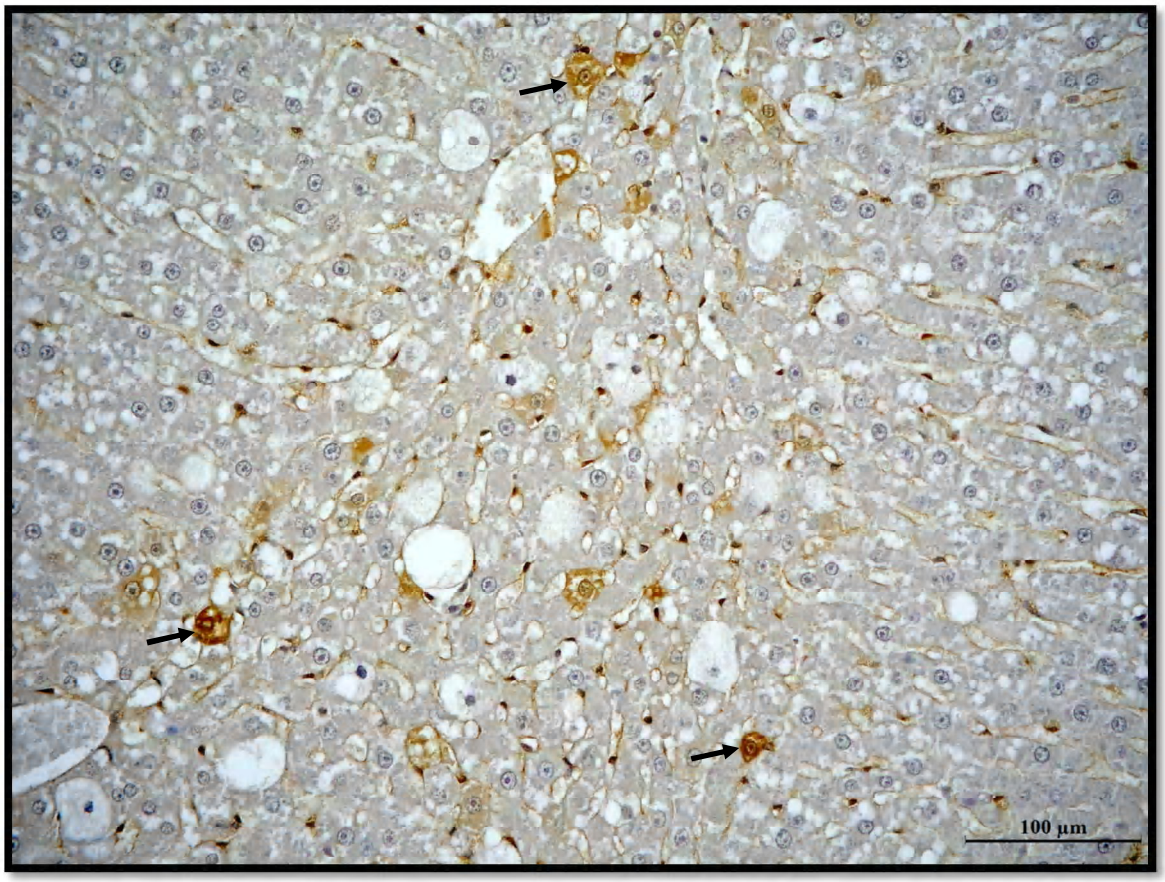


Şekil 24. Karbon tetraklorür+KTY verilen gruptaki ratların, hepatosit sitoplazmalarında makro-mikro yağ vakuollerinin siyah renkte görünümü. Karaciğer, (OsO_4 fikse edilmiş) HxE.

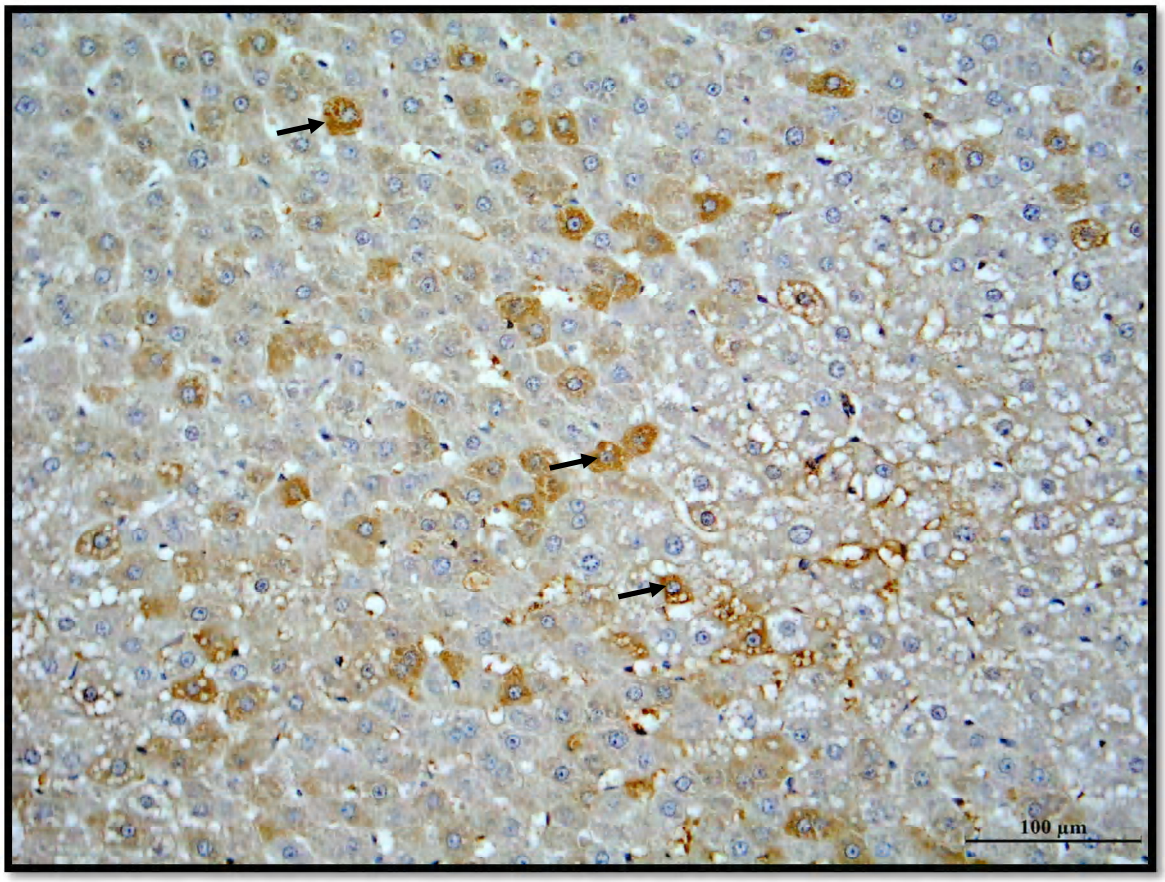
Çalışma sonunda bu gruptaki 8 adet ratın hepsinin karaciğer dokularının immunhistokimyasal incelemesinde; perivasküler, yağ vakouolleri bulunan hepatositler ve sentriasiner venlerin periferindeki hepatositlerde kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 boyamalarında pozitiflik tespit edildi. Pozitif hücrelerde sitoplazmanın kahverengi boyandığı dikkati çekti (Şekil 25, 26, 27).



Şekil 25. Karbon tetraklorür+KTY grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 3 pozitif görünümü. ABC-P.



Şekil 26. Karbon tetraklorür+KTY grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 8 pozitif görünümü. ABC-P.

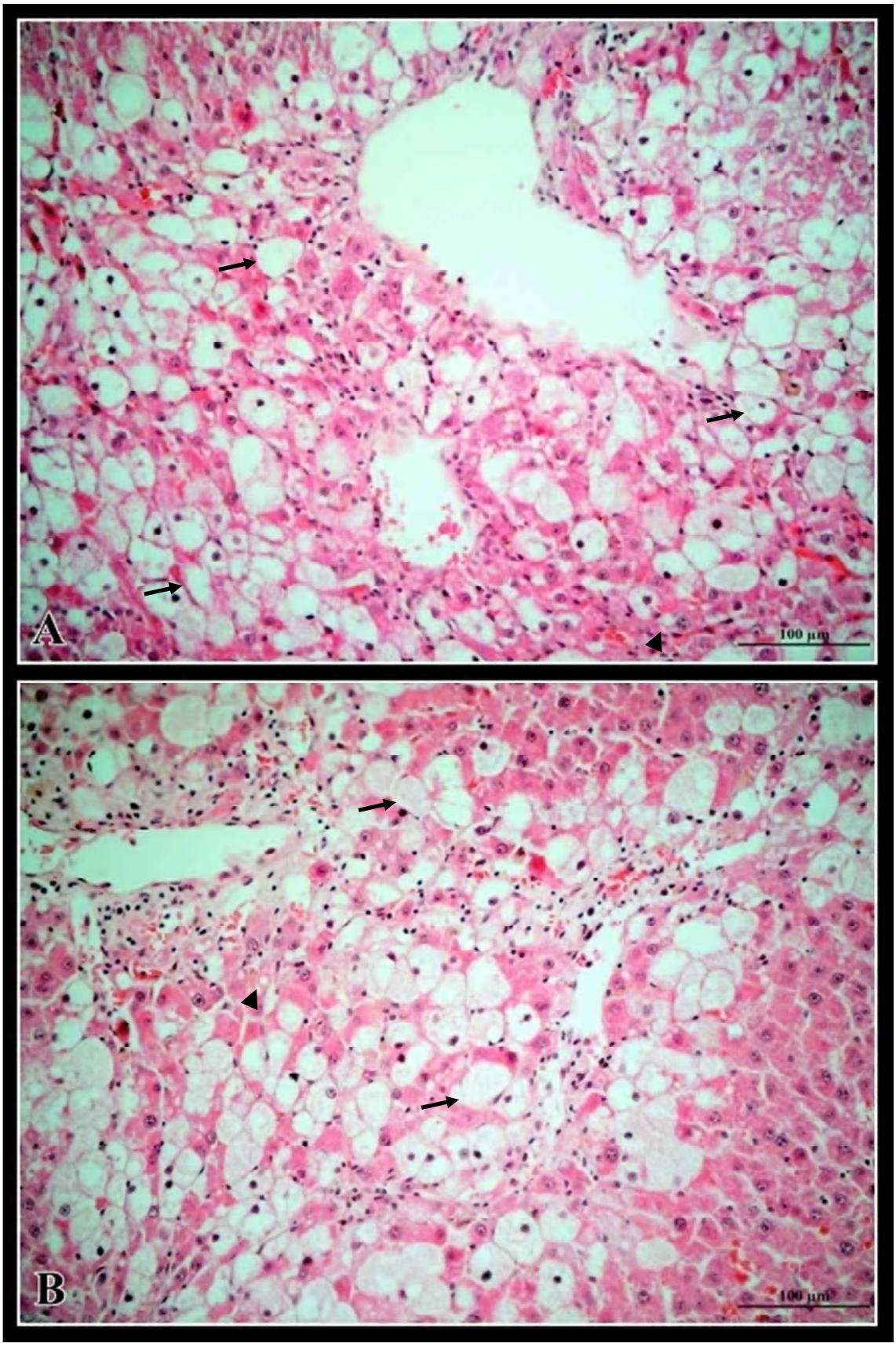


Şekil 27. Karbon tetraklorür+KTY grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 9 pozitif görünümü. ABC-P.

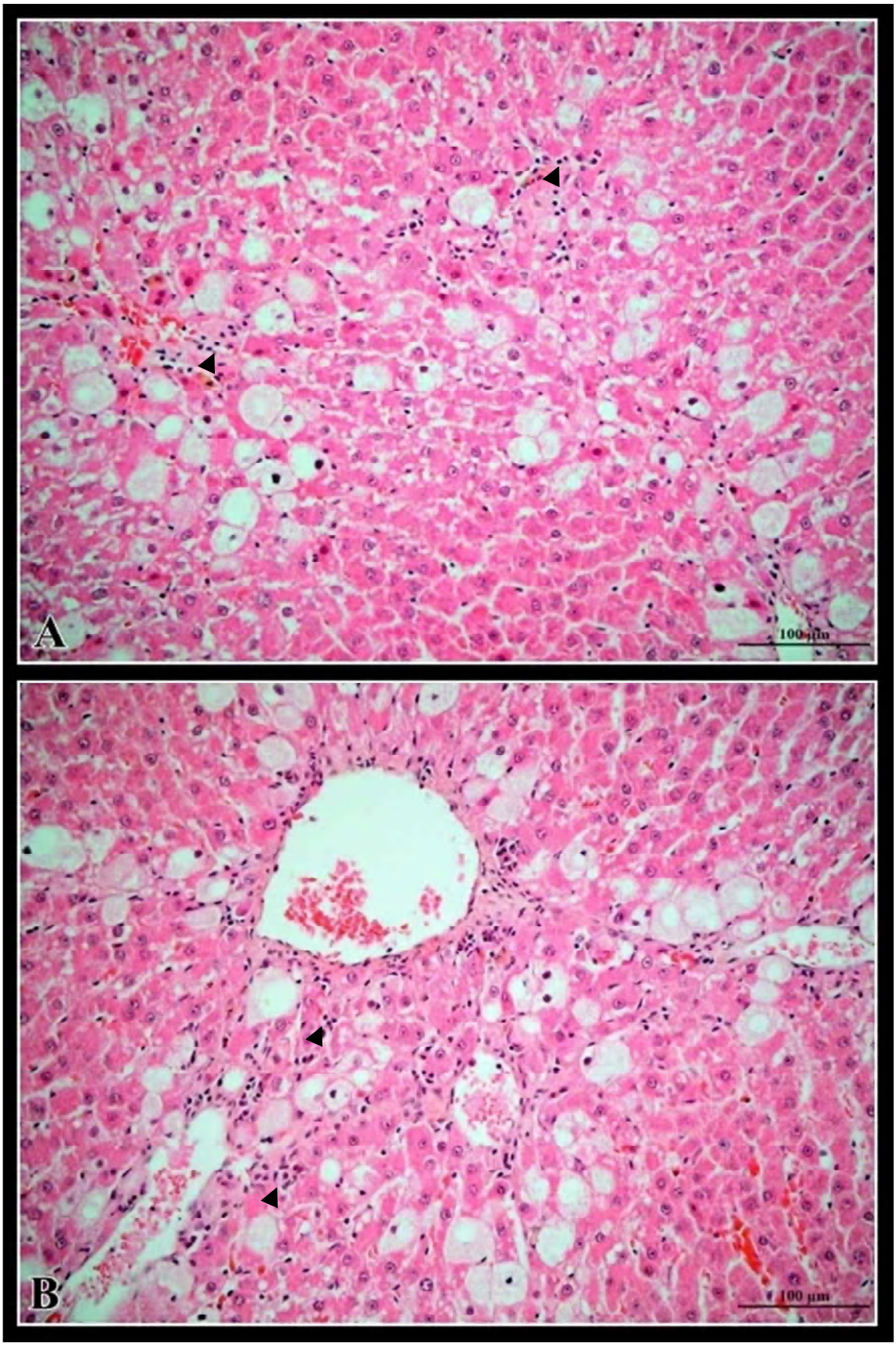
4.3.1.2.2. Karbon Tetraklorür+Nar Çekirdeği Yağı Grubu

Çalışma sonunda bu gruptaki 8 adet ratın hepsinin karaciğer dokularının histolojik incelemesinde iki farklı lezyon dikkati çekti. İlki CCl_4 ve KTY grubu ile birebir örtüşen görüntü idi. Bu grupta yine hepatositlerde yoğun makro ve mikroveziküler yağ vakuolleri görüldü. Bu vakuoller parankimdeki hepatositlerin çoğunda saptandı (Şekil 28AB). Özellikle yağlanma bölgelerinde daha yoğun olmak üzere tüm parankim dokuda lenfositten zengin mononüklear hücre infiltrasyon alanları görüldü (Şekil 29AB). Bu alanlarda damarlar hiperemikti. İkinci görüntüde ise lezyon şiddetinde herhangi bir azalma olmaksızın yağ vakuolleri daha küçük olup, parankimde net olarak sınıflandırılamayan geniş nekroz alanları içerisinde yer almaktaydı (Şekil 30). Nekroz alanları içerisinde daha belirgin olmak kaydı ile lenfositten zengin mononüklear hücre infiltrasyon alanları dikkati çekti (Şekil 31AB). Bu alanlarda damarlar hiperemi daha belirgindi.

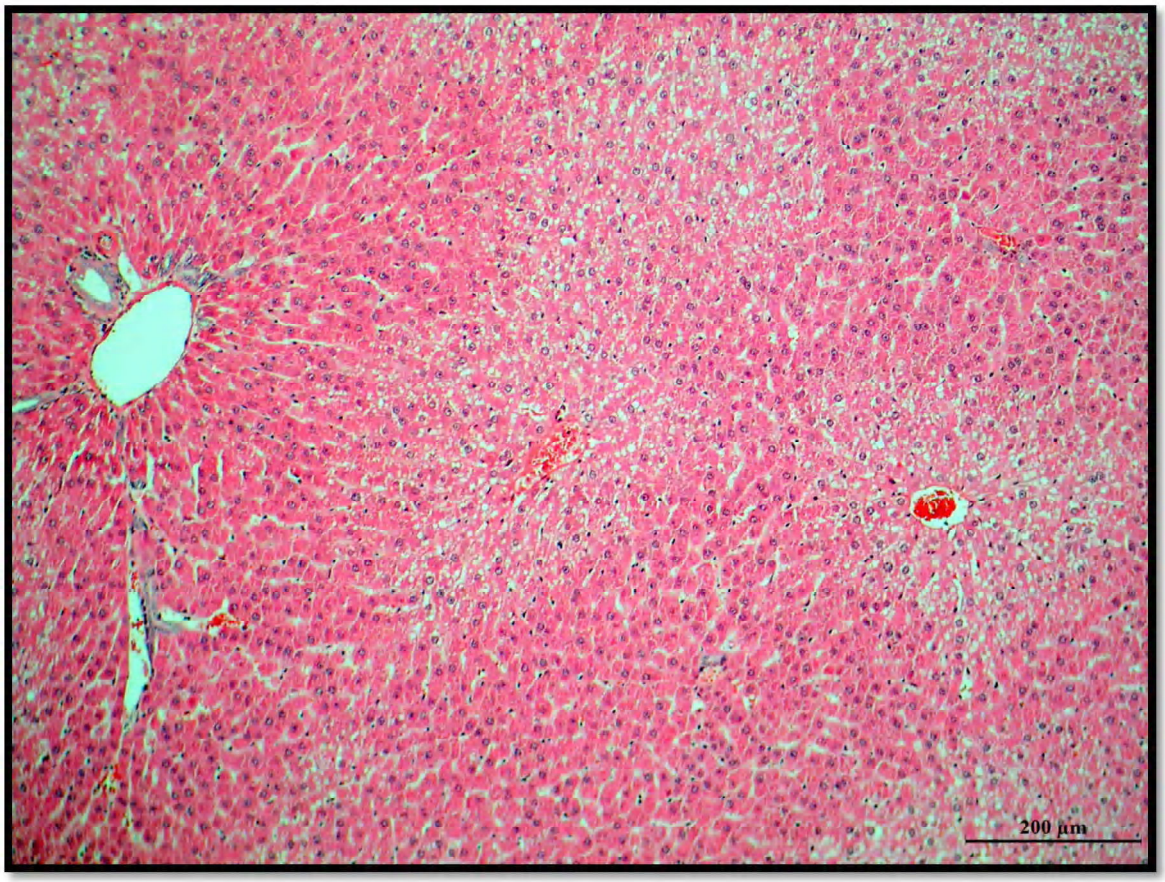
Karaciğer doku kesitlerinde CCl_4'e bağlı olarak oluşan yağlanma, yangı ve nekroz parametreleri skorlandı. Bu gruba ait hasar skorunun kontrol, KTY ve NÇYgruplarından şiddetli ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (Tablo 8). Diğer dokuların histolojik değerlendirmesinde herhangi patolojik bir lezyona rastlanmadı.



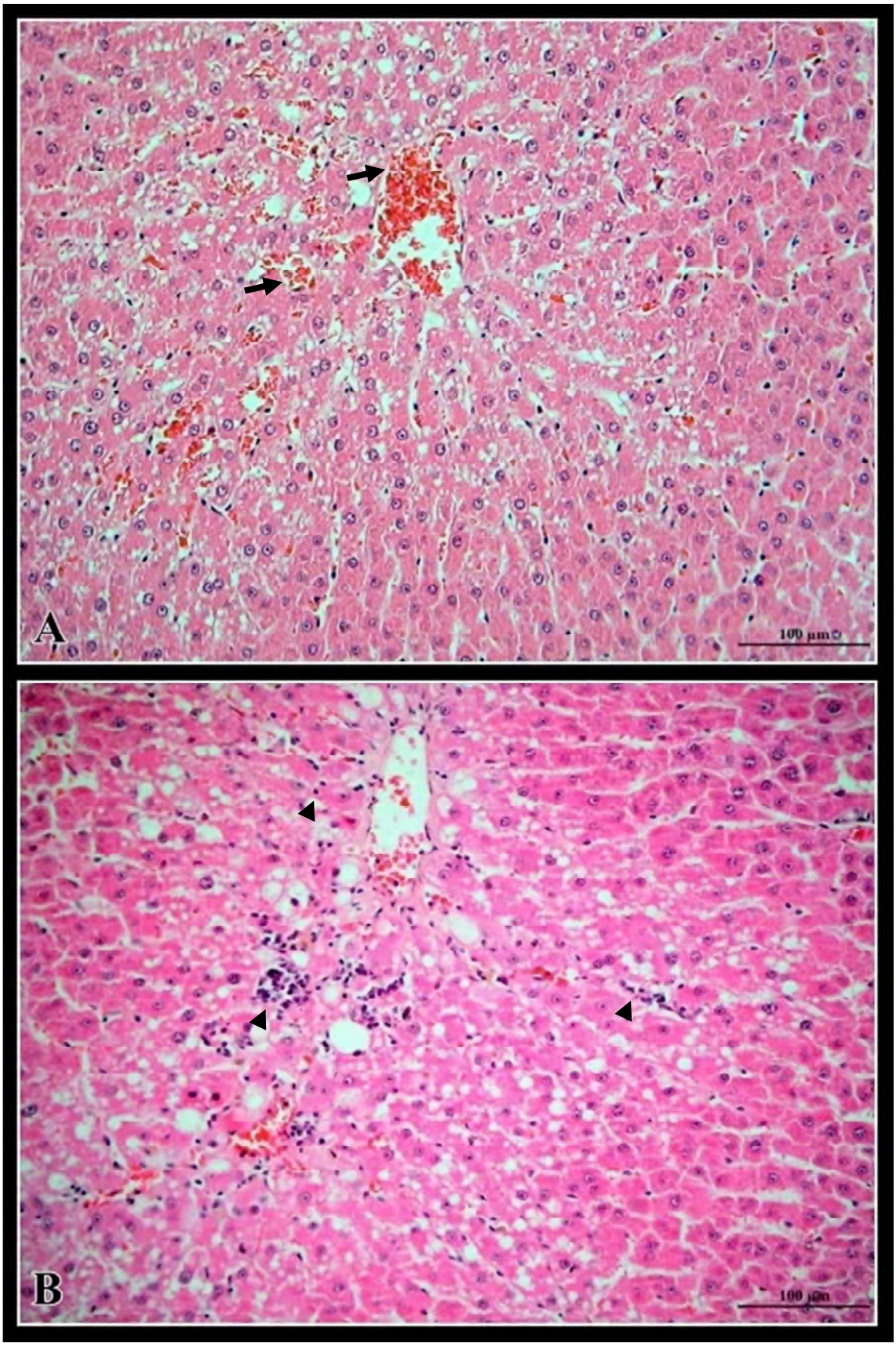
Şekil 28. Karbon tetraklorür+NÇY grubu ratlarda, **(A, B)** hepatositlerde yoğun makro (oklar) ve mikroveziküler (ok başları) yağ vakuollerinin görünümü. Karaciğer, HxE.



Şekil 29. Karbon tetraklorür+NÇY grubu ratlarda, karaciğerde **(A, B)** yağlanma bölgelerinde daha yoğun olmak üzere tüm parankim dokuda lenfositten zengin mononüklear hücre infiltrasyonunun (ok başları) görünümü. Karaciğer, HxE.

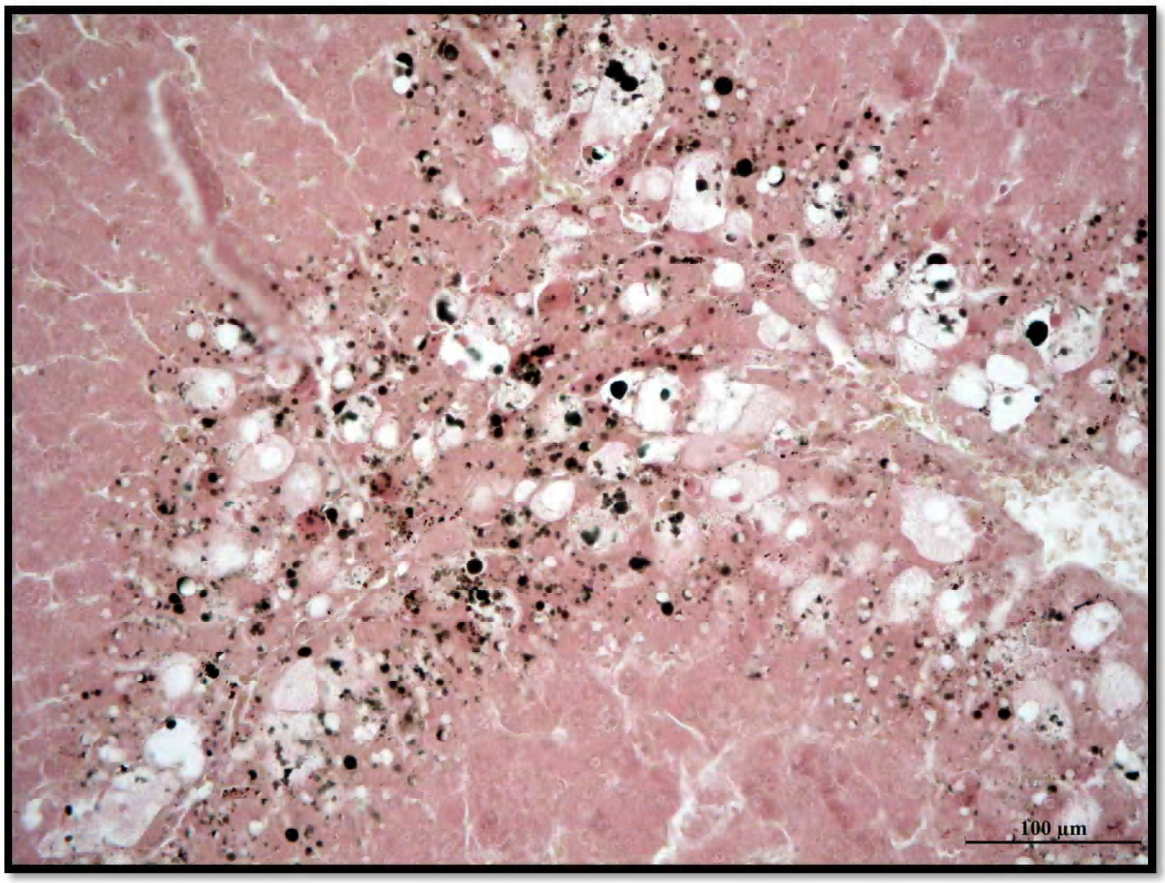


Şekil 30. Karbon tetraklorür+NÇY grubu ratlarda, hepatositlerde daha küçük yağ vakuolleri ve parankimde geniş nekroz alanlarının görünümü. Karaciğer, HxE.



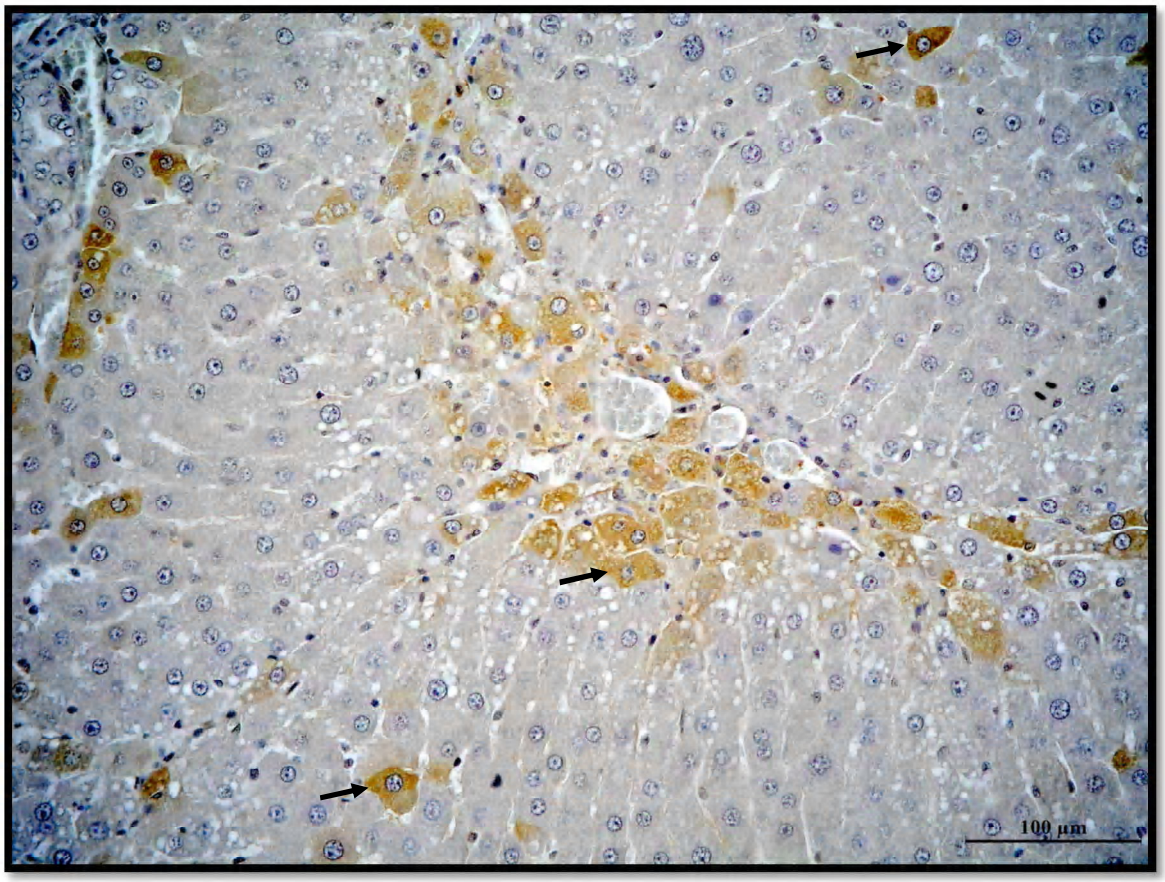
Şekil 31. Karbon tetraklorür+NÇY grubu ratlarda, karaciğerde **(A)** damarlarda hiperemi (oklar) ve **(B)** nekroz alanları içerisinde daha belirgin lenfositten zengin mononüklear hücre infiltrasyon alanlarının (ok başları) görünümü. Karaciğer, HxE.

Karaciğerden alınan kesitlerden bazılarına osmium tetroksit boyaması yapıldıktan sonra özellikle makro mikro yağ vakuollerinin olduğu alanlarda yağın siyah renkte boyandığı dikkati çekti (Şekil 32).

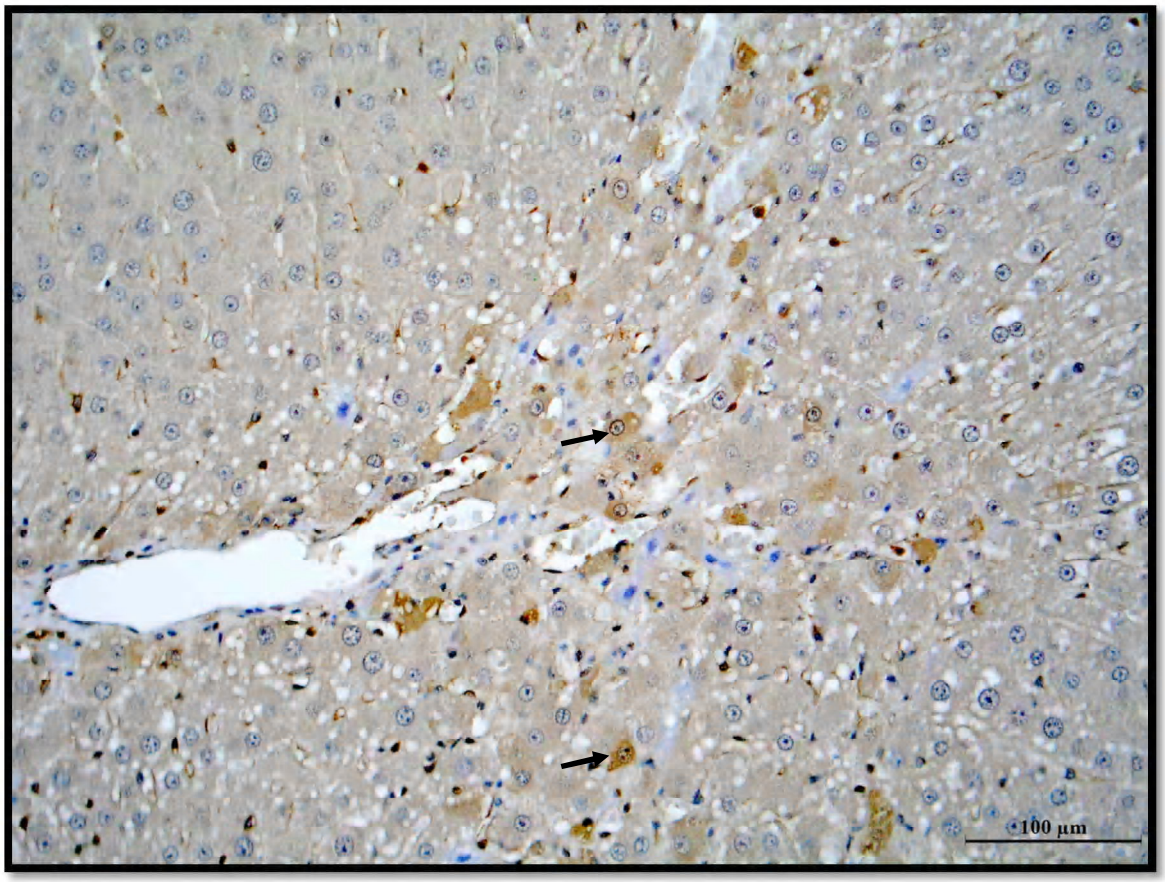


Şekil 32. Karbon tetraklorür+NÇY verilen gruptaki ratların, hepatosit sitoplazmalarında makro mikro yağ vakuollerinin siyah renkte görünümü. Karaciğer, (OsO_4 fikse edilmiş) HxE.

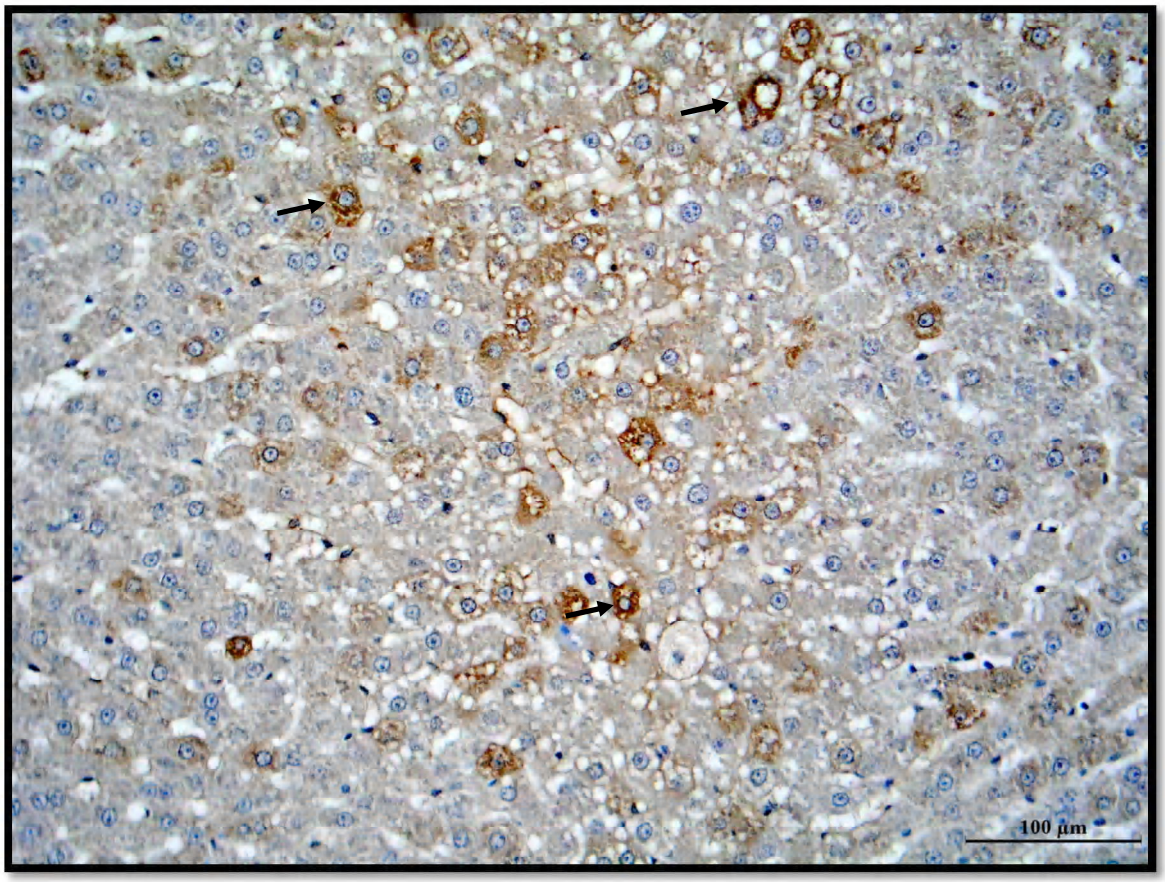
Çalışma sonunda bu gruptaki 8 adet ratın hepsinin karaciğer dokularının immunhistokimyasal incelemesinde; perivasküler, yağ vakouolleri bulunan hepatositler ve sentriasiner venlerin periferindeki hepatositlerde kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 boyamalarında pozitiflik tespit edildi. Pozitif hücrelerde sitoplazmanın kahverengi boyandığı dikkati çekti (Şekil 33, 34, 35).



Şekil 33. Karbon tetraklorür+NÇY grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 3 pozitif görünümü. ABC-P.



Şekil 34. Karbon tetraklorür+NÇY grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 8 pozitif görünümü. ABC-P.

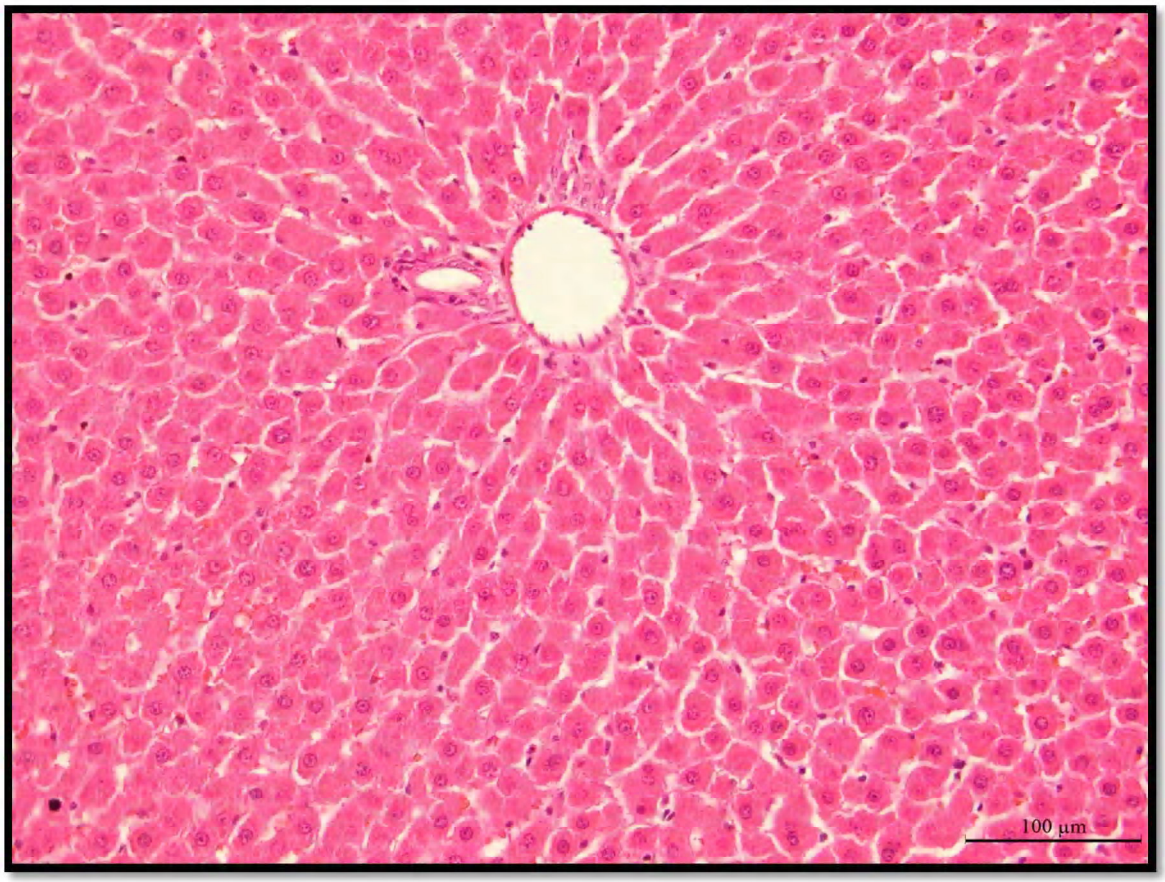


Şekil 35. Karbon tetraklorür+NÇY grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 9 pozitif görünümü. ABC-P

4.3.2. Kronik Grup

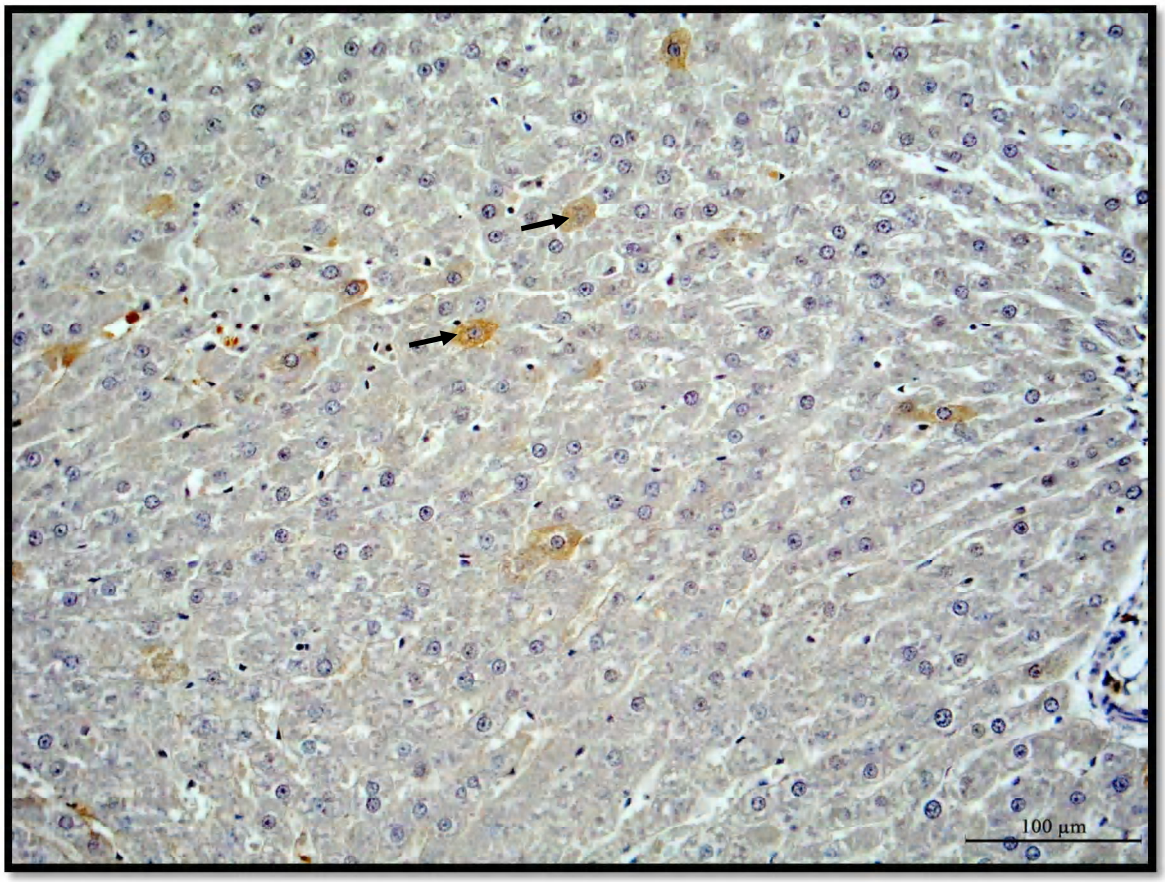
4.3.2.1. Kontrol Grubu

Çalışma sonunda bu gruptaki 8 adet ratın hepsinin histopatolojik muayenesinde karaciğer doku örneklerinin normal yapıda oldukları görüldü (Şekil 36). Aynı doku kesitlerine osmium tetroksit ile yapılan boyamada hepatositlerde yağ belirlenemedi. Sistemik olarak alınan diğer organların histolojik değerlendirmesinde herhangi patolojik bir lezyon bulunmayıp normal yapıda oldukları görüldü. Gruba ait karaciğer doku kesitlerinden yapılan histolojik hasar skorlamasında; fibrozis, yağlanma, yangı ve nekroz parametreleri açısından hasar skoru sıfırdı (Tablo 9).

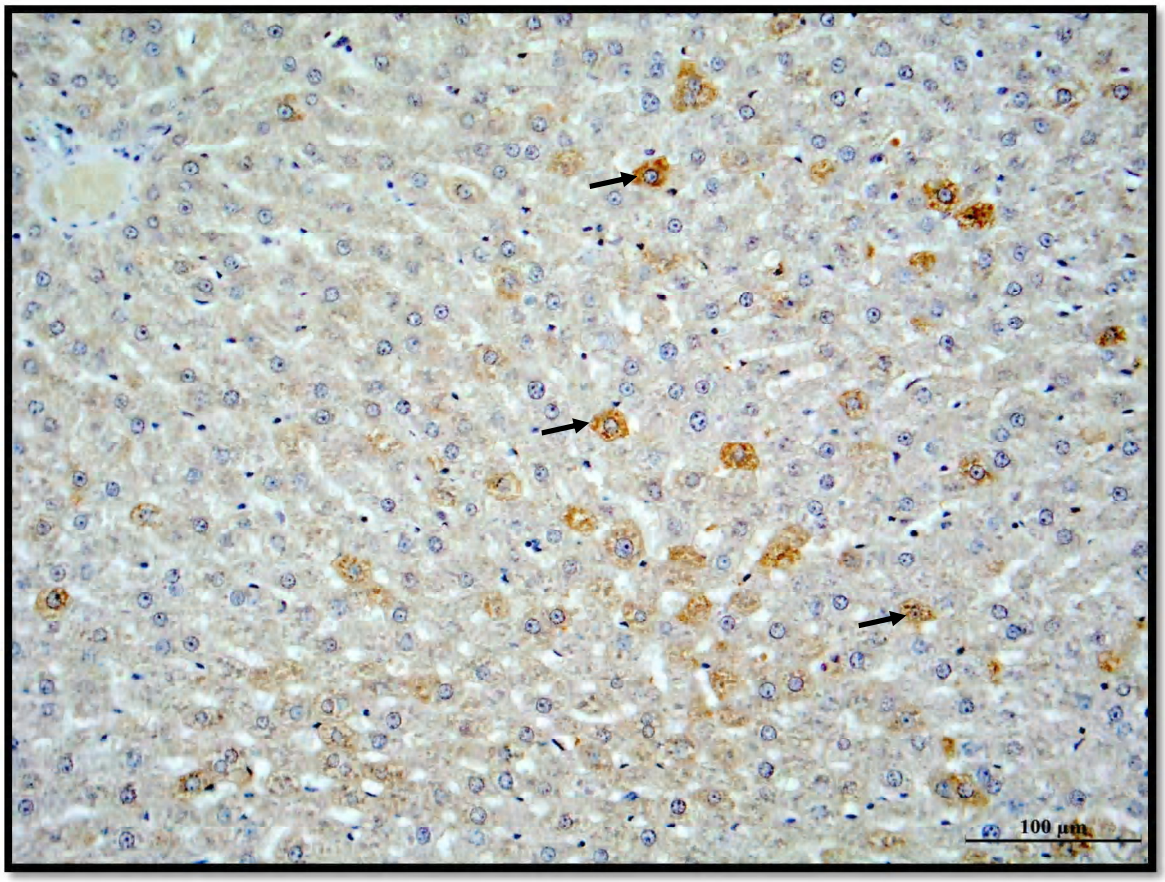


Şekil 36. Kontrol grubu; karaciğerin normal histolojik görünümü. Karaciğer, HxE.

Çalışma sonunda bu gruptaki 8 adet ratın hepsinin karaciğerlerinden hazırlanan doku kesitlerine kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 antikorlar ile immunohistokimyasal boyama yapıldı. Kaspaz 8'de boyanma negatifti. Ancak normal apoptoza maruz kalan az sayıda hepatositte kaspaz 3 ve kaspaz 9'da pozitiflik tespit edildi. Pozitif hücrelerde sitoplazma kahverengi boyanmış olduğu görüldü (Şekil 37, 38).



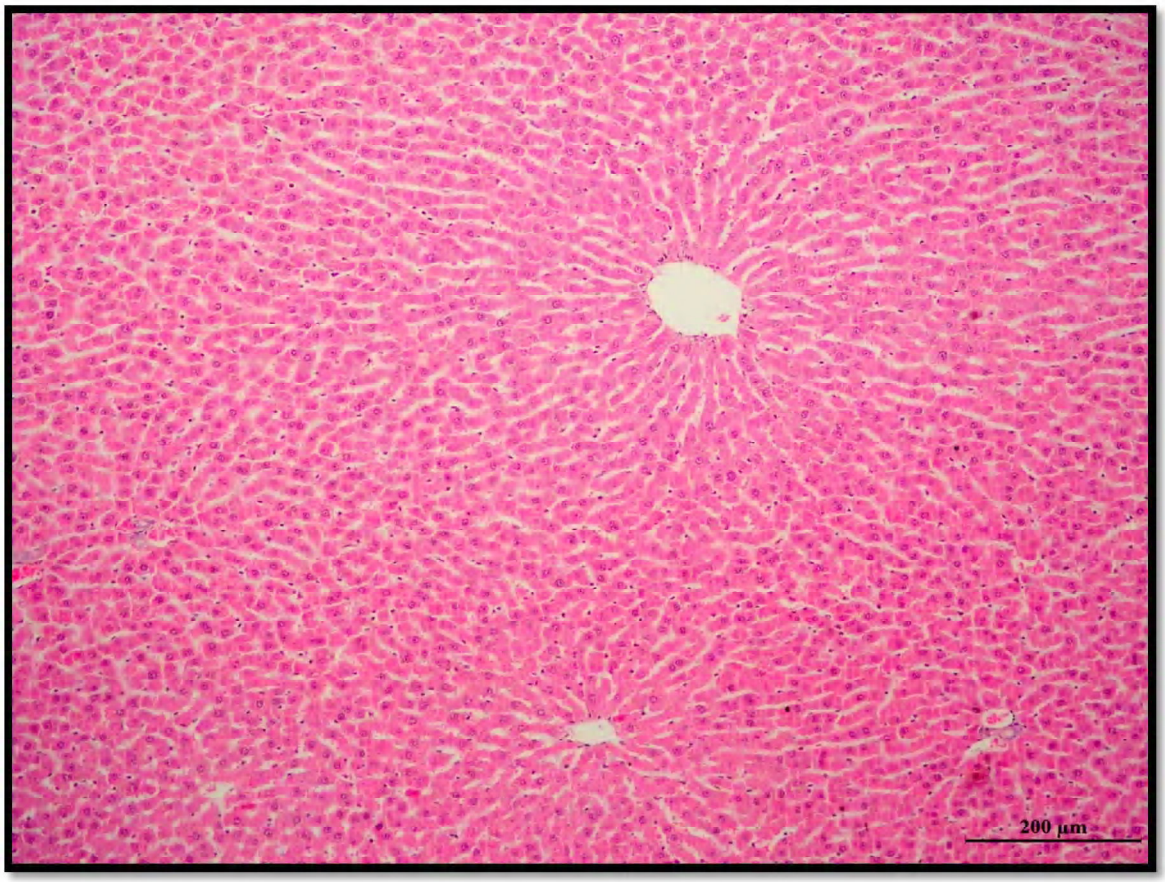
Şekil 37. Kontrol grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 3 pozitif görünümü. ABC-P.



Şekil 38. Kontrol grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 9 pozitif görünümü. ABC-P.

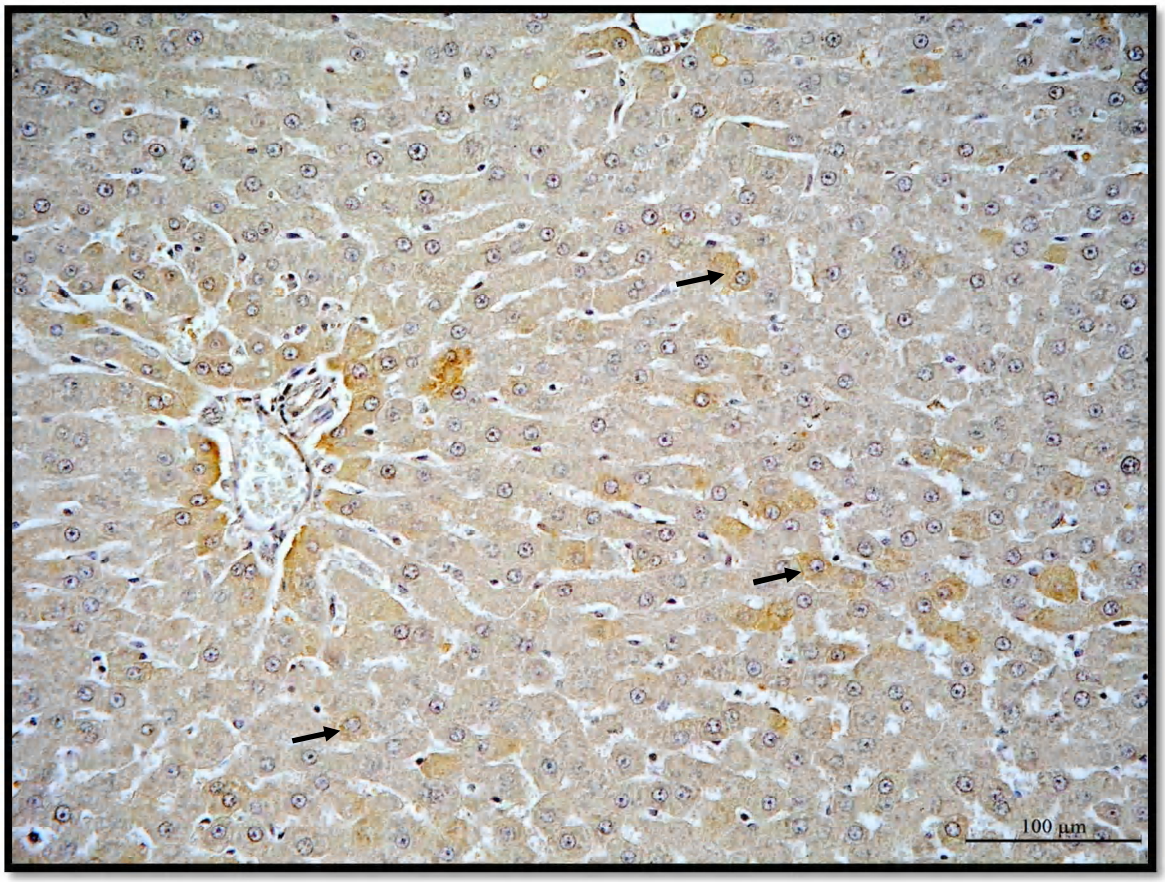
4.3.2.1.1. Keten Tohumu Yağı Grubu

Çalışma sonunda bu gruptaki 8 adet ratın hepsinin karaciğer doku kesitlerinin histopatolojisinde normal yapıda oldukları görüldü (Şekil 39). Aynı doku kesitlerine osmium tetroksit ile yapılan boyamada hepatositlerde yağ belirlenemedi. Sistemik olarak alınan diğer dokuların histolojik değerlendirmesinde herhangi patolojik bir lezyona rastlanılmadı. Gruba ait karaciğer doku kesitlerinden yapılan histolojik hasar skorlaması kontrol grubu ile benzerdi (Tablo 9).

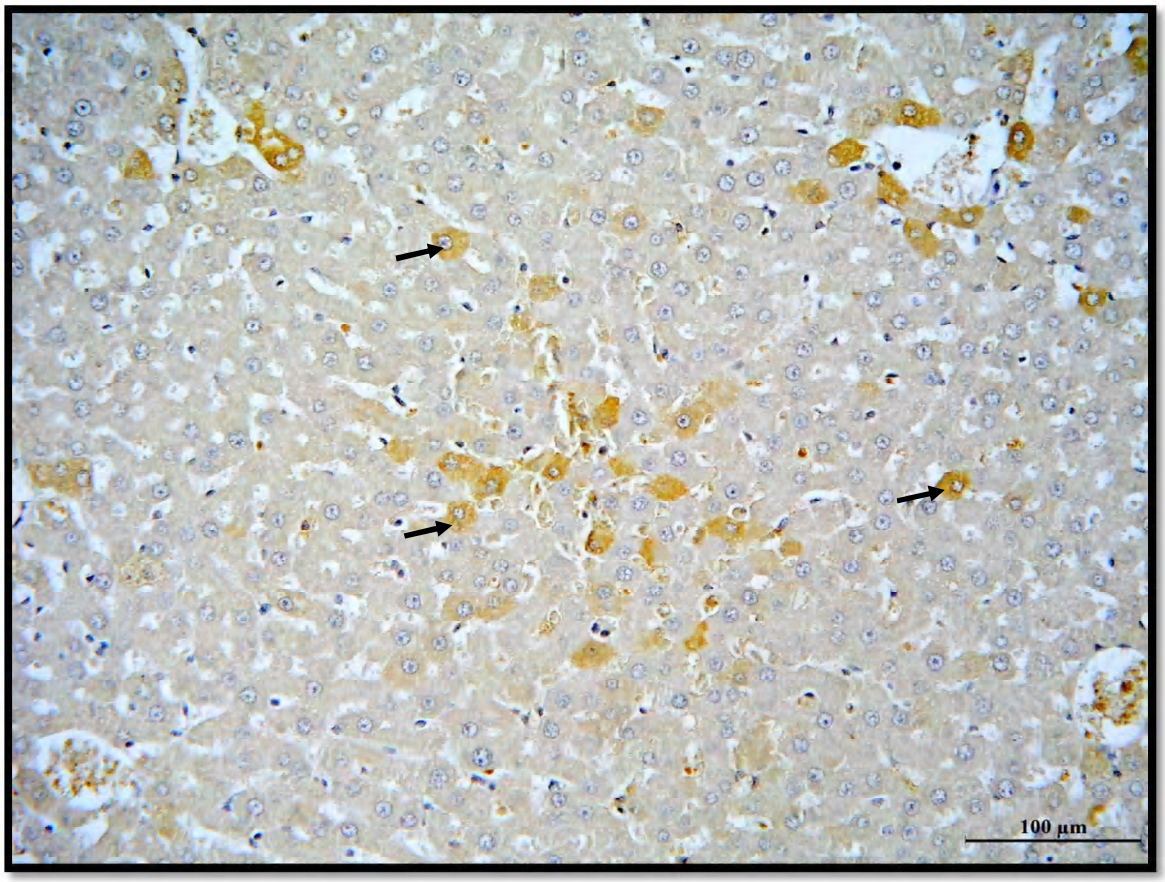


Şekil 39. Keten tohumu grubu; rat karaciğerlerinin normal histolojik görünümü. Karaciğer, HxE.

Çalışma sonunda bu gruptaki 8 adet ratın hepsinin karaciğer doku kesitlerine yapılan immunohistokimyasal boyamalarda; kaspaz 8'de boyanma negatifti. Ancak normal apoptoza maruz kalan az sayıda hepatositte kaspaz 3 ve kaspaz 9'da pozitiflik tespit edildi. Pozitif hücrelerde sitoplazmaların kahverengi boyandığı gözlendi (Şekil 40, 41).



Şekil 40. Keten tohumu yağı grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 3 pozitif görünümü. ABC-P.



Şekil 41. Keten tohumu yağı grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 3 pozitif görünümü. ABC-P.

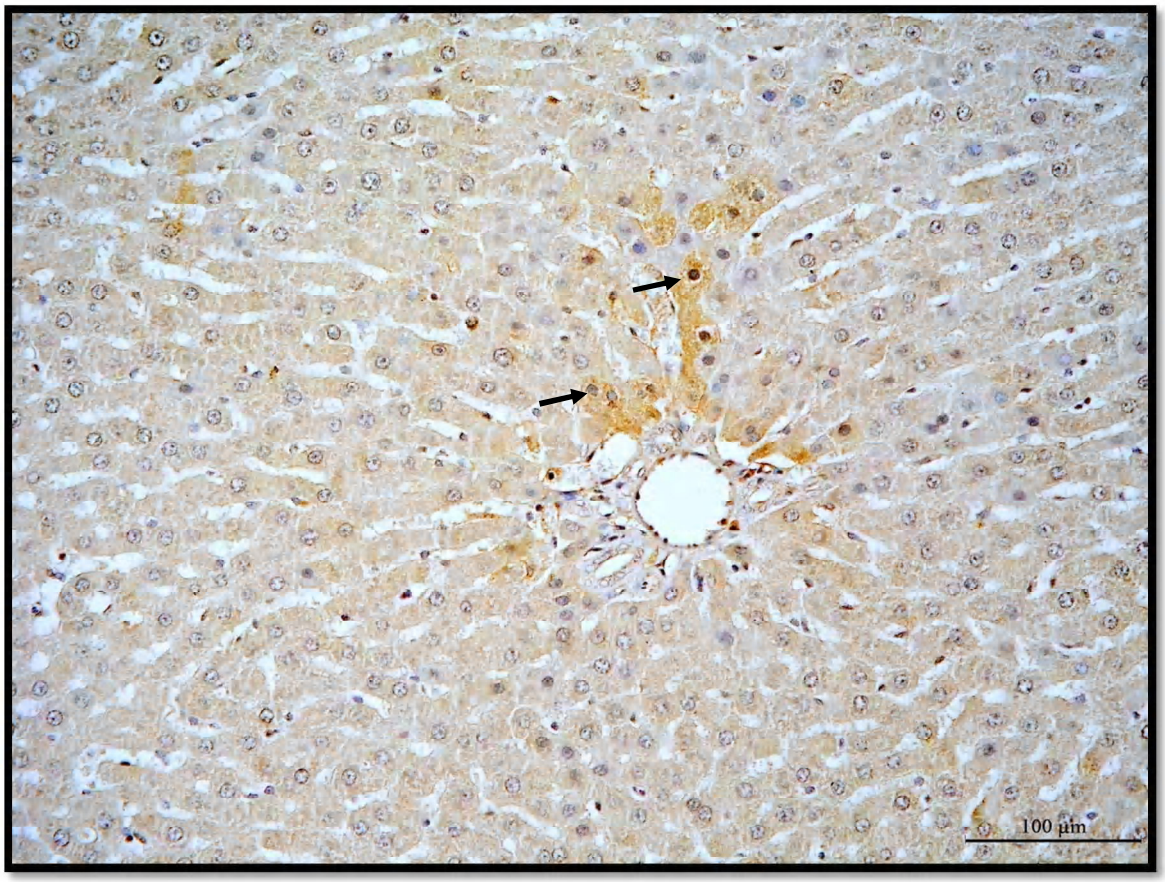
4.3.2.1.2. Nar Çekirdeği Yağı Grubu

Çalışma sonunda bu gruptaki 8 adet ratın hepsinin karaciğer doku kesitlerinin histopatolojisinde normal yapıda oldukları görüldü (Şekil 42). Aynı doku kesitlerine osmium tetroksit ile yapılan boyamada hepatositlerde yağ belirlenemedi. Sistemik olarak alınan diğer dokuların histolojik değerlendirmesinde herhangi patolojik bir lezyona rastlanılmadı. Gruba ait karaciğer doku kesitlerinden yapılan histolojik hasar skorlaması kontrol grubu ile benzerdi (Tablo 9).

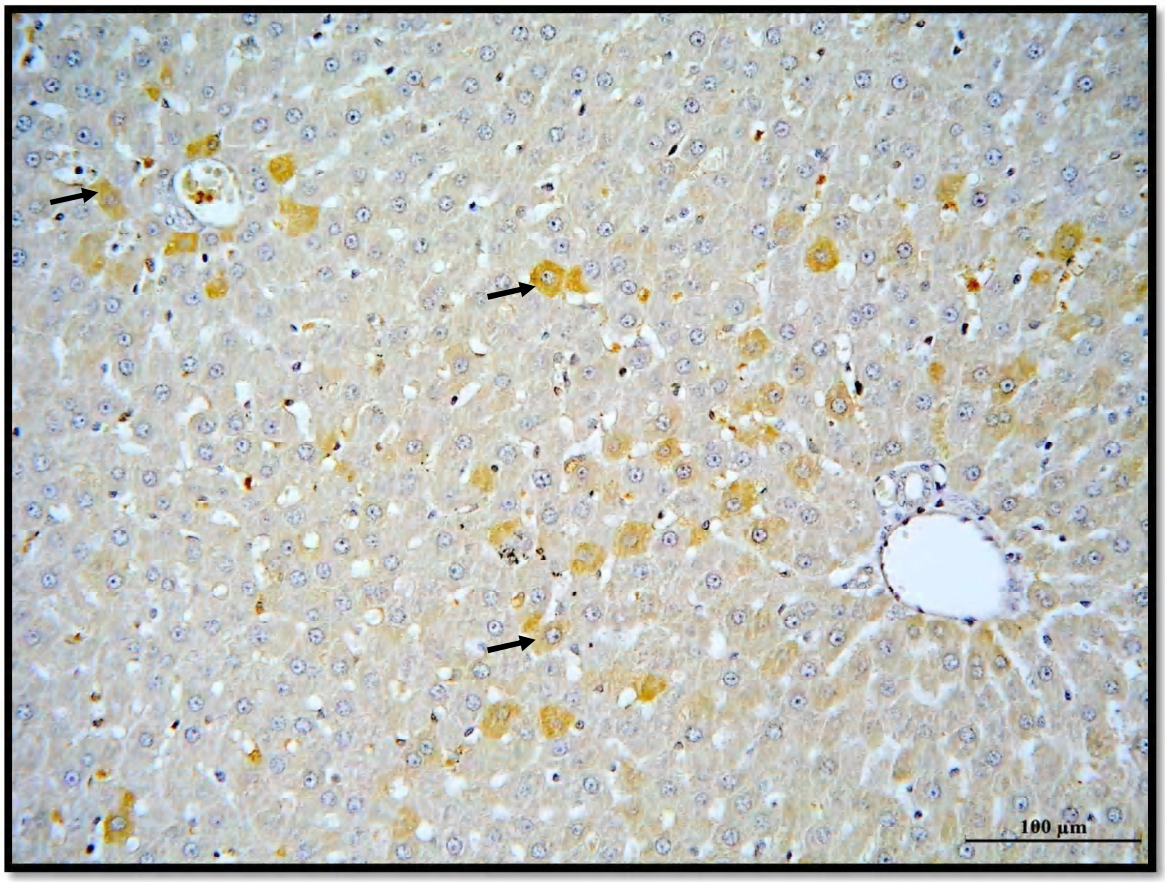


Şekil 42. Nar çekirdeği yağı grubu; karaciğerin normal histolojik görünümü. Karaciğer, HxE.

Çalışma sonunda bu gruptaki 8 adet ratın hepsinin karaciğer doku kesitlerine yapılan immunohistokimyasal boyamalarda; kaspaz 8'de boyanma negatifti. Ancak normal apoptoza maruz kalan az sayıda hepatositte kaspaz 3 ve kaspaz 9'da pozitiflik tespit edildi. Pozitif hücrelerde sitoplazmaların kahverengi boyandığı gözlendi (Şekil 43, 44).



Şekil 43. Nar çekirdeği yağı grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 3 pozitif görünümü. ABC-P.

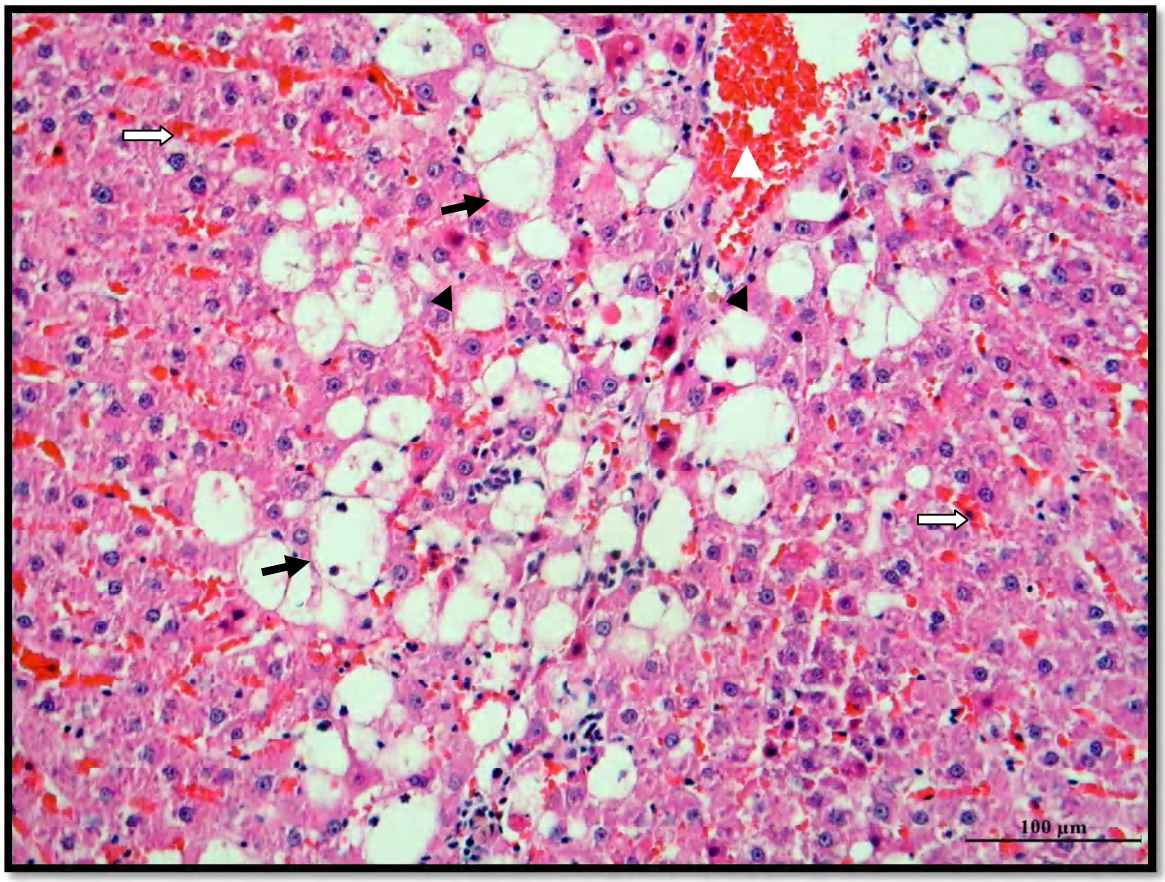


Şekil 44. Nar çekirdeği yağı grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 9 pozitif görünümü. ABC-P.

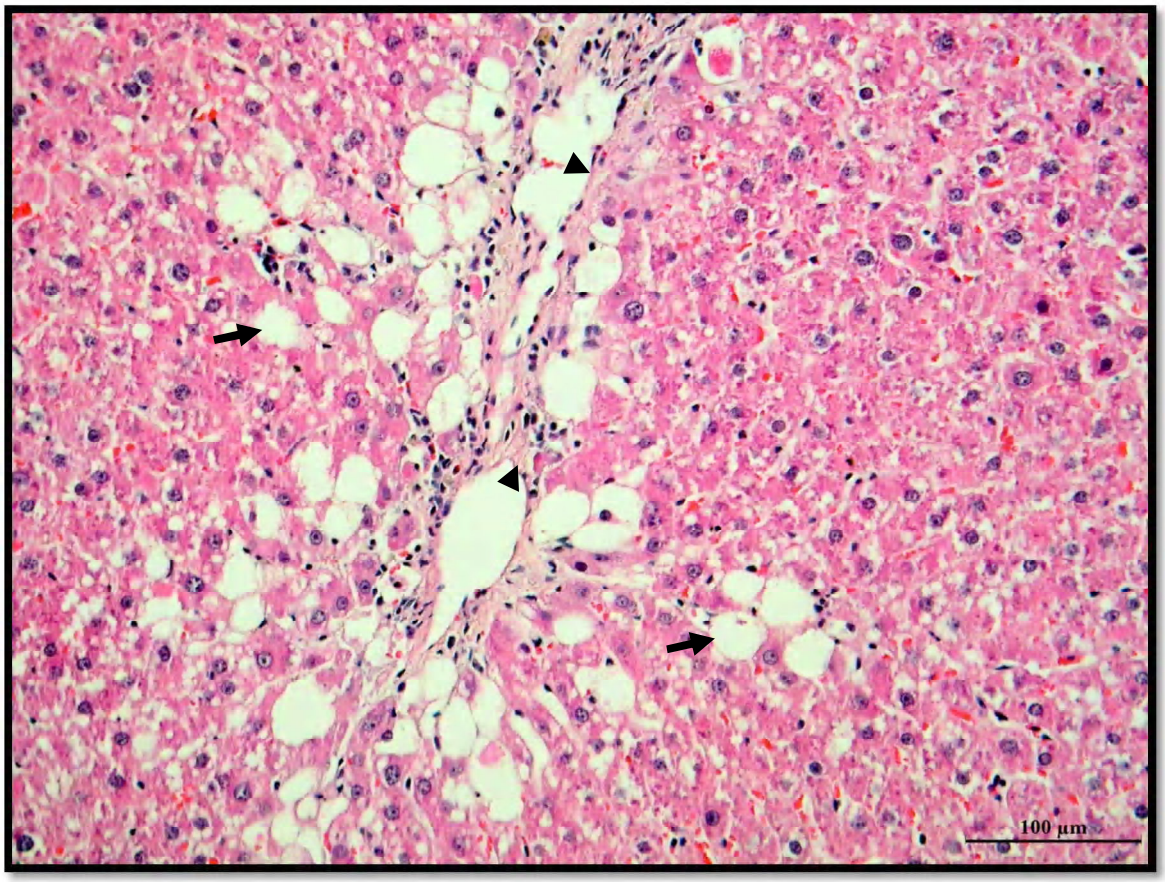
4.3.2.2. Karbon Tetraklorür Grubu

Çalışma sonunda bu gruptaki 8 adet ratın hepsinin karaciğer dokularının histolojik incelemesinde hepatositlerde makro ve mikroveziküler yağ vakuolleri görüldü**.** Damarlar hiperemik, sinuzoidler içerisinde eritrosit yığınlarının varlığı dikkati çekti. Parankimde yağ vakuolleri arasında ve periferinde lenfositten zengin mononüklear hücre infiltrasyon alanları görüldü (Şekil 45). Yağ vakuollerinin olduğu hepatositlerin arasına uzanan, V. centralis periferinden yer yer artmış fibröz bağ doku dikkati çekti (Şekil 46). Kesitlerin bazısında büyük yağ vakuolleri sayısı azalırken, yoğun şekilde mikroveziküler yağ vakuolleri gözlendi. Bu alanda Kupffer hücre hiperplazileri ile lenfosit hücre infiltrasyonları görüldü (Şekil 47). Diğer dokuların histolojik değerlendirmesinde herhangi patolojik bir lezyona rastlanmadı.

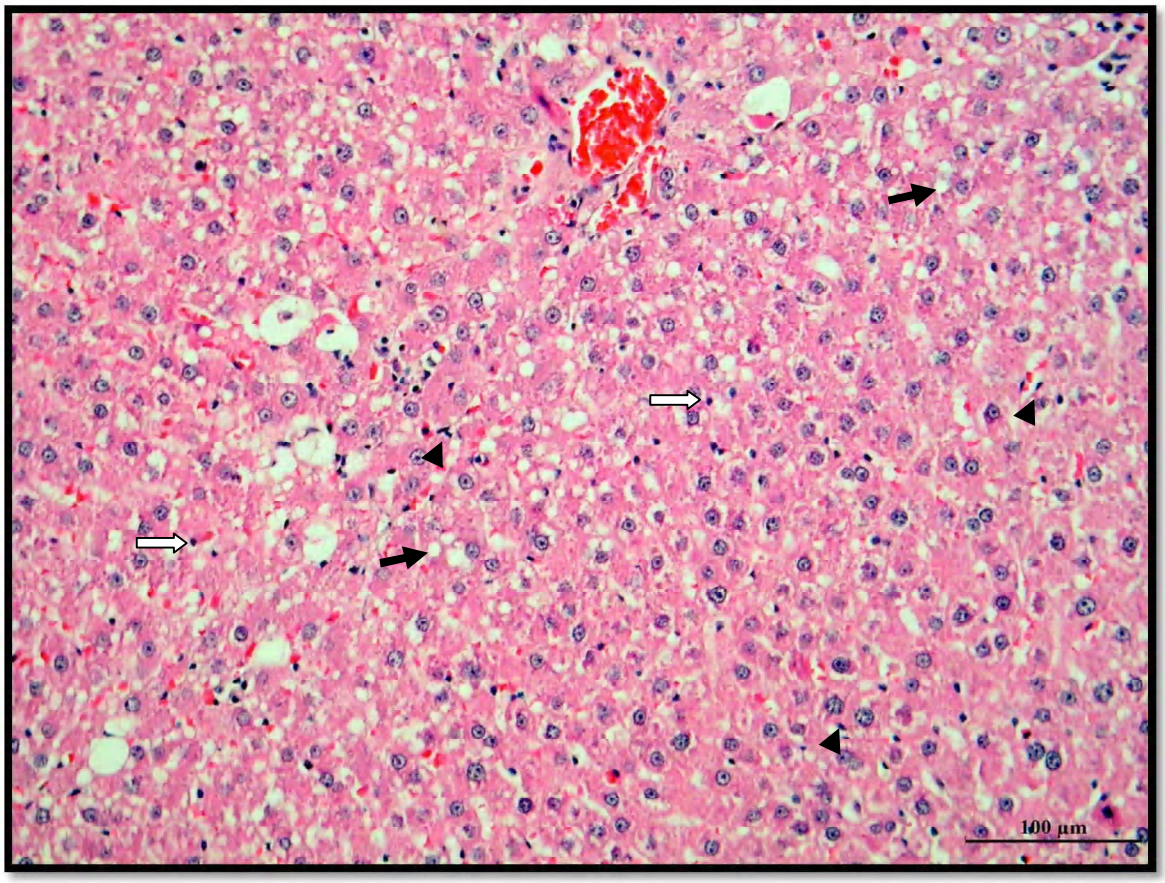
Karaciğer doku kesitlerinde CCl_4'e bağlı olarak oluşan yağlanma, yangı ve nekroz parametreleri skorlandı. Bu gruba ait hasar skorunun kontrol, KTY ve NÇY verilen gruplarından şiddetli ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (Tablo 9).



Şekil 45. Karbon tetraklorür grubu rat karaciğerlerinde damarlarda hiperemi (beyaz oklar), sinuzoidler (beyaz ok başları) içerisinde eritrosit yığınları ile hepatositlerde makro-mikroveziküler yağ vakuolleri (siyah oklar) ve bu alanlarda lenfositten zengin mononüklear hücre infiltrasyonlarının (siyah ok başları) görünümü. Karaciğer, HxE.

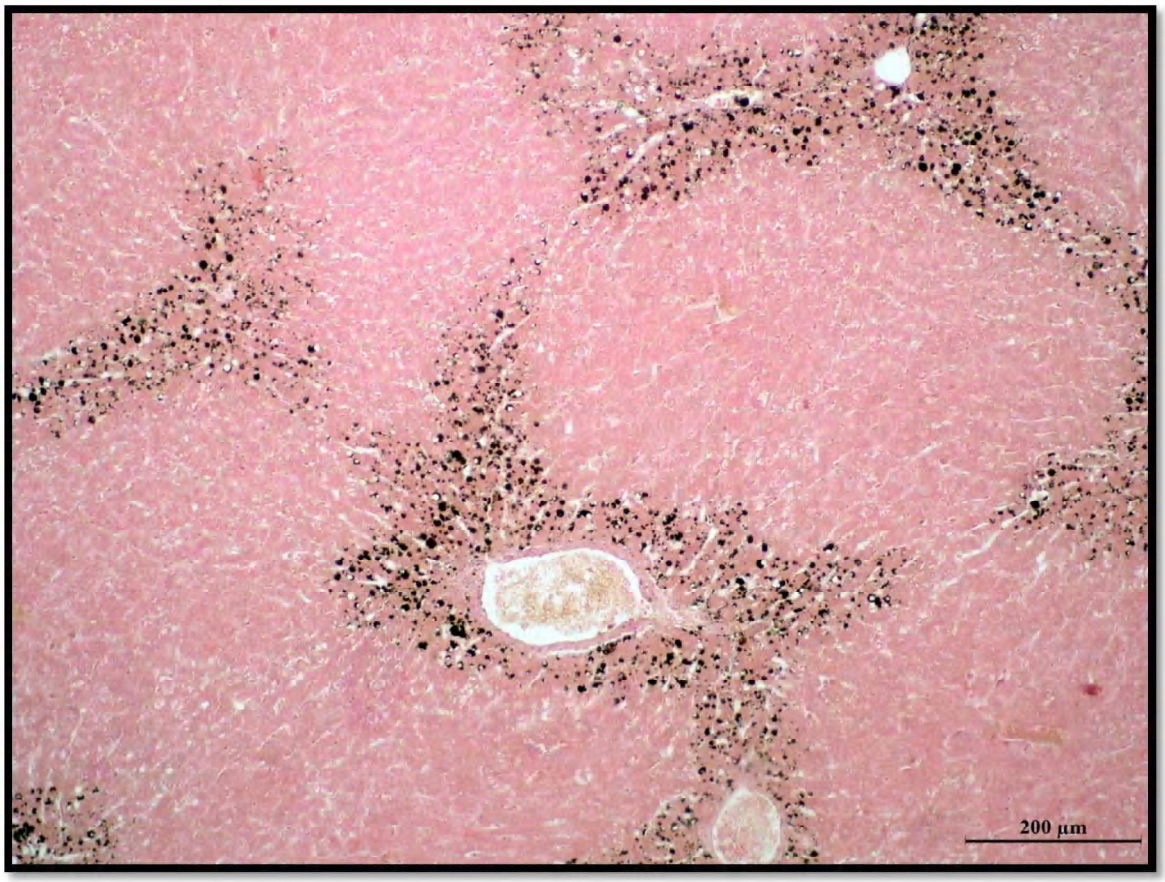


Şekil 46. Karbon tetraklorür grubu ratların karaciğerinde makro-mikro yağ vakuolleri (oklar) ile V. centralis periferinde yer yer artmış fibröz bağ dokunun (ok başları) görünümü. Karaciğer, HxE.



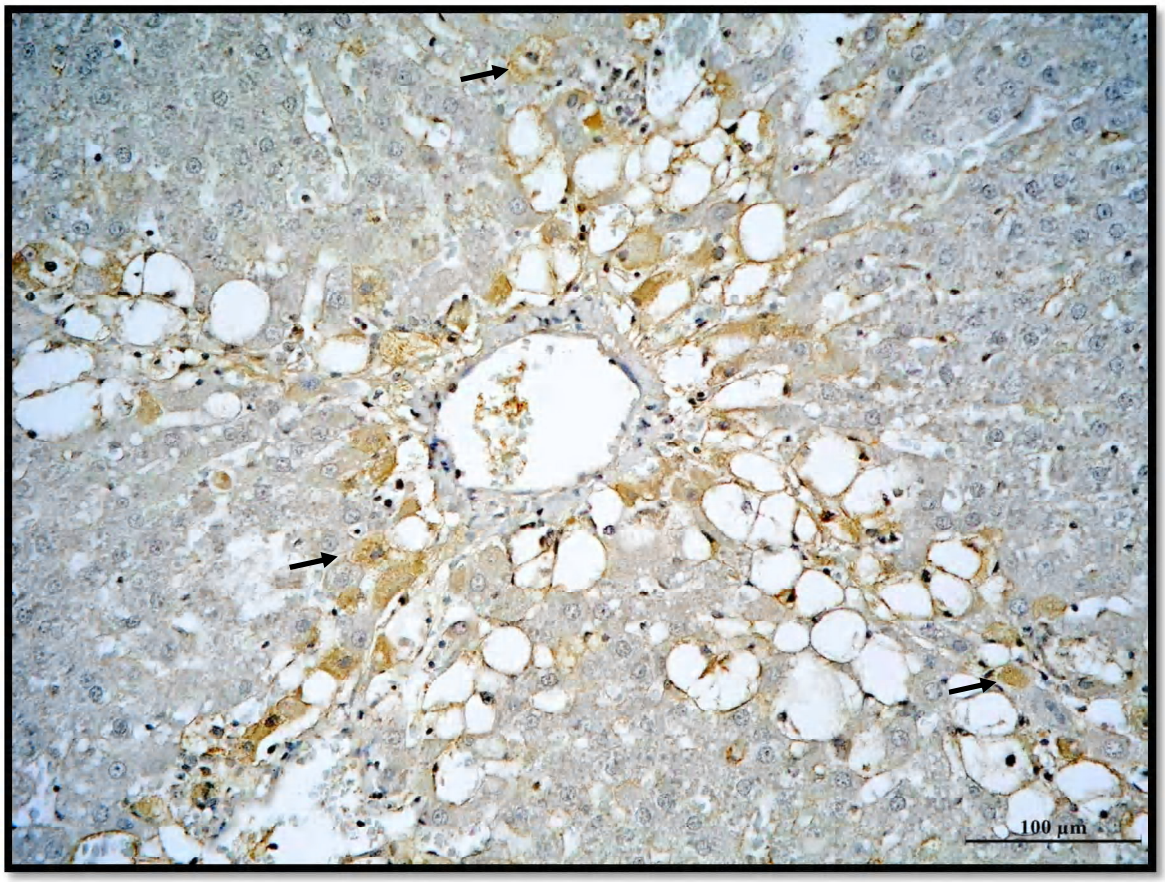
Şekil 47. Karbon tetraklorür grubu ratlarının karaciğer kesitlerinde mikroveziküler yağ vakuolleri (siyah oklar), Kupffer hücre hiperplazisi (siyah ok başları) ve lenfosit hücre infiltrasyonlarının (beyaz oklar) görünümü. Karaciğer, HxE.

Karaciğerden alınan kesitlerden bazılarına osmium tetroksit boyaması yapıldıktan sonra yağ vakuollerinin olduğu alanlarda yağın siyah renkte boyandığı dikkati çekti (Şekil 48).

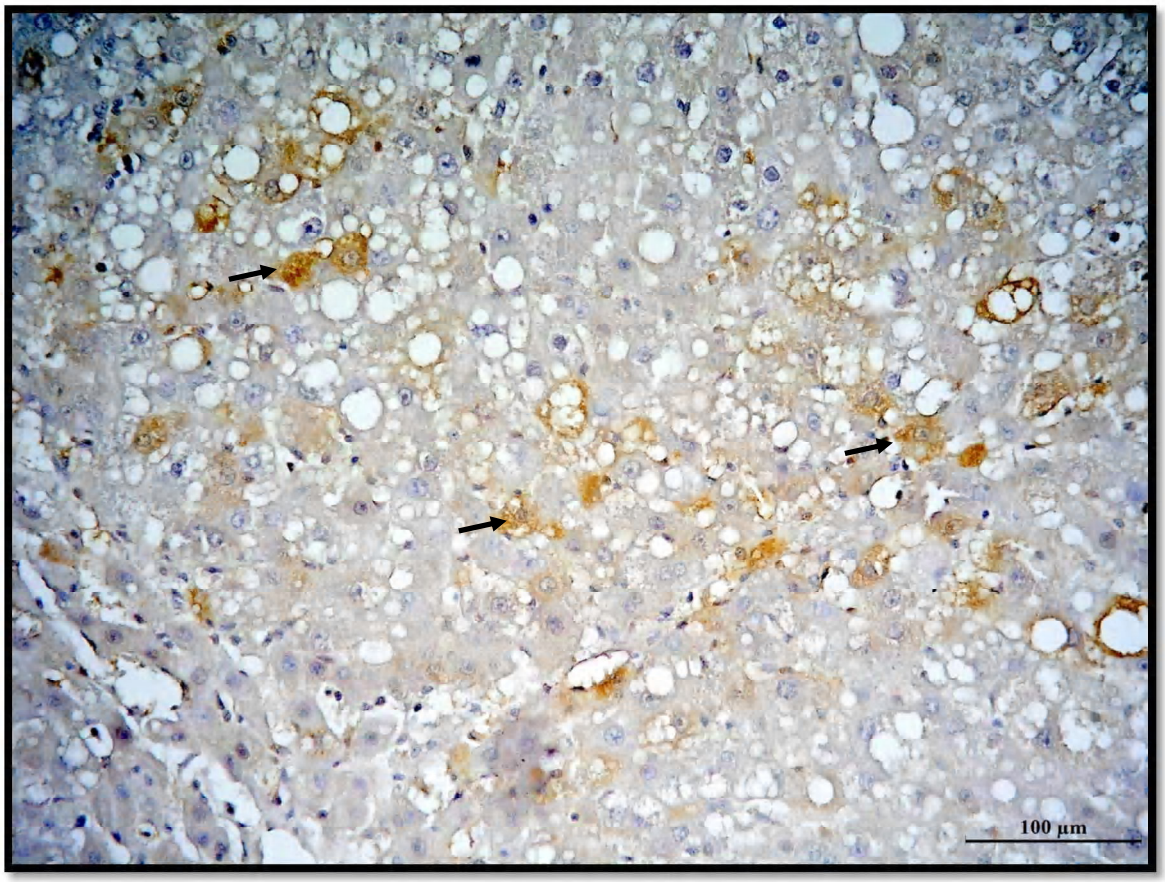


Şekil 48. Karbon tetraklorürgrubu ratlarının hepatositlerinde mikroveziküler yağ vakuollerinin siyah renkte görünümü. Karaciğer, (OsO_4 fikse edilmiş) HxE.

Çalışma sonunda bu gruptaki 8 adet ratın hepsinin karaciğer dokularının immunhistokimyasal incelemesinde; perivasküler, yağ vakouolleri bulunan hepatositler ve sentriasiner venlerin periferindeki hepatositlerde kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 boyamalarında pozitiflik tespit edildi. Pozitif hücrelerde sitoplazmanın kahverengi boyandığı dikkati çekti (Şekil 49, 50, 51).



Şekil 49. Karbon tetraklorür grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 3 pozitif görünümü. ABC-P.



Şekil 50. Karbon tetraklorür grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 8 pozitif görünümü. ABC-P.

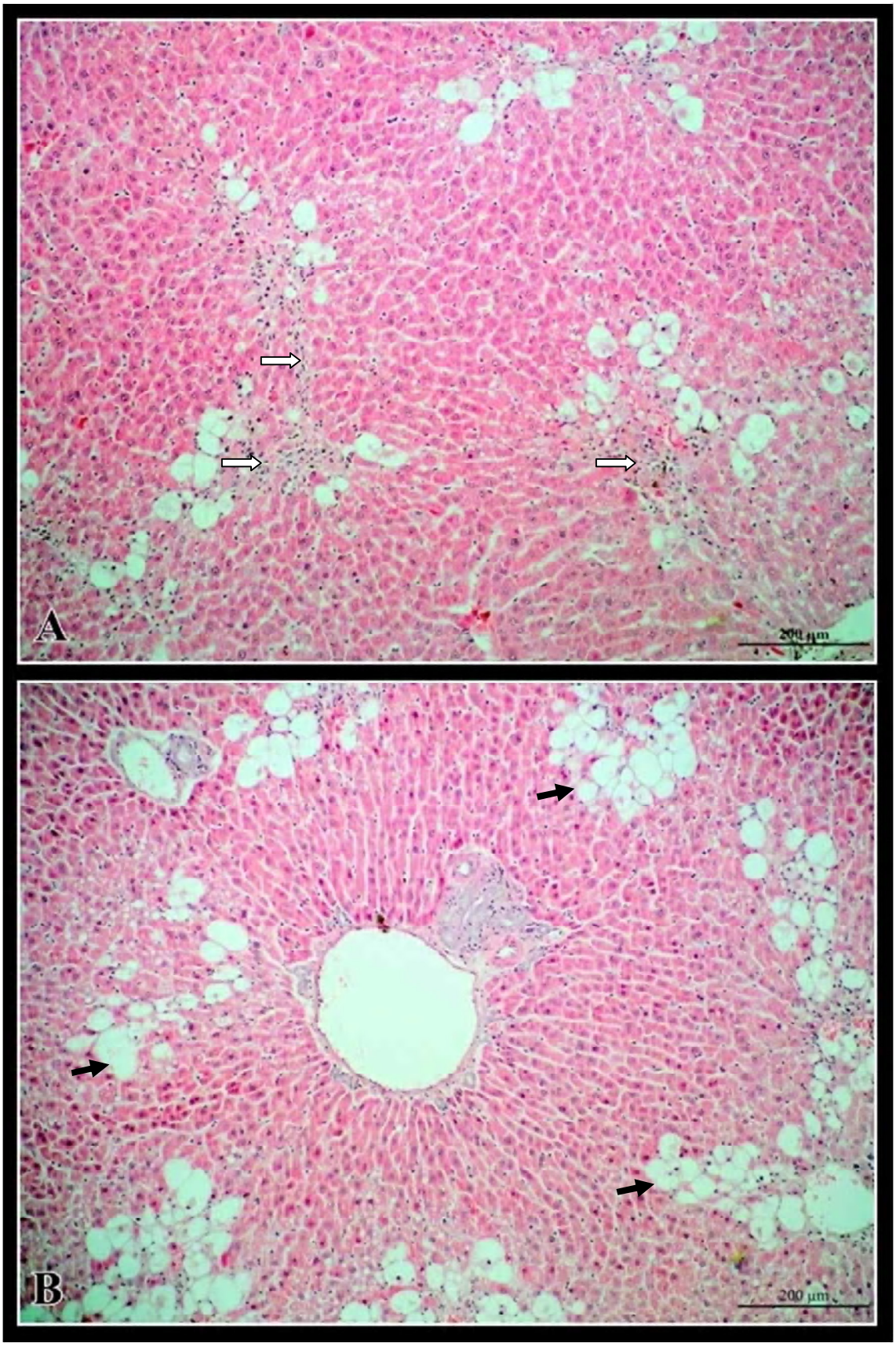


Şekil 51. Karbon tetraklorür grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 9 pozitif görünümü. ABC-P.

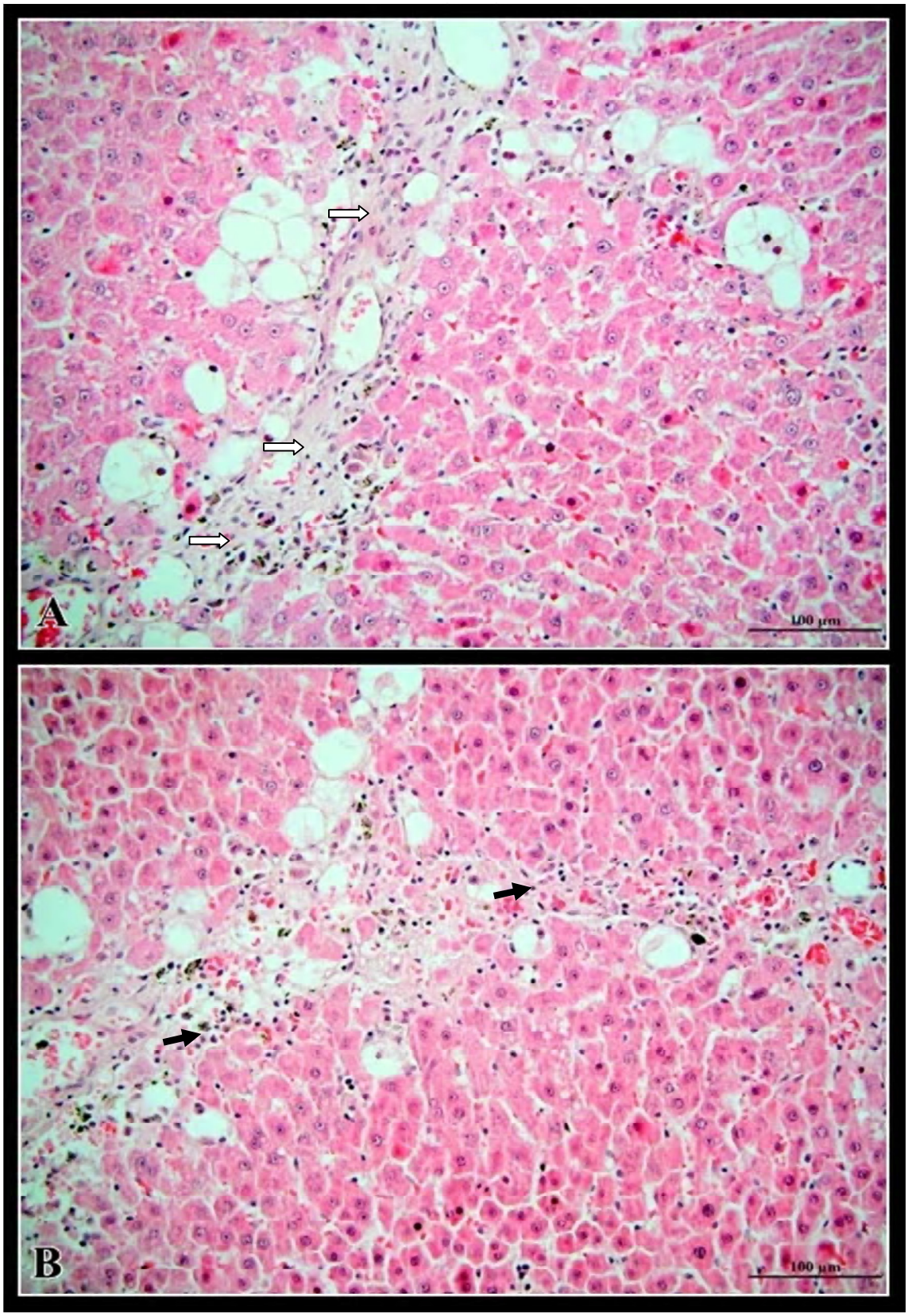
4.3.2.2.1. Karbon tetraklorür+Keten Tohumu Yağı Grubu

Çalışma sonunda bu gruptaki 8 adet ratın hepsinin karaciğer dokularının histolojik incelemesinde hepatositlerde CCl_4 grubuna göre daha az yoğunlukta makro ve mikroveziküler yağ vakuolleri görüldü. Bu bölgelerde fibröz doku artışı ile birlikte yağ vakuolleri küçük gruplar oluşturmuştu (Şekil 52AB). Özellikle yağlanma bölgelerinde yağ vakuolleri arasında ve periferlerinde fibröz bağ doku artışı dikkati çekti. Fibröz doku tam olmayan pseudolobları şekillendirmişti. Bağ doku artış alanlarında lenfositten zengin mononüklear hücre infiltrasyonları görüldü (Şekil 53AB). Parankimde net olarak sınıflandırılamayan geniş nekroz alanları dikkati çekti. Bu alanlar içerisinde küçük yağ vakuolleri gözlenmekte olup, alan pembe homojen bir kitleye dönüşmüştü (Şekil 54). Histopatolojik değerlendirmede lezyonların görünümü, CCl_4 grubu ile örtüşmekteydi.

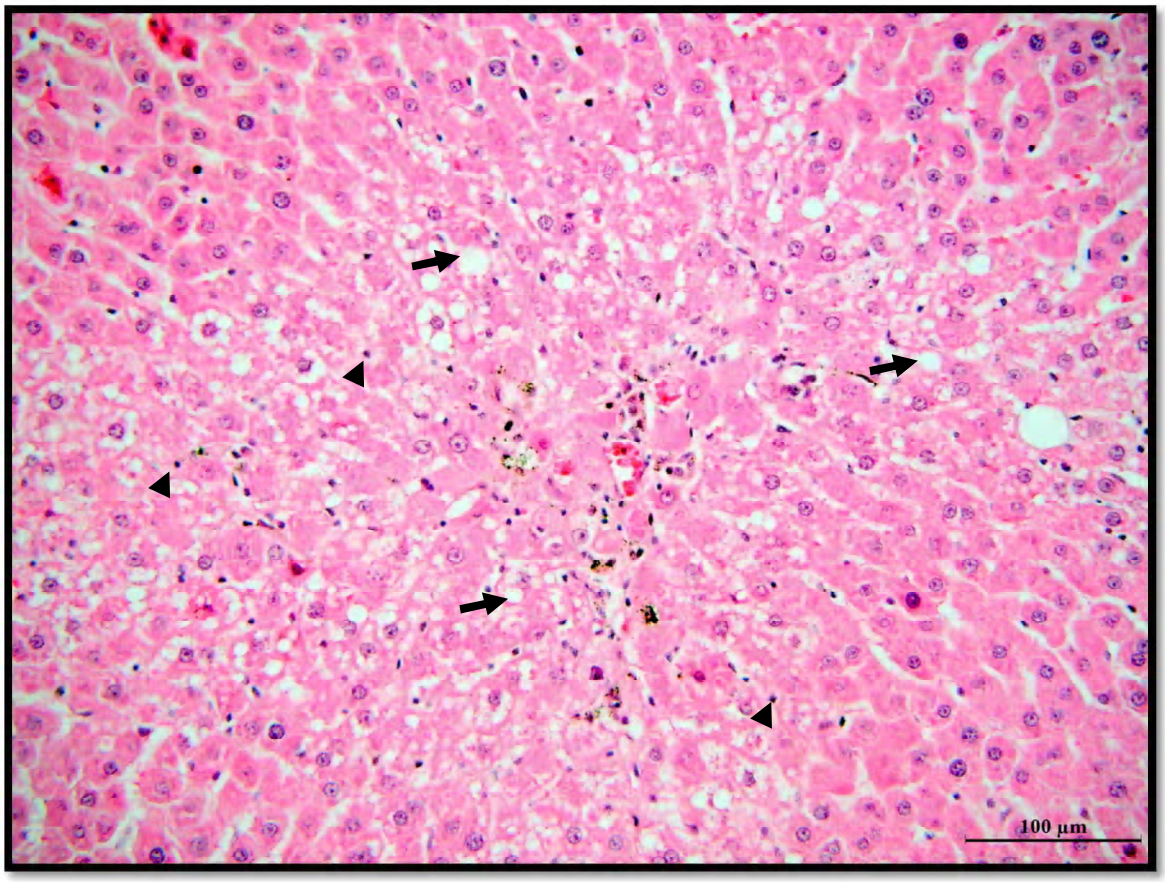
Karaciğer doku kesitlerinde CCl_4'e bağlı olarak oluşan yağlanma, yangı ve nekroz parametreleri skorlandı. Bu gruba ait hasar skorunun kontrol, KTY ve NÇY gruplarından şiddetli ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (Tablo 9). Diğer dokuların histolojik değerlendirmesinde herhangi patolojik bir lezyona rastlanmadı.



Şekil 52. Karbon tetraklorür+KTY grubu ratlarının karaciğer kesitlerinde fibröz doku artışı (beyaz oklar) **(A)** ile küçük gruplar oluşturmuş makro-mikro veziküler yağ vakuollerinin (siyah oklar) **(B)** görünümü. Karaciğer, HxE.

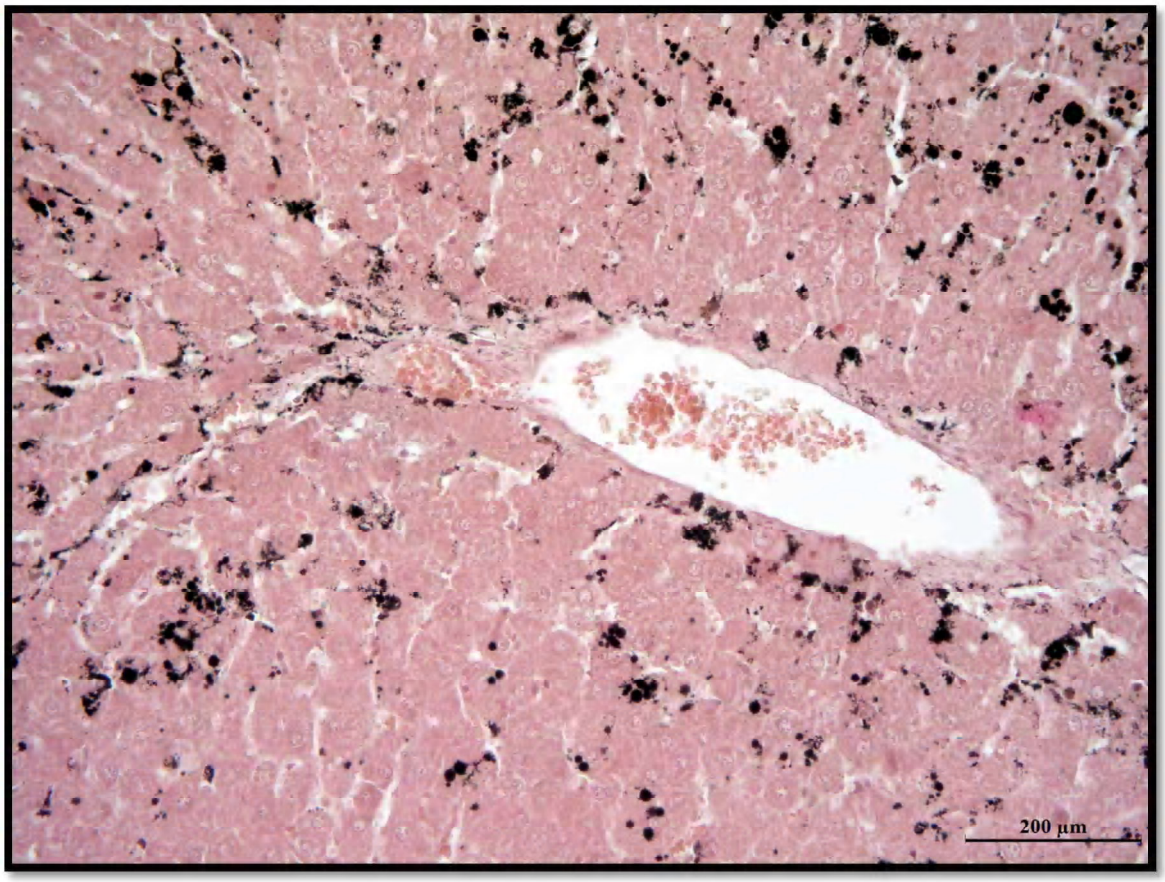


Şekil 53. Karbon tetraklorür+KTY grubu ratlarının karaciğer kesitlerinde küçük gruplar oluşturmuş yağ vakuolleri arasında ve periferlerinde fibröz doku artışıyla parankimde tam olmayan pseudolob görünümü (beyaz oklar) **(A)** ile lenfositten zengin mononüklear hücre infiltrasyon alanları (siyah oklar) **(B)**. Karaciğer, HxE.



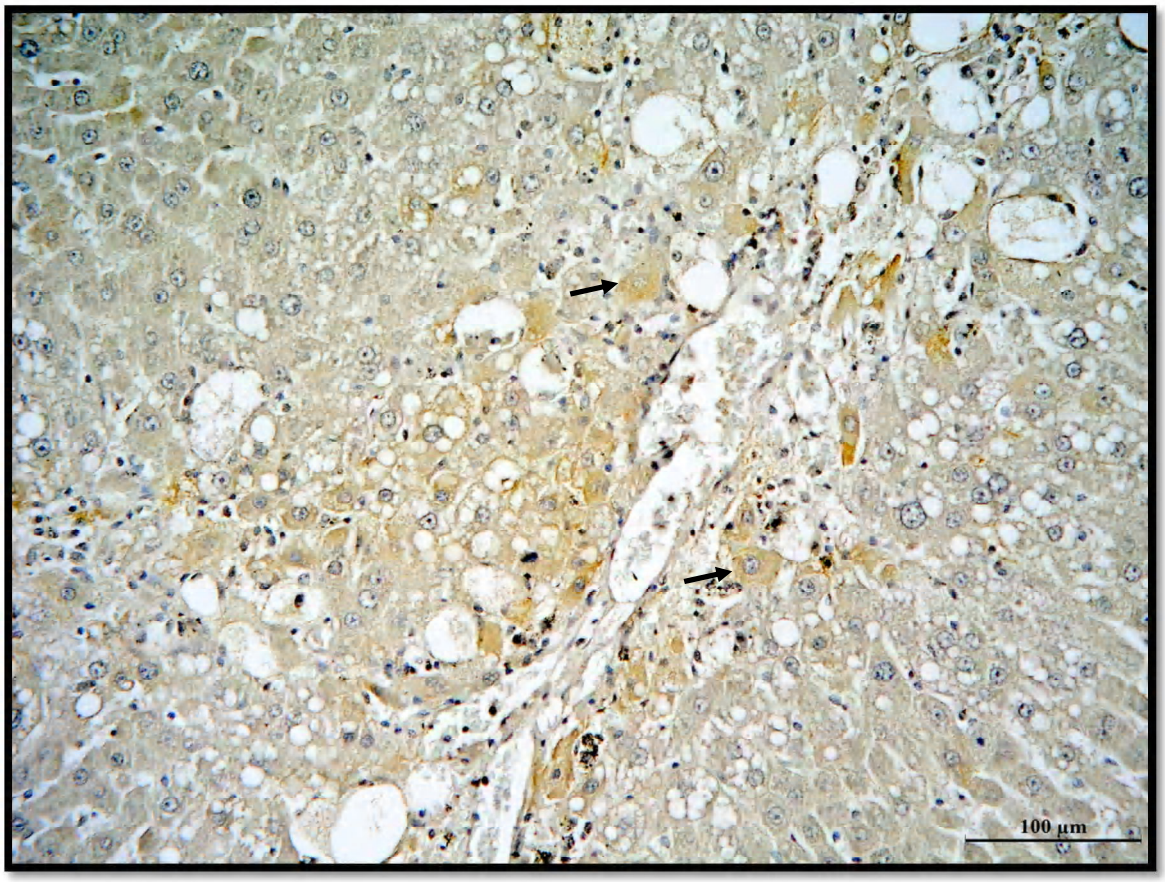
Şekil 54. Karbon tetraklorür+KTY grubu ratlarının karaciğer kesitlerinde parankimde geniş nekroz alanları ve içerisinde lenfositler (ok başları) ile küçük yağ vakuollerinin (oklar) görünümü. Karaciğer, HxE.

Karaciğerden alınan kesitlerden bazılarına osmium tetroksit boyaması yapıldıktan sonra özellikle makro mikro yağ vakuollerinin olduğu alanlarda yağın siyah renkte boyandığı dikkati çekti (Şekil 55).

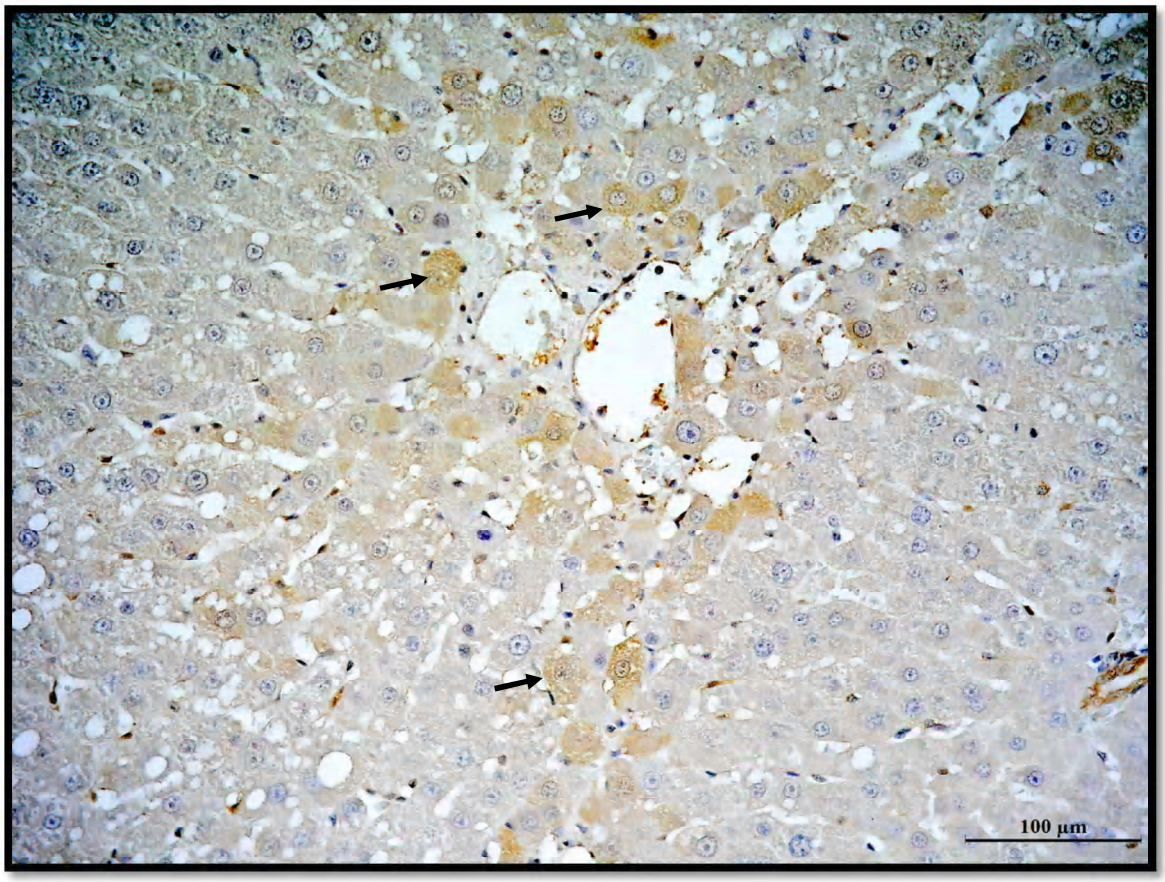


Şekil 55. Karbon tetraklorür+KTY grubu ratlarının hepatositlerinde makro ve mikro veziküler yağ vakuollerinin siyah renkte görünümü. Karaciğer, (OsO_4 fikse edilmiş) HxE.

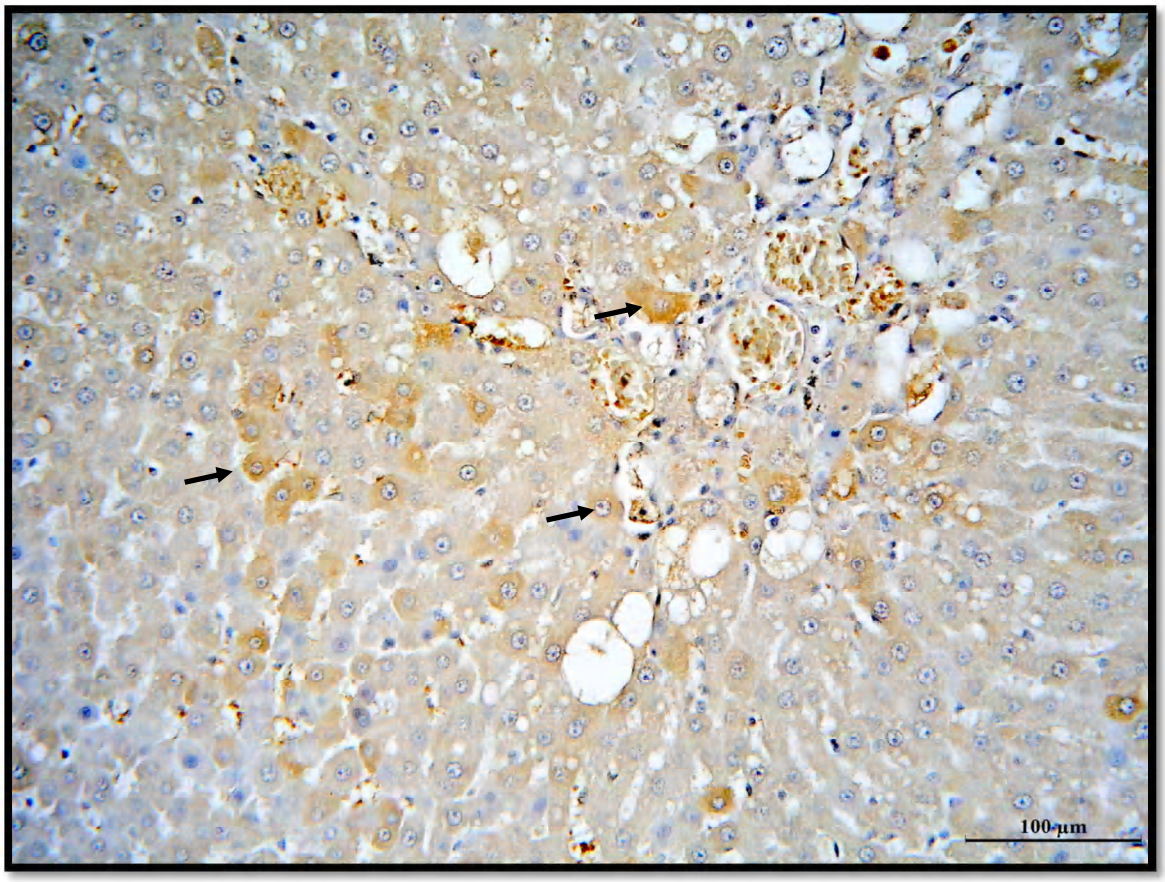
Çalışma sonunda bu gruptaki 8 adet ratın hepsinin karaciğer dokularının immunhistokimyasal incelemesinde; perivasküler, yağ vakouolleri bulunan hepatositler ve sentriasiner venlerin periferindeki hepatositlerde kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 boyamalarında pozitiflik tespit edildi. Pozitif hücrelerde sitoplazmanın kahverengi boyandığı dikkati çekti (Şekil 56, 57, 58).



Şekil 56. Karbon tetraklorür+KTY grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 3 pozitif görünümü. ABC-P.



Şekil 57. Karbon tetraklorür+KTY grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 8 pozitif görünümü. ABC-P.

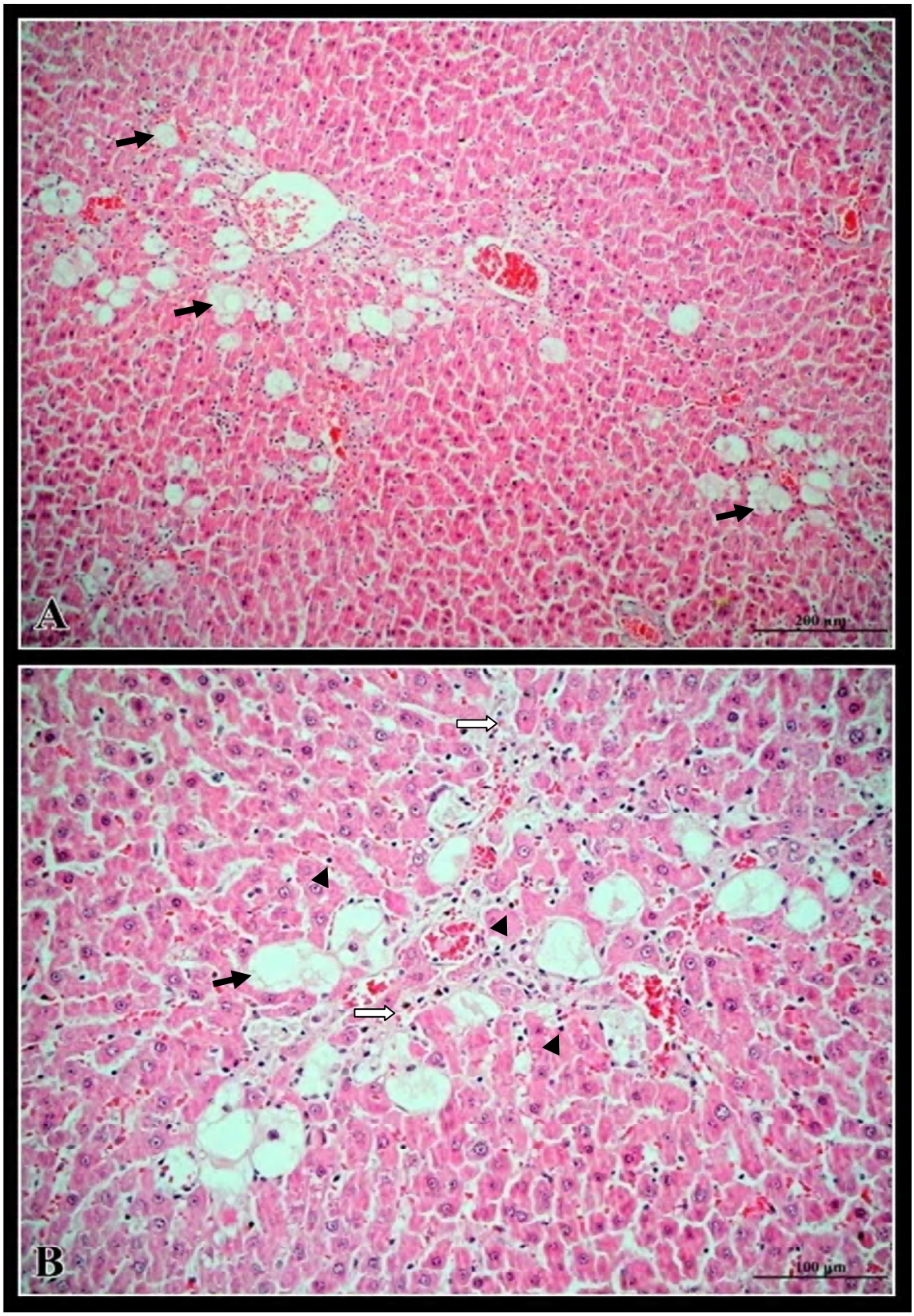


Şekil 58. Karbon tetraklorür+KTY grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 9 pozitif görünümü. ABC-P.

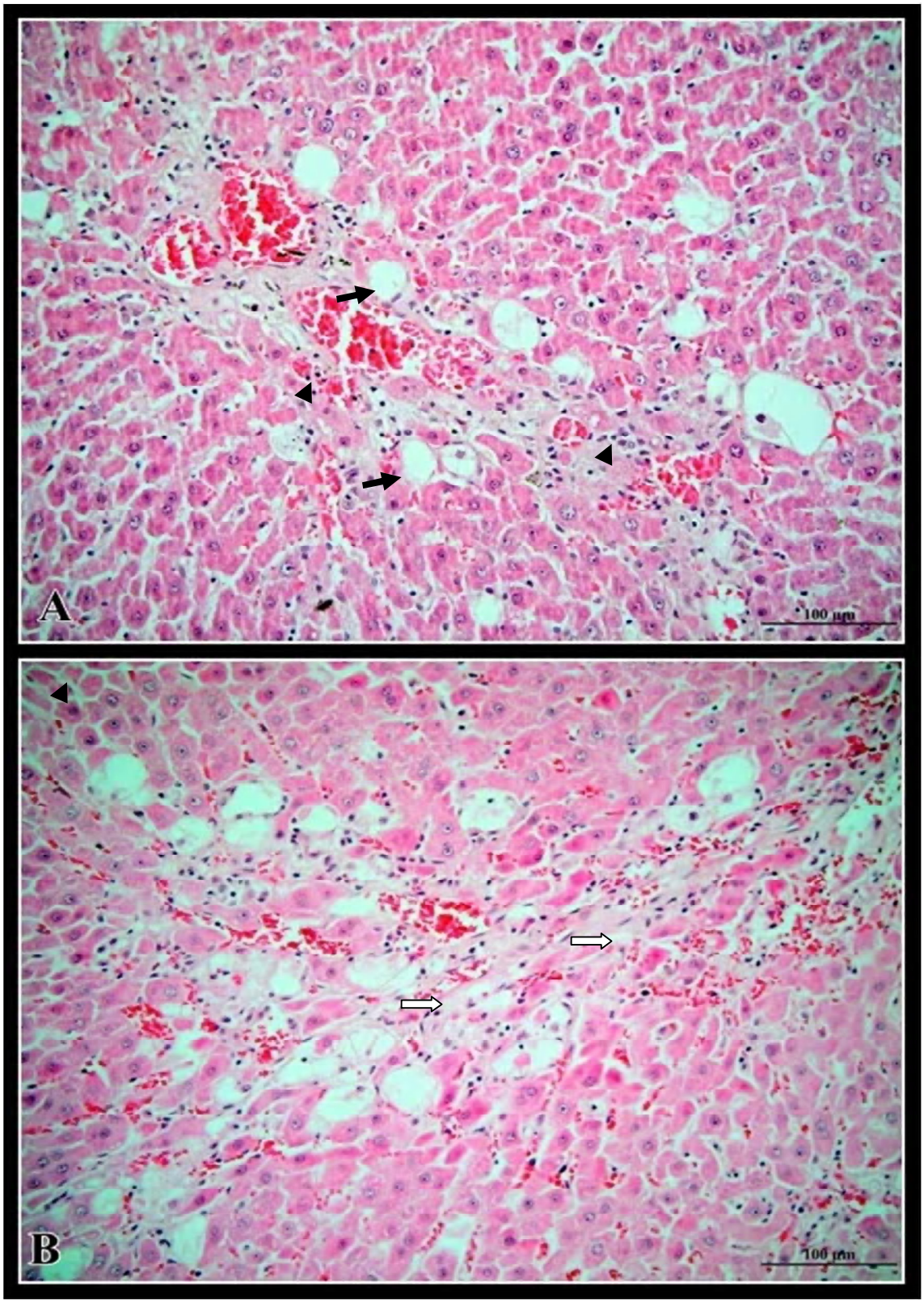
4.3.2.2.2. Karbon tetraklorür+Nar Çekirdeği Yağı Grubu

Çalışma sonunda bu gruptaki 8 adet ratın hepsinin karaciğer dokularının histolojik incelemesinde iki farklı lezyonun varlığı dikkati çekti. İlkinde hepatositlerde CCl_4 grubuna göre daha az yoğunlukta makro ve mikroveziküler yağ vakuolleri görüldü. Bu bölgelerdeki yağ vakuolleri sayı olarak az fakat küçük gruplar oluşturmuştu (Şekil 59AB). Özellikle yağ vakuolleri arasında ve periferlerinde sınırlı fibröz doku artışı dikkati çekti. Fibröz doku tam olmayan pseudolobları şekillendirmişti. Bağ doku artış alanlarında lenfositten zengin mononüklear hücre infiltrasyonları görüldü (Şekil 60AB). İkincisinde parankimde net olarak sınıflandırılamayan geniş nekroz alanlarının varlığı dikkati çekti (Şekil 61AB). Bu alanlar içerisinde mikroveziküler yağ vakuolleri gözlenmekte olup, alan pembe homojen bir kitleye dönüşmüştü (Şekil 62). Histopatolojik değerlendirmede lezyonların görünümü, ilki CCl_4 grubuna göre daha hafiflemişti, ikincisinde ise CCl_4 grubuna göre nekroz alanları çok daha belirgin olup, nekrotik alanlarda özellikle mikroveziküler yağ vakuollerinin daha yoğun olduğu gözlendi.

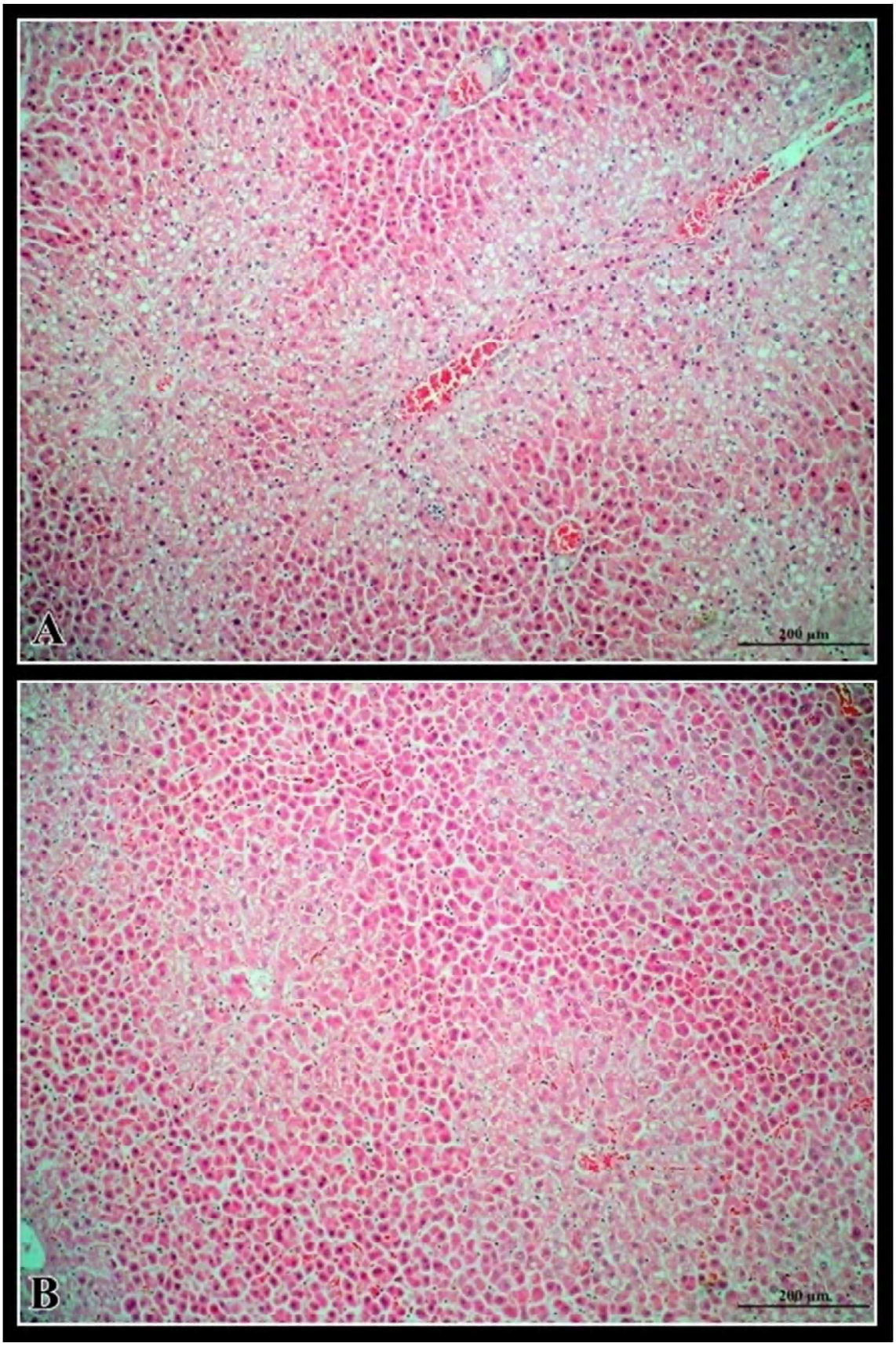
Karaciğer doku kesitlerinde CCl_4'e bağlı olarak oluşan yağlanma, yangı ve nekroz parametreleri skorlandı. Bu gruba ait hasar skorunun kontrol, KTY ve NÇY gruplarından şiddetli ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (Tablo 9). Diğer dokuların histolojik değerlendirmesinde herhangi patolojik bir lezyona rastlanmadı.



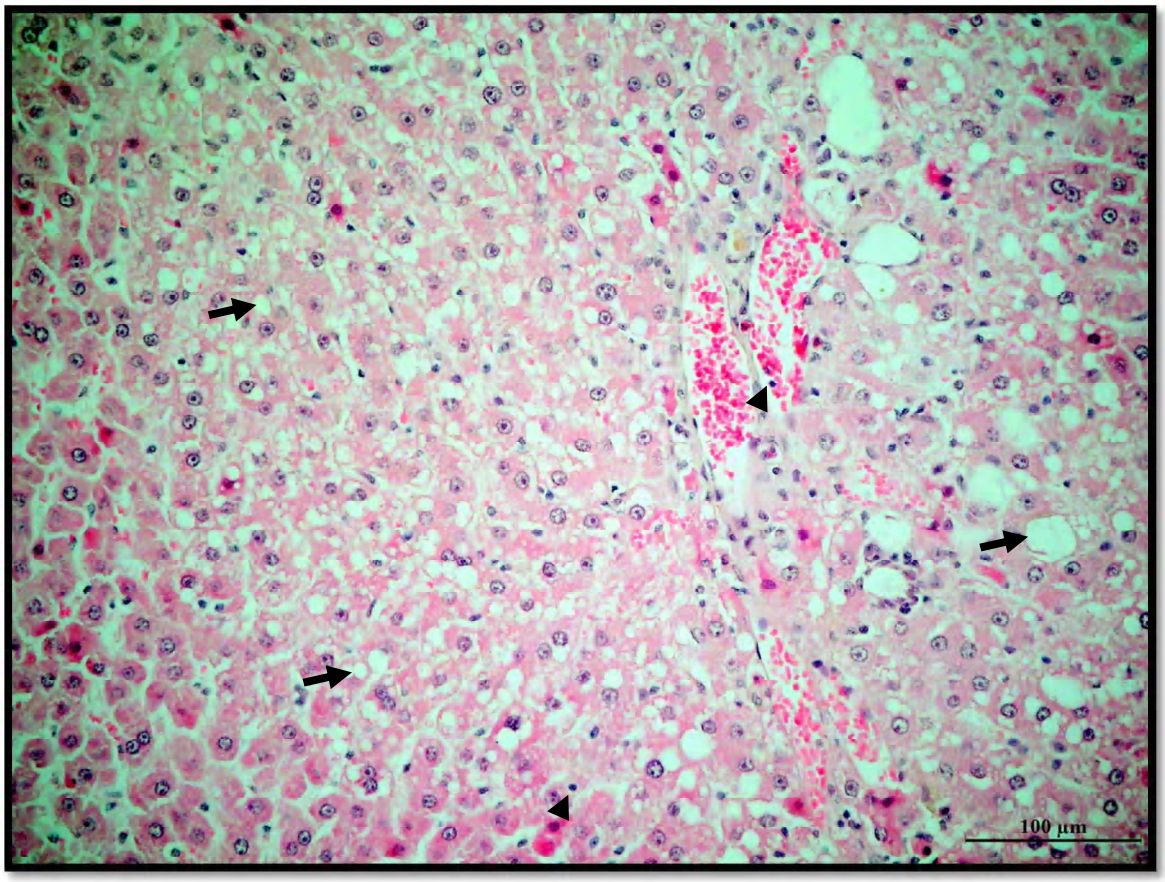
Şekil 59. Karbon tetraklorür+NÇY grubu ratlarının karaciğer kesitlerinde **(A)** makro-mikro veziküler yağ vakuolleri (siyah oklar) küçük gruplar oluşturmuş, **(B)** hafif fibröz doku artışı (siyah ok başları) ve lenfoid hücre (beyaz oklar) infiltrasyonunun görünümü Karaciğer, HxE.



Şekil 60. Karbon tetraklorür+NÇY grubu ratlarının karaciğer kesitlerinde parankimde **(A)** az sayıda yağ vakuolleri (siyah oklar), lenfositten zengin mononüklear hücre infiltrasyonları (siyah ok başları) ile **(B)** bu alanlanlar veperiferlerinde fibröz doku artışı (beyaz oklar) ile şekillenen tam olmayan pseudolobların görünümü. Karaciğer, HxE.

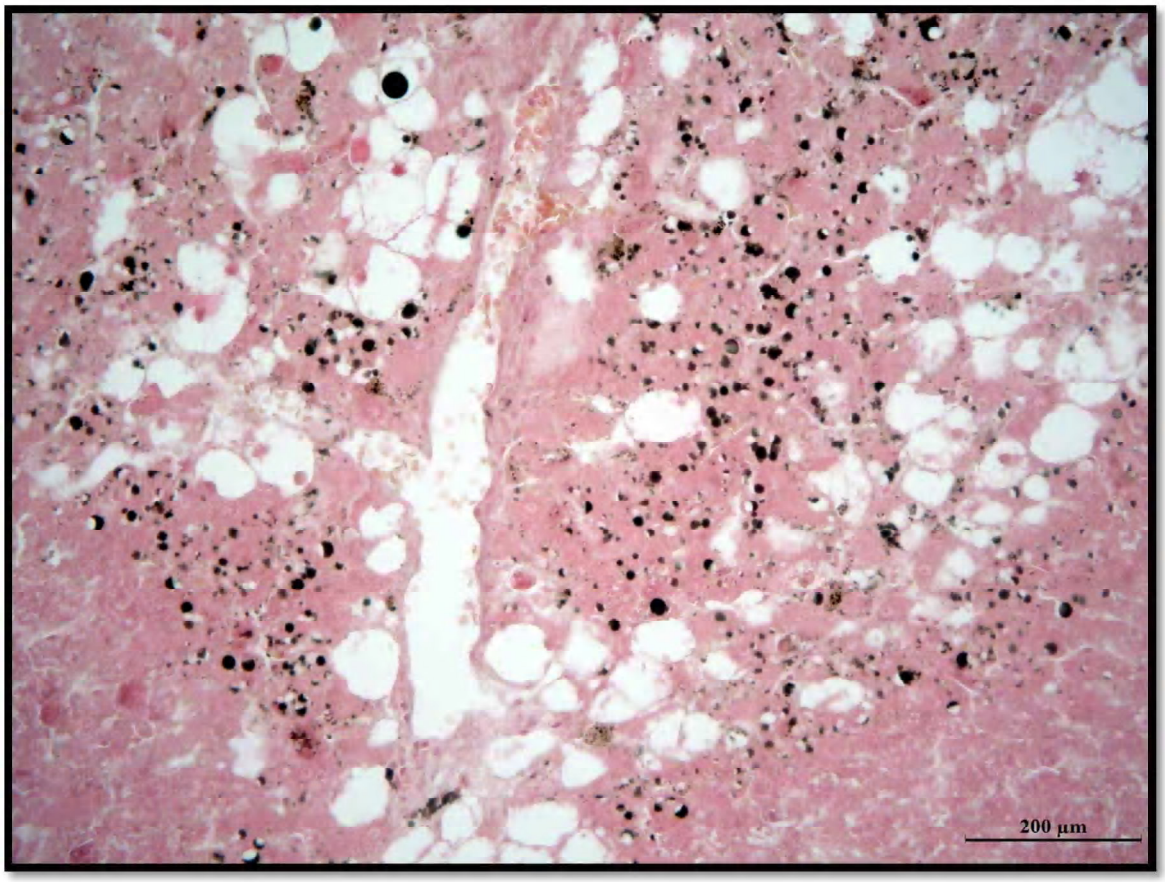


Şekil 61. Karbon tetraklorür+NÇY grubu ratlarının karaciğer **(AB)** kesitlerinde içerisinde mikroveziküler yağ vakuollerinin olduğu geniş nekroz alanlarının görünümü. Karaciğer, HxE.



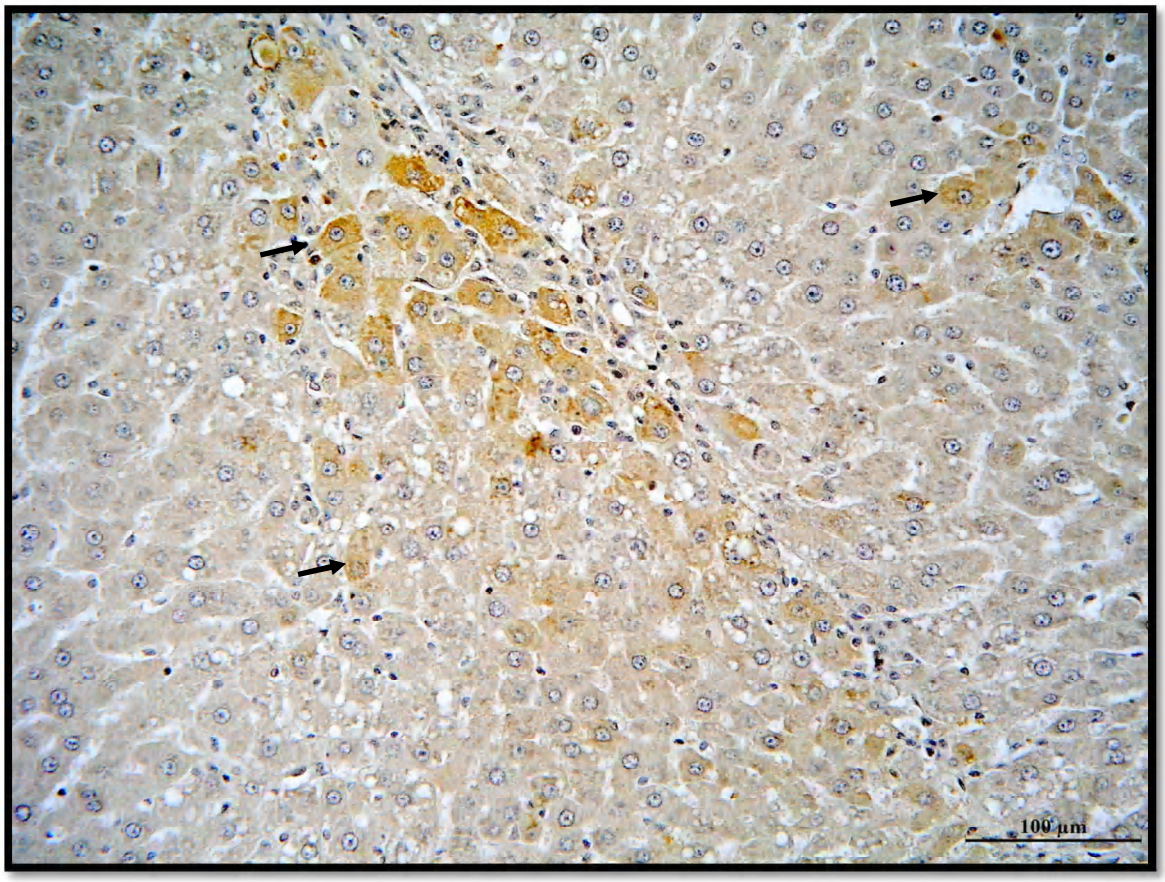
Şekil 62. Karbon tetraklorür+NÇY grubu ratlarının karaciğer kesitlerinde geniş nekroz alanları içerisinde çoğunluğu mikroveziküler ve az sayıda makroveziküler yağ vakuolleri (oklar), damarlarda hiperemi ile az sayıda lenfosit hücre infiltrasyonun (ok başları) görünümü. Karaciğer, HxE.

Karaciğerden alınan kesitlerden bazılarına osmium tetroksit boyaması yapıldıktan sonra özellikle makro mikro yağ vakuollerinin olduğu alanlarda yağın siyah renkte boyandığı dikkati çekti (Şekil 63).

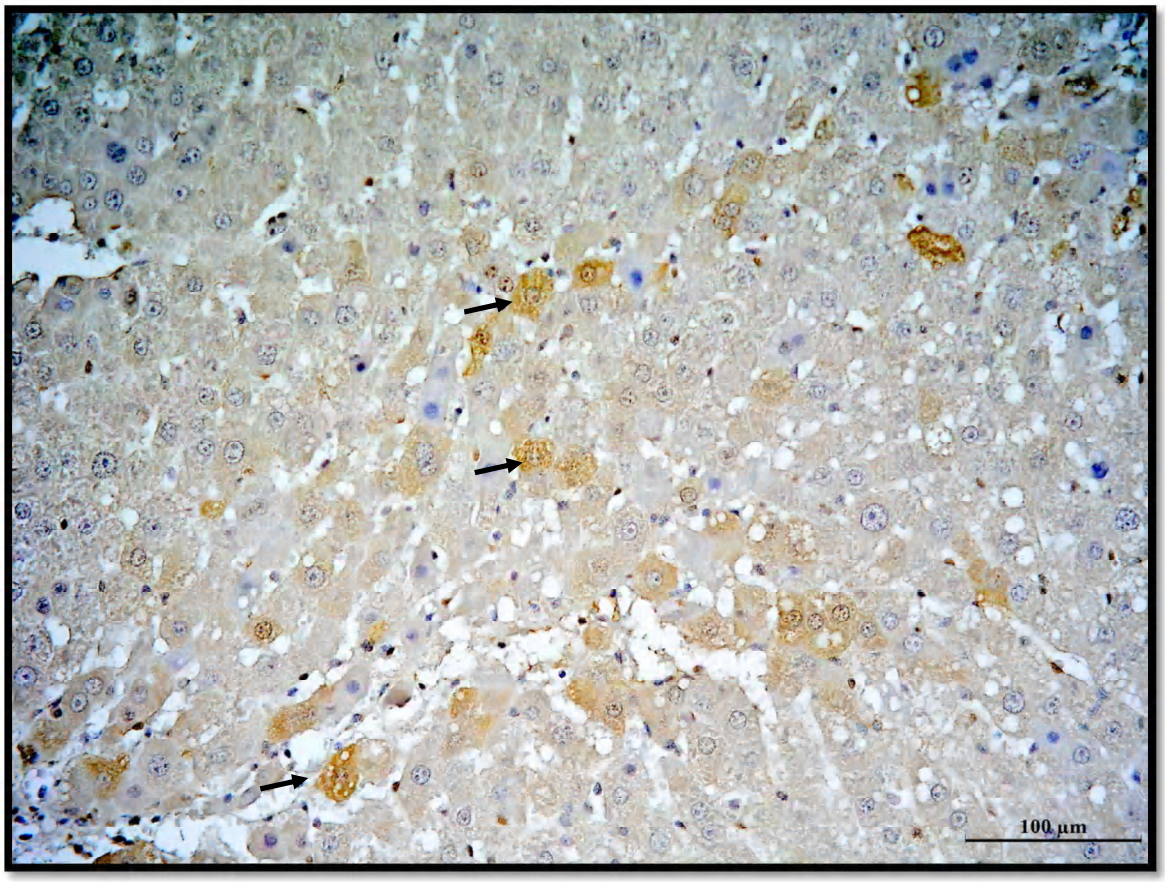


Şekil 63. Karbon tetraklorür+NÇY grubu ratlarının hepatositlerinde makro ve mikro veziküler yağ vakuollerinin siyah renkte görünümü. Karaciğer, (OsO_4 fikse edilmiş) HxE.

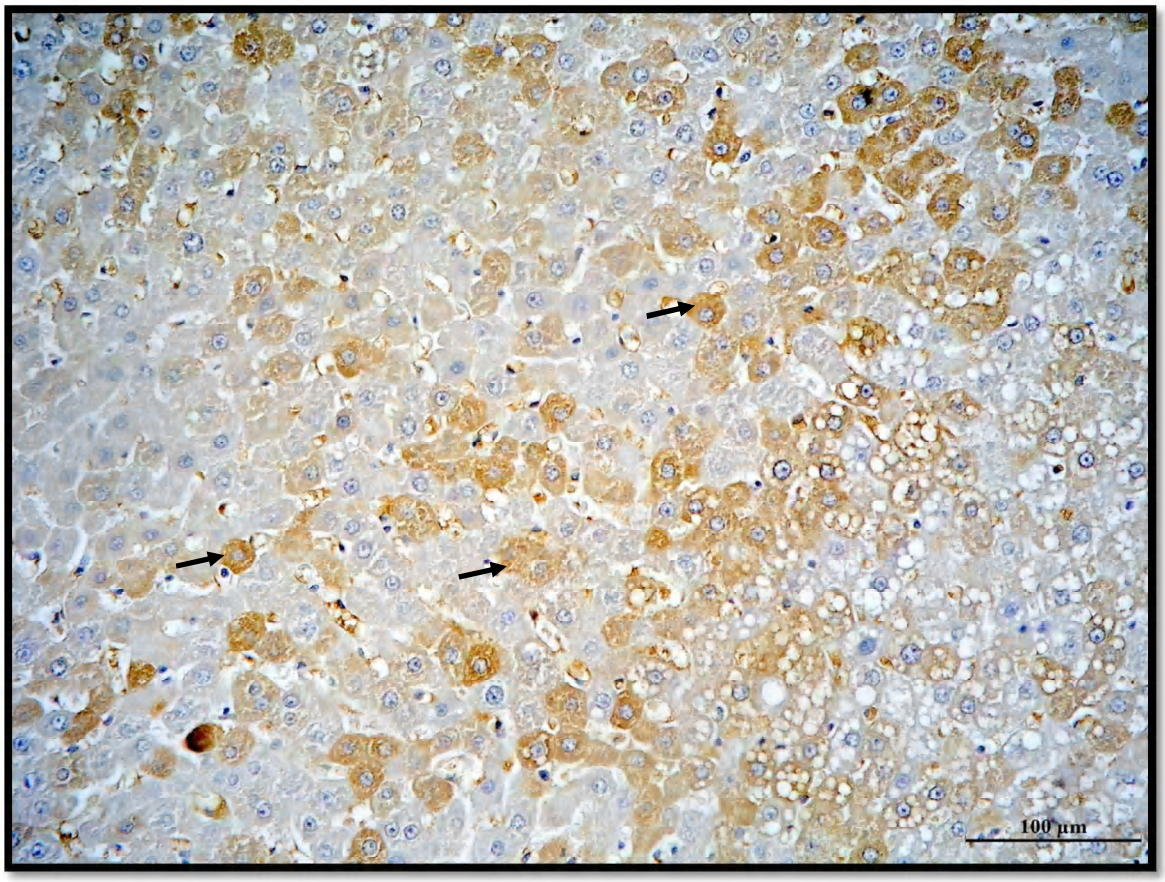
Çalışma sonunda bu gruptaki 8 adet ratın hepsinin karaciğer dokularının immunhistokimyasal incelemesinde; perivasküler, yağ vakouolleri bulunan hepatositler ve sentriasiner venlerin periferindeki hepatositlerde kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 boyamalarında pozitiflik tespit edildi. Pozitif hücrelerde sitoplazmanın kahverengi boyandığı dikkati çekti (Şekil 64, 65, 66).



Şekil 64. Karbon tetraklorür+NÇY grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 3 pozitif görünümü. ABC-P.



Şekil 65. Karbon tetraklorür+NÇY grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 8 pozitif görünümü. ABC-P.



Şekil 66. Karbon tetraklorür+NÇY grubu; immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 9 pozitif görünümü. ABC-P.

4.4. KARACİĞER HASAR SKORLAMASI

Akut ve kronik çalışmada; kontrol, NÇY ve KTY grupları yangı, yağlanma, nekroz ve fibrozis skorları sıfır olup, CCl_4, CCl_4+NÇY ve CCl_4+KTY gruplarından istatistiksel olarak anlamlı bir değişim tespit edildi ($P<0,001$). Karbon tetraklorürile karaciğer toksikasyonu oluşturulan ratlara iyileştirmek amaçlı verilen KTY ve NÇY'nın yangı, yağlanma, nekroz ve fibrozis skorları yönünden azaltıcı bir etkisi olmadığı görüldü (Tablo 8, 9).

4.5. BİYOKİMYASAL ANALİZ BULGULARI

Akut çalışmada gruplara ait serumdan ALT aktivitesi, trigliserit, total protein, albümin ve kolesterol düzeyleri ile karaciğer dokusundan MDA ve TAK aktiviteleri belirlenmiş etkileri Tablo 10'da verildi.

Kontrol, KTY ve NÇY grupları arasında serum ALT aktivitesi yönünden istatistiki anlamda bir fark belirlenmedi. Karbon tetraklorür uygulanan grupta karaciğer hasarına bağlı olarak önemli düzeyde artan ($P<0,01$) serum ALT aktivitesi, karaciğer hasarı oluşturulup KTY uygulanan hayvanlarda azalma göstermedi, ancak CCl_4'lü gruba NÇY'nın uygulaması ile bu enzimin aktivitesi önemli düzeyde düşüş ($P<0,01$) göstermiş olup, normal değerlere döndü (Tablo 10). Serum total protein düzeyleri yönünden, CCl_4+NÇY grubu hariç, diğer gruplar arasında bir fark bulunmadı. Karaciğer hasarı oluşturulan hayvanlarda NÇY uygulaması serum total protein değerlerinde azalmaya neden oldu ($P<0,01$). Gruplar arasında serum albümin değerleri yönünden istatistiki önemde bir fark saptanmadı ($P>0,05$), (Tablo 10). Karbon tetraklorür uygulaması ile oluşan karaciğer hasarına bağlı olarak önemli düzeyde artış gösteren serum total kolestrol düzeyleri ($P<0,01$) gerek KTY gerekse NÇY uygulamasından etkilenmedi (Tablo 10).Karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda serum trigliserit düzeyleri önemli düzeyde ($P<0,01$) artış gösterdi. Bu hayvanlara KTY ve NÇY uygulanması, artmış trigliserit düzeylerini sayısal olarak düşürdü, ancak istatistiki anlamda olmayan bu düşüşler, CCl_4+NÇY grubunda daha belirgindi (Tablo 10).

Karaciğer MDA düzeyleri yönünden kontrol, KTY ve NÇY grupları arasında istatistiki anlamda bir fark saptanmadı. Karbon tetraklorür uygulanması karaciğer MDA düzeylerini kontrol gruplarına göre önemli düzeyde artırdı ($P<0,001$), ancak bu artışlar

gerek KTY gerekse NÇY'nın akut uygulamalarından istatistiki önemde etkilenmedi (Tablo 11). Karaciğer TAK düzeyleri yönünden gruplar arasında istatistiki anlamda bir fark bulunamadı ($P>0,05$) (Tablo 11).

Kronik çalışmada gruplara ait serumdan ALT aktivitesi, trigliserit, total protein, albümin ve kolesterol seviyeleri ile karaciğer dokusundan MDA ve TAK aktiviteleri belirlenmiş etkileri Tablo 12'de verildi.

Karbon tetraklorür uygulanan tüm gruplarda serum ALT aktivitesi kontrol gruplarına göre, oluşan karaciğer hasarına bağlı olarak önemli düzeyde artış ($P<0,001$) gösterdi. Keten tohumu yağı ve NÇY'nın CCl_4'lü ratlara kronik olarak uygulanması, bu enzimin aktivitesindeki artışı düşürmedi (Tablo 12). Serum total protein ve albümin düzeyleri yönünden kontrol ile sadece KTY ve NÇY grupları arasında herhangi bir fark belirlenmedi. Sadece CCl_4 uygulanan grupta, serum total protein ve albümin düzeyleri istatistiki önemde düşüş gösterdi ($P<0,01$). Karbon tetraklorür'lü ratlara gerek KTY gerekse NÇY uygulaması, bu parametrelerde istatistiki anlamda bir değişikliğe neden olmadı (Tablo 12). Kontrol grubuna göre diğer tüm deneme gruplarında serum total kolestrol düzeyleri istatistiki önemde yüksek bulundu ($P<0,01$) (Tablo 12). Serum trigliserit düzeyleri yönünden gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark gözlenmedi ($P>0,05$) (Tablo 12).

Kontrol, KTY ve NÇY grupları arasında karaciğer MDA düzeyleri yönünden bir fark belirlenmedi. Karbon tetraklorür uygulaması ile görülen karaciğer toksisitesi sonucu karaciğer MDA düzeyleri önemli düzeyde artış ($P<0,001$) gösterdi. Karbon tetraklorür'lü gruplara gerek KTY gerekse NÇY uygulanması, artmış olan MDA düzeylerini istatistiki önemde etkilemedi, ancak sayısal olarak azalttı (Tablo 13). Keten tohumu yağı ve NÇY'nın gerek tek başına gerekse CCl_4'lü gruplara kronik olarak verilmesi karaciğer TAK'inde önemli artışlara neden oldu ($P<0,001$) (Tablo 13).

Tablo 8. Akut deneme gruplarına ait doku hasar parametre skorlarının istatistiksel önem kontrolü.

Gruplar	Medyan (%25; %75 Yüzdelik)						İstatistik Önem Kontrolü (Kruskal Wallis Test)
	CCl_4 (N=8)	KONTROL (N=8)	KTY (N=8)	KTY+CCl_4 (N=8)	NÇY (N=8)	NÇY+CCl_4 (N=8)	
Yangı	$2,0^{b}$ (1,0-3,0)	0^{a} (0-0)	0^{a} (0-0)	$2,0^{b}$ (1,75-3,0)	0^{a} (0-0)	$2,0^{b}$ (1,75-3,0)	**P<0,001**
Yağlanma	$3,5^{b}$ (3,0-4,0)	0^{a} (0-0)	0^{a} (0-0)	$3,0^{b}$ (3,0-4,0)	0^{a} (0-0)	$3,5^{b}$ (3,0-4,0)	**P<0,001**
Nekroz	$3,0^{b}$ (2,75-3,00)	0^{a} (0-0)	0^{a} (0-0)	$2,0^{b}$ (1,75-3,0)	0^{a} (0-0)	$2,0^{b}$ (1,75-2,25)	**P<0,001**
Fibrozis	$2,0^{b}$ (2,0-2,25)	0^{a} (0-0)	0^{a} (0-0)	$1,0^{b}$ (1,0-2,0)	0^{a} (0-0)	$1,0^{b}$ (1,0-1,25)	**P<0,001**

$^{a-b}$: Her satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark önemlidir.

Tablo 9. Kronik deneme gruplarına ait doku hasar parametre skorlarının istatistiksel önem kontrolü.

Gruplar	Medyan (%25; %75 Yüzdelik)						İstatistik Önem Kontrolü (Kruskal Wallis Test)
	CCl_4 (N=8)	KONTROL (N=8)	KTY (N=8)	KTY+CCl_4 (N=8)	NÇY (N=8)	NÇY+CCl_4 (N=8)	
Yangı	$1,5^b$ (1,0-2,0)	0^a (0-0)	0^a (0-0)	$2,0^b$ (1,0-2,0)	0^a (0-0)	$1,0^b$ (1,0-2,0)	**P<0,001**
Yağlanma	$3,0^b$ (2,0-3,25)	0^a (0-0)	0^a (0-0)	$2,0^b$ (2,0-3,0)	0^a (0-0)	$2,0^b$ (2,0-3,0)	**P<0,001**
Nekroz	$2,0^b$ (1,75-2,25)	0^a (0-0)	0^a (0-0)	$2,0^b$ (1,75-2,25)	0^a (0-0)	$2,0^b$ (2,0-3,0)	**P<0,001**
Fibrozis	$2,0^b$ (1,0-3,0)	0^a (0-0)	0^a (0-0)	$3,0^b$ (2,0-3,0)	0^a (0-0)	$3,0^b$ (2,0-4,0)	**P<0,001**

$^{a-b}$: Her satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark önemlidir.

Tablo 10. Akut karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda kontrol ve deneme gruplarının serum biyokimyasal parametreleri.

Gruplar	Medyan (%25; %75 Yüzdelik)						İstatistik Önem Kontrolü (Kruskal Wallis Testi)
	KONTROL (N=8)	CCl_4 (N=8)	KTY (N=8)	KTY+CCl_4 (N=8)	NÇY (N=8)	NÇY+CCl4 (N=8)	
ALT(U/L)	68,0[a] (65,0;81,5)	103,0[b] (69,5;190,5)	67,5[a] (62,0;71,25)	174,[0b] (72,0;810,0)	64,0[a] (59,0;68,0)	65,0[a] (59,0;126,0)	P<0,05
Total Protein(g/dL)	6,4[b] (6,1;6,5)	5,7[a] (5,6;5,9)	6,3[b] (6,2;6,6)	6,2[b] (6,0;6,5)	6,6[b] (6,4;6,8)	6,4[b] (6,0;6,5)	P<0,001
Albümin(g/dL)	4,0 (3,9;4,1)	4,1 (3,9;4,2)	4,1 (4,0;4,2)	4,1 (3,9-4,3)	4,1 (4,0-4,3)	3,9 (3,7-4,0)	P>0,05
Total kolesterol (mg/dL)	66,0[a] 58,5;71,0	73,0[b] 72,5; 77,2	62,5[a] 59,7;67,2	70,0[b] 68,0;76,0	69,5[a] 64,0;76,0	72,0[b] 68,25;80,50	P<0,01
Trigliserit (mg/dL)	95,5[a] (72,7; 107,5)	220,0[b] (107,5; 239,0)	98,0[a] (79,5,0; 112,5)	167,5[b] (109,0;175,5)	97,0[a] (67,5;130,5)	128,5[b] (95,0; 151,0)	P<0,01

[a-b]: Her satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark önemlidir.

Tablo 11. Akut karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda kontrol ve deneme gruplarının karaciğer MDA ve TAK parametreleri.

Gruplar	Medyan (%25; %75 Yüzdelik)						İstatistik Önem Kontrolü (Kruskal Wallis Testi)
	KONTROL (N=8)	CCl_4 (N=8)	KTY (N=8)	KTY+CCl_4 (N=8)	NÇY (N=8)	NÇY+CCl_4 (N=8)	
MDA (µmoL/mg protein)	21,6[a] (20,1-23,4)	35,4[b] (24,3-38,3)	22,2[a] (19,5-24,3)	25,9[b] (25,7-33,2)	22,2[a] (19,5-24,3)	25,8[b] (25,3-28,3)	P<0,001
TAK (mmol/L)	3,3 (2,5-3,6)	3,6 (3,2-3,9)	2,8 (2,3-3,1)	3,2 (3,1-3,3)	3,0 (2,4-3,7)	3,3 (3,1-3,7)	P>0,05

[a-b]: Her satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark önemlidir.

Tablo 12. Kronik karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda kontrol ve deneme gruplarının serum biyokimyasal parametreleri.

Gruplar	Medyan (%25; %75 Yüzdelik)						İstatistik Önem Kontrolü (Kruskal Wallis Testi)
	KONTROL (N=8)	CCl_4 (N=8)	KTY (N=8)	KTY+CCl_4 (N=8)	NÇY (N=8)	NÇY+CCl_4 (N=8)	
ALT(U/L)	70,5[a] (66,0-72,5)	152,5[b] (122,5-334,25)	55,0[a] (50,25-72,0)	356,0[b] (251,0-508,0)	56,[0a] (49,75-58,25)	262,0[b] (159,75-348,25)	P<0,001
Total Protein (g/dL)	6,83[b] (6,8-6,9)	6,4[a] (6,3-6,6)	6,61[ab] (6,4-6,6)	6,5[a] (6,4-6,6)	6,69[ab] (6,61-6,84)	6,49[a] (6,2-6,6)	P<0,01
Albümin (g/dL)	4,4[b] (4,2-4,5)	4,13[a] (4,0-4,2)	4,3[ab] (4,2-4,4)	4,2[ab] (4,1-4,3)	4,3[ab] (4,2-4,4)	4,16[a] (4,0-4,2)	P<0,01
Total kolesterol (mg/dL)	58,0[a] (56,5-60,0)	72,0[b] (66,75-88,75)	73,0[b] (66,5-85,5)	80,0[b] (72,0-82,25)	79,0[b] (70,5-87,25)	75,5[b] (62,75-79,25)	P<0,01
Trigliserit (mg/dL)	103,5 (69,0-116,5)	139,5 (112,7-163,2)	120,0 (88,2-199,2)	106,0 (101,0-142,2)	102,5 (83,5-113,7)	119,5 (84,75-171,0)	P>0,05

[a-b]: Her satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark önemlidir.

Tablo 13. Kronik karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda kontrol ve deneme gruplarının karaciğer MDA ve TAK parametreleri.

Gruplar	Medyan (%25; %75 Yüzdelik)						İstatistik Önem Kontrolü (Kruskal Wallis Testi)
	KONTROL (N=8)	CCl_4 (N=8)	KTY (N=8)	KTY+CCl4 (N=8)	NÇY (N=8)	NÇY+CCl_4 (N=8)	
MDA (nmoL/mg protein)	16,1[a] (14,8-18,0)	29,6[b] (23,0-43,1)	17,9[a] (16,7-22,9)	22,6[ab] (21,0-25,9)	19,6[a] (15,4-22,2)	21,2[ab] (18,0-22,4)	P<0,001
TAK (mmol/L)	1,4[ab] (1,2-1,9)	1,0[a] (0,7-1,0)	2,1[b] (1,9-2,2)	1,6[b] (1,2-1,9)	2,5[b] (2,2-2,8)	2,0[b] (1,8-2,3)	P<0,001

[a-b]: Her satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark önemlidir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Ratlara karbon tetraklorür'ün akut veyakronik olarak uygulanmasında karaciğerindeki hepatositler üzerine granülsüz endoplazmik retikulumda bulunan sitokrom P450 enzim sistemi aracılığıyla toksik karakterde ara metabolitleri olan triklorometil (CCl_3) ve triklorometil peroksil (CCl_3O_2) serbest radikal metabolitlerine dönüşmesi ile bunların da hücre membranındaki doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunu başlatmak veya protein ve yağlara bağlanarak hücre membranlarını bozmak suretiyle karaciğer hasarını oluşturduğu bildirilmektedir (3, 25, 27, 32).

Ratlarda karaciğer hasarı oluşturmak amacıyla CCl_4'ün akut uygulandığı çalışmalar mevcuttur (86-108). Bu çalışmalarda karaciğerde sentrilobüler hepatositlerde nekroz, sitoplazmada vakuoler dejenerasyon ve yağlı karaciğer oluşturduğu (86-108) bildirilmiştir.

Karbon tetraklorür'ün akut olarak uygulandığı çalışmalarda; Arosio et al. (94) ratlarda karbon tetraklorür tek doz olarak 3 mg/kg, Kodai et al. (95) 2 ml/kg, Ma et al. (96) 10 ml/kg, Ravikumar et al. (97) 2 ml/kg, Ali et al. (98) 1 ml/kg, Arhoghro et al. (99) 0,5 ml/kg, Ozenirler et al. (100) 2 ml/kg vermişlerdir. Bu araştırıcılar uygulamadan 24 saat sonra karaciğer kesitlerinde hepatosit sitoplazmalarında yağ vakuol oluşumları, remark kordonlarının bozulmasına bağlı interstisyel ödem, V. centralis'lerde ve sinüzoidal alanlarda konjesyon, fokal nekroz, yangı hücre infiltrasyonu şekillendiğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde Shenoy et al. (101) ve Chidambara et al. (102) 0,5 ml/kg ve Singhaland Gupta (103) 1 ml/kg CCl_4'ün yedi gün ve Shankar et al. (104), Karthikeyan et al. (105), Kumar et al. (106) 15 gün boyunca 72 saatte bir 1 ml/kg dozunda CCl_4 uygulanmasıyla karaciğer kesitlerinde sentrilobüler hepatositlerde tek hücre nekrozları, midzonal ve periportal hepatositlerde hafiften şiddetliye kadar değişen yağ vakuol oluşumları, sentral vende konjesyon, çevresinde ve sinüsoidal boşluklarda lenfosit ve Kupffer hücre infiltrasyonları görüldüğünü bildirmişlerdir. Yine CCl_4'ün 2

hafta boyunca haftada üç kez Das et al. (107) 0,6 ml/kg dozunda, Abdelaziz and Ali (108) 4 hafta boyunca haftada iki kez 0,5 ml/kg dozunda vermesi ile yukarıdaki araştırıcıların bulguları ile örtüşen sonuçları bildirmişlerdir. Bu çalışmanın akut döneminde CCl_4'ün ilk hafta iki doz halinde 3 gün ara ile 1 ml/kg intraperitonal yolla uygulanması sonucunda karaciğerde sentrilobüler ve parankimde net olarak sınıflandırılamayan geniş nekroz alanları, çoğunluğu lenfosit olan mononüklear hücre infiltrasyonları ve özellikle sentrilobüler bölgede daha yoğun olmak kaydıyla tüm parankimde hepatositlerde büyüklükleri farklı, keskin kenarlı yuvarlak yağ vakuollerinin gözlenmesi, CCl_4'ün farklı dozları kullanılarak akut karaciğer hasarı oluşturan yukarıdaki araştırmacıların (104, 105, 106) bulguları ile birebir örtüşürken, bazı araştırmalar (95, 96, 97,98, 99, 100) ile büyük benzerlikler göstermiştir.

Karaciğer hasarı oluşturma da CCl_4'ün kronik olarak uygulandığı çalışmalar da mevcuttur (86, 109-116, 133). Bu çalışmalarda CCl_4 hepatositlerde yağ nekrozu, artmış nekrotik alanlar özellikle karaciğer parenkimasını bozarak, ekstrasellüler matriks moleküllerinin sentezinde artışa neden olup, bağ dokusu proteinlerinin birikimiyle kollagenin yoğunlaşmasını sağlayarak fibrozisten siroza kadar uzanan kronik hasarlar ortaya çıkarabilmektedir (1, 5, 28, 109).

Karbon tetraklorür'ün kronik olarak uygulandığı çalışmalarda; Lvet al. (109) ratlara sekiz hafta boyunca haftada üç kere, Yehia et al. (86) on hafta boyunca haftada bir kere, Tasci et al. (133), Ochenashko et al. (110) on iki hafta boyunca haftada iki kere 0,2 ml/kg dozunda CCl_4'ün, karaciğer dokusunda özellikle portal bölgeden gelişen fibrosit, fibroblast ve kollagen demetlerden oluşan fibröz dokunun çevrelediği şiddetli nekroz, hepatositlerde yağ dejenerasyonu ile yangısal hücre infiltrasyonlarının bulunduğu pseudolob oluşumlarına sebep olduğu bildirilmiştir. Çalışmalardan bazılarında ise; Ali et al. (98) 1 ml/kg, Özaslan et al. (111) 0,5 ml/kg, Tan et al. (112) 0,5 µl/g CCl_4'ü 6 hafta boyunca haftada bir kez, Tantawy et al. (113) 0,4 ml/kg, Huang et al. (114) 2 ml/kg, Yim et al. (115), Liu et al. (116) 1 ml/kg CCl_4'ü altı hafta üzeri, haftada 2 kez verdiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmalarda ortak bulgu karaciğerde makro-mikroveziküler yağlanma, hepatositlerde nekroz, rejeneratif nodüller masif fibroz ve mononükleer hücre infiltrasyonudur.

Sunulan çalışmanın kronik döneminde CCl_4'ün on iki hafta boyunca haftada 0,2 ml/kg dozunda uygulayan araştırmacıların (110, 133) karaciğer bulgularıyla paralellik

göstermektedir. Karaciğer kesitlerinde özellikle dejenerasyonun ve yağ vakuollerinin olduğu hepatositlerin yoğun olduğu karaciğer parankiminde ortadan şiddetliye değişen çoğunluğu lenfositlerden oluşan yangısal hücre infiltrasyonu ile kısmi fibrozis oluşumları, bazı kesitlerde pembe homojen renkli içerisinde çok sayıda mikrovezikül yağ vakuollerinin olduğu nekroz alanları saptanmıştır.

Bu çalışmanın hem akut hem de kronik aşamasındaki CCl_4'ün rat karaciğerlerinde görülen histopatolojik değişiklikler, lipid peroksidasyonunun başlamasından sorumlu olan mikrozomlarında sitokrom P450-2E1 vasıtasıyla metabolize edildikten sonra triklorometil serbest radikaline (CCl_3) dönüştürülmesi ile başladığını bildiren (3, 25, 27), membran hücre geçirgenliğini bozarak mitokondriyal yıkım ile ilgili oksidasyon azalması ve yağ asitlerinin esterleşerek hepatositlerde trigliserit halindeki birikimine sebep olduğunu ortaya koyan (132), lipid peroksidasyonu sonucu oluşan toksik reaktif aldehitler, enzim inhibisyonu, DNA hasarı ve lipoprotein salgılanmasının engelleyerek karaciğer yıkımını desteklediği sonucuna varan çalışmalar (3, 4, 5, 6, 25, 27, 28) ile aynı fikirde olup, sentrilobuler yağ nekrozu oluşumunun sitokrom P450 sisteminin yoğun olduğu portal bölgelerde daha şiddetli görüldüğü ve oluşan serbest radikaller aracılığıyla gerçekleşen reaksiyonların nekrozun sebebi olabileceği, bununla birlikte periasiner ve portal bölgelerde yağ nekrozu ve hepatositlerdeki yıkıma bağlı çoğunluğu lenfositlerden oluşan hücresel eksudasyonu oluşumunu açıklayan (25) araştırmacının yorumlarından ileri geldiğini düşündürmektedir.

Antioksidan içerikli bitkisel kaynaklı bileşiklerin ucuz ve kolay ulaşılabilir olması toksik ve yan etkilerinin az olmasından dolayı, farklı kimyasal maddeler ile oluşturulan karaciğer hasarına karşı karaciğeri koruyucu etkilerinin belirlenmesi amacıyla, hayvan modellerinde yapılan deneysel çalışmalarda popüler hale gelmiştir (9, 10, 11).

Keten tohumu yağı, yağ asitlerinin yaklaşık %55'ini oluşturan omega 3 (n-3) yağ asitlerinden alfa-linolenik asidin (ALA) en zengin kaynaklarından birisidir (69, 70, 71). Tokoferoller, yağda çözünebilen en güçlü doğal antioksidanlar olup, Keten tohumu yağında α, β, γ ve δ tokoferolleri içermektedir (72). Yapılan çalışmalarda keten tohumunda bulunan diğer önemli antioksidanlardan biri, flavonoidlerden flavan C- ve O-glikositlerdir. Flavonoidler; hepatotoksinlere, serbest radikallere karşı biyolojik aktiviteye sahipken, lipid perosidasyona karşı enzim aktivitesini inhibe etmektedir (72, 73). Çalışmalar doğrultusunda, sahip olduğu bu içeriklerle östrojenik, antiviral,

antibakteriyel, antifungal, antihelmintik, antikarsinojenik ve en önemlisi antioksidan özelliklere sahiptir (118, 119, 120).

Çeşitli toksik maddeler ile akut karaciğer hasarı oluşturulan ve hasarın keten tohumu yağı (120, 134, 135,136, 137, 138) ve keten tohumu ekstresinin (139, 140, 141) iyileştirici etkisinin araştırıldığı çalışmalar mevcuttur.

Keten tohumu yağının, karbon tetraklörür toksikasyonu ile oluşturulan karaciğer hasarına iyileştirici etkisini histopatolojik yönünden araştırmış herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ancak farklı toksik maddelerle karaciğer hasarı oluşturup, iyileştirmek amacıyla keten tohumu yağı kullanılan çalışmalar (120, 134, 135,136, 137, 138) bulunmaktadır. Bu çalışmalardan Chavan et al. (120) acetaminophen ile oluşturulan karaciğer toksikasyonunda keten tohumu yağının hepatositlerde oluşan yağ vakuollerini azaltığını ve remark kordonlarını kısmen eski yapısına döndürdüğünü, Abdel-Moneimet al. (134) kurşun ile oluşturduğu karaciğer toksikasyonunda, Kupffer hücresinin sayıca artışını, yangı hücresi infiltrasyonlarının yanı sıra hepatositlerdeki sitoplazmik yağ vakuol oluşumlarını ve dejenerasyonunu kısmen azalttığını, Alarifi et al. (135) kurşun asetat ile oluşturulan karaciğer toksikasyonunda nekrotik odaklar içindeki lenfositik hücre infiltrasyonlarını, hepatositlerdeki sitoplazmik yağ vakuollizasyon ve dejenerasyonunu, kupffer hücrelerinin sayısını azaltarak hepatositlerde rejenerasyonun olduğunu, Hendawi et al. (136) thiacloprid ile oluşturduğu toksikasyonda hepatik hücrelerde şiddetli hidropik dejenerasyonu ve yağ vakuollerine sahip hepatositler ve çevresindeki yangısal lenfoid seri hücre infiltrasyonlarını azaltarak oluşan lezyonları hafiflettiğini, El Makawy et al. (137) bisphenol-A ile oluşturduğu karaciğer toksikasyonunda nekrotik alanlar ile birlikte hepatositlerdeki vakuoller yağ dejenerasyonunun şiddetini azalttığını, Wanget al. (138) ethanol ile oluşturulan karaciğer toksikasyonunda hepatositlerdeki makroveziküller yağlanmanın şiddetini azaltarak vezikülleri küçülttüğünü bildirmişlerdir. Ayrıca ratlarda akut CCl_4 toksikasyonuna karşı tedavi amaçlı keten tohumu ekstresi kullanılmış az sayıda çalışmada mevcuttur (139, 140, 141). Bu çalışmalardan Kasote et al. (139) CCl_4 toksikasyonu ile oluşturulmuş karaciğer hasarında ki oluşan nekrozun ve yağ dejenerasyonun engellendiğini, benzer şekilde Khanchandani et al. (140) yaptığı çalışmada, V. centralis çevresinde geniş nekroz alanlarının rejenerasyonunu ve oluşan yağ vakuol sayılarını azalttığını, Endohet al. (141) tarafından yapılan benzer çalışmada

da hepatositlerdeki ciddi vakuoller dejenerasyonun ve nekrozun şiddetini, mononükleer hücre infiltrasyonunu, azalttığını bildirmişlerdir.

Sunulan çalışmada akut olarak verilen CCl_4 ile karaciğer yıkımının iyileştirilmesi amacıyla, keten tohumu yağı verilerek elde edilen veriler, bu konu ile ilgili yeterli çalışmaya ulaşılmadığından tartışılamamıştır. Farklı toksik maddeler ile oluşturulan karaciğer hasarını iyileştirmek için keten tohumu yağı verilerek (120, 134, 135, 136, 137, 138) karaciğerlerde oluşan hasar (hepatositlerde yağ vakuollerinin, nekrozun, yangı hücrelerinin azalması ve hepatositlerde iyileştirici yönden rejenerasyon gözlemlenmesi)'ları iyileştirdiği yönündeki çalışmalar ve CCl_4 ile karaciğer yıkımının iyileştirilmesi amacıyla keten tohumu ekstresi verilerek yapılan çalışma (139, 140, 141) verilerindeki nekrozun ve yağ dejenerasyonun engellendiği, yağ vakuollerinin sayılarının ve yangısal hücresi infiltrasyonunun azaldığı bildirilen sonuçlarla bu çalışmanın sonuçlarını değerlendirmek de sağlıklı olamayacağı düşünülmüştür. Ancak çalışmamızda karaciğer dokusunda meydana gelen histopatolojik değişiklikler CCl_4 gurubundaki ile birebir örtüştüğünden keten tohumu yağının iyileştirici bir etkisi olmadığı tarafımızdan tespit edilmiştir.

Çeşitli toksik maddeler ile kronik karaciğer hasarı oluşturulan ve oluşan hasarın keten tohumu yağı ile iyileştirilmesi yönünde yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanılamamıştır.

Ahmed-Farid et al. (142) 20 mg/kg dozunda kurşun asetat ile oluşturulan toksikasyonuna karşı 90 günlük 0,5 ml/kg dozunda keten tohumu yağının verilmesinde rat testisinde seminifer tubullerde dejeneratif değişiklikleri engellediğini, Prathapan et al. (143) oral yolla 4 mg/kg arsenik ile oluşturulan toksikasyonun da 45 günlük 500 mg/kg dozunda keten tohumu yağının kullanımının rat kalbinde oluşan mikro hemorajilerin ve intersitisyel ödemin şiddetini önemli derecede azalttığını bildirmişlerdir. Bu konuda farklı dokularda çalışma yapan (142, 143) araştırıcıların oluşan lezyonları keten tohumu yağı kullanımı ile iyileşmesi yönündeki verilerin çalışma verileriyle değerlendirilmesinin uygun olamayacağı düşüncesindeyiz.

Sunulan bu çalışmada kronik CCl_4 toksikasyonu ile ilgili aşamasında oluşan karaciğer lezyonlarının iyileştirilmesi amacıyla keten tohumu yağı uygulanmış olup, hepatositlerde makro-mikro yağ vakuol oluşumları, hepatositlerdeki dejeneratif ve

nekrotik değişiklikler, lezyon bölgelerinde mononükleer hücre infiltrasyonları, remark kordonlarının yapısının bozulması ile özellikle portal ve V. centralis periferinden fibröz doku artışı ile parankimde tam olmayan pseudolob oluşumları gözlenmiştir. Akut aşamadan ayrılan en önemli özellikler makro yağ vakuollerinin sayısı azalırken küçük gruplar oluşturması, nekrotik alanlarda ise çok sayıda mikrovezikül yağ vakuollerinin görülmesi çok sınırlı bir iyileşme olduğunu düşündürebilir.

Nar suyunun, kabuğunun ve yağının, değişik mekanizmalarla çok sayıda terapötik yarar sağladığı göstermiş olup, birçok araştırmacı yaptıkları çalışmalarda nar bileşiklerinin antioksidan ve anti-inflamatuvar özellikte olduğunu bildirmişlerdir (81, 82, 83). Bu etkilerden antioksidan olanların punisik asit, yağ asitleri, steroller ve ellagik asit etkileri ile anti-inflamatuvarların ise hücre bölünmesi, invazyon ve anjiyogenezi engelleyerek oluşturdukları bildirilmiştir (82).

Çeşitli toksik maddeler ile akut karaciğer hasarı oluşturulan ve oluşan hasarın nar çekirdeğinin yağı (122, 124, 125, 144) nar çekirdeği ekstresi (130, 145, 146) nar kabuğunun ekstresi (102, 147, 148) ve nar suyunun (149, 150) iyileştirici etkisini araştırmış çalışmalar mevcuttur.

Melo et al. (124) ve Gram et al. (125) çalışmalarında karbon tetraklörür ile karaciğer hasarı oluşturup, iyileştirmek amacıyla nar çekirdeği yağı verdiği grupta hafif ve orta derecede mikro ve makro vakuoller gözlenirken, ortalarında nötrofil infiltrasyonu ve kanama odakları bulunan nekrozları bildirmişlerdir. Karbon tetraklörür ile karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda, iyileştirmek amacıyla Yang et al. (130) nar çekirdeği ekstraktı vermiş, yağ vakuollerinin sayıca ve yangı hücrelerinin sayısının azaldığını, nar kabuğu ekstresi veren araştırmacılardan Osman et al. (148) sentriasiner hepatositlerde oluşan vakuoller dejenerasyon, steatozis ve nekroz ile bu alanlardaki fokal mononüklear yangısal hücre infiltrasyonlarının şiddetinin azaldığını, Chidambara et al. (102) ise karaciğer parankimin histolojisinin kontrol grubuna yaklaştığını fakat kanama alanlarının varlığının devam ettiğini bildirmişlerdir.

Karbon tetraklörür dışındaki toksik maddeler ile oluşturulan karaciğer hasarı çalışmalarından Abozidet al. (147) ethanol ile oluşturulan karaciğer toksikasyonunda nar kabuğunun, kupffer hücresinin sayıca artışını, hepatositlerdeki sitoplazmik yağ vakuol oluşumlarını azaltarak histopatolojik olarak kontrol grubu ratların karaciğerine

kısmen yaklaştırdığını, cisplatin ve arsenik ile oluşturulan karaciğer toksikasyonunda nar çekirdeği ekstresinin iyileştirici etkisini araştıran, Yıldırım et al. (145) hepatoselüler nekrozun ve yağ dejenerasyonun şiddetini azaltığını, Shafik et al. (146) ise nekrotik odaklar içindeki lenfositik hücre infiltrasyonlarını, hepatositlerdeki sitoplazmik yağ dejenerasyonunun lezyonlarını hafiflettiğini, Parasetamol ve civa klörür ile oluşturulan karaciğer toksikasyonunda nar çekirdeği yağının iyileştirici etkisini araştıran, Ali et al. (144), sentrolobüler nekrozun ve hepatositlerdeki balonumsu dejenerasyonun şiddetinin azaldığını, Boroushaki et al. (122) ise hepatositlerdeki yağ vakuol oluşumunu, yangısal hücre infiltrasyonunu ve nekrozun şiddetini azalttığı, D-GaIN ile dimetilnitrozamin oluşturulan karaciğer toksikasyonunda nar suyunun iyileştirici etkisini araştıran, Amal et al. (149) santral bölgede yangısal hücre infiltrasyonunu ve hücrelerdeki nekrozu engellediğini, Shaban et al. (150) ise hepatositlerde vakuol oluşumları ve balonumsu dejenerasyon gözle görülür derecede azalttığını bildirmişlerdir.

Nar çekirdeği yağının, karbon tetraklörür toksikasyonu ile oluşturulan karaciğer hasarına iyileştirici etkisinin araştırıldığı sınırlı sayıda çalışmaya rastlanılmıştır (124, 125). Bu çalışmalarda bildirilen histopatolojik bulgular ile sunulan çalışmamızdaki bulgular, birebir örtüşmektedir. Karbon tetraklorür ile oluşturulan karaciğer toksikasyonunu iyileştirmek amacıyla nar çekirdeği yağı (144) ve nar ekstraktı (102, 130, 148) verilerek yapılan çalışmalarda karaciğerde şekillenen lezyonlardan histopatolojik incelemede yağ vakuollerinin ve yangı hücrelerinin sayıca azaldığını, nekroz ve mononükleer hücre infiltrasyonlarının azaldığı bildirilmiştir. Sunulan çalışmada ise CCl_4+NÇY grubunda karaciğer lezyonlarından makro-mikro veziküler yağ vakuol oluşumları çoğunluğu lenfosit olan mononükleer hücre infiltrasyonları ve nekroz alanları ile remark kordonlarının yapısının bozulması, damarlarda hiperemi gibi bozukluklar CCl_4 grubundakine benzerlik göstermiştir. Benzer şekilde bazı çalışmalarda (124, 125) nar çekirdeği yağının iyileştirici etki gösterip göstermediği tam olarak ortaya konulamamıştır. Sunulan çalışmada karaciğer hasarının nar çekirdeği yağının verilmesi ile tam olarak düzelmediği, bu nedenle bu konuda yeni araştırmaların yapılmasının uygun olacağı kanaatine varılmıştır.

Kronik karaciğer toksikasyonuna karşı nar çekirdeği yağının (125, 151), nar suyunun (86) ve nar ekstresinin (152) iyileştirici etkisi yönünde yapılmış sınırlı sayıda çalışmalar mevcuttur. Karbon tetraklorür ile oluşturulan karaciğer toksikasyonuna karşı Gram ve

ark. (125) nar çekirdeği yağı kullanmış, CCl_4 grubu ratlarda oluşmuş ciddi mikro-makro yağ vakuollerinin, mononükleer hücre infiltrasyonlarının şiddetinin değişmediğini bildirmiştir. Diğer çalışmalarda ise; Sodium Fluoride ile oluşturulan karaciğer toksikasyonuna karşı Ali et al. (151) nar çekirdeği yağını kullanarak hepatositlerin stoplazmalarındaki yağ vakuollerinin, nekrotik odaklar içindeki lenfositik hücre infiltrasyonlarının ve kupffer hücrelerinin sayıca azalmasını sağlayarak, kontrol grubu ratların karaciğerlerine kısmen yaklaştırdığını bildirmişlerdir. Karbon tetraklorür ile oluşturulan karaciğer toksikasyonuna karşı Yehia et al. (86) nar suyunu kullanarak, CCl_4 grubu ratlarda oluşmuş ciddi yağ vakuollerinin, geniş nekroz odaklarının, mononükleer hücre infiltrasyonlarının şiddetini yüksek oranda azalttığını, El-Khadragy et al. (152) nar ekstraktını kullanarak, CCl_4'ün neden olduğu mikroveziküler yağ vakuollerinin, mononükleer hücre infiltrasyonlarının ve fibrozis tamamen engellendiğini bildirmişlerdir.

Sunulan çalışmada kronik CCl_4 toksikasyonu ile ilgili aşamasında oluşan karaciğer lezyonlarının iyileştirilmesi amacıyla nar çekirdeği yağı uygulanmış, sonuçları değerlendirmek için yapılan literatür taramalarında bir çalışmaya rastlanılmıştır (125). Bu çalışmada bildirilen histopatolojik bulgular ile sunulan çalışmamızdaki bulgular, birebir örtüşmektedir. Karbon tetraklorür ve CCl_4 dışındaki farklı toksik maddeler ile oluşturulan karaciğer hasarını iyileştirmek amaçlı verilen nar ekstresinin, nar kabuğunun ve nar suyunun kullanımındaki çalışmalar ile çalışma sonuçlarımızı birebir değerlendirmek mümkün olmamıştır. Nar çekirdeği yağının özellikle fibroz doku oluşumunu kısmen engellediği, hepatositlerdeki makro-mikro veziküler yağ vakuollerinden bazı kesitlerde makroların daha az sayıda ve topluluklar halinde, kesitlerden bazılarında ise mikroveziküllerin geniş nekroz alanları içerisinde sayısının arttığı şeklinde ve bu kesitlerin her ikisinde de özellikle lenfositlerden oluşan mononükleer hücre infiltrasyonlarında devamlılık ile sınırlı artmış fibröz dokuyla şekilenen pseudolob oluşumları CCl_4 grubundakine benzer şekilde görülmesi karaciğer hasarını iyileştirme yönünde çok sınırlı etki yaptığını düşündürmektedir.

Bir hücre ölüm formu olan apoptoz, esas olarak, kaspaz ailesi sistein proteazlarının aktivasyonundan kaynaklanmaktadır (153). Kaspazlar, hücrelerde aktif olmayan proenzimler olarak bulunan ve bir hücre apoptotik intihar etmeye karar verdiğinde proteolitik bölünme ile aktive hale gelen enzimleri temsil eder (21). Kaspaz 8 enzimi

ekstrinsik veya ölüm reseptör yolunu, kaspaz 9 enzimi apoptozun intrinsik veya mitokondriyal yolu ile oluşan inisyatör kaspazlardır. Bu iki yol birleşir ve kaspaz 3 enzimini ve apoptozisin başlamasına neden olur (154, 155). Karbon tetraklorür karaciğer de nekrozu tetiklese de, hepatositlerdeki mitokondriyal fosfolipid tabakasını yok eder ve kaspaz 3'e bağlı apoptozu tetiklemektedir (155, 156). Ratlarda karaciğer hasarı oluşturmak amacıyla CCl_4'ün uygulanan in vitro ve in vivo çalışmalarda, karaciğer hücrelerinde apoptozu belirlemek için yapılan kaspaz aktivitesini içeren immunohistokimyasal bulgular mevcuttur (24, 155-166). Bu çalışmalardan; Lee et al. (157), Domitrović et al. (156), Karakus et al. (24), Hassan et al. (158), Edfawy et al. (159), Liu et al. (160), Aram et al. (161), Chan et al. (162), Leu et al. (163), Lu et al. (164), Xie et al. (165) ve Parajuli et al. (166) tarafından kaspaz 3 aktivitesinin artığını, Liu et al. (160) çalışmasında kaspaz 8 aktivitesinin herhangi bir değişiklik görmediğini, Aram et al. (161), Chan et al. (162), Leu et al. (163), Lu et al. (164), Xie et al. (165) ve Parajuli et al. (166) ise kaspaz 8 aktivitesindeki artışı bildirmişlerdir. Ayrıca Liu et al. (160), Guo et al. (153), Xie et al. (165) ve Parajuli et al. (166) çalışmalarında kaspaz 9 aktivitesinde de artış görüldüğünü ifade etmişlerdir. Çalışmamızın hem akut hemde kronik CCl_4 verilen gruplarında kaspaz 3, 8, 9 değerlendirilmiştir. Kaspaz 3 sonuçları Lee et al. (157), Domitrović et al. (156), Karakus et al. (24), Hassan et al. (158), Edfawy et al. (159), Liu et al. (160), Aram et al. (161), Chan et al. (162), Leu et al. (163), Lu et al. (164), Xie et al. (165) ve Parajuli et al. (166) çalışma sonuçları ile uyumlu olup, kaspaz 8 aktivitesinde, Liu et al. (160) çalışmasında herhangi bir değişiklik gözlenmezken, Aram et al. (161) Chan et al. (162), Leu et al. (163), Lu et al. (164), Xie et al. (165) ve Parajuli et al. (166) çalışma sonuçları ile çalışma verileri uyumlu olup, benzer şekilde artış tespit edilmiştir. Liu et al. (160), Guo et al. (153), Xie et al. (165) ve Parajuli et al. (166) çalışmalarında kaspaz 9 aktivitesinin artığını bildirdikleri şekilde çalışmamızda da benzer şekilde artmıştır. Araştırıcıların ve araştırmanın sonuçlarında CCl_4'ün neden olduğu aşırı reaktif oksijen türevleri oluşumu; endojen antioksidan enzimlerini tüketmekte ve kaspaz 3, 8 ve 9 gibi enzimlerin aktif olarak hepatosit apoptozisini tetiklediği (167), bu durumun CCl_4 toksikasyonunda hem instrinsik hem de ekstrinsik yolu kullanarak hepatositlere apoptoza götürdüğü ve yıkımı gerçekleştirdiğini düşündürmektedir.

Keten tohumu yağının, karbon tetraklörür toksikasyonu ile oluşturulan karaciğer hasarını iyileştirici özelliğini, kaspaz aktivitesine etkisi yönünde yapılmış çalışmalara

rastlanılmamıştır. Ancak farklı toksik maddelerle karaciğer hasarı oluşturup, iyileştirmek amacıyla keten tohumu yağı kullanılan çalışmalar (120, 134-138, 168) bulunmaktadır. Bu araştırmaların hiç birisinde apoptoza giden hepatositlerde kaspaz aktivitesi belirlenmesine yönelik bir tanesi dışında çalışılmamıştır (168). Bu çalışmada ise El-Sharaky al. (168) bromobenzene ile oluşturulan karaciğer toksikasyonunda karaciğer hasarını iyileştirmek amaçlı keten tohumu ekstraktı vermiş, bromobenzene uyguladığı gruplarda kaspaz 3 aktivitesi, kontrol grubuna göre yoğun bir şekilde artmışken, bromobenzene ile birlikte keten tohumu ekstresi verilen grupta kaspaz 3 aktivite yoğunluğunun bromobenzene grubuna göre anlamlı bir şekilde azaldığını bildirmiştir.

Karbon tetraklorür ile oluşturulan karaciğer hasarında, keten tohumu yağının hepatositler üzerindeki kaspaz aktivitesi etkisine dair herhangi bir çalışmaya ulaşılamamıştır. El-Sharaky al. (168) çalışmasında Bromobenzene ile oluşturulan karaciğer hasarı, keten tohumu ekstraktı ile iyileştirici etkisini araştırmışlardır. Bu araştırmacılar hepatotik apoptozun kaspaz 3 aktivitesi ile azaldığını bildirmişlerdir. Sunulan bu çalışmada CCl_4 toksikasyonu ile ilgili akut ve kronik karaciğer yıkım aşamasında hepatositlerde gözlenen apoptoz kaspaz 3, 8, 9'da pozitif tespit edilmiştir. Her ne kadar farklı toksik madde kullanılmış olsa da benzer şekilde bu çalışmada da keten tohumu yağı uygulamasıyla kaspaz 3'ün yanında 8, 9'daki apoptoza giden pozitif hepatosit yoğunluğunun kısmen azaldığı saptanmıştır.

Karaciğer hasarı oluşturma da CCl_4'ün ve farklı toksik maddelerin hem akut hem de kronik olarak uygulandığı, nar çekirdeği ekstraktı (169, 170), nar suyu (150) ve nar ekstraktının (171) iyileştirme ve apoptozun tetiklenmesindeki engelleme etkisini araştıran çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarda karbon tetraklörür ve cisplatin ile oluşturulan karaciğer toksikasyonunda nar çekirdeği ekstresinin iyileştirici etkisini araştıran, İbrahim et al. (169), CCl_4 uyguladığı gruplarda kaspaz 3 pozitif hepatositlerin kontrol grubuna göre sayısı yoğun şekilde artarken, CCl_4 ile birlikte nar çekirdeği ekstresi verilen gruptaki pozitif hepatosit sayısı yoğunluğu CCl_4 grubuna göre hafif bir azalma gösterdiğini, Çayır et al. (170), cisplatin uyguladığı grupta V. centralis çevresindeki hepatositlerde yoğun kaspaz 3 pozitifliği tespit ederken, cisplatinin neden olduğu yoğun kaspaz 3 aktivasyonunu nar çekirdeği ekstraktının önemli ölçüde azalttığını, Shaban et al. (150) diethylnitrosamine ve phenobarbital ile karaciğer hasarı

oluşturup, iyileştirmek amacıyla nar suyu uyguladığı gruplardaki kaspaz 3 aktivitesini, kontrol grubu seviyelerine indirdiğini, Choudhuryet al. (171) ise arsenik ile karaciğer hasarı oluşturup, hepatositlerde artmış kaspaz 3 aktivitesinin, arsenik+nar ekstraktı verdiği gruplarda ise azalttığını bildirmişlerdir.

Sunulan çalışmada CCl_4 toksikasyonu ile ilgili akut ve kronik karaciğer yıkım aşamasında hepatositlerde gözlenen apoptoz kaspaz 3, 8, 9 da pozitif tespit edilirken, nar çekirdeği yağı uygulamasıyla kaspaz 3, 8, 9'daki apoptoza giden pozitif hepatosit yoğunluğunun kısmen azaldığı görülmüştür. Literatür taramalarında çalışmamızla birebir örtüşen herhangi bir çalışma olmadığı için sonuçlar istenilen şekilde değerlendirilememiştir. Ancak CCl_4 ve farklı toksik maddeler ile oluşturulan karaciğer hasarındaki, nar çekirdeği ekstraktı (169, 170), nar suyunun (150) ve nar ekstraktı (171) kullanılan çalışmalarda apoptoza giden hepatositlerde kaspaz 3 aktivitesinde azalma bildirilirken, kaspaz 8 ve 9 ile ilgili herhangi bir veri olmadığı için, çalışma sonuçları ile değerlendirilmesi sağlıklı olmayacağı düşüncesi ön plana çıkmıştır. Sağlıklı değerlendirme ancak kaspaz 3, 8 ve 9 aktivitesinin birlikte değerlendirildiği bir çalışmayla olabileceği sonucuna varılmıştır.

Birçok enzimin dokulara spesifik olarak bulunmasından dolayı kan düzeylerinde tespit edilen artışlar karaciğer, böbrek, kalp ve iskelet kası gibi dokulardaki dejenerasyon ve nekrozla seyreden hastalıkların klinik teşhisine kesinlik kazandırmak amacı ile kullanılır (7, 172). Ratlarda, hepatotoksisitede serum ALT, SDH ve GDH aktiviteleri hepatosellüler hasarın en iyi indikatörleridir (172).

Karbon tetraklorür gibi nekroza sebep olan ajanların karaciğer parankiminde hasara yol açarak kandaki AST ve ALT aktivitelerinde artışa sebep olduğu bildirilmektedir (173). Karbon tetraklorür ile yapılan akut ve kronik çalışmalarda karaciğer hasarının derecesine bağlı olarak, serum AST, ALT ve ALP enzim aktivitelerinin yükseldiği gösterilmiştir (87, 90, 137, 138, 139, 139, 140, 141, 142).

Karbon tetraklorür ile oluşturulan akut (95, 99, 103, 108, 174, 175, 176, 183) ve kronik (33, 111, 112, 113, 115, 116, 177,178, 179) çalışmalarda oluşan karaciğer hepatosit hasarına bağlı hücre membran permeabilitesinin bozulmasıyla kan dolaşımına geçişleri artan ALT enziminin, serum aktivitelerinde anlamlı yükselmeler dikkati çekmiştir.

Sunulan çalışmada bazı araştırmacıların (33, 95, 99, 103, 108, 111, 112, 113, 115, 116, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 183) bulgularıyla uyumlu olarak ratlara CCl_4'ün akut ve kronik uygulanması sonucu, hepatosit yıkımına bağlı hücre membran permeabilitesinin bozulması nedeni ile kan dolaşımına geçen ALT enziminin serum aktivitelerinde anlamlı bir yükseliş olduğu dikkati çekmiştir.

Karaciğer hasarının karakteristik bulgusu olan protein düzeylerindeki azalmaları çalışmalarında bildiren araştırıcılar vardır (180, 181). Özellikle CCl_4 ile karaciğer toksikasyonu oluşturan Gnanaprakash et al. (87) serum total protein, Abdelaziz et al. (108), Ahmed et al. (178) ise serum albümin düzeylerinin azaldığını bildirmişlerdir. Çalışmalardan bazılarında ise; Tantawy et al. (113), Ali et al. (98), Shenoy et al. (101), Breikaa et al. (182), Kumar et al. (183), CCl_4 uygulamasının hem total protein hem de albümin düzeylerinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Sunulan çalışmada yukarıdaki araştırmacıların (87, 98, 101, 108, 113, 178, 182, 183) bulgularıyla uyumlu olarak hem akut hem de kronik dönemde CCl_4'e bağlı olarak görülen serum total protein ve albümin düzeylerindeki azalmaların, bu toksik maddenin endoplazmik retikulumdaki poliribozomları bozarak karaciğerde protein sentezini aksatmasından (180, 181, 183) kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir.

Hasarlı karaciğerin belirlenmesinde serum kolesterol düzeylerindeki artıştan da yararlanılabileceği bildirilmektedir (184). Karbon tetraklorür ile karaciğer hasarı oluşturulan çalışmalarda (97, 115, 185, 186) karaciğer hücre hasarı sonrasında kolesterolün dolaşıma geçmesi sebebiyle serumdaki düzeylerinin yükseldiği saptanmıştır. Ayrıca bir diğer benzer çalışmada (187) serum kolesterol ve trigliserit düzeylerindeki artışlar, karaciğerden aşırı miktarda salınmasına bağlanmıştır. Sunulan çalışmada da yukarıdaki araştırıcıların (97, 115, 185, 186) çalışmalarıyla uyumlu olarak akut ve kronik CCl_4 ile oluşan karaciğer hasarında serum total kolesterol ve trigliserit düzeylerinde artış belirlenmiştir. Bu artışın nedeni CCl_4 uygulamasıyla esterleşen yağ asitlerinin trigliserit şeklinde hepatositlerde birikimi ve karaciğer hücre hasarına bağlı olarak aşırı miktarda dolaşıma salınması sebebiyle olabileceğini bildiren araştırmalarla (185, 186, 187) örtüşmektedir.

Malondialdehit lipid peroksidasyonunun son ürünü olarak membran denatürasyonu ve peroksidasyona yol açan hidrojen peroksit ve reaktif oksijen türlerinin ortaya çıkmasına yol açar (52, 53). Akut (86, 101, 103, 164, 174) ve kronik (86, 109, 112) CCl_4

uygulamasıyla oluşturulan karaciğer hasarında araştırıcılar karaciğer MDA düzeylerinin arttığını bildirmişlerdir. Aynı şekilde sunulan çalışmada da hem akut hem de kronik olarak CCl_4 verilen ratlarda belirlenen karaciğer MDA düzeylerindeki artışlar, CCl_4'ün karaciğer endoplazmik retikulumda bulunan sitokrom P450 enzimi aracılığıyla toksik karakterde CCl_3 ve CCl_3O_2 serbest radikallerine dönüşmesiyle oluşan lipid peroksidasyonunun sonucu şekillenen doku hasarı ve antioksidan savunma mekanizmasının yetersizliğinden (6, 87, 101) ileri gelebilir.

Ratlarda karbon tetraklorürle oluşturulan akut karaciğer hasarının iyileştirilmesi amacıyla keten tohumu yağı verilerek biyokimyasal verilerin değerlendirildiği yeterlisayıda çalışmaya (117) rastlanamamıştır. Sadece Fadlalla et al. (117) karaciğer toksisitesinde yüksek olan serum ALT aktivitesi ile total kolesterol ve MDA düzeylerinin, KTY uygulaması ile anlamlı bir şekilde azaldığını, azalmış total protein düzeylerinin ise arttığını bildirmişlerdir.

Ratlarda çeşitli toksik maddeler (etanol, acetaminophen, kurşun, kurşun asetat Thiacloprid gibi) ile karaciğer hasarı oluşturulan ve hasarın keten tohumu yağı (120, 134, 136, 138, 188) veya ekstresinin (139), iyileştirici etkisinin araştırıldığı çalışmalarda, hasara bağlı artmış ALT aktivitesinin azaldığı ortaya konulmuştur. Chavan et al. (120) parasetamol ile karaciğer toksikasyonunda, azalan serum total proteinin keten yağı ile arttığını, yüksek seviyedeki kolesterol ve trigliserit düzeylerinin azaldığını, Naqshbandi et al. (188) da cisplatin ile oluşturduğu toksikasyonda, artmış olan kolesterol düzeylerinin keten tohumu yağı ile azaldığını tespit etmişlerdir. Karaciğer toksikasyonunu iyileştirmek amaçlı Kasote et al. (139), keten tohumu ekstresini, Chavan et al. (120), Abdel-Moneim et al. (134), Hendawi et al. (136), Wang et al. (138) da keten tohumu yağını uyguladıkları çalışmalarında lipid peroksidasyona bağlı artan MDA düzeylerinin azaldığını bildirmişlerdir.

Sunulan çalışmada ise karbon tetraklorür uygulanan gruplarda karaciğer hasarına bağlı olarak önemli düzeyde artan ($P<0,01$) serum ALT aktivitesi, akut ve kronik olarak karaciğer hasarı oluşturulup KTY uygulanan hayvanlarda azalma göstermemiştir. Karaciğer hasarına bağlı olarak azalan serum protein ile artış gösteren total kolesterol, trigliserit ve karaciğer MDA düzeyleri de KTY uygulamalarından etkilenmemiştir.

Karbon tetraklorür ile ratlarda oluşturulan akut karaciğer hasarının iyileştirilmesi amacıyla nar çekirdeği yağı verilerek yapılan çalışmalarda (124, 125) toksisiteye bağlı olarak artan serum ALT aktivitesi ile MDA düzeylerinin anlamlı bir şekilde azaldığı (124, 125), azalan serum total protein düzeylerinin de arttığı (125) bildirilmiştir. Çeşitli toksik maddeler (ethanol, cisplatin, arsenik, parasetamol, civa klörür, dimetilnitrozamin) ile hem akut hem de kronik karaciğer hasarı oluşturulan ve oluşan hasarın nar çekirdeğinin yağı (122, 144, 151), nar çekirdeği ekstresi (130, 145, 146), nar kabuğunun ekstresi (147) ve nar suyunun (86, 149) iyileştirici etkisinin araştırıldığı çeşitli çalışmalar mevcuttur. Karaciğer hasarını iyileştirmek amacıyla nar çekirdeği yağı veren Boroushaki et al. (122) ve Ali et al. (144) yüksek olan ALT enzim aktivitesi ile MDA, Ali et al. (151) ALT aktivitesinin yanında total kolesterol düzeylerinin de azaldığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte karaciğer toksisitesi oluşturulan ratlarda nar çekirdeği ekstresinin, karaciğer hasarına bağlı olarak artmış olan ALT enzim aktivitesi (130, 145, 146) ile MDA düzeylerini (145, 146) azalttığı, azalmış olan serum total protein ve albümin düzeylerini (146) artırdığı saptanmıştır. Diğer yandan Abozid et al. (147) ethanol ile karaciğer toksikasyonunda azalan serum total protein ve albümin düzeylerinin nar kabuğu ekstresi ile arttığını, yüksek seviyedeki kolesterol ve trigliserit düzeylerinin azaldığını, Yehia et al. (86) da CCl_4 ile oluşturduğu toksikasyonda nar suyunun, artan ALT aktivitesi ile MDA düzeylerini azaltığını tespit etmişlerdir.

Sunulan çalışmada, CCl_4 (124, 125) ve diğer toksik maddeler (122, 144, 151) ile karaciğer hasarı oluşturan çeşitli araştırmacıların bulguları ile uyumlu olarak, akut dönemde CCl_4 ile oluşturulan karaciğer hasarına bağlı artış gösteren ALT enzim aktivitesi NÇY uygulanması ile önemli düzeyde düşmüştür ($P<0,01$), azalan serum total protein düzeyleri de Gram et al. (125)'un bulgularına benzer şekilde artmıştır. Ancak karaciğer TAK; MDA düzeyleri ile serum albümin, total kolesterol ve trigliserit düzeyleri NÇY uygulamasından etkilenmemiştir. Kronik dönemde karaciğer hasarı oluşturulan ratlara NÇY uygulaması karaciğer TAK düzeyi hariç; diğer biyokimyasal parametrelerde herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır.

Serbest radikaller vücutta sürekli olarak oluşturulan ve antioksidan savunma sistemleri tarafından ortadan kaldırılan moleküllerdir (44). Normalde vücudumuzda oksidanlar ve antioksidanlar arasında bir denge vardır. Total oksidan düzeyinin (TOS) total antioksidan kapasiteyi (TAK) aştığı durumlarda oksidatif stres ve doku hasarı gelişir

(52, 53). Karbon tetraklorürle ratlarda oluşturulan karaciğer hasarında karaciğer antioksidan kapasitesinin azalttığını bildiren çalışmalar (189, 190, 191) olmasına karşın, karaciğer hasarını önlemek amaçlı antioksidan özellikli keten tohumu yağı ve nar çekirdeği yağı verilerek total antioksidan kapasitesini değerlendiren herhangi bir araştırmaya rastlanılamamıştır. Bu çalışmada, akut dönemde karaciğer TAK düzeyleri yönünden gruplar arasında istatistiki anlamda bir fark bulunmazken ($P>0,05$), kronik dönemde KTY ve NÇY'nın gerek tek başına gerekse CCl_4'lü gruplara verilmesi ile karaciğer TAK'inde önemli artışlar belirlenmiştir ($P<0,001$). Ancak bu artışlar karaciğer doku hasarını düzeltecek düzeyde olamamıştır.

Karbon tetraklorür verilerek karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda yapılan bu çalışmanın hem akut hem de kronik aşamasında karaciğerlerde görülen histopatolojik değişiklikler benzer çalışmalarının yapılması durumunda daha sağlıklı değerlendirilebilecektir. Karbon tetraklorür ve haricinde diğer toksik materyal ile yapılan toksikasyonlara karşı, keten tohumu yağı ve ekstresi kullanılan çalışmalar (120, 134, 135,136, 137, 138, 139, 140) da keten tohumu ekstresi ve yağının iyileştirme özelliği ile ilgili sonuçları bu konuda klasik bilgiler veren (72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79) çalışmalarla örtüşmektedir. Ortak düşünce keten tohumunun iyileştirme özelliğinin yapısındaki, tokoferollerin ve flavonoidlerin; lipid oksidasyonunu geciktirerek, lignanların ise; membran ATPaz aktivitesini bastırabildiğinden ve hücre çoğalması ile ilişkili enzimleri inhibe edebildiğinden tümör hücrelerinin çoğalmasını engelleyerek, antikanserojenik olduğu bildirilirken (72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79) oksidatif streside azaltması gibi etkileri ile keten tohumu yağında bulunan omega 3 yağ asitlerinden alfa-linolenik asit ve α, β, γ ve δ tokoferolleri içermesiyle ilgili olabileceği şeklindedir (69, 70, 71, 72). Ancak sunulan çalışma akut ve kronik dönemde karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda KTY uygulaması hem histopatolojik hemde biyokimyasal parametrelerde herhangi bir değişikliğe neden olmaması; karaciğer dokusundaki hasarın düzelmediğini göstermektedir.

Nar çekirdeği yağının CCl_4 ile oluşturulan karaciğer hasarına üzerine iyileştirici etkisini akut çalışan Melo et al. (124) ve Gram et al. (125) çalışma sonuçlarında karaciğer hasarının iyileşip iyileşmediği yönünde belirgin bir sonuç elde edememişlerdir. Sunulan çalışmada nar çekirdeği yağının akut CCl_4 toksikasyonuyla ilgili karaciğer hasarına iyileştirici yönde sınırlı etkisi gözlenmiştir. Karbon tetraklorür ve haricindeki diğer toksik materyaller ile yapılan toksikasyonlara karşı, nar kullanılan çalışmalarda (86,

102, 122, 127, 128, 129, 130, 150) narın iyileştirme özelliği ile ilgili sonuçları bu konuda klasik bilgiler veren (81-85) çalışmalarla örtüşmektedir. Nar çekirdeği yağının içeriğindeki flavonoid ve fenolik bileşenlerinden ileri gelen antioksidan aktivitesine (147) punisik asit başta olmak üzere, linoleik ve linolenik asit gibi doymamış yağ asitlerine bağlı olarak (192) NÇY uygulaması ile akut dönemde CCl_4'ün neden olduğu karaciğer hasarı sonucu artan serum ALT enzim aktivitesinin, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalması ile karaciğer hasarı sonucu azalan serum total protein düzeylerinin artmasının yanında, karaciğer MDA, serum albümin, total kolesterol ve trigliserit düzeylerinin etkilenmemesi karaciğer dokusundaki hasarın düzelmediğinin göstergesi olabileceğini düşündürmektedir. Kronik dönemde ise NÇY uygulaması hem histopatolojik hemde biyokimyasal parametrelerde TAK düzeyi hariç herhangi bir değişikliğe neden olmaması; karaciğer dokusundaki hasarın düzelmediğini göstermektedir.

Sonuç olarak:

- Sunulan çalışmanın akut döneminde kullanılan 2 ml/kg nar çekirdeği yağının, CCl_4 ile karaciğerde oluşturulan histopatolojik değişiklikler üzerinde olumlu etkisi gözlenmemesine karşın, genel olarak incelenen biyokimyasal değerleri kontrol grubu değerlerine yaklaştırdığından, kısmen iyileştirici bir etkisinin olabileceği, ancak bu iyileşmenin karaciğer dokusundaki hasara yansımadığı düşünülmektedir.
- Diğer yandan nar çekirdeği yağının kronik olarak uygulanması ile hem histopatolojik değişiklikler hem de bazı biyokimyasal parametreler üzerinde herhangi bir etkisinin görülmemesi, muhtemelen CCl_4'ün uzun süre kullanımına bağlı olarak karaciğerde geri dönüşümsüz bir hasarın gelişmesinin yanında, organizmanın uzun süre uygulanan nar çekirdeği yağına adaptasyonundan kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.
- Akut ve kronik olarak verilen 4 ml/kg keten tohumu yağı, hem histopatolojik değişiklikler hem de biyokimyasal parametreler ile lipid peroksidasyon göstergeleri üzerinde herhangi bir etkisi görülmedi.
- Nar çekirdeği ve keten tohumu yağının elde edilmesinde kullanılan bu bitkilerin kısımları (kabuk, meyve, çekirdek), elde edilen ürünlerin çeşidi (ekstrakt, yağ, su) ile yetiştikleri toprağın yapısı gibi etkenlere bağlı olarak içeriklerinin farklılığına, farklı işleme teknikleri ile hayvanların bireysel duyarlılıkları gibi birçok faktöre bağlı olarak değişebileceği düşünülmektedir.
- Nar çekirdeği yağı ve keten tohumu yağının farklı sürelerde ve herhangi bir yan etki oluşturmaksızın en iyi sonucu verecek farklı dozlarının kullanılarak dokular üzerine etkilerinin belirlenmesine yönelik yeni akut ve kronik çalışmaların yapılmasına ihtiyaç olduğu kanaatine varıldı.

6. KAYNAKLAR

1. Crawford JM. Karaciğer ve safra yolları. In: Robbins Temel Patoloji (7. Baskı). Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2003; 591-630.
2. Stalker MJ, Hayes MA.Liver and biliary system. Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of domestic animals,Elsevier Philadelphia, PA 2007; 2, 297-388.
3. Recknagel RO, Glende EA JR, Dolak JA, Waller RL. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. Pharmacol Therapeut 1989; 43: 139-154.
4. Bischoff K, Ramaiah SK. Liver toxicity. In: Gupta RC (eds), Veterinary Toxicology Basic and Clinical Principles, Academic Press, 2007: 145-160.
5. Basu S. Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: Eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients. Toxicology 2003; 189: 113-127.
6. Manibusan MK, Odin M, Eastmond DA. Postulated carbon tetrachloride mode of action: A review. J Environ Sci Heal C 2007; 25: 185-209.
7. Kalaycıoğlu L, Serpek B, Nizamlıoğlu M, Başpınar N, Tiftik AM. Biyokimya. Nobel Yayın Dağıtım Ltd. Şti, Ankara, 2000: 450-496.
8. Angulo P. GI epidemiology: nonalcoholic fatty liver disease. Aliment Pharmacol Ther 2007; 25: 883-889.
9. Schinella G, Mosca S, Cienfuegos-Jovellanos E, et al. Antioxidant properties of polyphenol-rich cocoa products industrially processed. Food Research International 2010; 43(6): 1614-1623.
10. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology 1982; 47(5): 412.
11. Radi, R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. Proceedings of the National Academy of Sciences 2018: 115(23); 5839-5848.
12. Berkin Ş, Alçığır G. Nekropsi Yöntem, Medisan Yayınları Serisi, Ankara 2003; 74.

13. Dursun, N. Veteriner Anatomi II. Ankara. Medisan Yayınevi, 2008; 63-69.

14. Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG. Textbook of Veterinary Anatomy-E-Book. Elsevier Health Sciences,2009.

15. König HE, Hans-Georg HG, Bragulla H. Veterinary anatomy of domestic mammals: textbook and colour atlas. Schattauer Verlag 2007.

16. Gülmez N. Sindirim sistemi III: Sindirim Sistemi. Veteriner Özel Histoloji. Nobel Basımevi, Ankara, 2016; 191-195.

17. Sherlock S, Dooley J. Anatomy and Function, Diseases of the Liver and Biliary System (10 th ed), Oxford, Blackwell Science Ltd, UK, 1997; 1-15.

18. İnci A. Sindirim Kanalının Salgı Fonksiyonları. In: Çavuşoğlu, H (ed), Tıbbi Fizyoloji (9. Baskı). Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 1996; 827-828.

19. Erickson HH, Goff JP, Uemura EE. Dukes physiology of domestic animals. John Wiley & Sons, 2015.

20. Studdert VP, Gay CC, Blood DC. Saunders Comprehensive Veterinary Dictionary E-Book. Elsevier Health Sciences, 2011.

21. Eckle VS, Buchmann A, Bursch W, Schulte-Hermann R, Schwarz M. Immunohistochemical detection of activated caspases in apoptotic hepatocytes in rat liver. Toxicologic pathology 2004; 32(1), 9-15.

22. Öktem S, Özhan MH, Özol D. Apoptozisin önemi. Toraks Dergisi 2001; 2(1), 91-95.

23. Coşkun G, Özgür H. Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi 2011; 20(3): 145-158.

24. Karakus E, Karadeniz A, Simsek N, et al. Protective effect of Panax ginseng against serum biochemical changes and apoptosis in liver of rats treated with carbon tetrachloride (CCl_4). Journal of hazardous materials 2011; 195, 208-213.

25. Sun F, Hamagawa E, Tsutsui C, et al. Evaluation of oxidative stress during apoptosis and necrosis caused by carbon tetrachloride in rat liver. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease 2001; 1535(2), 186-191.

26. Shi J, Aisaki K, IkawaY, Wake K. Evidence of hepatocyte apoptosis in rat liver after the administration of carbon tetrachloride. The American journal of pathology 1998; 153(2), 515-525.

27. Weber LW, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: Carbon tetrachloride as a toxicological model. Crc Cr Rev Toxicol 2003; 33: 105-136.

28. Brattin WJ, Glende EA, Recknagel RO. Pathological mechanisms in carbon tetrachloride hepatotoxicity. J Free Radical Bio Med 1985; 1: 27-38.

29. Fan AM, Alexeeff GV. Public health goal for carbon tetrachloride in drinking water. U.S. Environmental Protection Agency, California, D.C, 2000: 2-21.

30. Thrall KD, Vucelick ME, Gies RA et al. Comparative metabolism of carbon tetrachloride in rats, mice, and hamsters using gas uptake and PBPK modeling. J Toxicol Environ Health A 2000; 60: 531-548.

31. Huang B, Ban X, He J, et al. Hepatoprotective and antioxidant activity of ethanolic extracts of edible lotus (Nelumbo nucifera Gaertn.) leaves. Food Chemistry 2010; 120(3), 873-878.

32. Shyur LF, Huang CC, Lo CP, et al. Hepatoprotective phytocompounds from Cryptomeria japonica are potent modulators of inflammatory mediators. Phytochemistry 2008; 69(6), 1348-1358.

33. Muriel P, Escobar Y. Kupffer cells are responsible for liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride. J Appl Toxicol 2003; 23: 103-108.

34. Wu D, Zhai Q, Shi X. Alcohol□induced oxidative stress and cell responses. Journal of gastroenterology and hepatology 2006; 21, S26-S29.

35. Brent J A, Rumack BH. Role of free radicals in toxic hepatic injury II. Are free radicals the cause of toxin-induced liver injury?. Journal of Toxicology: Clinical Toxicology 1993; 31(1), 173-196.

36. Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program mechanism of caspase activation. Journal of Biological Chemistry 2001; 276(36), 33869-33874.

37. Kus I, Ogeturk M, Oner H, et al. Protective effects of melatonin against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats: a light microscopic and biochemical study. Cell Biochem Funct 2005; 23: 169-174.

38. Jadhav VB, Thakare VN, Suralkar AA, et al. Hepatoprotective activity of Luffa acutangula against CCl_4 and rifampicin induced liver toxicity in rats: a biochemical and histopathological evaluation. Indian J Exp Biol 2010; 48: 822-829.

39. Kadiiska MB, Gladen BC, Baird DD, et al. Biomarkers of oxidative stress study II: are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl_4 poisoning?. Free Radical Biology and Medicine 2005; 38(6), 698-710.

40. Mercan U. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2004; 15(1), 91-96.

41. Eşrefoğlu M. Özel Histoloji, Medipres Matbaacılık Yayıncılık Ltd Şti, Malatya, 2009; 106-120.

42. Cochranc CG. Cellular injury by oxidants. Am J Med 1991; 92: 235-305.

43. Yılmaz S, Bahçecioğlu İH. Karbon tetraklorür ile siroz oluşturulmuş ratlarda lipid peroksidasyonu, antioksidant enzim ve pirüvat kinaz aktiviteleri. Turk J Vet Anim Sci 2000; 24: 25-28.

44. Wu D, Cederbaum AI. Alcohol, oksidative stress and free radical damage, Alcohol Res Health 2003; 27: 277-284.

45. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem Biol Interac 2006; 160: 1-40.

46. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants and nutrition. Nutrition 2002: 18; 872-879.

47. Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant. Free Radic Res Commun 1990; 1: 1-32.

48. Aybey B, Tufan H, Ergenekon G. Serbest Radikaller. Türk Dern 1996; 30: 116-122.

49. Kaya S, Pirinççi İ, Bilgili A. Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji. Medisan Yayın Serisi: 35, Ankara, 1998.

50. Matés JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. Toxicology 2000;153: 83-104.

51. KavasGÖ. Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri. Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences 1989; 9(1), 1-8.

52. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. J Clin Pathol 2001; 54:176-186.

53. Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. Biochemical and Biophysical Research Communications 2005; 338: 668–676.

54. Tabakoğlu E, Durgut R. Veteriner hekimlikte oksidatif stres ve bazı önemli hastalıklarda oksidatif stresin etkileri. AVKAE Dergisi 2013; 3(1), 69-75.

55. Basaga HS. Biochemical aspects of free radicals. Biochem Cell Biol 1990; 68: 989-998.

56. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chem 1995; 41: 1819-1828.

57. Uchida K. 4-Hydroxy-2-Nonenal: A product and mediator of oxidative stress. Progr Lip Res 2003; 569: 1-26.

58. Kelly KA, Havrilla CM, Brady TC, Abramo KH, Levin ED. Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. Environ Health Perspect 1998; 106: 375-384.

59. Haddad JJ. Oxygen sensing and oxidant/redox-related pathways. Biochem Bioph Res Co 2004; 316: 969-977.

60. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. Annual review of biochemistry 1995; 64(1), 97-112.

61. Aruoma OI. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. Food and Chemical Toxicology 1994; 32(7): 671-683.

62. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The international journal of biochemistry & cell biology 2007; 39(1): 44-84.

63. Moure A, Cruz JM, Franco D, et al. Natural antioxidants from residual sources. Food Chemistry, 2001; 72(2): 145-171.

64. Naczk M, Shahidi F. Extraction and analysis of phenolics in food. Journal of chromatography A 2004; 1054(1): 95-111.

65. Özel GSK, Birdane YO. Antioksidanlar. Kocatepe Vet J 2014; 7(2): 41-52.

66. Namiki M. Antioxidants/antimutagens in food. Critical Reviews in Food Science & Nutrition 1990; 29(4): 273-300.

67. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease curiosity, cause, or consequence? Lancet. 1994; 344: 721-725.

68. Koracevic D, Koracevic G, Djordjevic V, et al. Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. J Clin Pathol. 2001; 54: 356–361.

69. İşleroğlu H, Yıldırım ZYM. Fonksiyonel bir gıda olarak keten tohumu. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 2005; 22 (2): 23-30.

70. El-Beltagi HS, Salama ZA, El-Hariri DM. Evaluation of fatty acids profile and the content of some secondary metabolites in seeds of different flax cultivars (Linum usitatissimum L.). General and Applied Plant Physiology 2007; 33(3-4): 187-202.

71. Hemmings SJ, Song X. The effects of dietary flaxseed on the Fischer 344 rat. III. Protection against CCl_4-induced liver injury. Cell biochemistry and function, 2005; 23(6): 389-398.

72. Oomah BD, Mazza G. Flaxseed products for disease prevention. Functional Foods. USA: Technomic Publishing Co. Inc. Lancaster Basel 1998: 91-138.

73. Ko KM, Mak DH, Li PC, Poon MK, Ip SP. Enhancement of hepatic glutathione regeneration capacity by a lignan-enriched extract of fructus schisandrae in rats. The Japanese Journal of Pharmacology 1995; 69(4): 439-442.

74. Sung SH, Lee EJ, Cho JH, Kim HS, Kim YC. Sauchinone, a lignan from Saururus chinensis, attenuates CCl_4-induced toxicity in primary cultures of rat hepatocytes. Biological and Pharmaceutical Bulletin 2000; 23(5): 666-668.

75. Meagher LP, Beecher GR, Flanagan VP, Li BW. Isolation and characterization of the lignans, isolariciresinol and pinoresinol, in flaxseed meal. Journal of agricultural and food chemistry 1999; 47(8): 3173-3180.

76. Bloedon LT, Szapary OP. Flaxseed and Cardiovascular Risk. Nutrition Reviews, 2004; 62: 18-27.

77. Mazza, G. (Ed.). In: Functional foods: biochemical and processing aspects (Vol. 1). CRC Press, 1998.

78. MeagherTouré A, Xueming X. Flaxseed lignans: source, biosynthesis, metabolism, antioxidant activity, bio□active components, and health benefits. Comprehensive reviews in food science and food safety 2010; 9(3), 261-269.

79. Rajesha J, Rao AR, Karuna Kumar M, Ravishankar GA. Hepato-protective potential of hull fraction from indian flaxseed cultivar. Asian Journal of Medical Sciences 2010; 1(2), 20-25.

80. Gurib-Fakim, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Molecular aspects of Medicine 2006; 27(1): 1-93.

81. Gil MI, Tomás-Barberán FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. Journal of Agricultural and Food chemistry 2000; 48(10): 4581-4589.

82. Ignarro LJ, Byrns RE, Sumi D, de Nigris F, Napoli C. Pomegranate juice protects nitric oxide against oxidative destruction and enhances the biological actions of nitric oxide. Nitric oxide 2006; 15(2).

83. Lansky EP, Newman RA. Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. Journal of ethnopharmacology 2007; 109(2): 177-206.

84. Noda Y, Kaneyuki T, Mori A, Packer L. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2002; 50(1): 166-171.

85. Celik I, Temur A, Isik I. Hepatoprotective role and antioxidant capacity of pomegranate (Punica granatum) flowers infusion against trichloroacetic acid-exposed in rats. Food and Chemical Toxicology 2009; 47(1): 145-149.

86. Yehia HM, Al Olayan EM, Elkhadragy MF. Hepatoprotective role of the pomegranate (Punica granatum) juice on carbon tetrachloride induced oxidative stress in rats. Life Sci J 2013; 10: 1534-1544.

87. Gnanaprakash K, Madhusudhana CC, Ramkanth S et al. Aqueous extract of *Flacourtia indica* prevents carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rat. Int J Biol Sci 2010; 6: 51-55.

88. Etim OE, Akpan EJ, Usoh IF. Hepatotoxicity of carbon tetrachloride: Protective effect of Gongronema latifolium. J Pharm Sci 2008; 21: 268-274.

89. Zuinen R, Yamaji K, Aoki M, Chikuma T, Hojo H. Early induced, high-level interleukin-6 expression in the rat peritoneal cavity into which a hepatotoxicant carbon tetrachloride was administered. Toxicol Lett 2007; 170: 42-48.

90. Atasever A, Yaman D. The effects of grape seed and colchicine on carbon tetrachloride induced hepatic damage in rats. Exp Toxicol Pathol 2014; 66: 361-365.

91. Ilhan N, Seçkin D. Protective effect of Nigella sativa seeds on CCl4-induced hepatotoxicity. FÜ Sağ Bil Tıp Derg 2005; 19: 175-179.

92. Balderas Renteria I, Camacho Corona M, Carranzo Rozales P. Hepatoprotective effect of Leucophyllum frutescens on Wistar albino rats intoxicated with carbon tetrachloride. Ann Hepatol 2007; 6: 251-254.

93. Khorshid HR, Azonov JA, Novitsky YA, Farzamfar B, Shahhosseiny MH. Hepatoprotective effects of setarud against carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. Indian J Gastroenterol 2008; 27: 110-112.

94. Arosio B, Gagliano N, Fusaro LM et al. Aloe-emodin quinone pretreatment reduces acute liver injury induced by carbon tetrachloride. Pharmacol Toxicol 2000; 87: 229-233.

95. Kodai S, Takemura S, Minamiyama Y, et al. S-allyl cysteine prevents CCl_4-induced acute liver injury in rats. Free radical research 2007; 41(4), 489-497.

96. Ma JQ, Ding J, Zhang L, Liu CM. Hepatoprotective properties of sesamin against CCl_4 induced oxidative stress-mediated apoptosis in mice via JNK pathway. Food and Chemical Toxicology 2014; 64, 41-48.

97. Ravikumar S, Gnanadesigan M. Hepatoprotective and antioxidant activity of a mangrove plant Lumnitzera racemosa. Asian Pacific journal of tropical biomedicine 2011; 1(5), 348-352.

98. Ali SA, Rizk MZ, Ibrahim NA, et al. Protective role of Juniperus phoenicea and Cupressus sempervirens against CCl_4. World journal of gastrointestinal pharmacology and therapeutics 2010; 1(6), 123.

99. Arhoghro EM, Ekpo KE, Ibeh GO. Effect of aqueous extract of scent leaf (Ocimum gratissimum) on carbon tetrachloride (CCl_4) induced liver damage in albino Wister rats. African Journal of Pharmacy and Pharmacology 2009; 3(11), 562-567.

100. Ozenirler S, Dincer S, Akyol G, Ozoğul C, Oz E. The protective effect of Ginkgo biloba extract on CCl_4-induced hepatic damage. Acta Physiologica Hungarica 1997; 85(3), 277-285.

101. Shenoy KA, Somayaji SN, Bairy KL. Hepatoprotective effects of Ginkgo biloba against CCl_4-induced hepatic injury in rats. Indian J Pharmacol 2001; 33: 260-266.

102. Chidambara Murthy KN, Jayaprakasha GK, Singh RP. Studies on antioxidant activity of pomegranate (Punica granatum) peel extract using in vivo models. Journal of agricultural and food chemistry 2002; 50(17), 4791-4795.

103. Singhal KG, Gupta GD. Hepatoprotective and antioxidant activity of methanolic extract of flowers of Nerium oleander against CCl_4–induced liver injury in rats. Asian Pacific journal of tropical medicine 2012; 5(9), 677-685.

104. Shankar NG, Manavalan R, Venkappayya D, Raj CD. Hepatoprotective and antioxidant effects of Commiphora berryi (Arn) Engl bark extract against CCl_4-

induced oxidative damage in rats. Food and chemical toxicology 2008; 46(9), 3182-3185.

105. Karthikeyan M, Deepa K. Hepatoprotective effect of Premna corymbosa (Burm. f.) Rottl. & Willd. leaves extract on CCl_4 induced hepatic damage in Wistar albino rats. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine 2010; 3(1), 17-20.

106. Kumar PV, Sivaraj A, Elumalai EK, Kumar BS. Carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats-protective role of aqueous leaf extracts of Coccinia grandis. Int J Pharm Tech Res 2009; 1(4), 1612-1615.

107. Das BK, Bepary S, Datta BK, et al. Hepatoprotective activity of Phyllanthus reticulatus. Pakistan journal of pharmaceutical sciences 2008; 21(4).

108. Abdelaziz DH, Ali SA. The protective effect of Phoenix dactylifera L. seeds against CCl_4-induced hepatotoxicity in rats. Journal of ethnopharmacology 2014; 155(1), 736-743.

109. Lv P, Luo HS, Zhou XP et al. Thalidomide prevents rat liver cirrhosis via inhibition of oxidative stress. Pathol Res Pract 2006; 202: 777-788.

110. Ochenashko OV, Volkova NA, Mazur SP,et al. Cryopreserved fetal liver cell transplants support the chronic failing liver in rats with CCl_4-induced cirrhosis. Cell transplantation 2006; 15(1), 23-33.

111. Özaslan M, Kılıç IH, Aytekin T, Güldür ME, Bozkurt AI. Investigation of antioxidant effect of zinc biochemically and histopathologically in rats. Biotechnology & Biotechnological Equipment 2005; 19(2), 136-143.

112. Tan H, He Q, Li R, Lei F, Lei X. Trillin reduces liver chronic inflammation and fibrosis in carbon tetrachloride (CCl_4) induced liver injury in mice. Immunological investigations 2016; 45(5), 371-382.

113. Tantawy AA, Moustafa AEGA, Ibrahim HM. Histopathological And Immunohistochemical Evaluation of Antifibrogenic Effect of Grape Seed Extract on CCl_4-Induced Model of Hepatic Fibrosis. Egyptian Journal of Hospital Medicine 2016; 65.

114. Huang YH, Shi MN, Zheng WD, et al. Therapeutic effect of interleukin-10 on CCl_4-induced hepatic fibrosis in rats. World Journal of Gastroenterology: WJG 2006; 12(9), 1386.

115. Yim YK, Lee H, Hong KE, et al. Hepatoprotective effect of manual acupuncture at acupoint GB34 against CCl4-induced chronic liver damage in rats. World journal of gastroenterology: WJG 2006; 12(14), 2245.

116. Liu JY, Chen CC, Wang WH, et al. The protective effects of Hibiscus sabdariffa extract on CCl_4-induced liver fibrosis in rats. Food and Chemical Toxicology 2006; 44(3), 336-343.

117. Fadlallah A, Saleh Abd Elal Z, Fadlalla E. Protective Effect of Olive, Almond and Flaxseed Oil Against Carbon Tetrachloride -Induced Hepatotoxicity In Rat Models. African J Biol Sci 2013; 6, 243-259.

118. Bhatia AL, Sharma A, Patni S, Sharma AL. Prophylactic effect of flaxseed oil against radiation□induced hepatotoxicity in mice. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives 2007; 21(9), 852-859.

119. Bhatia AL, Manda K, Patni S, Sharma AL. Prophylactic action of linseed (Linum usitatissimum) oil against cyclophosphamide-induced oxidative stress in mouse brain. Journal of medicinal food 2006; 9(2), 261-264.

120. Chavan T, Khadke S, Harke S, et al. Hepatoprotective effect of polyunsaturated fatty acids against repeated subacute acetaminophen dosing in rats. Int J Pharm Bio Sci 2013; 4(2), 286-295.

121. Sarıca ZS, Liman BC. Ratlarda Pentaklorofenol Zehirlenmesinde Nar Çekirdeği Yağının Lipid Peroksidasyonu ve Biyokimyasal Parametrelere Etkileri. Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2016; 13(2), 109-119.

122. Boroushaki MT, Mollazadeh H, Rajabian A, et al. Protective effect of pomegranate seed oil against mercuric chloride-induced nephrotoxicity in rat. Renal failure 2014; 36(10), 1581-1586.

123. Bouroshaki MT, Sadeghnia HR, Banihasan M, Yavari S. (). Protective effect of pomegranate seed oil on hexachlorobutadiene-induced nephrotoxicity in rat kidneys. Renal Failure 2010; 32(5), 612-617.

124. Melo ILP, Silva AMO, Carvalho EBT, et al. Effect of Pomegranate (Punica granatum L.) Seed Oil on Markers of Oxidative Stress Induced by Carbon Tetra-chloride in Wistar Rats. Int J Food Sci Nutr Diet 2015; 5, 1-8.

125. Gram DY, Atasever A, Eren M. Effect of pomegranate (Punica granatum) seed oil on carbon tetrachloride-induced acute and chronic hepatotoxicity in rats. Pharmacognosy Research 2018; 10(2), 124.

126. Çalışkan D, Koca T, Doğuç DK, Özgöçmen M, Akçam M. Ratlarda parasetamole bağlı akut karaciğer toksitesinde nar suyunun koruyucu etkisi. Turkish Pediatrics Archive/Turk Pediatri Arsivi 2016; 51(2).

127. Ibrahim ZS, Nassan MA, Soliman MM. Ameliorative effects of pomegranate on carbon tetrachloride hepatotoxicity in rats: A molecular and histopathological study. Molecular medicine reports 2016; 13(4), 3653-3660.

128. Wei XL, Fang RT, Yang YH, et al. Protective effects of extracts from Pomegranate peels and seeds on liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. BMC complementary and alternative medicine 2015; 15(1), 389.

129. Abdou HS, Salah SH, Boolesand HF, Abdel Rahim EA. Effect of pomegranate pretreatment on genotoxicity and hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride (CCl_4) in male rats. Journal of Medicinal Plants Research 2012; 6(17), 3370-3380.

130. Yang LN, Fu ZX, Li MZ, et al. Protective effect of pomegranate seed extracts on carbon tetrachloride-induced liver injury in mice. Journal of Jilin University (Medicine Edition) 2011; 5, 021.

131. Green Cj, Kneight J, Precious S, Simpkin S. Ketamine alone and combined with diazepam or xylazine in laboratory animals: a 10 year experience. Lab Anim 1981; 15: 163-170.

132. Manual of Histologic Staining Methods; of the Armed Forces Institute of Pathology, Luna LG (Edt), New York Blakiston Division, McGraw-Hill, 1968, 34-75.

133. Tasci I, Mas N, Mas MR, Tuncer M, Comert B. Ultrastructural changes in hepatocytes after taurine treatment in CCl_4 induced liver injury. World J Gastroenterol 2008; 14: 4897-4902.

134. Abdel-Moneim AE, Dkhil MA, Al-Quraishy S. The redox status in rats treated with flaxseed oil and lead-induced hepatotoxicity. Biological trace element research 2011; 143(1), 457-467.

135. Alarifi SA, Aldahmash BA, El-Nagar DM, Dkhil MA. Effect of corn oil, flaxseed oil and black seed oil on lead acetate-induced hepatic tissue damage: A histological study. Journal of Medicinal Plants Research 2012; 6(24), 4128-4134.

136. Hendawi MY, Alam RT, Abdellatief SA. Ameliorative effect of flaxseed oil against thiacloprid-induced toxicity in rats: hematological, biochemical, and histopathological study. Environmental Science and Pollution Research 2016; 23(12), 11855-11863.

137. El Makawy A, Eissa F, Mahmoud EB, Elhamalawy O. Flaxseed oil as a protective agent against bisphenol-A deleterious effects in male mice. Bulletin of the National Research Centre 2018; 42(1), 5.

138. Wang M, Zhang XJ, Yan C, et al. Preventive effect of α-linolenic acid-rich flaxseed oil against ethanol-induced liver injury is associated with ameliorating gut-derived endotoxin-mediated inflammation in mice. Journal of Functional Foods 2016; 23, 532-541.

139. Kasote DM, Badhe YS, Zanwar AA, Hegde MV, Deshmukh KK. Hepatoprotective potential of ether insoluble phenolic components of n-butanol fraction (EPC-BF) of flaxseed against CCl_4-induced liver damage in rats. Journal of pharmacy & bioallied sciences 2012; 4(3), 231.

140. Khanchandani R, Singh SP, Agarwal A. Role of omega-3 fatty acid in hepatoprotection against carbon tetra chloride induced liver injury in albino rabbits. Journal of Biomedical and Pharmaceutical Research 2014; 3(6).

141. Endoh D, Okui T, Ozawa S, et al. Protective effect of a lignan-containing flaxseed extract against CCl_4-induced hepatic injury. Journal of Veterinary Medical Science 2002; 64(9), 761-765.

142. Ahmed-Farid OA, Hassan MA. The Protective Effect Of Flaxseed Oil Supplemented With High Source Of Branched Chain Amino Acids Against The Rats Testicular Toxicity Induced By Lead Acetate.World Journal Of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 2017; 6,30-42.

143. Prathapan A, Abhilash M, Raghu KG, et al. Attenuation of arsenic trioxide induced cardiotoxicity through flaxseed oil in experimental rats. Redox Report 2017; 22, 346-352

144. Ali NA, Saeed SZ. Pomegranate seed oil ameliorates paracetamol induced hepato- and nephro-toxicity in rats. Middle East Journal of Internal Medicine 2013; 6(2).

145. Yıldırım S, KısaF, Karadenız A, et al. Effects of pomegranate seed extract on liver paraoxonase and bcl-xL activities in rats treated with cisplatin. Journal of Medicinal Plants Research 2012; 6(12), 2317-2323.

146. Shafik NM, El Batsh MM. Protective effects of combined selenium and Punica granatum treatment on some inflammatory and oxidative stress markers in arsenic-induced hepatotoxicity in rats. Biological trace element research 2016; 169(1), 121-128.

147. Abozid MM, Farid HE. The anti-fatty liver effects of guava leaves and pomegranate peel extracts on ethanol-exposed rats. J Biol Chem Environ Sci 2013; 8(3), 83-104.

148. Osman M, Ahmed M, Mahfouz S, Elaby S. Biochemical studies on the hepatoprotective effects of pomegranate and guava ethanol extracts. N Y Sci J 2011; 4: 27-41.

149. Amal AF, Monira A, Abeer H. Modulatory effects of pomegranate juice on nucleic acids alterations and oxidative stress in experimentaly hepatitis rats. Life sci 2012; 9: 676-682.

150. Shaban NZ, El-Kersh MA, Bader-Eldin MM, Kato SA, Hamoda AF. Effect of Punica granatum (pomegranate) juice extract on healthy liver and hepatotoxicity induced by diethylnitrosamine and phenobarbital in male rats. J Med Food 2014; 17: 339-349.

151. Ali EH, Al-Okaily BN. Role of Pomegranate Seed Oil (PSO) Against Hepatotoxicity Induced by Sodium Fluoride in Adult Female Rats.Journal of Kerbala for Agricultural Sciences 2017; 28-43.

152. El-Khadragy MF. Hepatoprotective role of the pomegranate (Punica granatum) juice on carbon tetrachloride-induced oxidative stress in rats. Afr J Biol Sci 2011; 7, 135-49.

153. Guo XL, Liang B, Wang XW, et al. Glycyrrhizic acid attenuates CCl4-induced hepatocyte apoptosis in rats via a p53-mediated pathway. World Journal of Gastroenterology: WJG 2013; 19(24), 3781.

154. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-β. Nature 2000; 403(6765), 98.

155. Tao LL, Cheng YY, Ding D, et al. C/EBP-α ameliorates CCl4-induced liver fibrosis in mice through promoting apoptosis of hepatic stellate cells with little apoptotic effect on hepatocytes in vitro and in vivo. Apoptosis 2012; 17(5), 492-502.

156. Domitrović R, Škoda M, Marchesi VV, et al. Rosmarinic acid ameliorates acute liver damage and fibrogenesis in carbon tetrachloride-intoxicated mice. Food and chemical toxicology 2013; 51, 370-378.

157. Lee TY, Chang HH, Wang GJ, et al. Water□soluble extract of Salvia miltiorrhiza ameliorates carbon tetrachloride□mediated hepatic apoptosis in rats. Journal of pharmacy and pharmacology 2006; 58(5), 659-665.

158. Hassan MH, Edfawy M, Mansour A, Hamed AA. Antioxidant and antiapoptotic effects of capsaicin against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. Toxicology and industrial health 2012; 28(5), 428-438.

159. Edfawy M, Hassan MH, Mansour A, Hamed AA, Amin HAA. Meloxicam Modulates Oxidative Stress Status, Inhibits Prostaglandin E2, and Abrogates Apoptosis in Carbon Tetrachloride–Induced Rat Hepatic Injury. International journal of toxicology 2012; 31(3), 276-286.

160. Liu H, Wang Z, Nowicki MJ. Caspase-12 mediates carbon tetrachloride-induced hepatocyte apoptosis in mice. World Journal of Gastroenterology: WJG 2014; 20(48), 18189.

161. Aram G, Potter JJ, Liu X, Torbenson MS, Mezey E. Lack of inducible nitric oxide synthase leads to increased hepatic apoptosis and decreased fibrosis in mice after chronic carbon tetrachloride administration. Hepatology 2008; 47(6), 2051-2058.

162. Chan CC, Lee KC, Huang YH, et al. Regulation by resveratrol of the cellular factors mediating liver damage and regeneration after acute toxic liver injury. Journal of gastroenterology and hepatology 2014; 29(3), 603-613.

163. Leu JI, Crissey MAS, Taub R. Massive hepatic apoptosis associated with TGF-β1 activation after Fas ligand treatment of IGF binding protein-1–deficient mice. The Journal of clinical investigation 2003; 111(1), 129-139.

164. Lu B, Xu Y, Xu L, et al. Mechanism investigation of dioscin against CCl_4-induced acute liver damage in mice. Environmental toxicology and pharmacology 2012; 34(2), 127-135.

165. Xie J, Liu J, Chen TM, et al. Dihydromyricetin alleviates carbon tetrachloride-induced acute liver injury via JNK-dependent mechanism in mice. World Journal of Gastroenterology: WJG 2015; 21(18), 5473.

166. Parajuli DR, Park EJ, Che XH, et al. PF2401-SF, standardized fraction of Salvia miltiorrhiza, induces apoptosis of activated hepatic stellate cells in vitro and in vivo. Molecules 2013; 18(2), 2122-2134.

167. Jiang W, Gao M, Sun S, et al. Protective effect of L-theanine on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. Biochemical and biophysical research communications 2012; 422(2), 344-350.

168. El-Sharaky AS, Newairy AA, Eweda SM, Kamel MA. Bromobenzene-induced hepatotoxicity in male rats: the protective effect of flaxseed. Toxicological & Environmental Chemistry 2012; 94(5), 1000-1013.

169. Ibrahim MAR, Okail HAM, Emam NMM. Ameliorative Effects of Pomegranate Peel Extract on Hepatotoxicity Induced by Carbon Tetrachloride in Mice.International Journal of Research Studies in Biosciences (IJRSB) 2016; 4(10), 23-31.

170. Çayır K, Karadeniz A, Şimşek N, et al. Pomegranate seed extract attenuates chemotherapy-induced acute nephrotoxicity and hepatotoxicity in rats. Journal of medicinal food 2011; 14(10), 1254-1262.

171. Choudhury S, Ghosh S, Mukherjee S, et al. Pomegranate protects against arsenic-induced p53-dependent ROS-mediated inflammation and apoptosis in liver cells. The Journal of nutritional biochemistry 2016; 38, 25-40.

172. Evans GO. Animal Clinical Biochemistry. 2nd Ed. Taylor & Francis Group, USA, 2009; 1-344.

173. Plaa GL. Chlorinated methanes and liver injury: highlights of the past 50 years. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2000; 40: 42-65.

174. Huo HZ, Wang B, Liang YK, Bao YY, Gu Y. Hepatoprotective and antioxidant effects of licorice extract against CCl_4-induced oxidative damage in rats. International Journal of Molecular Sciences 2011; 12(10), 6529-6543.

175. Sumalatha S, Padma D, Pai KSR, et al. Hepatoprotective activity of aqueous extract of caesalpinia bonduc against CCl_4 induced chronic hepatotoxicity. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 2016; 8(4), 207-211.

176. Al-Ghamdi MS. Protective effect of Nigella sativa seeds against carbon tetrachloride-induced liver damage. The American journal of Chinese medicine 2003; 31(05), 721-728.

177. Shyu MH, Kao TC, Yen GC. Hsian-tsao (Mesona procumbens Heml.) prevents against rat liver fibrosis induced by CCl_4 via inhibition of hepatic stellate cells activation. Food and chemical toxicology 2008; 46(12), 3707-3713.

178. Ahmed SK, Mohammed SA, Khalaf G, Fikry H. Role of bone marrow mesenchymal stem cells in the treatment of CCL4 induced liver fibrosis in albino rats: a histological and immunohistochemical study. International journal of stem cells 2014; 7(2), 87.

179. Tipoe GL, Leung TM, Liong EC, et al. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) reduces liver inflammation, oxidative stress and fibrosis in carbon tetrachloride (CCl_4)-induced liver injury in mice. Toxicology 2010; 273(1-3), 45-52.

180. Achliya GS, Wadodkar SG, Dorle AK. Evaluation of hepatoprotective effect of Amalkadi ghrita against carbon tetrachloride induced hepatic damage in rats. J Ethnopharmacol 2004; 90: 229-232.

181. Zeashan H, Amresh G, Singh S, Rao CV. Hepatoprotective activity of Amaranthus spinosus in experimental animals. Food and Chemical Toxicology 2008; 46(11), 3417-3421.

182. Breikaa RM, Algandaby MM, El Demerdash E, Abdel Naim AB. Biochanin a protects against acute carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. Biosci Biotechnol Biochem 2013; 77: 909-916.

183. Kumar R, Kumar S, Patra A, Jayalakshmi S. Hepatoprotective activity of aerial parts of Plumbago zeylanica linn against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. Int J Pharmacy Pharmaceut Sci 2009; 1: 171-175.

184. Karagül H. Klinik biyokimya. Medisan Yayınevi, Ankara, 2000.

185. Botsoglou NA, Taitzoglou IA, Botsoglou E et al. Effect of long-term dietary administration of oregano and rosemary on the antioxidant status of rat serum, liver, kidney and heart after carbon tetrachloride-induced oxidative stress. J Sci Food Agric 2009; 89: 1397-1406.

186. Ahsan R, Islam KM, Musaddik A, Haque E. Hepatoprotective activity of methanol extract of some medicinal plants against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in Albino rats. Global J Pharm 2009; 3: 116-122.

187. Palaniswamy R, Raghunathan PP. Protective effect of Bacopa monnieri leaf extract against oxidative stress induced hepatotoxicity in rats. Int J Pharm Pharmac Sci 2013; 5: 555-558.

188. Naqshbandi A, Khan W, Rizwan S, Khan F. Studies on the protective effect of flaxseed oil on cisplatin-induced hepatotoxicity. Human & experimental toxicology 2012; 31(4), 364-375.

189. Wu SJ, Lin YH, Chu CC, Tsai YH, Chao JCJ. Curcumin or saikosaponin a improves hepatic antioxidant capacity and protects against CCl_4-induced liver injury in rats. Journal of medicinal food 2008; 11(2), 224-229.

190. Panovska T, Kulevanova S, Gjorgoski I, Bogdanova M, Petrushevska G. Hepatoprotective effect of the ethyl acetate extract of Teucrium polium L. against carbontetrachloride-induced hepatic injury in rats. Acta pharmaceutica 2007; 57(2), 241-248.

191. Hismiogullari SE, Hismiogullari AA, Sunay FB, et al. The protective effect of curcumin on carbon tetrachloride induced liver damage. Revue de Médicine Vétérinaire 2014; 165(7), 194-200.

192. Saha SS, Chakraborty A, Ghosh S, Ghosh M. Comparative study of hypocholesterolemic and hypolipidemic effects of conjugated linolenic acid isomers against induced biochemical perturbations and aberration in erythrocyte membrane fluidity. Eur J Nutr 2012; 51: 483-95.

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

Tarih: 13.01.2016 **Toplantı Sayısı: 01** **Karar No:16/008**

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 13.01.2016 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	
Füsun Ferda ERDOĞAN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Ahmet ÖZTÜRK	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi	
Çağrı ŞAKALAR	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi	KATILMADI
M. Betül AYCAN	Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi	
Nükhet KÜTÜK	Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi	
Serpil SARIÖZKAN	Doç. Dr.	Veteriner Fakültesi	
Çağrı Çağlar SİNMEZ	Yard.Doç. Dr.	Veteriner Fakültesi	
Hamiyet ÜNAL	Yard.Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi	
Osman İBİŞ	Yard.Doç. Dr.	Ziraat Fakültesi	
Serap ALTUNTAŞ EROĞLU	Avukat	Kurumla İlişkisi Olmayan Üye	KATILMADI
Asiye GÖKBELEN	Yardım Sevenler Derneği Başkanı	Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi	KATILMADI

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji A.D.'dan **Prof. Dr. Ayhan ATASEVER** tarafından sunulan **"Ratlarda Karbon Tetraklorür ile Oluşturulan Akut ve Kronik Karaciğer Hasarı Üzerine Keten Tohumu ve Nar Çekirdeği Yağının Etkisi ve Kaspaz Aktivitesi ile Hepatik Apoptozisin Belirlenmesi."** başlıklı proje incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verildi.

Tarih : 13.01.2016
Etik kurul Başkan Vekili : Prof. Dr. Fahri OĞUZKAYA
İmza :

Turnitin Orijinallik Raporu

İşleme kondu: 25-Ara-2018 09:56 +03
NUMARA: 1060505451
Kelime Sayısı: 17253
Gönderildi: 1

Ratlarda Karbon Tetraklorür ile Oluşturulan Akut ve Kronik Karaciğer Hasarı Üzerine Keten Tohumu ve Nar Çekirdeği Yağının Etkisi ve Kaspaz Aktivitesi ile Hepatik Apoptozisin Belirlenmesi Görkem Ekebaş tarafından

Benzerlik Endeksi	Kaynağa göre Benzerlik
%19	Internet Sources: %15 Yayınlar: %12 Öğrenci Ödevleri: %7

6% match (06-Eki-2018 tarihli internet)
http://ercivet.erciyes.edu.tr/arsiv/2016/d2/makale1.pdf

1% match (yayınlar)
YAMAN, Duygu and ATASEVER, Ayhan. "Karbon Tetraklorür ile Oluşturulan Akut ve Kronik Karaciğer Hasarı Üzerine Biberiye Ekstraktının (Rosmarinus officinalis) Etkisi", Erciyes Üniversitesi, 2016.

1% match (26-Nis-2015 tarihli internet)
http://vetkontrol.tarim.gov.tr/adana/Belgeler/Enstit%C3%BCye%20Ait%20Muhtelif%20Evraklar/dergi%202013.pdf

1% match (02-Eyl-2010 tarihli internet)
http://ziraat.gop.edu.tr/dergiyayinlar/DERG%C4%B0-2005-2/H.%C4%B0%C5%9ELERO%C4%9ELU%20ET%20AL..DOC

1% match (yayınlar)
ATASEVER, Ayhan, BARAN, Oktay and EKEBAŞ, Görkem. "RATLARDA KARBON TETRAKLORUR İLE OLUŞTURULAN KRONİK KARACİĞER HASARI ÜZERİNE ZERDEÇAL", Fırat Üniversitesi, 2017.

1% match (20-Mar-2017 tarihli öğrenci ödevleri)
Submitted to Erciyes Üniversitesi on 2017-03-20

1% match (18-Şub-2016 tarihli internet)
http://acikerisim.dicle.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/11468/1259/Aort%20ve%20mitral%20kapak%20hastal%C4%B1klar%C4%B1nda%20serum%20paraoksonaz sequence=1&isAllowed=y

1% match (21-May-2015 tarihli internet)
http://library.cu.edu.tr/tezler/8472.pdf

1% match (11-Şub-2015 tarihli internet)
http://www.ejmanager.com/mnstemps/81/81-1335338448.pdf?t=1371283563

< 1% match (18-Ara-2007 tarihli internet)
http://www.predator.de/rc5analyzer/rc5AnalyzerX.dmg

< 1% match (26-Kas-2018 tarihli internet)
http://docplayer.biz.tr/2484059-Apoptoz-ve-nekrozun-molekuler-mekanizmasi.html

< 1% match (11-Eki-2009 tarihli internet)
http://www.dogaltedavi.net/tehlikeli_maddeler/2800-toksikolojide_serbest.html

< 1% match (23-Kas-2016 tarihli öğrenci ödevleri)
Submitted to Marmara University on 2016-11-23

< 1% match (yayınlar)
KABAK, Yonca Betil and GÜLBAHAR, M.Yavuz. "Sıçanlarda deneysel bakır zehirlenmesinde karaciğer ve böbrek dokularında apoptozisin belirlenmesi", Ankara Üniversitesi, 2013.

< 1% match (24-Ağu-2015 tarihli internet)
http://www.journals.istanbul.edu.tr/iuvfd/article/download/5000047547/5000044877

< 1% match (11-Oca-2016 tarihli öğrenci ödevleri)
Submitted to TechKnowledge Turkey on 2016-01-11

< 1% match (20-May-2015 tarihli internet)
http://www.firattipdergisi.com/text.php3?id=889

< 1% match (23-Haz-2015 tarihli internet)
http://veteriner.istanbul.edu.tr/wp-content/uploads/2015/04/KARAC%C4%B0%C4%9EER-HASTALIKLARININ-PATOLOJ%C4%B0S%C4%B0.pdf

< 1% match (yayınlar)
KARAMAN, Olcay and KOCABAĞLI, Neşe. "Süt ineği rasyonuna formik asitle olgunlaştırılmış mısır silajı katılmasının döl verimi, buzağı sağlığı, süt verimi ve sütün kompozisyonuna etkisi", İstanbul Üniversitesi, 2010.

< 1% match (14-Haz-2017 tarihli öğrenci ödevleri)
Submitted to Karadeniz Teknik University on 2017-06-14

< 1% match (07-Ara-2018 tarihli öğrenci ödevleri)
Submitted to Fırat Üniversitesi on 2018-12-07

< 1% match (12-Ağu-2018 tarihli internet)
https://baytarizm.wordpress.com/2013/01/page/2/

< 1% match (18-Şub-2016 tarihli internet)
http://edergi.sdu.edu.tr/index.php/sdusbed/article/viewFile/4550/4377

< 1% match (yayınlar)
"Handbook of Exoplanets", Springer Nature America, Inc, 2018

< 1% match (yayınlar)
SARICA, Şenay, KARATAŞ, Ümit and DIKTAŞ, Merve. "Çay (Camellia sinensis); içeriği, metabolizma ve sağlık üzerine etkileri, Antioksidan aktivitesi ve etlik piliç karma yemlerinde kullanımı", Gaziosmanpaşa Üniversitesi, 2008.

< 1% match (27-Kas-2011 tarihli internet)
http://www.genbilim.com/content/view/7924/34/

< 1% match (25-May-2016 tarihli öğrenci ödevleri)
Submitted to Gaziantep Aniversitesi on 2016-05-25

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Görkem EKEBAŞ

Uyruğu: T.C.

Doğum Tarihi ve Yeri: 13 Mart 1988, Ankara

Medeni Durumu: Evli

Tel: 0 536 261 09 98

email: gekebas@erciyes.edu.tr

Yazışma Adresi: Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, 38039 Melikgazi/KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Doktora	ERÜ Sağlık Bil Ens. Veteriner Patoloji ABD	Devam ediyor
Lisans	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2012
Lise	Gazi Çiftliği Lisesi	2006

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2014-Halen	Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi	Araştırma Görevlisi

YABANCI DİL

İngilizce