DOKTORA TEZİ

2022

ANATOMİ

Derya ACAR

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

PİNEALEKTOMİ (PINX) YAPILMIŞ RATLARDA CCL4 İNDÜKTE EDİLMESİYLE KARACİĞER DOKUSUNDA OLUŞAN MORFOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE MELATONİNİN REJENERATİF ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Derya ACAR

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Anatomi Programı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ
2022

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

PİNEALEKTOMİ (PINX) YAPILMIŞ RATLARDA CCL4 İNDÜKTE EDİLMESİYLE KARACİĞER DOKUSUNDA OLUŞAN MORFOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE MELATONİNİN REJENERATİF ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Derya ACAR

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Anatomi Programı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Tuncay ÇOLAK

Etik Kurul Uygunluk Onayı
Tarih:25.02.2021 Karar No: KOÜ HADYEK 2/3-2021201 Proje No:2021/07

KOCAELİ
2022

ÖZET

Pinealektomi (PINX) Yapılmış Ratlarda CCL4 İndükte Edilmesiyle Karaciğer Dokusunda Oluşan Morfolojik Değişiklikler Üzerine Melatoninin Rejeneratif Etkilerinin Araştırılması

Amaç: Çalışmamızdaki amacımız pinealektomi işlemi yapılmış ve CCL4 ile karaciğer hasarı modeli oluşturulmuş ratlarda meydana gelen karaciğer hasarını gözlemlemek ve en güçlü antioksidanlardan biri olan melatoninin karaciğer hasarı üzerinde iyileştirici etkilerinin olup olmadığını histolojik ve biyokimyasal açıdan incelemektir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda 250-300 gr ağırlığında 56 adet wistar albino cinsi erkek sıçan üzerinde gerçekleştirilmiştir. Sıçanlar 7 gruba ayrılmıştır (Kontrol, Sham PINX+mısır yağı, CCL4 (model), PINX, PINX+CCL4, PINX+melatonin, PINX+CCL4+melatonin grup) (n:8). PINX işlemi, deneyin ilk gününde gerçekleştirilmiştir. Melatonin uygulamaları 15 gün boyunca günlük verilmiştir. CCL4 uygulaması 15 gün boyunca gün aşırı devam etmiştir. 16.gün anestezi altında kesim yapılarak karaciğer dokuları alınmıştır. Biyokimyasal olarak MDA,GSH, CAT, SOD, TAS, TOS,OSI, AST, ALT, ALP, IL-6, IL-1B değerlerine bakılmıştır. Histolojik olarak TGF-1B düzeyi ele alınmıştır. İstatiksel analizler IBM SPSS 14 ile yapılmış ve $p<0.05$ istatistiksel manada anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Bulgular: CCL4 grupları, PINX grupları MDA seviyelerinin yükseldiği, CAT ve SOD seviyelerinin azaldığı, TAS düzeylerinin azaldığı, TOS ve OSI değerlerinde dramatik artışların olduğu ve AST, ALT ve ALP değerlerinin artışı yönünde anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0.05$). IL-6 ve IL-1beta değerlerinde CCL4 ve PINX gruplarında artış yönünde anlamlı faklılık bulunmuştur ($p<0.05$). Melatonin verilen grupların tamamında, melatoninin iyileştirici etkisi görülmüştür. CCL4 uygulaması sonrası histopatolojik bulgular incelendiğinde hepatositlerde konjesyon, nekroz ve hücre infiltrasyonları tespit edilmiştir. Melatonin uygulamasının ise bu histopatolojik bulguları azalttığı saptanmıştır. PINX+CCL4 grubunda TGF-1B expresyonu en fazla iken PINX+CCL4+melatonin gruplarında daha azdı.

Sonuç: Çalışmamızda yapmış olduğumuz biyokimyasal, histopatolojik ve immünohistokimyasal incelemeler sonucu melatoninin antioksidan ve antienflamatuar

etkisiyle CCL4 gibi kanserojen etkili faktörlere rağmen karaciğer dokusu üzerinde iyileştirici özelliğinin olduğunu gözlemlendi.
Anahtar kelimeler: Karaciğer hasarı, CCL4 indükleme, Pinealektomi, Melatonin etkisi

ABSTRACT

Investigation of the Regenerative Effects of Melatonin on Morphological Changes in Liver Tissue by Inducing CCL4 in Pinealectomy (PINX) Rats

Objective: The aim of this study is to observe liver damage in rats that underwent pinealectomy and in which liver damage model was created with CCL4, and to examine whether melatonin, one of the strongest antioxidants, has curative effects on liver damage histologically and biochemically.

Material and Method: Our study was carried out on 56 Wistar albino male rats weighing 250-300 g. Rats were divided into 7 groups (Control, Sham PINX+corn oil, CCL4 (model), PINX, PINX+CCL4, PINX+melatonin, PINX+CCL4+melatonin group) (n:8). PINX procedure was performed on the first day of the experiment. Melatonin applications were given daily for 15 days. CCL4 administration continued every other day for 15 days. On the 16th day, the liver tissues were taken by cutting under anesthesia. Biochemically, MDA, GSH, CAT, SOD, TAS, TOS, OSI, AST, ALT, ALP, IL-6, IL-1B parameters were examined. TGF-1B level was evaluated histologically. Statistical analyzes were made with IBM SPSS package program v14 and $p<0.05$ was accepted as statistically significant.

Results: MDA levels increased, CAT and SOD levels decreased, TAS levels increased, TOS and OSI values increased dramatically, and AST, ALT and ALP values were significantly increased in the CCL4 groups and PINX groups biochemically examined. There were significant increases in IL-6 and IL-1beta values in the CCL4 and PINX groups. In the groups given melatonin, the melatonin-improving effect was observed. When histopathological findings after administration of CCL4 were observed congestion, necrosis and cell infiltrations were detected in hepetocytes. Melatonin application was found to reduce these histopathological findings. While TGF-1B expression was the highest in PINX+CCL4 group, it was less in PINX+CCL4+melatonin groups.

Conclusion: As a result of biochemical, histopathological and immunohistochemical studies conducted in our study, we observed that melatonin has a healing effect on liver tissue due to its antioxidant and anti-inflammatory effect.

Key words: Liver damage, CCL4, Pinealectomy, Melatonin

TEŞEKKÜR

Öğrencisi olmaktan gurur duyduğum tez danışmanım ve değerli hocam Prof. Dr. Tuncay ÇOLAK' a meslek hayatımdaki yardımlarından dolayı teşekkürlerini sunarım.

Lisans üstü eğitimim sürecinde ilgi ve alakalarını eksik etmeyen, Prof. Dr. Belgin BAMAÇ ve Prof. Dr. Serap ÇOLAK'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Tez İzlem Komitesinde bulunan hocalarım Doç. Dr. Ceyla ERALDEMİR ve Dr. Öğretim Üyesi Ayla TEKİN ORHA'ya katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Tez aşamasının her basamağında desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Eyüp ALTINÖZ, Dr. Öğretim Üyesi Mehmet DEMİR, Doç. Dr. Hülya ELBE ve Melike KARAYAKALI 'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tez aşamasında manevi desteklerini hep hissettiğim İsmail SİVRİ ve Sevda YAMAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Beni her konuda destekleyen, benden ilgi, sabır ve koşulsuz sevgilerini hiç eksik etmeyen, varlıklarıyla bana hep güç veren aileme, kızım Zehra'ya tüm kalbimle teşekkür ederim.

ORİJİNALLİK BİLDİRİMİ

Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Pinealektomi (PINX) Yapılmış Ratlarda CCL4 İndükte Edilmesiyle Karaciğer Dokusunda Oluşan Morfolojik Değişiklikler Üzerine Melatoninin Rejeneratif Etkilerinin Araştırılması" başlıklı tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, şekil, tablo ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimde yer alan deneysel çalışmalar/araştırmalar bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yapılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususlar bir intihal programı (Turnitin vb.) kullanılarak test edilmiş olup, doğruluğunu beyan ederim.

…….. / ….. / 20….

Derya ACAR

İmza

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
ORJİNALLİK BİLDİRİMİ	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER	xi
TABLOLAR	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Embriyoloji	2
1.1.1. Karaciğer Embriyolojisi	2
1.2. Anatomi	3
1.2.1. Karaciğer Anatomisi	3
1.3. Histoloji	6
1.3.1. Karaciğer Histolojisi	6
1.4. Karbon Tetraklörür (CCL4)	11
1.5. Serbest Radikaller	14
1.6. Antioksidanlar	19
1.7. Melatonin	24
2. AMAÇ	36
3. YÖNTEM	37
3.1. Çalışma Materyalleri	37
3.2. CCL4’ ün hazırlanması	37
3.3. Melatoninin (MLT) Çözeltisinin Hazırlanması ve Enjeksiyonu	37
3.4. Ratların Bakımı	37
3.5. Rat Deney Protokolü	38
3.6. Pinealektomi İşlemi	38
3.7. Ratlarda Karaciğer Toksitesi Modeli	39
3.8. Ratlardan Numune Alınması	39

3.9. Biyokimyasal Analizler 39
3.9.1. Numunelerin Hazırlanma Aşamaları 39
3.9.2. Oksidatif Stres Parametrelerinin Değerlenirme Aşamaları 40
3.9.3. Karaciğer Fonksiyon Testleri Ölçümü 42
3.10. Melatonin Seviyelerinin Ölçümü 42
3.11. Histopatolojik Analiz 42
3.12. İmmünohistokimyasal Analiz 42
3.13. İstatiksel Analiz 43
4. BULGULAR 44
4.1. Biyokimya SONUÇLARI 44
4.1.1. Karaciğer Oksidatif Stres Parametreleri Düzeyi 44
4.1.1.1. Karaciğer MDA ve GSH Düzeyi 44
4.1.1.2. Karaciğer Dokusu Antioksidan Enzim Aktivite Düzeyleri 46
4.1.1.3. Karaciğer Dokusu Oksidan/Antioksidan Enzim Aktivite Düzeyleri 48
4.1.1.4. Serum Karaciğer Fonksiyon Testlerinin Düzeyleri 51
4.1.1.5. Karaciğer Dokusu İnflamasyon Belirteç Düzeyleri 53
4.2. Histopatolojik Bulgular 55
4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular 58
5. TARTIŞMA 60
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 65
7. KAYNAKLAR 69
8. ÖZGEÇMİŞ 81
EKLER 83
EK-1. ETİK KURUL ONAYI 83

SİMGELER VE KISALTMALAR

ROS: Reaktif oksijen türleri

IL-1B: Interlökin-1 beta

MLT: Melatonin

MDA: Malondialdehit

GSH: İndirgenmiş glutatyon

TAS: Toplam antioksidan durumu

CAT: Katalaz

SOD: Süperoksit dismutaz

CCL_4: Karbon tetraklorür

AST: Aspartat amino transferaz

ALT: Alanin amino transferaz

ALP: Alkalen fosfataz

GPx: Glutatyon Peroksidaz

TOS: Total oksidan durumu

OSI: Oksidatif stres indeksi

$OH^{\cdot}$: Hidroksil radikali

NO: Nitrik asit

$O_2^{\cdot-}$: Süperoksit anyonu

O_2: Moleküler oksijen

CCL_3: Triklorometil

CCL3O2: Triklorometil peroksil

DNA: Deoksiribo nükleik asit

CYP450: Sitokrom P450

α: Alfa

β: Beta

ŞEKİLLER

Şekil.1.1. Karaciğerin anterior ve posteriordan görüntüsü 4

Şekil.1.2. Karaciğer Lobülü 7

Şekil.1.3. Karaciğer Lobülünün Temel Yapısı 8

Şekil.1.4. CCL4 metabolizması ve reaktif metabolitlerin oluşumu 13

Şekil.1.5. Serbest Radikallerin Hasar Verme Basamakları 16

Şekil.1.6. Pineal bez 25

Şekil.1.7. Melatonin Sentezi Basamakları 27

Şekil.1.8. Melatonin Sentezi Döngüsü 28

Şekil.1.9. Melatonin antioksidan mekanizmalarından biri 29

Şekil.1.10. Oksidatik Stresin Karaciğer Üzerindeki Etkisi 30

Şekil.4.1. Ortalama karaciğer doku MDA (nmol/g yaş doku). 47

Şekil.4.2. Ortalama karaciğer doku GSH (nmol/g yaş doku). 48

Şekil.4.3. Ortalama karaciğer doku CAT değerleri (K/g protein). 49

Şekil.4.4. Ortalama karaciğer doku SOD değerleri (U/g protein). 50

Şekil.4.5. Ortalama karaciğer TAS değerleri (nmol Trolox Equiv/L). 51

Şekil.4.6. Ortalama karaciğer TOS değerleri (nmol H2O2 Equiv/L). 52

Şekil.4.7. Ortalama karaciğer OSI değerleri (Arbitrary Unit). 52

Şekil.4.8. Ortalama serum ALT düzeyleri. 54

Şekil.4.9. Ortalama serum AST düzeyleri 54

Şekil.4.10. Ortalama serum ALP düzeyleri. 55

Şekil.4.11. Ortalama serum IL-1β düzeyleri 56

Şekil 4.12. Ortalama IL-6 düzeyleri. 57

Şekil.4.13. Kontrol grubu, Sham ve PINX grubuna ait hemotoksilin eosin ile boyanmış histolojik görüntüler 58

Şekil.4.14. CCL4 ve. PINX+CCL4 grubuna ait hemotoksilin eosin ile boyanmış histolojik görüntüler 59

Şekil.4.15. PINX ve PINX+CCL4 grubuna ait melatonin uygulaması grubu 59

Şekil.4.16. Doku örneklerine ait anti TGF B1 antikorunun immünohistokimyasal yöntemlerle boyanmış histolojik görüntüleri 61

TABLOLAR

Tablo 4.1. Ortalama karaciğer doku MDA ve GSH düzeyleri (nmol/g yaş doku). 47

Tablo 4.2. Ortalama karaciğer doku SOD ve CAT aktiviteleri. 49

Tablo 4.3. Ortalama karaciğer TAS, TOS ve OSI düzeyleri. 51

Tablo 4.4. Ortalama serum ALT, AST ve ALP düzeyleri. 53

Tablo 4.5. Ortalama IL-1β ve IL-6 düzeyleri. 56

Tablo 4.6. Ortalama histopatolojik hasar skoru. 58

Tablo 4.7. TGF-β1 immünreaktivitesi için ortalama H-Skoru. 60

1. GİRİŞ

Karaciğer, vücut ağırlığının yaklaşık oalarak %2' sini oluşturur. Hem endokrin hem de ekzokrin bir bez gibi çalışır. Safra kanalları ile safrayı doudenuma boşaltması görevi ile ekzokrin; glikoz, glikoproteinler, globülinler gibi proteinler, fibrinojen, albümin ve protrombin gibi maddeleri sentezleyerek direk olarak kana vermesi görevi ile de endokrin bir bez gibi görev yaparak, önemli metabolik işlevleri olan bir organdır (Altınbaşak, 2019). Biyokimyasal ve fizyolojik işlevlerinden dolayı zararlı ve toksik maddelere maruz kalmaktadır. Karaciğerde hasar olduğunda belirtiler çok geç ortaya çıkar ve bu nedenle tedavisi de zor olmaktadır (Naaz ve ark., 2007)

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) bildirdiği verilere göre, yılda 2,4 milyon insanın ölüm nedenini karaciğer hastalıklarıdır. Gelişmekte olan ülkelerde prevelansının yüksek olduğu, yüz milyonlarca insanın etkilendiği, dünya çapında bir sağlık problemidir (Fathy ve ark., 2019). Bu yönleriyle karaciğer hastalıkları tüm dünyada yüksek morbidite ve mortalite nedeni haline gelen ciddi sağlık sorunları arasında yer alır (Joshi ve ark., 2019).

Farklı sebeplerden oluşabilen karaciğer hasarı, oksidatif stresi takiben serbest radikallerin ortaya çıkışıyla oluşur (Bacon ve ark., 1983). Hücre membranlarında hasara. Sebep oldukları, karbonhidratlipitler, proteinler ve deoksiribonükleik asit (DNA) üzerinde zararlı etkiler meydana getirdiği gösterilmiştir (Brattin ve ark., 1985).

Preoksidant aktiviteleri ile bilinen karbon tetraklörür (CCL4), karaciğer hasarı modeli oluşturmak için en yaygın kullanılan ksenobiyotiktir. CCL4' ün metabolize edilmesiyle ortaya çıkan serbest radikaller organ üzerinde hasar veren etkilere neden olur (Wang ve ark., 2005).

Reaktif oksijen türleri (ROS), ve reaktif azot türleri (RSN) olarak adlandırılan serbest radikal türevlerinin artması, oksidatif stres ile beraber ortaya çıkar. Oksidatif stres sonucu ortaya çıkan serbest radikallerin hastalıkların oluşumundaki etkisinin anlaşılması ile bu radikallere olan ilgi son yıllarda daha da artmıştır. Lipit membranlarındaki proteinlerin geri dönüşümsüz bir şekilde değişimini serbest radikaller yapar ve böylece karaciğer hasarı başlar. Ayrıca organizmadaki DNA, protein ve karbonhidratların da yapısını bozarak kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser de dahil bir çok hastalığın zeminini hazırlarlar (Lingli ve ark., 2019).

CCL4' ün neden olduğu toksik etkilerle lipit peroksidasyonu artar. CCL4, sitokrom P-450 ile metabolize edildikten sonra triklorometil (CCL3) serbest radikaline dönüşür ve

toksik etkilerini bu şeklilde gösterir. Lipit peroksidasyonu ile ortaya çıkan son ürün olan malondialdehit (MDA) oksidatif stresde önemli bir indikatördür. MDA düzeyi lipit peroksidasyonu düzeyini belirlemek için kullanılır (Düzgüner, 2005).

Oksidatif stres sonucu oluşan serbest radikallere karşı vücudun antioksidan sistemi mevcuttur. Antioksidan seviyesi göstergesi olan enzimler arasında; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), Glutatyon S-transferaz (GST), glutatyon peroksidaz (GPx) ve redükte glutatyon (GSH) sayılabilir (Ballur, 2022).

Melatonin, seratoninle birlikte esansiyel aminoasit olan triptofandan türeyen bir indolamindir (Pereira, 2020). Melatoninin başlıca üretildiği yer gl. Pinealis tir (Stanciu, 2020). Hidrofobik olması sebebiyle difüzyonla membranları ve kan-beyin bariyerini geçebilir (Salehi, 2019). Melatonin serbest radikalleri direk olarak süpürme yeteneği vardır ayrıca diğer antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırarark oksidatif stresi azaltan çok güçlü bir antioksidandır (Esteban-Zubero ve ark., 2017). Kısacası melatonin, serbest radikal süpürücü etkisiyle direkt olarak, serbest radikal üretimini azaltarak indirekt olarak, diğer antioksidan enzimlerin etkisini artırarak etkisini gösterir (Rezzani, 2014).

Melatonin oksidatif stresi azaltıcı etkisinden dolayı CCL4 ile oluşturduğumuz karaciğer hasarı üzerine iyileştirici etkisinin olacağını düşündük. Bu amaç doğrultusunda, lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA, oksidatif stres belirteçlerinden olan TAS, TOS ve OSI değerlerine bakıldı. Ayrıca GSH, SOD ve CAT düzeyleri incelendi. Karaciğer hasarında artan AST, ALT ve ALP değerleri incelendi. Kan numunlerinden elde edilen serumda inflamasyon göstergelerinden olan interlökin (IL)-6 ve interlökin (IL)-1 beta seviyeleri ölçüldü ve histopatolojik inceleme yapıldı. TGF B-1 ile boyama işlemi yapıldı.

1.1. Embriyoloji

1.1.1. Karaciğer Embriyolojisi

Karaciğer, hamileliğin 3.haftasında duodenumdan içi boş bir endodermal tomurcuk olarak yapılanmaya başlar. Bu yapı karaciğer ve safra oluşturmak üzere ikiye ayrılır. Hepatik bölüm çift potansiyelli öncül hücreler içerir. Bunlar hepatositler ya da erken primitif safra kanallarına katılan kanal hücrelerine dönüşür. Bu değişime hücre içindeki sitokeratin tipin değişimi eşlik eder (Van Eyken ve ark., 1993).

Karaciğer parankimi endoderm tabakadan, stroması ise mezoderm tabakadan gelişmeye başlar. Karaciğer divertikülünün arkasından safra kesesi ve extrahepatik safra yolları, divertikülün önünden ise karaciğer ve intrahepatik yollar gelişir (Larsen, 2009).

Karaciğer divertikülü 22-24. günlerde belirmeye başlar (Jung, 1999). Divertikülün ön kısmından intrahepatik yollar ve karaciğer gelişirken, arka kısımdan ekstrahepatik safra yolları ve safra kesesi gelişir (Zorn, 2008). Divertikül, gelişme aşamasındaki mide ve kalp arasındaki splaknik bir mezoderm olan septum transversuma doğru gider. Divertikülün büyümesine etrafındaki bu mezoderm tabakası destek verir (Sadler, 2018).

1.2. Anatomi

1.2.1. Karaciğer Anatomisi

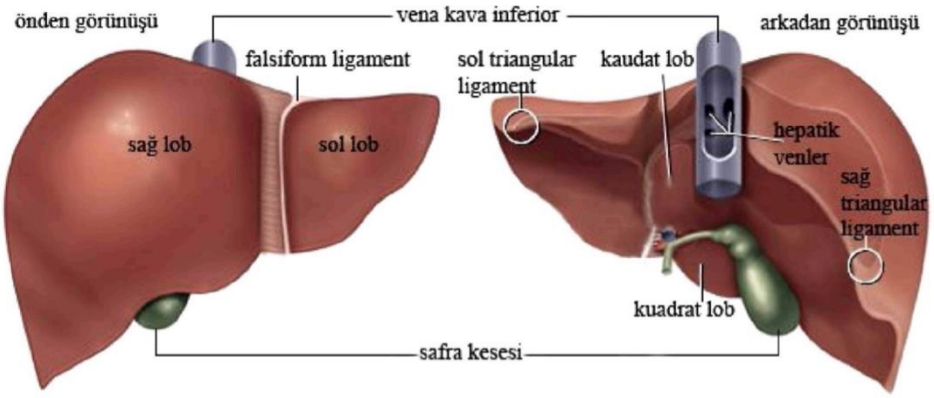
Karaciğer vücudun deriden sonra en büyük organıdır aynı zamanda en büyük bezidir. Abdominal bölgede, diyaframın altında, sağ üst köşede lokalize olmuştur, iki yüzü ve iki kenarı bulunur. Alt yüzü iç organlarla, üst yüzü ise diyafram ile komşudur. Karaciğerin dört adet lobu bulunur. Lobus hepatis dexter, lobus hepatis sinister, lobus quadratus, lobus caudatus karaciğer loblarının isimleridir. Kostalar tarafından, sağ üst kadranda korunur. Organın ağırlığı ortalama 1,5 kilogramdır (Arıncı ve Elhan, 2016; Yang ve ark, 1997). Canlı karaciğeri 1kilogran kan taşıdığı için ağırlığı 2,5 kilogram olur ve tüm vücut ağırlığının ortalama %2 sini oluşturur. Kırmızı kahve renginde, dışı pürüzsüz kolay parçalanabilen, elastik ve kıvamlı bir yapıya sahiptir. Dalaktan sonra yırtılma durumu en yüksek olan organdır (Erdoğan, 2018).

Karaciğerin arka bölümünde periton yoktur ve bu kısımda bulunan fibroz yapı ile diyaframa tutunmuştur. Aşağı kısmının arkaya ve sola bakan bölümü karın boşluğunda bulunan diğer organlarla komşuluğu vardır. Bu bölümde karaciğere giriş kısmı hükmündeki hillum kısmı mevcuttur. Bu hillumdan vena porta, hepatica propria, safra kanalları, sinirler ve lenfatik damarlar giriş çıkış yaparlar (Aslan 2010).

Karaciğerin konumu, bireyin vücut yapısına, solunum durumuna ve pozisyonuna bağlı olarak değişir. Nefes alırken 3cm aşağıya iner, yatar durumda biraz yukarı çıkar, ayakta iken aşağıya iner, sırt üstü yatarken arkaya ve yukarı çıkar. Yaşlı bireylerde de aşağı iner.

İki ayrı kaynaktan karaciğere kan akışı mevcuttur (Koçak, 2019). Bu kaynaklardan dakikada 1450 ml kan sağlanırken, bu kanla beraber çeşitlim organlarda üretilen hormonlarda karaciğere girişi sağlanmış olur (Guyton ve Hall, 2017). Oksijenden zengin kanın %25-%30'luk kısmını hepatik arter ile, gastrointestinal sistemden elde edilen besin

açısından zengin kanın %70-%75'ini portal ven ile bünyesinde taşır. Böylece karaciğerde sadece toksinlerin temizlenmesi ve besin metabolizması haricinde arterdeki sınırlı kan akışını dengeleyerek karaciğerin oksijen gereksinimi de sağlanır (Leissa ve ark., 2017, Koçak ve ark., 2019)



Şekil.1.1. Karaciğerin anterior ve posteriordan görüntüsü (Koçak, 2019).

Karaciğerin bağları

Periton karaciğeri örterken, karın boşluğunun değişik bölümlerine atlarken bazı bağlar oluşturur ve bu bağlar aracılığı ile diyaframa ve karın ön duvarına tutunur.

1)Lig. Falciforme hepatis: Dikey konumlu bir bağdır. Üstte diyaframın alt yüzüne , ön ucu ile karın ön duvarından göbeğe kadar uzanır. Lig.falciforme hepatis içinde vv.paraumbilicales bulunur. Bu ligamentin aşağıya uzanan bölümünün içinde v.umblicalis'ler bulunur ve bu kısma lig. Teres hepatis adı verilir.

2)Lig. Teres hepatis: Lig.falciforme hepatisin alt kenarında bulunan ve umblicusa uzanan bir bağdır. İçinde v.umblicalisler bulunur. Bu ven embriyonik dönemde işlevi olan ve daha sonra tıkanan bir damardır. Doğumda ductus venosus ve v. Umblicalis kapanır. Fibröz bir bant halini alır.

3)Lig. Coronarium hepatis: Karaciğerin ön kısmını örten periton diyaframın alt yüzüne uzanır, arka yüzünü örten periton ise diyaframın alt yüzüne atlayarak arka tarafa geçer.böylelikle periton iki yaprak halinde karaciğeri sarar ve sonra diyaframa uzanır

4)Lig. Hepatorenale: Lig.coronarium hepatis in arka yaprağı sağ böbrek ve böbreküstü bezlerinin ön yüzüne uzanır ve bu bölüme lig.hepatorenale denir.

5)Lig. Triangulare dextrum: Lig. Coronarium hepatisin ön ve aarka yaprakları, area nuda nın sağ ucunda birleşerek lig.triangulare dextrumu oluşturur.

6)Lig. Triangulare sinistrum: Lig. Coronarium hepatisin ön ve aarka yaprakları, area nuda nın sağ ucunda birleşerek lig.triangulare dextrumu oluşturur (Gökmen, 2003).

Karaciğeri yerinde tutan yapılar

Canlıda içerisindeki kanla birlikte 2,5kg ağırlığındaki karaciğer abdominal boşlukta sağ üst köşede asılı olarak durmaktadır ve yerinde tutan yapılar;

1)Abdomila bölgede bulunan negatif basınç en önemli etkendir. Karın boşluğuna hava girmesi durumunda(pneumoperitoneum) karaciğer 2-3 cm aşağıya iner.

2)Karaciğer diğer organların üzerinde bulunduğu için yerinde durması kolaydır.

3)Karın bölgesindeki kasların tonusu karaciğerin yerinde durmasını kolaylaştıran etkenlerdendir.

4)Periton bağları karaciğeri diyaframa sabitler. Lig.triangulare dextrum, lig. Triangulare sinistrum ve lig.coronarium başta olmak üzere karaciğeri taşırlar. Lig.falciforme hepatis karaciğeri taşımaz sadece yanlara hareketini kısıtlar.

5)Area nuda karaciğerin diyaframa tutunmasına yardım eden eden en önemli oluşumlardan biridir.

6)Karaciğerin v.cava inferiora tutunması v.hepaticalar aracılığı ile olur. Ve bu mararla karaciğer yukarıdan asılmış olur.

7)Omentum minus ve içinden geçen yapılar karaciğeri komşu yapılara bağlar (Gökmen, 2003; Ozan, 2014).

Karaciğer salgı, metabolik fonksiyonlar ve sentez olarak çok işlevsel bir organdır. Karbonhidratları, yağları, amino asitleri, mineralleri ve vitaminleri alır işler ve depolar (Bilgiç ve ark., 2016).

Karaciğere kan iki kaynaktan ulaşır. Bunlardan biri portal vendir; bağırsak ve dalaktan venöz kanı getirir. Diğer kaynak ise hepatik arterdir ve koliak aksisten arterial kanı karaciğere getirir. Arteria hepatica propria ile oksijen yönünden zengin kan, vena porta yolu ile besin yönünden zengin kan gelir. Organa gelen kanın %80 ini vena porta, %20 sini arteria hepatica propria taşır. Vena porta; vena porta dextra, vena porta sinistra olmak üzere, arteria hepatica propria; arteria hepatica dextra, arteria hepatica sinistra olmak üzere porta hepatiste ikiye ayrılır, daha sonra saydığımız bu damarlar karaciğer içine girdikten sonra interlobüler ve intersegmental dallara ayrılırlar. Karaciğerdeki venöz dolaşım ise karaciğerin arkasında bulunan sağ sol vena hepatikalarla gerçekleştirilir ve son olarak vena cava inferior'a dökülür (Arıncı ve Elhan 2016, Gray's Anatomy, 2008).

Sağ ve sol vagal sinirler, sağ frenik sinirden gelen dallar, T 7-10 sempatik ganglionlardan gelen dallar çölyak pleksus ile birleşir ve karaciğerin sinir ağını oluşturur. Karaciğer içerisinde bu sinirlerin oluşturduğu pleksus safra kanalları, hepatik arter ve portal venle birlikte yol alır (Moore, 2007).

Karaciğerin lenfatikleri, hillusta bulunan nodi lymphatici hepatis' e buradan da nodi lyphatici caelicaya drene olurlar. Aynı zamanda lenf damarlarının bir bölümüde karın arka duvarındaki diyafram kısmına drene olurlar (Perek, 2005).

Safra sıvısı karaciğerin hepatosit hücreleri tarafından sentezlenir, sentezlenen safra safra kanalikülleri ile santral venden portal triada doğru akar. Safra kanalikülleriHering kanalı, duktuli biliferi, ductus interlobularis üretilen safranın izlediği yoldur. İnterlobüler kanallara kadar ilerleyen safra bu kanalın sağ ve sol hepatik safra kanallarına drene olur. bu iki kanal birleşir ve ductus hepaticus communis'i meydana getirir ve bu yapıda ligamentum hepatoduodenalis içerisinde ductus sisticus ile birleşip ductus coledekus'u oluşturur. Yetişkin bir inaın karaciğerinde farklı şekil ve boyutlarda iki kilometreden daha fazla safra kanalları ve duktülleri bulunmaktadır (Northover, 1979; Terblanche ve ark., 1983).

1.3. Histoloji

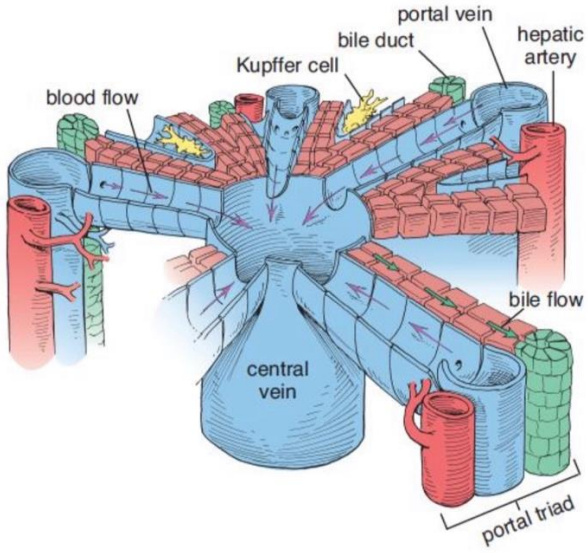
1.3.1. Karaciğer Histolojisi

Fibröz glisson kapsülü, perisinizoidal aralıklar, sinüzoidal kapillerler karaciğerin histolojik bölümleridir. Organize hepatosit kordonlarında oluşan yapıya parankim denir. Bu kordonlar tek hücre kalınlığındadır ve sinüzoidal kapillerle birbirinden ayrılmışlardır (Ross, 2014; Junqueira ve Carneiro, 2003).

Stroma bağ dokusu yapısındadır ve organı dıştan saran glisson kapsülü ile devam eder ve bu kapsülden organ içine uzanana trabeküller parankimi lobüllere ayırır. Bağ dokusu yapısında olan stroma içinde sinirler, kan damarları, safra kanalları ve lenf damarları uzanmaktadır. Hepatosit kordonları arasındaki vasküler kanallara sinüzoidler, hepatositler ile sinüzoid endotel arasındaki boşluklara da disse aralıkları adı verilir. (Ross, 2014)

Karaciğer lobülü: karaciğerin en temel yapısını hepatositler oluşturur. Karaciğerin lobçuklarının köşelerinde portal triadları içeren portal alanlar vardır. Her portal triad bünyesinde bir arter, bir ven, lenfatik damarlar ve safra kanalları oluşturur ve bu yapılar bağ dokusu ile çevrilmiştir. Hepatositler karaciğer içerisinde ışınsal olarak yerleşmişlerdir.

Hücre plakları lobülün periferinden merkezine doğru ilerlemiştir. Hücre plakların arasında karaciğer sinüzoidleri yerleşmiştir. İnce retiküler lif kılıfıyla sarılı sinüzoidler kuppfer hücreleri adı verilen makrofajlarıda içerirler. Kupffer hücreleri hepatik sinüs kanındaki bakteri ve diğer yabancı maddeleri fagosite ederler (Ross, 2014; Junqueira ve Carneiro, 2003).



Şekil1.2.Karaciğer Lobülü (Ross, 2014)

Karaciğer Hücre Tipleri

Karaciğer beş tip özelleşmiş hücreden oluşmuştur; hepatosit, stellat hücre, biliyer epitelyal hücreler, kupffer hücresi, karaciğer sinüzoidal endotelyal hücrelerdir. Bu hücrelerin her biri benzersiz görevleri ile hepatik işlevleri yerine getirir (Junqueira ve Carneiro, 2003)

Karaciğer parankimi altıgen lobüller halinde düzenlenmiştir. Her lobülün uç kısımlarında, hepatik arter dalları, safra kanalı ve portal ven portal triadı oluşturur. Lobüller, portal triadı merkeze drene eden ince duvarlı sinüsoidal kılcalları bünyesinde bulundurur. Sinüzoidal kılcallar, portal kanın hepatositler ile iletişimini sağlayan özel endotel hücrelerle kaplıdır (Ross, 2014).

Hepatositler:

Karaciğerin ana hücreleri hepatositlerdir ve bu hücreler işlevsel olarak en çeşitli hücreler arasındadır. Hepatositlerin; endokrin, ekzokrin ve metabolik görevleri vardır ve bu hücreler büyük, yuvarlak ve merkezi çekirdekli ve mitokondriden zengin hücrelerdir. Karaciğer parankiması küçük bir merkezi venin etrafında, yüzlerce hepatositin düzensiz tabakalar halinde sıralanmasıyla oluşan binlerce küçük hepatik lobüler halinde organize olur. Her lobül daha fibröz bir bağ dokuyla beraber 3-6 portal alan içerir (Poli, 2000).

Stellatlar

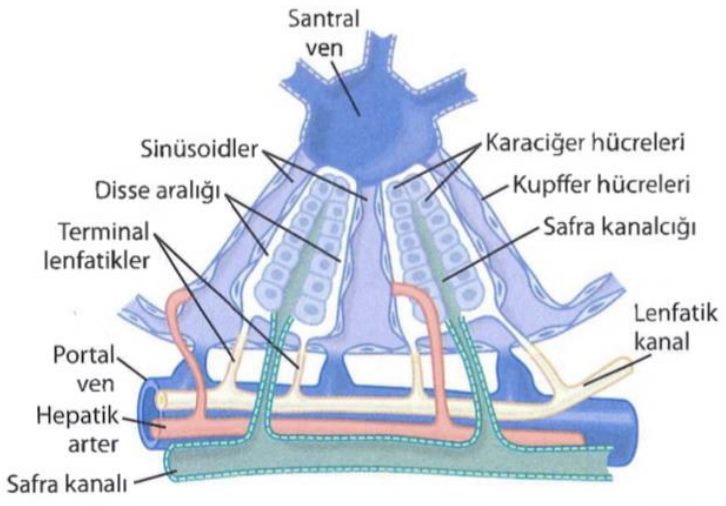
Stellat hücreler, çok sayıda retinoid ve yağ damlacıkları içeren, hareketsiz yada aktif halde bulunabilen, tipik olarak sessiz formda bulunan hücrelerdir (Geerts, 2001). A vitamini depo etme görevleri vardır. Ayrıca hepatosit büyüme faktörü (HGF) salgılar ve hepatosit gelişimini sağlar (Friedman, 2008). Normal şartlar altında stellat hücreleri hareketsizdirler, karaciğer hasarı oluşması durumunda aktif duruma geçerler ve A vitamini depolarını kaybetmeye başlarlar. Bu süreç başladığında karaciğer sirozundan, hepatik fibrozise kadar ilerleyen hastalıklar başlar (Parola, 2008).

Biliyer Epitel Hücreler

Karaciğer bünyesinde hepatositlerden sonra en çok bulunan ikinci hücre tipidir. Biliyer epitel hücreler safra kanalının lümenini kaplarlar. Görevi üretilen safrayı taşımak ve PH dengesini sağlamaktır (Junqueira ve Carneiro, 2003).

Kupffer Hücreleri

Kupffer hücreleri sinüzoid sinüzoid duvarın elemanlarıdır ve mononüklear fagositik sisteme aittirler (Fausto ve Campbell, 2003). Komşu endotelyal hücreler ile bağlantı kurmazlar. İmmünolojik ve fagositik aktivitelere sahip makrofajlardır. Portal dolaşım yoluyla giren bir çok patojeni algılarlar ve yara iyileşmesi sürecinde antiinflamatuar etki sergilerler. Karaciğerin savunmasında aktif görev yapan bu hücreler, yaşlı eritrositlerin parçalanmasında da rol oynarlar (Olakunle, 2011, Ustuner ve ark. 2018).



Şekil.1.3.Karaciğer Lobülünün Temel Yapısı (Guyton ve Hall, 2017)

Sinüzoidal Endotelyal Hücreler

Sinüzoidal lümenlerde diyaframsız, geniş fenestra plaklar oluştururlar. Protein ve bazı partiküllerin değişiminde önemli görevi vardır ve aktif bir bariyer gibi çalışır (Trefts ve ark., 2017).

Sinüzoid venleri çevreleyen endotel hücrelerde geniş boşluklar vardır. Bu tabakanın alt kısmında, endotel hücreler ile karaciğer hücreleri arasında bir aralık vardır ve bu aralığa disse aralığı (perisinüsoidal aralık) denir. Disse aralıkları ile lenfatik damarlar bağlantılıdır ve sıvının fazlası lenfatikler aracılığı ile uzaklaştırılabilir (Ross ve Pawlina, 2014).

Karaciğerin fonksiyonları

Kan Depolama İşlevi

Karaciğerin kendi damarlarında yüksek miktarlarda kan depolayabilme özelliği vardır. Sağ atriyumdaki kan basıncı arttığında karaciğer içindeki basınçta artar ve karaciğer bir litreye kadar çıkabilen miktardaki ekstra kanı çoğu sinüslerde, daha azı hepatik venlerde olacak şekilde depo eder. Çünkü genişleyebilen bir organdır. Aynı şekilde kan hacmi azaldığında da ek kan sağlayabilir (Guyton ve Hall, 2017).

Karbonhidrat Metabolizması

Büyük miktarlarda glikojen depolama, glikojenez, galaktoz ve früktozu glikoza çevirme ve karbonhidrat metabolizması sonucu oluşan ürünlerden önemli yapıların oluşturulması gibi önemli bir göreve sahiptir. Kandaki glikoz seviyesinin devamlılığı açısından önemlidir. Kanda bulunan fazla glikozu alır ve depo eder. Kandaki glikoz azaldığında ise tekrar kana glikoz verir ve böylece dengeyi sağlamış olur (Guyton ve Hall, 2017).

Lipit Metabolizması

Vücut için gerekli enerjinin temini için yağ asitlerinin oksidasyonu, kolestrol, fosfolipit ve lipoprotein sentezi, karbonhidrat ve proteinlerden yağ sentezi karaciğerin diğer bir önemli görevidir (Çapan, 2010).

Karaciğer, lipitlerin ve lipoproteinlerin alımını, sentezini, depolanmasını ve salgılanmasını sağlar. Yağların etkin bir şekilde emilmesini sağlar. Oksidatif yollarla yağ asitlerini iç enerji kaynağı olarak görülür (Ozougwu, 2017).

Endojen ve eksojen kökenli anyonlar sinüzoidal kanallardan uzaklaştırılıp, idrar veya safra yoluyla atılırlar. Salgılatıcı görevlerin değerlendirilmesi klinik açıdan önemlidir. Kullanılan testler arasında safra asitleri ve bilirübin gibi endojenlerin ve de amino-pirin ve indosiyanin yeşili gibi eksojenlerin belirlenmesi yer alır. Bilirübin, yaşlanan eritrositlerden türeyen sarı bir oluşumdur ve biyotransformasyon yapıldıktan sonra idrar ve safra ile atılır.

Karaciğerin bir önemli özelliğide safra metabolizmasını ayarlamaktır. Safranın iki görevi vardır. Biri kolestrolün hepatik atılımını sağlamak, diğeri ise lipitlerin intestinal sistemde daha kolay emilmesi için çözünmesini sağlamaktır. Bu sayede risk oluşturacak kolestrol fazlalığı önlenmiş olur (Guyton ve Hall, 2017).

Kolestrol metabolize edildiğinde, kolik asit ve kenodeoksikolik asit ortaya çıkar. Bunlar primer safra asitleri olarak adlandırılır çünkü hepatik kökenlidirler. Primer safra asitleri safra kanalına salınmadan hemen önce taurin veya glisin ile kendi bünyesinde bulunan karboksilik asit ile birleşirler ve böylece suda çözünürlükleri artar. Bu durumla beraber dört tane primer safra asidi oluşur. Bu primer safra asitlerinin isimleri; koliglisin, koliltaurin, kenodeoksikolilglisin ve kenodeoksikoliltaurin'dir. Serbest safra asitleri safrada yer almazlar (Guyton ve Hall, 2017).

Safra asidi gastrointestinal sistemden geçerken, bakteriyel flora tarafından sekonder safra asitlerine dönüştürülürler. Karaciğerde sekonder safra asitleri taurin veya glisin ile birleştirilir ve safra bileşenleri olarak primer safra asitlerine birleşirler (Guyton ve Hall, 2017).

Entherohepatik dolaşım olarak adlandırılan sistemle vücutta safra asidi havuzu oluşturulur. Enterohepatik dolaşımı oluşturan yapılar; karaciğer, terminal ileum, biliyer sistem ve portal venöz dolaşımdır (Guyton ve Hall, 2017).

Protein ve Aminoasit Metabolizması

Aminoasitlerin deaminasyonu, plazma proteinleri oluşturma, amonyağı üre oluşturarak vücut sıvılarından uzaklaştırma ve önemli aminoasitlerin birbirlerine dönüşümleri karaciğerin görevleri arasındadır (Çapan, 2010).

Aminoasitler, karabonhidrat ya da yağa çevrilmeden önce deaminasyona uğraması gerekir. Deaminasyon bir miktar böbreklerde yapılsa da asıl iş karaciğerde yapılır. Deaminasyon işlemlerinden sonra ortaya amonyak açığa çıkar. Bu amonyağa bağırsaklarda bakterilerle sürekli üretilen amonyakta eklenir. Amonyak karaciğer tarafından üreye çevrilir ve üre oluşturarak kandaki üreyi uzaklaştırır (Guyton ve Hall, 2017, Koçak, 2019).

Plazma proteinlerinin çok büyük bölümü karaciğerde üretilir ve plazma proteinlerinin azalması durumu karaciğerin büyümesine neden olur (Guyton ve Hall, 2017).

Vitaminlerin Depo Edilmesi İşlevi

Karaciğerin vitamin depolama özelliği de mevcuttur. Karaciğerde en fazla A vitamini depolama işlemi gerçekleşir, neredeyse 10 ay yetecek kadar A vitamini depo

edilebilir. Aynı zamanda D vitamini ve B12vitaminleri de depolanır (Guyton ve Hall, 2017; Ozougwu, 2017).

Demir Depolama İşlevi

Apoferritin, karaciğerde yüksek miktarda bulunabilen ve demir ile birleşebilen bir proteindir. Dolaşımdaki demir miktarının artması ile apoferritin birleşir ve ferritin oluşumu sağlanır ve ihtiyaç durumunda kullanılması için hepatik hücrelerde depolanır (Guyton ve Hall, 2017).

Kan Pıhtılaşmasındaki İşlevi

Karaciğerde üretilen koagülasyon ürünlerinden, faktör VII, fibrinojen, asselatör globülin, protrombin gibi pıhtılaşma faktörlerinin meydana gelmesi için K vitamini gereksinimi vardır. K vitamini miktarı az olursa bu faktörlerin yoğunluğu azalır ve pıhtılaşma sistemi bozulur (Guyton ve Hall, 2017).

Detoksifikasyon İşlevi

Karaciğerin çok önemli görevleri arasında ilaçların metabolize edilmesi ve amonyak, galaktoz gibi maddelerin düzenlenmesi yer alır. Bunların yanında kalıtsal enzim eksikliklerinden köken alan metabolik sıkıntılar karaciğeri olumsuz yönde etkilemektedir. Galaktozemi bu duruma örnek verilebilir. Galaktoz-1-fosfat üridiltransferaz enziminim doğuştan eksikliği karaciğer, böbrek ve beyinde probleme neden olan galaktoz-1-fosfat toksik metabolitinin birikmesine neden olmaktadır (Guyton ve Hall, 2017).

1.4. Karbon Tetraklörür (CCL4)

Karbon tetraklorür, bir karbon atomuna dört tane klor atomunun tetrahedral bir biçimde bağlanmasıyla oluşan renksiz, berrak, uçucu, aromatik kokulu ve çok zararlı bir ksenobiyotiktir (Canbek ve ark., 2017).

CCI4 solunum yolu ile vücuda alınabildiği gibi deri ve yutma yolu ile de alınabilir ve lipit hücrelerine yerleşir. Metabolize edildikten sonra %4 kadar miktarı nefesle dışarı verilir, geri kalan kısmı ise proteinler, yağlar ve diğer hücre içi moleküllerle etkileşime geçer. Yapılan çalışmaların sonucuna dayanarak, Birleşik Devletler Çevre Koruma Dairesi (EPA) CCI4'ü B2 sınıf derecesinde kanserojen madde olduğunu kabul etmiştir (Thrall ve ark., 2000; Altınbaşak M., 2019).

Endüstriyel alanlarda, soğutucu ekipmanlarda, tohum ekstratı üretim aşamasında, yağlar, pestisit ürünleri, petrol ürünlerinde kimyasal ve organik çözücüler olarak kullanılır. böcek ilaçlaması işiyle ilgilenen insanlarda, tekstil ve kimya fabrikalarında çalışanlarda,

tehlikeli atık çalışanlarında, otomobil tamircileri ve kuru temizlemede çalışanların bu maddeye fazla oranda maruz kaldıklarını söyleyebiliriz (Kumar ark., 2005).

Yapılan çalışmalarda karbontetraklorür'ün karaciğerde ciddi hasarlara yol açtığı ve bunun yanında beyin, kalp, böbrek gibi yapılarda da ürettiği serbest radikallerle zarar verdiği kanıtlanmıştır (Szymonik ve ark., 2003, Vural ve ark., 2017).

Hem insanlarda hem de deney hayvanlarında hepatotoksiteye neden olduğu için çalışmalarda en çok tercih edilen yöntem CCL4 indülenmesiyle oluşturulan karaciğer hasarı modelidir. (Lee ve ark., 2007; Bilgiç ve ark., 2016)

Tekrarlayan bir şekilde karbon tetraklörüre maruz kalınması serbest radikal üretilmesine sebebiyet verir ve hepatotoksiteye neden olarak karacaiğer hasarına neden olur. Bu etkisinden dolayı karaciğer hasarı oluşturmak istenen metotlar arasında en sık kullanılan yöntemdir (Hernandez ve ark., 1997) CCl4' ün metabolize edilmesiyle ortaya çıkan serbest radikallerin varlığı sonucu ortaya çıkan oksidatif stresin etkisi ile karaciğer problemleri ve fibrozu arasında anlamlı bir ilişkinin olduğu yapılan birçok çalışmada ortaya konmuştur (Gochee ve ark., 2003; Altınbaşak, 2019).

CCl4'e maruz kalınarak zehirlenme belirtileri; baş dönmesi, baş ağrısı, güçsüzlük, vücutta dengesizlik, sersemlik, uyşukluktur, mide bulantısı, kusma ve ishaldir. Akut CCl4 vakalarında hepatotoksite, kronik CCl4 vakalarında ise siroz meydana gelir (Basu, 2003; Altınbaşak, 2019).

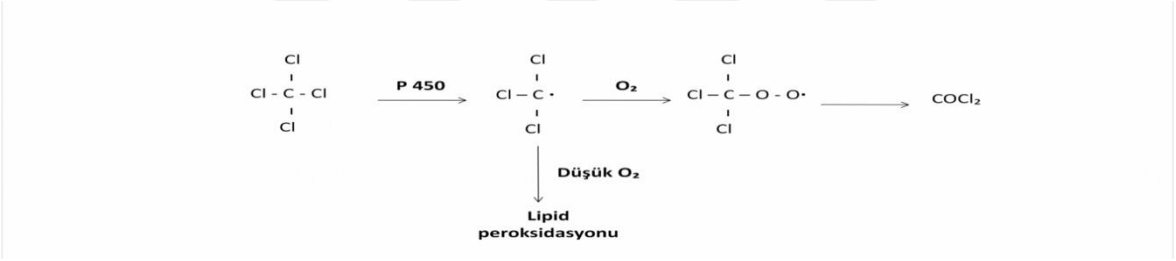
Serbest radikaller karasız bir yapıya sahiptir fakat CCL4 çok kararlı bir yapısı vardır, biyolojik yönden aktif değildir. Ancak bir takım enzimlerle reaksiyona girdikten sonra bu kararlı yapısını kaybedip, serbest radikallere dönüşüp patojen etkilerini sergiler. CCL4' ü aktif bir serbest radikal haline dönüştüren enzim sitokrom P-450' dir. Aktivite gösterebilmesi için reaktik toksik ürünlere dönüşmesi şarttır. Bu yolla oluşan metabolitler, karaciğerdeki moleküllerle tepkimeye girerek, karaciğerde nekroza varan karaciğer hasarlarına sebep olurlar. (Kose ve ark, 2005, Colak, 2016)

Deney hayvanları üzerinde yapılmış bir çok çaışmada CCL4 toksik etkisini sitokrom P-450 ile triklorometil' e (CCL3) dönüştüğünde gösterir.(Kayaalp, 2002)

CCL4 başta karaciğer olmak üzere bir çok organ üstünde hem akut hem de kronik problemlere neden olur (Tirkey, 2005). Serbest radikallerin vücut içi antioksidanlarını yenerek arttığı durumlar hücrelerde dejenerasyona hatta ölüme varan hasarlar oluşturabilir. Bu şekilde serbest radikallerin artması halinden en çok etkilenen yapılar hücre membranlarında bulunan lipitlerdir ve çok zararlı lipit peroksidasyonu durumu ortaya

çıkar. Lipit peroksidasyonu ortaya çıkan son metabolit MDA' dır ve CCL4 lipit peroksidasyon ürünlerinin artmasına neden olarak, hücreleri bu metabolitlere karşı koruyan enzimlerin azalmasına neden olmaktadır. CCL4' ün sitokrom P-450 enzimiyle, triklorometil (CCL3), triklorometil peroksit (CCL3O2) ve N-asetil-benzokinonelmin (NAPQI) aktif serbest radikallerine dönüşünce bu toksik etkilerini gösterir. (Vural, 2017)

CCI4 toksik etkilerini karaciğer hücrelerinde bulunan sitokrom P-450 enizmin biyotransformasyonu ile triklorometil' e dönüştürerek gösterir. Granülsüz endoplazmik retikulumda bulunan sitokrom P-450 biyosentez ve detoksifikasyon mekanizmalarının gerçekleştiği bir elektron taşıma sistemidir. Her ne kadar diğer organlarda da varlık gösterse en çok bulunduğu yer karaciğer dokusudur. Triklorometil radikali daha sonra oksijen ile birleşir ve triklorometil peroksil (CCI3O2) radikaline dönüşür ve bu radikalde yağ asitleri ile tepkimeye girerek lipit peroksidasyonunu başlatır ve hücre zarının bozulmasına neden olur.(Sheweita S. A. Ve ark., 2001, Vural D. F., ve ark, 2017) Aşırı lipit birikimi karaciğerde bozulmlar meydana getirir ve siroza doğru ilerleyen bir olaylar zinciri başlar. (Güven ve ark., 2003; Altınbaşak, 2019).



Şekil.1.4. CCL4 metabolizması ve reaktif metabolitlerin oluşumu (Çolak, 2011)

CCl4 metabolize edildikten sonra oluşturduğu CCl3 serbest radikali ile lipit ve proteinlere kovalent bağlanarak toksik etki meydana getirir. Toksik etki sonrası hücre membranlarındaki fosfolipitlerde doymamış yağların peroksidasyon oluşturması ile direk etki gösterir. Karaciğerde oksidatif stresin artması ve antioksidan sistemlerin baskılanması ile de indirekt etkisi meydana gelir. (Coşgun ve ark., 2019).

Karbon tetraklörür'ün sitokrom P-450 ile metabolize edilerek oluşturduğu ara ürünler DNA' lara da kovalent olarak bağlanarak DNA kırıklarına da sebep olduğu saptanmıştır. Oksidatif strese maruz kalan DNA bir çok hastalığın temelini oluşturabilir (Lavanya ve ark., 2009).

Redüktif dehalojenasyon, radikallerin bağlanması, protein sentezi baskılanması, yağ birikiminin oluşması, apopotoz ve fibrozis CCl4 tarafından oluşturulan karaciğer hasarının basamaklarıdır (Boll ve ark., 2001).

CCl4 ile oluşturulan karaciğer hasarında görülen bazı histolojik durumlar; balonlaşma dejenerasyonu, yağ başkalaşımları, hücre inflamasyonu, hücre nekrozu ve lenfosit ve kuupffer hücre infiltrasyonudur (Oh, 2003).

Karaciğer hasarı oluştuğunda, normalde hücre sitoplazmasında bulunan karaciğer enzimlerinden olan AST, ALT ve ALP kana geçer ve seviyeleri artar. Karaciğer hasarı tayininde en sık kullanılan bakılan serum markerleri AST, ALT ve ALP'dir (Fahmy, 2009, Colak, 2016)

1.5. SERBEST RADİKALLER

Elektronlar atom çekirdeğinin etrafında orbital adı verilen yapılarda hareket ederler ve çiftli halde bulunurlar (Pancar, 2020). Elektronlar atomlarda çiftli halde bulundukları için stabillerdir ve reaktif değillerdir ve kararlı durumdadırlar. Bazı durumlarda atomun bir veya daha fazla orbitalinde eşlenmemiş elektron bulunabilir ve bunlara serbest radikaller adı verilir ve bu yapılar kararsız yapılardır. Serbest radikaller eşleşmemiş elektronlara sahip olduklarından dolayı çevrelerinde bulunan atom ve moleküllere bağlanmak için güçlü bir eğilim gösterirler. Elektronları eşli halde bulunan atom ve moleküller ise çok daha fazla kararlı yapılar olduğu için reaksiyona girme istekleri serbest radikaller kadar fazla değildir ve bu şekildeki kararlı eşleşmemiş elektronu bulunmayan moleküllere nonradiakaller adı verilmiştir (Yıldız, 2020; Phaniendra ve ark., 2015; Sifuentes ve ark., 2017).

Karasız yapıda olan serbest radikallerin ömrü kısadır, yarı ömürlüdürler. Serbest radikaller kararsız bir yapıda olduklarından dolayı çevresinde bulunan moleküllerle tepkimeye girerek elektron alma çabasındadırlar. Amaçları bir an önce kararlı yapıya ulaşmaktır. Tepkimeye girme hızları yüksektir, eşleşmemiş elektron özelliğinden dolayı (Gürdöl, 2010).

Serbest radikaller biyolojik sistem içinde metabolik olaylar sırasında yan ürün olarak üretilebildiği gibi, ilaçlar, radyasyon, kimyasallar, hava kirliliği, sigara, alkol, fitokimyasal maddeler, yaşlanma, toksik maddelere maruz kalma (alloksan, parakuat, karbon tetraklörür), stres fakörü gibi endojen ve eksojen olarak üretilebilirler (Koçak, 2019).

Serbest radikaller kaynağını oksijenden alıyorsa reaktif oksijen türleri (ROS), kaynağını nitrojenden alıyorsa reaktif nitrojen türleri (NOS/RSN) olarak adlandırılırlar.

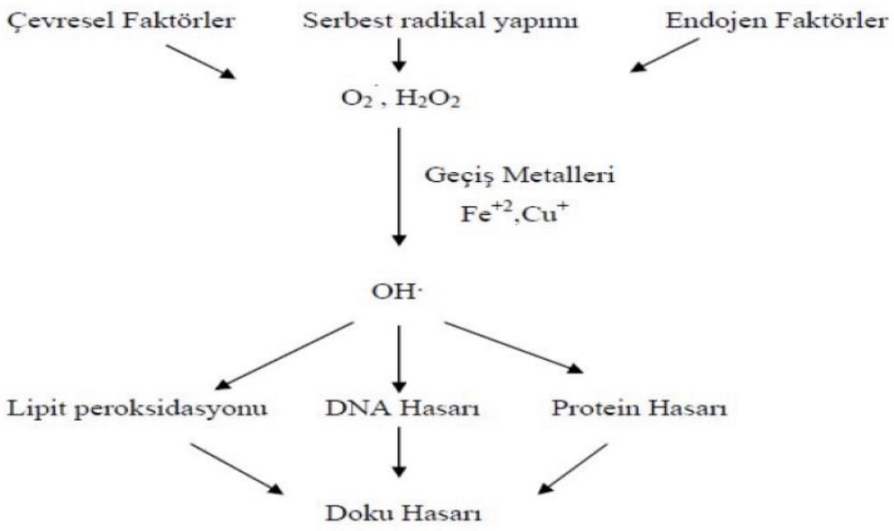
Bunların yanında karbon kaynaklı ve kükürt kaynaklı serbest radikallerde bulunmaktadır. (Wu ve ark., 2013).

İnsan vücudunda günlük yaşamı devam ettirmek için devamlı olarak enerjiye ihtiyaç vardır. Ve bu enerji mitokondrilerde üretilen ATP den karşılanır. ATP üretilirken yan ürün olarak serbest radikaller çıkmaktadır. Bu endojen kaynaklı serbest radikallere bir örnektir. Serbest radikal kaynakları dış kaynaklı da olabilmektedir. Serbest radikallerin fazlalığı yaşlanma sürecini hızlandırır, kardiyovasküler hastalıklar, kanser, böbrek hastalıkları, nörolojik hastalıklar, otoimmün hastalıklar, karaciğer hastalıkları, kas hastalıkları gibi bir çok ciddi hasara neden olabilir (Freeman, 1982; Gedik S. Ve ark., 2017).

Yaşam için çok önemli olan oksijen, metabolik olaylarda reaktif oksijen türü olduğunda vücuda zarar verebilmekltedir (Diplock, A. (1998)). Normal oksijene göre, reaktif oksijen türlerinin kimyasal reaksiyona girme isteği daha fazladır. Çiftlenmemiş elektronlar serbest radikallere reaktiflik kazandırır ve vücudun çeşitli bölümlerine zarar verebilirler. DNA, protein, lipit, koenzimler ve nükleotitler zarar gören başlıca yapılardır. (Coşgun, 2019)

Serbest radikaller canlı organizmada oksijene ihtiyaç duyarlar. Yaşlı ve hasta hücreler diğer iyi durumdaki hücrelere göre çok daha fazla serbest radikal üretirler. Çoğunlukla bulunan serbest radikaller: hidroksil, azot oksit, süper oksit radikalleri, peroksil, azot trioksittir ve bu yapılar hücrelerin DNA, protein, enzim, karbonhidrat, lipit ve diğer molekül grupları ile etkileşerek yapılarında bozulmalar meydana getirirler. Kollojen yapısında hasar oluşturarak dokularda harabiyet oluştururlar, lipit peroksidasyonu ile doymamış yağ asitlerinin yıkımı ile hasar meydana getiriler. Ayrıca en önemli hasarlardan biri de mitokondri zarının incelmesine neden olarak geçirgenliği artırıp organelin parçalanmasına kadar giden zararlar oluşturabilir. Serbest radikaller normal seviyede olduğunda her zaman zararlı çalışmazlar. Düşük dozda serbest radikal varlığı detoksifikasyon reaksiyonları, immün fonksiyonları, hücreler arası haberleşmeyi sağlarlar. Normal sınırlar içinde ROS varlığı zararlı değildir. Örneğin hidrojen peroksit bakterileri öldürmek için kullanılır (Mercan, 2004; Durmuş, 2005; Karakan, 2017, Koçak ,2019).

Serbest radikaller hücre düzeyinde metabolizma evresinde devamlı oluşurlar ve bunu dengelemek için antioksidan sistemleri mevcuttur. Antioksidan sistemlerine rağmen bazı durumlarında denge bozulmakta ve bu da oksidatif strese neden olmaktadır. Oksidatif stres de hücre ölümlerine neden olabilecek kadar çok serbest radikal üretimine neden olabilmektedir (Jing, 2019; Koçak, 2019).



Şekil.1.5. Serbest Radikallerin Hasar Verme Basamakları (Altınbaşak, 2019).

Reaktif oksijen türleri

Canlı ortamda oluşan serbest radikallerin en sık rastlananı oksijen kaynaklıdır. Bu radikaller çiftlenmemiş elektronlara sahip olmadıkları için radikal olarak adlandırılmazlar, hücre membranından geçişleri kolay olduğu için hücre üzerine etki edebilecek yeteneğe sahip oldukları için radikal olmayan reaktif türler olarak 'reaktif oksijen türleri (ROS)' olarak adlandırılır (Tekkes, 2006, McCord, 1993).

Biyolojik sistem içinde oksijenin çok büyük bir kısmı suya dönüşür. %5- %2 lik kadar bir bölümü elektron alarak hücrenin yapısını değiştiren ve membranda oksidasyona neden olabilen reaktif oksijen türlerine dönüşür. Bunlar; süperoksit radikali, singlet oksijeni, hidrojen peroksit, hidroksil radikali, nitroksit radikalidir (Altınbaşak, 2019).

Mitokondri, plazma zarı, endoplazmik retikulum ve proksidazlar endojen ROS üretiminin birincil kaynaklarıdır (Yıldız, 2020).

Oksijen molekülü elektron alarak en son suya indirgenir. Bir elektron aldığında süperoksit anyonu, iki elektron aldığında hidrojen peroksit, üç elektron aldığında hidroksil radikali, dört elektron aldığında ise su meydana gelir. Bahsi geçen bu ROS türlerinin tümü radikal değildir. Bütün oksijen radikalleri ROS tur ama tüm ROS lar oksijen radikali değildir (Büyüksulu, 2015; Özcan ve ark., 2015; Koçak, 2019).

Organizmada birçok ROS bulunur. En sık ROS oluşan yapılarda lipit yapılardır. Lipit radikalinin oksijen ile tepkimeye girerek lipit peroksi radikalinin oluşumu ile süreç tamamlanmaktadır. Lipit peroksi radikalinin diğer lipitlerle reaksiyon başlatması, lipit

hidroperoksitlerin oluşmasına neden olur. Lipit peroksidasyonunun hızını; demir ve bakır iyonları hızlandırır. Lipit radikallerin yüksek oranda toksik ürünlere dönüştüğü bilinmektedir. En çok bilinen toksik ürün ise aldehit ailesinden malondiaaldehit (MDA) dır (Çavdar, 1997).

Süperoksit Radikali

Oksijen molekülüne bir elektron eklenerek indirgenmesiyle süperoksit radikali oluşur. Süperoksitin en fazla üretildiği yer mitokondrilerdir. Mitokondri içerisinde bulunan elektron taşıma sisteminde (ETZ) enerji dönüştürülürken az miktarda elektron kaçağı olabilmekte ve bu durumda oksijenin süperoksit radikaline dönüşümüne sebep olmaktadır. Süperoksit çok reaktif değildir ve oluşum yerinden fazla uzağa gitmez çünkü lipit membranlarının geçirgenlik özelliğini düşürür, meydana geldiği yerde çevrili kalır ve de kendisi direk olarak zarar vermez. Moleküler düzeyde etkisi, süperoksitin sekonder olarak meydana getirdiği diğer radikallerdir. Düşük PH da daha reaktiftir, hem indirgeyici hem de oksitleyici özelliğe sahiptir (Cosgun, 2019). Süperoksit zayıf bir radikaldir ve tek başına hücre hasarı vermesi zordur ama oksidatif strese yol açabilecek reaksiyonları başlatabilir (Halliwell ve Gutteridge, 1984; Colak, 2016).

Süperoksitler'in sadece zararlı özellikleri yoktur, fayda da sağlarlar (vasküler fonksiyonların regülasyonu, apopotoz, nötrofillerin bakteriyal aktivitesi ve inflamasyon gibi durumlarda). Süperoksit seviyesi azalırsa bakteriyal enfeksiyonlara karşı eğilim artabilir (Yıldız, 2020).

Süperoksit seviyeleri artarsa, süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile hidrojen peroksit (H2O2) ve oksijene (O2) dönüştürülerek azaltılır. SOD, süperoksiti H2O2 ve O2 dönüşmesi için katalizler. Asitliği düşük ortamda SOD olamadan da H2O2 ye çevrilebilir. SOD sayesinde süperoksitin hücre içinde birikmesinin önüne geçilmiş olur (Yıldız, 2020). Hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerine kıyasla daha az zararlı bir radikaldir süperoksit. (Bolduc ve ark., 2018; Koçak, 2019)

Hidrojen Peroksit

Süperoksitin elektron transferi sonucu SOD ile tepkimesi sonucu ya da oksijenin iki elektron alarak indirgenmesiyle hidrojen peroksit oluşur. Yapısında eşleşmemiş elektron içermediğinden dolayı radikal olmamasına karşın daha reaktif oksijen türlerinin yapım aşamasındaki rolü ve hücre zarlarına nüfuz edebilmesinden dolayı önem teşkil eder. Diğer bir önemli görevi de hücre içi sinyal sorumluluğunu üstlenmesidir (Nordberg, 2001).

Reaktif bir tür olmamasına karşın H2O'nin oksitleyici olduğu kabul edilmektedir (Akyüz, 2007).

Hidrojen peroksit bir radikal değildir fakat süperoksitlerle tepkimeye girerek ROS türevi olan hidroksil radikalini oluşturur ve yağda çözünebilme özelliğinden dolayı demir içeren membranlarda hasar oluşturabilir. (Özcan ve ark., 2015). Fazladan olan, istenmeyen hidrojen peroksit; glutatyon, peroksidaz, katalaz ve diğer oksidazlarla hücreden uzaklaştırılır. (Gutteridge, 1995).

$O_2 + 2e^- + 2H \rightarrow H_2O_2$ $\qquad\qquad$ $O_2^{\cdot -} + e^- + 2H \rightarrow H_2O_2$

$\overset{SOD}{2O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2}$

Hidroksil Radikali

Radikaller içinde en toksik etkiye sahip olan radikaldir. Bir çok moleküle tepkimeye giren çok reaktif bir türdür. Yarılanma ömrü kısadır, hızlıca üretilip hemen uzaklaştırılmasına rağmen oluşturduğu hasar çok güçlüdür (Gutteridge, 1995). Atmosferdeki kimyasalların ana oksitleyicisi hidroksil radikalidir. Çok küçük, suda çözünür, reaktif, hareketli ve çok zararlı bir radikaldir (Forster ve ark, 2007).

Hidrojen peroksitin indirgenmesi ve suyun radyasyona maruz kalması ile hidroksil radikali oluşur (Halliwell, 2015).

Hidroksil lipit peroksidasyonu başlatarak hücre zarının yapısına harabiyet verir. Hücre zarının geçirgenliğini artırarak hücre ölümüne sebep olur ve böylece karaciğer, akciğer, böbrek ve kanser gibi hastalıklara yatkınlığı artırır. (Baykal, 2000; Akkuş, 1995). Hidroksil radikaliokadar reaktiftir ki karşılaştığı her molekül ile reaksiyona girebilir. Bu özelliği dış orbitalinde eşlenmemiş elektron içermesinden kaynaklanmaktadır. En büyük bilinen hasarı lipit peroksidasyonudur. Hücre zarı su içermediğinden dolayı hedefi yağ asitleridir ve lipit peroksidasyonu ile zarın yapısını bozar ve hücre ölümüne sebep olabilir. (Gutteridge, 1995).

Yalnızca lipitlere değil DNA üzerindede zararlı etkileri vardır. DNA zincirlerinde kırılmalara neden olarak mutajenik etkilere sebep olabilir. Ayrıca glikolipitler, karbonhidratlar, proteinler gibi elektron olarak zengin moleküllerede toksik ve tehlike yaratan bir radikaldir. (Ayala ve ark., 2014;)

Singlet Oksijen

Eşlenmemiş elektrona sahip olmadığı için serbest radikal olmasada, dönme yönlerinin farklılığından dolayı oksijenin yüksek reaktif formudur ve serbest radikal

tepkimelerini başlatabilirler. Bundan dolayı da serbet radikal sınıfında adları anılır. (Gutteridge, 1995).

Singlet oksijen süperoksitin dismutasyonu, hidrojen peroksitin Hipoklorid ile reaksiyonu sonucu ya da oksijen elektronlarından birinin dışarıdan enerji alması ile kendi dönüş yönünün tersi yönde olan farklı bir yörüngeye yer değiştirmesi ile oluşabilir (Gutteridge, 1995).

Oldukça hızlı bir şeklide uzaklaştırılmasına rağmen (ömrü çok uzun olmadığı için), çevresindeki moleküllerle etkileşebilir. Singlet oksijen ortamda arttığı zaman oksidatif stresi başlatabilir, lipit, protein, nükleik asileri okside ederek toksik etki gösterebilir (Agnez-Lima ve ark., 2012).

1.6. Antioksidanlar

Canlı organizmada sürekli surette üretilen serbest radikallerin zararlı etkilerini minimale indirmek için, hücresel boyutta koruma sağlamak amacıyla güçlü savunma sistemleri olan antioksidan mekanizması vardır, bu mekanizma oksitlenmeyi geciktirme ve önleme yeteneğine sahiptir (Federico ve ark, 2007). Her ne kadar serbest radikal üretimi olsa da antioksidanlarla onların zarar verici etkileri dengelenmelidir. Dengenin serbest radikaller lehine bozulmasında ileri derecede hücre hasarları ve beraberinde bir çok zarar görünmektedir. Antioksidanlar serbest radikal etkilerini bertaraf etmek için çalışan, hücreleri korumakla yükümlü çok önemli sistemlerdir (Cornelli, 2009).

Oksidanlar, antioksidanlardan fazla üretilirse yada antioksidan mekanizması yeterince çalışmazsa yani bir dengesizlik söz konusu olursa lipit, protein, karbonhidrat ve DNA hasarları oluşur (Halliwel, 1991).

Serbest oksijen radikallerini tutup daha zayıf moleküllere çevirme işlemleri antioksidanların toplayıcı etkisidir. Radikallere bir hidrojen ekleyip aktivitelerini azaltarak inaktif hale getirmeleri baskılayıcı etkisidir. Antioksidanlar, kendilerini radikallere bağlayıp onların zincirlerini kırarak, zincirleme tepkime oluşturmalarının önüne geçerler bu da zincir kırıcı etkisidir. Serbest radikallerin lipit, protein, karbonhidrat ve DNA gibi yapılara verdiği zararları onarma özellikleri onların onarıcı etkisidir. Metal iyonları ve oksijeninin konsantrasyonlarını azaltıp, uzaklaştırarak oksitlenmeyi durdururlar bu da antioksidanların hücresel kinaz kayıplarını önleme etkisidir. Enzimatik olmayan ve enzimatik olan antioksidan sentezini artırarak etki ederler. Bu özellikleriylede enzimatik etkilerini ortaya koyarlar. Bunların yannda antioksidanlar; DNA mutasyonunu, lipit

peroksidasyonunu ve proteinlerin çapraz bağlanmasının önüne geçerler. (Akkuş, 1995; Bayraktar ve ark., 2005; Baz, 2014)

Antioksidanlar, suda ve yağda çözünen serbest radikal tutucuları, enzimleri ve metal iyon bağlayan proteinleri kapsamaktadır. Endojen ve eksojen kaynaklı antioksidanlar olarak iki başlık altında toplanır (Mehmetçik ve ark., 2008, Ozturk ve ark., 2009). Endojen antioksidanlarda enzimatik antioksidanlar ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak iki gruba ayrılır. Ekzojen antioksidanlar ise besinlerden direk alınan, C ve E vitamini, karotenoidler, polifonik bileşikler, elementler (çinko, kükürt, selenyum) dir (Altınbaşak, 2019).

Endojen Antioksidanlar

Enzimatik Antioksidanlar

Enzimatik antioksidanlar, serbest radikallerin saldırısını azaltmak ve onların zarar verici döngülerini kırdıkları için en önemli birincil antioksidanlar olarak adlandırılır (Hsiao, 2001). Etki mekanizmaları genel olarak suda çözünerek sitoplazmadaki zararlı oksijen yapılarını uzaklaştırmak ve yok etmektir (Colak, 2016).

Enzimatik antioksidanlar; süperoksit dismutaz (SOD), mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi, katalaz (CAD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), fosfolipit hidroperoksit glutatyon peroksidaz (PLGSH-Px), glutatyon S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz, NADH peroksidaz' dır. (Colak, 2016)

Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz Sistemi

Hücre içinde enerji üretilen asıl yer mitokondrilerdir. Mitokondri iç zarı kıvrımlı bir yapıya sahiptir. Böylelikle yüzey alanı artmıştır. Mitokondri iç zarı üzerinde elektron taşıma zinciri (ETZ) mevcuttur. Yüksek enerjinin oluştuğu yerdir. Solunum zinciri olarak ta adlandırılır. Vücutttaki en aksiyonlu yer mitokondri ETZ leridir. ETZ lerde 5 tane kompleks bulunur. Kompleks 1, 2, 3, 4, 5 diye adlandırılırlar. Yiyeceklerden gelen elektronlar 1 den 4'e kadar akar. Elektron akışı 4. İstasyonda biter. 5. İstasyonda ise ATP oluşur (Guyton ve Hall, 2017).

ETZ komplekslerinde serbest radikal üretimi olur. En çok serbest radikal ETZ 1' de oluşur. Koenzim Q10, kompleks 1 ve 2'den aldığı elektronları kompleks 3'e aktarmakla görevlidir. Kompleks 3' e gelen elektronları kompleks 4'e taşıyan molekül ise Sitokrom-C dir. Ortamda fazladan oluşmuş serbest radikal varlığında ETZ zincirindeki elektron akışını kesen yada kısan yapılardır. Böylece bir miktar bile olsa da Sitokrom-C hücreleri kurtarır (Guyton ve Hall, 2017).

Süperoksit Dismutaz (SOD)

Normal hücresel olaylar sırasında, hücre içinde sürekli olarak süperoksit üretilir. SOD enzimi, süperoksiti hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürür ve ayrıca katalaz (CAT) ya da glutatyon proksidaz (GPx)enzimlerini uyararak hidrojen peroksiti ortamdan uzaklaştırır. Normalde mitokondrilerde yer alan sitokrom sistemi hücre içi yapıları ROS etkilerinden korur fakat bazen yetersiz kalabilir ve bu durumda SOD ortaya çıkar ve etkinliğini artırarak hücreyi zararlı etkilere karşı savunur (Gutteridge, 1995).

Hücre içindeki ROS saldırılarına karşı ilk koruyucu mekanizma SOD mekanizmasıdır ve en etkili antioksidan enzimdir. Çünkü süperoksit anyonu yok edilmezse lipit, protein, karbonhidrat ve nükleik asitlerin yapısını bozmaya yönelik serbest radikal tepkimelerinin ateşleyicisi olarak ortamda kalır ve ciddi zararlara yol açar. Bunu önlemek için SOD savunma mekanizması mevcuttur (Pancar, 2020).

SOD kendi içinde üç farklı türevi vardır. Bunlar mitokondride Mn-SOD, sitozol ve diğer organellerde CuZn-SOD, hücre dışında ise EC SOD olarak bulunur.(eyalettin Öztürk). SOD türevleri anti-tümör aktivitesinde, fagosite edilmiş bakterilerin yok edilmesinde ve inflamatuar yanıtta çok önemli görev üstlenir (Karabulut, 2016; Mesner, 2012). SOD aktivitesi oksijen artışı ile artar.

$$O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H_+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

Katalaz (CAT)

Katalaz, ROS grubundan olan süperoksit'in parçalanmasından sonra oluşan hidrojen peroksiti, su ve moleküler oksijene çevirmekle yükümlü bir enzimatik antioksidandır ve bu işlemi bir katalaz enzimi 6 milyon kere yapabilme yetisine sahiptir bundan dolayı enzimler arasında en yüksek devinime sahip olan antioksidandır (Aslani, 2016). Hidrojen peroksit birikimini önleyerek hücreyi yıkıcı etkilerden korur (Öğetürk 2009).

Katalaz enzimi tüm hücrelerde belli miktarlarda bulunmasına karşın eritrosit, karaciğer, böbrek, kemik iliği gibi yapılarda çok daha fazla bulunur. (Çimen ve ark., 2005). Kanser, ateroskleroz, retinopati, diyabet, iskemik reperfüzyon hasarı, beslenme yetersizliği, nörodejeneratif hastalıklar, otoimmün hastalıklar ve yaşlanma gibi sorunlu durumlarda oluşan oksidatif stres yaratan durumlarda CAT savunmadaki başrol enzimidir. (Fahmy ve

ark., 2009). CAT enzimi yaşla beraber aktivitesi artan bir antioksidandır (Alexander, 1998).

$$2H_2O_2 \xrightarrow{CAT} 2H_2O + O_2$$

Glutatyon peroksidaz (GSH-Px)

Vücut hücrelerinin ROS saldırılarına karşı korunduğu antioksidan sistemlerin enzimatik olanlarının arasında glutatyon peroksidaz da bulunmaktadır. GSH-Px yapısında selenyum bulundurur ve hücre sitoplazmasında yer alırlar. Mitokondri ve sitozol içerisinde yer alırlar ve hidrojen peroksit'in uzaklaştırılmasında görevlidirler. (Akkuş 1995). Bu enzim tüm organlarda bulunur ancak plazma sentez formunu böbrekler aracılığı ile yapar ve en çok bulunduğu organ karaciğerdir (Messner ve ark., 2012; Aslani, 2016).

GSH-Px redükte glutatyonu yükseltgerken, hidrojen peroksiti suya çevirir ve bu şekilde hemoglobin ve membran lipitlerini oksidatif strese karşı korur.(Akkuş ve ark., 1996)

GSH-Px solunum patlaması sırasında serbest radikallerin peroksidasyonu sonucu fagositoz yapan hücreleri korur, fagositoz yapan hücrelerin korunmasında önemli rolü vardır (Akkuş,1995; Bilgiç, 2016).

$$H_2O_2 + 2GSH \rightarrow 2H_2O + GSSG$$

$$ROOH + 2GSH \rightarrow ROH + GSSG + H_2O$$

Glutatyon S Transferaz (GST)

Toksik metabolitler ile glutatyonun konjuge olmasını katalizleyerek, zararlı ürünlerin detoksifiye edilmesini sağlar. Endojen tepkimeler sonucu oluşan veya dışardan eksojen olarak yabancı alınan toksik bileşikler glutatyon ile konjuge edilir, vücuttaki diğer moleküllerle birleşmesi engellenip diğer hücrelere zarar vermeden GST sayesinde suda çözünen moleküllere dönüştürülür, idrar yada safra yolu ile vücuttan atılır (Seven, 1996).

Membran bileşenlerini indirgeme özelliğine sahip olan GST'ler hücreleri lipit peroksidasyonundan korur. GST'ler herbisit, antikanser ilaçlar, pestisit, kimyasal kanserojenler, çevresel kirlilikler ve ksenenobiyotiklerin detoksifikasyonunda rol alarak güçlü doğal koruyucu sistemlerden biri olarak anılır (Gyami ve ark., 2004, Altınbaşak 2019).

Glutatyon Redüktaz (GR)

Antiosidan özellik gösteren glutatyon redüktaz, glutatyon S-tarnsferaz ve glutatyon peroksidazın tepkimeleri sonucu oluşan okside olmuş glutatyonu, redükte glutatyona (GSH) çevirir. Glutatyon hücre içinde az miktarda bulunduğu için bu dönüştürme işlemi çok önem arz eder. İndirgenmiş glutatyon miktarı yüksek seviyede tutulması önemlidir. Glutatyon redüktaz bu işlemi yaparken pentoz fosfat yolundan saağlanan NADPH'ı koenzim olarak kullanır (Akkuş, 1994, Altinbaşak, 2019).

Oksitlenmiş glutatyona, NADPH bir elektron aktarır ve tekrar glutatyona dönüşür. NADPH serbest radikal hasarının önüne geçmek içşin gerekli bir moleküldür (Karabulut ve Gülay, 2016).

GSH-Px ve katalaz aktivitelerinin meydana gelebilmesi için glutatyonun devamlı surette hücre içinde bulunması gerekmektedir (Seven ve ark., 1996).

Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Hücre içi ortamlarda enzimatik antioksidanlar, hücre dışı ortamlarda ise enzimatik olmayan antioksidanlar daha rahat görevlerini gerçekleştirirler, daha aktif ve etkilidirler.(Halliwell B., 1991) Enzimatik olmayan antioksidanlar lipit faz ve sıvı faz olanlar olmak üzere iki bölümde ele alınır (Colak, 2016).

Lipit fazda olanlar; a-tokoferol, B-karoten dir. A-tokoferol E vitamininin büyük bölümünü oluşturur, dokudaki majör E vitamini formudur, yağda çözünebilir ve zincir kırıcı bir antioksidandır, hücre membranındaki lipitleri korur (Gutteridge, 1995; Hsiao ve ark., 2001).

B-karoten ise A vitaminmin öncülüğünü yapar, singlet oksijeni ortamdan uzaklaştırarak, ROS aktivitesi ile oluşabilecek oksidatif stresten hücreyi korur (Colak, 2016).

Sıvı fazda olanların sayısı hayli çoktur. Bunlardan bazıları; askorbik asit,melatonin, ürat, sistein, seruloplazmin, transferrin, miyoglobin, hemoglobin, metionin, ferritin, albümin,bilürübin ve glutatyondur (Öğetürk ve ark., 2009).

Askorbik asit bu saydığımız antioksidanlar içerisinde en güçlü olanıdır, lipit peroksidasyonunu başlatan radikalleri elimine eder ve lipitlerin okside olmasının önüne geçer. Sıvı faz antioksidanlarından melatonin de ROS grubundan olan hidroksili ortamdan uzaklaştırma özelliğine sahip, güçlü antioksidanlardandır. Lipofilik bir yapıya sahip olduğu için kan beyin bariyerini geçebilir ve burada da antioksidan aktivite gösterebilir (Gutteridge, 1995). Ürat lipit radikalleri üzerinde etkisi yoktur, singlet oksijen, hidroksil radiakallerini uzaklaşırır. Süperoksit ve hidroksi radikalini toplayan antioksidanlardan biri

de sistein dir ve aynı görevi bilürübin de yapar. Seruloplazmin antioksidanı da yine lipit peroksidasyonunun önüne geçen bir sıvı fazdaki enzimatik olmayan antioksidandır. Aynı şekilde transferin de demiri bağlayarak lipit peroksidasyonunun önüne geçer. Sıvı fazdaki enzimatik olmayan antioksidanlardan olan ferritin de demiri bağlama özelliğine sahiptir. Albümin, bakırı bağlama özelliği vardır ve bunun yanında hidroksil radikalini inhibe eder. Serbest radikaller ve peroksitlerle tepkimeye giren glutatyon hücreleri ROS etkilerine karşı korur (Koçak, 2019).

Glutatyon (GSH)

Enzimatik olmayan antioksidan ailesine mensup olan glutatyon, suda çözünen ve önemli iyicil etkileri olan, peroksitlere karşı oksidatif strese savaş açan bir tripeptittir. Glutatyon, ROS'lara karşı engelleyici görevi vardır. Oksidatif stres durumunda hidrojen peroksit ve glutatyon peroksidaz varlığında suya yıkımlanır. Gulutatyon oksitlendiğinde GSSG denilen okside glutatyona dönüşür, GSSG'nin antioksidan etkisi yoktur. Okside glutatyon olan GSSG sonrasında glutatyon redüktaz ile tekrar GSH'a dönüşür. Okside olan glutatyonu (GSSG), redükte glutatyona dönüştürülmesi NADH kullanılması ile mümkün olur ve bu işlemi Glutatyon Redüktaz enzimi yapar. Glutatyon hücre içinde nispeten az bulunduğu için bu dönüşüm çok elzemdir. Serbest radikallerin yayılmasının önüne geçen glutatyon detoksifikasyon içinde çok önemlidir (Hayes, 1999; Aslani ve Ghobadi, 2016).

Glutatyon vücut hücrelerinin korunması için çok önemlidir, lenfositleri aktive eder ve bağışıklık sistemini kuvvetlendirir, hemoglobinin oksitlenmesinin önüne geçer, hasarlı DNA yapılarını iyileştirir, serbest radikallerin dönüşümünü yani detoksifikasyonunu sağlar, proteinleri korur, E ve C vitaminlerini aktif formlarına dönüştürebilme özellikleri vardır (Kasnak, 2015; Aslani ve Ghobadi, 2016).

En çok karaciğer hücrelerinde bulunan GSH vücudun tüm hücrelerinde belli oranlarda mevcuttur ve yapısında glutamat, sistein ve glisin içerir. Ksenobiyotiklerin detoksifiye edildiği en önemli organ karaciğerdir ve GSH en çok burada bulunur ve üretilmesi için herhangi bir genetik bilgiye ihtiyaç olmadan üretimi sağlanabilir ve ROS etkisini en aza indirir (Mitchell, 1987; Gedik, 2017).

1.7. Melatonin

Melatonin, büyük çoğunluğu glandula pineaaliste üretilen, sirkadiyen ritim, endokrin sistemin düzenlenmesi, düz kas tonusunun ayarlanması, immün fonksiyonların artırılması, üreme sistemlerinin düzenlenmesi, yaşlanma, antibiyotiklerin yan etkilerinden korunma, uyku uyanıklık durumu, açlık tokluk, kardiyovasküler sisteme iyicil etkileri olan,

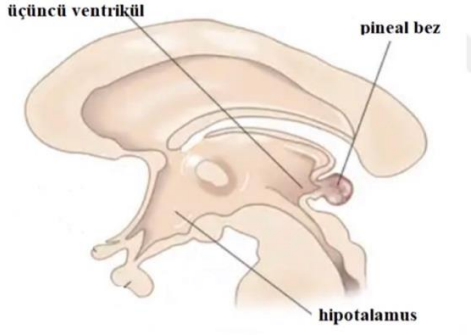
triptofandan köken alan, endojen üretilebildiği gibi bir çok meyve sebze ve kuruyemişten de tedarik edilebilen, hem suda hemde yağda çözünebildiği için hücre içine kolaylıkla girerek ROS etkilerine karşı güçlü bir antioksidan özelliğe sahip çok güçlü bir antioksidandır (Köykun, 2012; Hirsch-Rodriguez, 2007; Deniz, 2018).

Son yıllarda yapılan çalışmalara göre melatonin yalnızca glandula pinealiste değil, ayrıca timüs, kalp, karaciğer, kas, kemik iliği, trombositler, dalak, karaciğer, retina, glia hücreleri, pankreas, harder bezi, mide, plasenta, astrositler, lenfositler, böbrekler, bağırsak, serebral korteks, testis ve deriden de salındığı bulunmuştur. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılarak HIOMT mRNA expresyonu ve NAT analizi ile ortaya konsada en hatırı sayılır melatonin sentezi glandula pinealis ten yapılmaktadır (Kleszczynski ve Fischer, 2012; Li ve Zhou, 2015).

Melatonin sentezlendikten sonra depolanmadan komşu kapillere bırakılır ve genel dolaşıma kolayca katılır. Melatonin lipofilik özelliğinden dolayı doku ve sıvılara dağılımı çok kolaydır. Dolaşıma katıldıktan sonra, kan beyin bariyerine sahip olmadığı için direk olarak beyin omurilik sıvısı (BOS) na da karışabilmektedir (Turgut, 2002). Melatonin yarılanma süresi 30 ila 60 dakika arasındadır, ekzojen verilen melatonin yarılanma süresi daha kısa olup 12 ile 48 dakika arasında değişmektedir. Eksojen melatoninin kullandığı metabolizma yolları ile endojen melatonin kullandığı yollar aynıdır (Dinler K., 2008).

Glandula Pinealis Anatomisi ve Histolojisi

Milattan önce 3.yüzyıllar zamanından bu yana bilinen pineal bez 1514-1564 yılları arasında ayrıntılı bir şekilde incelenmeye başlanmış, Hint felsefesine göre üçüncü göz olarak kabul edilmiş, Descartes ise ruhun merkezi olarak bu bezden söz etmiş, fakat melatoninin varlığından 1958'de Lerner ilk kez söz etmiştir. 'Pinea' kelimesi Latince'de çam kozalağı anlamına gelmektedir. Corpus pineale, epiphsis cerebri, glandula pinealis; pineal bezin diğer isimlerindendir. (Köykun, 2012; Calvo, 1985)



Şekil.1.6. Pineal bez (Grays, 1985).

Glandula pinealis, beynin merkezinde commissura posterior ile commissura habernulorum arasında bulunur, doğrudan üçüncü ventriküle bağlı olan tek parça halinde bulunan bir beyin uzantısıdır. İnsan pineal bezi; 120-150 mg ağırlığındadır, sıçanlardaki ağırlığı ise 0,9-1,56 mg arasında değişir (Köykun, 2012). Üçüncü ventrikülün tavanının arka ucuna 100 mm çapında, 2700-3000 mm uzunluğundaki bir pineal sapla bağlanır. (Taner D., 2017).

Pineal bez, pia mater ile sarılıdır ve bu pia materden içerikan damarları, miyelinsiz sinir lifleri içeren septalar girer. Tüm hormon salgılayan organlar gibi pineal bezde kapiller ağ bakımından güçlüdür (Köykun, 2012). Böbrekten sonra vücudun en fazla kan akımına sahip organıdır (Deniz, 2018). Pineal bezde iki ana hücre tipine rastlanır, pinealositler ve glial hücreler. Pinealositlerin, glia hücrelerine göre sayıları daha fazladır. Pinealositler daha fazla sayıda bulunmalarının yanında sekresyon yapımından sorumludur, glial hücreler ise daha az sayıda olup destek veren hücrelerdir (Karagöz, 2002; Köykun, 2012).

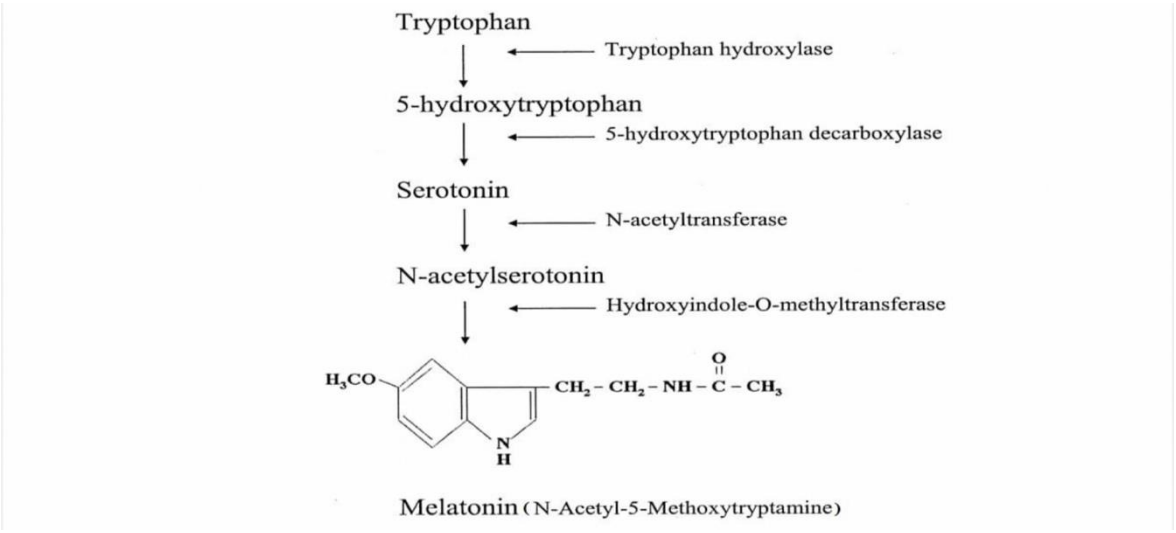
Pineal bezin arteriyal beslenmesinden posterior choroidal arterler, venöz dolaşımından internal serebral arterler sorumludur ve kan beyin bariyeri mevcut değildir (Reiter, 1993).

Melatonin Sentezi

Melatonin sentezinde rol oynayan en önemli yapı pinealositlerde sentezlenen triptofandır. Triptofan'ın besinlerle alınması gerekmektedir (Ölmez ve ark., 2000). Pineal bezde kan beyin bariyeri bulunmadığı için kandaki triptofan pinealositlere ulaşımı çok kolaydır (Turgut ve ark., 2002). Dışarıdan alınan triptofan melatonin düzeyinin artmasını sağlar. Pinealositlere alınan triptofan, hidroksilaz enzimi ile 5-hidroksitriptofan'a hidroksitlenir. 5-hidroksiriptofan, aromatik- L- aminoasit dekarboksilaz ile 5-hidroksitriptamin (seratonin)'e dekarboksillenir. Seratonin, N-asetil transferaz (NAT) enzimi ile N-asetil seratonine ve bu da hidroksiindol-0-metil transferaz (HIOMT) etkisi ile melatonin e dönüşür (Brzezinski, 1997; Köykun, 2012)

Melatonin üretilmesinde hız sınırlayıcı bir enzim olan NAT, endojen olarak gün içinde ritim gösterir, ışık varlığında NAT düzeyinde düşüş görünür (Roseboom ve ark., 1996; Stokkan ve ark., 1991).

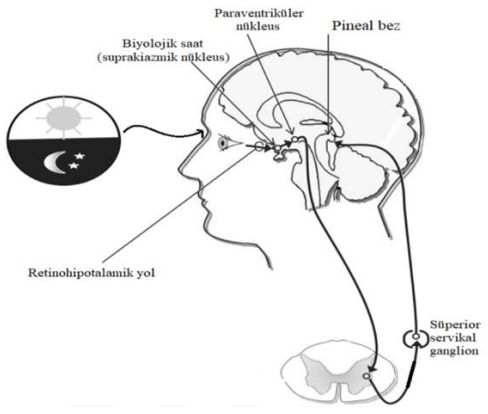
Melatonin, suprakiazmik nükleus (SKN) tarafından kontrolü sağlanır. SKN, supraventriküler bölge üzerinden hipotalamusun dorsomedial çekirdeği ile bağlantı kurar (Köykun, 2012).



Şekil.1.7. Melatonin Sentezi Basamakları (Weissbach, 1960).

Melatonin Sistemik ve Antioksidan Etkileri

Melatonin DNA, lipitler, proteinler gibi önemli yapıları korurlar, oksidatif stresi azaltırlar ve hücre içi metabolizmayı düzenleyerek iyicil etkilerini her daim gösteriler. Kendileri antioksidan etkisiyle çalıştıkları gibi, diğer antioksidanların aktive olmasında da etkin rol oynarlar (Süperoksit dismutaz, glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz, katalaz gibi) (Bülbüller ve ark., 2005; Konturek ve ark., 2007). Karanlıkta melatonin sentezi en yüksek seviyededir, yaklaşık %80'i gece sentezlenir. Melatonin etkisiyle uykuya geçişin daha kolay olduğu ve uykunun sürdürülebilirliğinin arttığı gözlemlenmiştir. Melatonin kandaki seviyesini değiştiren ışık varlığının yanında yaşla da alakası çoktur. Yenidoğanda melatonin seviyesi düşüktür, üçüncü aydan sonra düzene girmeye başlar. İlk üç ay nöroglial hücreler yoğunluktadır, daha sonra pinealositler aktifleşir.Alkol, sigara, gürültü, tok uyumak, fazla çay kahve tüketimi, depresyon ilaçları da melatonin seviyesini azaltan etkenlerdendir. (Ferguson ve ark., 2010; Şener 2010;)



Şekil.1.8. Melatonin sentezi döngüsü (Korkmaz ve ark., 2009).

Kemikler üzerinde de iyileştirici etkileri söz konusudur. Osteoblast yapımının artırıldığı, osteoklaastları inhibe ederek kemikleri güçlendirdiğine dair çalışmalar mevcuttur (Cardinali ve ark., 2003).

Böbreklere zarar verebilen civa klorürden koruma özelliğine sahip olan melatonin, glömerüler filtrasyonu da düzenler (Quiroz ve ark., 2008).

Melatonin ROS ve RSN'lerden hücreleri temizleyen güçlü bir antioksidandır. Temizlediği reaktif yapılar arasında; hidrojen peroksit, hidroksil, nitrik oksit ve daha birçoğu bulunur(Gomez-Moreno ve ark., 2010).

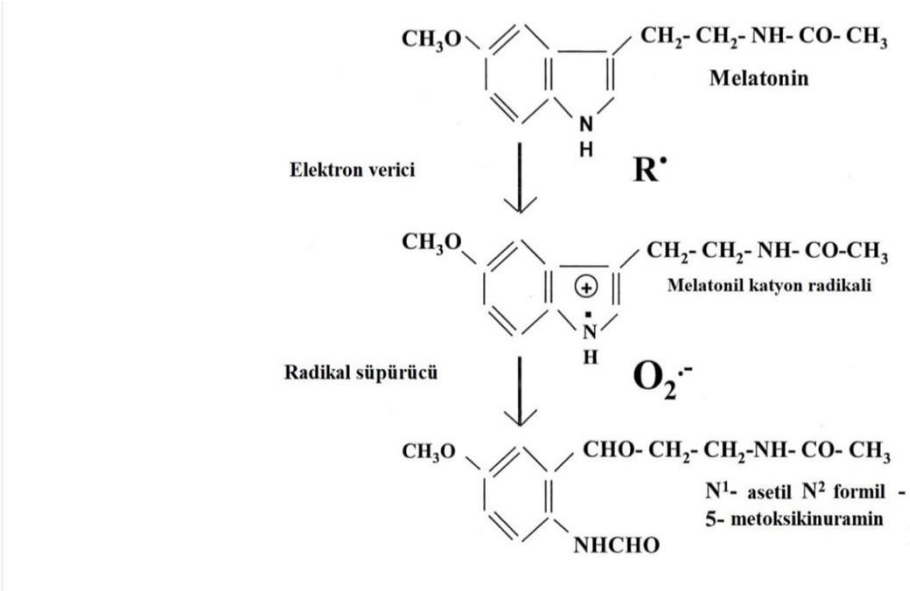
Melatonin en yüksek düzeyde mitokondri ve hücre mebranlarında bulunur ve buralarda lipitlerle etkileşir ve lipit peroksidasyonunun önüne geçer. Mitokondrinin iç zarında buluna ETZ lerde enerji üretme yeteneğini artırırlar ve ETZ' lerde bulunan DNA ve proteinleri oksidatif stresten korur. (Karbownik ve ark., 2000)

Melatonin'de kan beyin bariyeri olmadığından dolayı hücre membranı tarafından engellenmez ve hücre içine kolaylıkla girebilir; fonksiyonlarına reseptörlerin aaraacılık etmesinin haricinde onlardan bağımsız olarakta hareket edebilir. (Rodriguez ve ark., 2004; Reiter, 1991)

Sıçanlar üzerinde yapılan araştırmalarda karaciğer, beyin ve böbreklerde melatonin uygulamasının, glutatyon peroksidaz aktivitesinin arttığı sonucuna ulaşılmıştır (Reiter, 1997).

Melatonin lipofilik özelliği sayesinde hücre içine hatta hücre çekirdeğine kadar kolayca girebilir böylece DNA'nın korunmasına çok ciddi fayda sağlayarak diğer antioksidanlara karşı bir üstünlük sağlamış olur. bu üstünlüğü gece en pik noktada yaşar. Diğer bir üstünlüğü ise uzun süre kullanımlarında dahi toksik etki göstermemesidir. (Tan, 1993; Keskin 2020)

Jetlag, uyku düzeni, üremenin kontrol edilmesi, immün fonksiyonlarının düzenlenmesi, anti-tümoral etki, anti-fibrotik etki, antioksidan etki melatoninin en önemli etki gösterdiği alanlardır (Özerkan, 2015).



Şekil.1.9. Melatonin antioksidan mekanizmalarından biri (Reiter, 2001)

1.8. Oksidatif Stres

Oksijen hayatımızı sürdürmek için çok gerekli olsada, özellikle mitokondri organelinde glukoz, amino asit ve lipitlerin okside edilerek enerji üretilmesi esnasında, ETZ sistemi içerisinde az miktar sayıda elektron kaçağı olur ve bu da ROS oluşumunu gerçekleştirir. ROS üretimi yalnızca mikondrial yolla değil, dış ortamdan (inflamatuar hücreler) ya da çevresel proosidanlarla (ksenobiyotikler, patojenler, stres) eksojen olarak da üretilebilirler (Burçak, 2004).

ROS üretimi hücrelere zarar veren yapılar olsa da vücut bu tarz saldırılara karşı kendini korumak adına antioksidanlar yardımıyla yapılan, detoksifikasyon mekanizmalarına sahiptir. Kan vücudun tümüne antioksidan dağıtılması ve taşınmasını sağladığı için çok önemlidir (Ghiselli ve ark., 2000).

Vücut hücrelerinde oksidanlar, antioksidanlar tarafından dengede tutulmaya çalışılır, bu sağlanmaya çalışan denge herhangi bir nedenle oksidanlar lehine bozulursa hücrede oksidatif stres oluşur. Buda kanserden, otoimmün hastalıklara; nörolojik defektlerden, DNA hasarına kadar birçok büyük hastalığa neden olur (Aljumaılı, 2021).

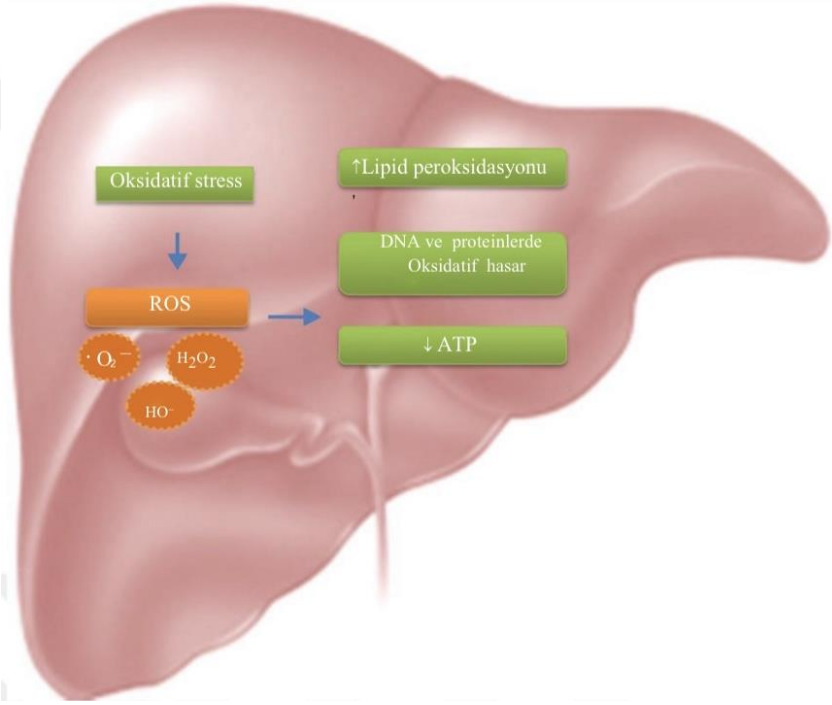
Diyabet, Alzheimer, yaşlılık, radyasyona maruz kalma, uyuşturucu kullanımı, böbrek yetmezliği, gibi durumlarda da oksidatif stres, serbest radikallere bağlı olarak meydana gelmektedir (Bansal ve Kausal, 2014).

Endojen ve eksojen kaynaklı oluşabilen ROS'ların yoğunluğununhücre içinde artmasının neden olduğu oksidatif strese karşı hücreleri savunan, onları koruyan antioksidan mekanizmanın yetersiz kaldığı durumlarda hücre düzeyinde istenmeyen

durumlar oluşabilmekte ve vücudun hayati önem arz eden moleküllerinde bozulmalar meydana gelebilmektedir. Bu zararlı durumların en önemlileri arasında lipit peroksidasyonu, proteinler arasında oluşan disülfit bağlar, DNA hasarları sayılabilir (Sarıkaya, 2020). Antioksidanların hücreleri koruyabilmeleri adına redoks ayarını devam ettirebilmesi için kan çok önemli bir faktördür, antioksidanların tüm vücuda taşınmasını ve yayılmasını sağlar (Ghiselli ve ark., 2000).

Oksidatif stres moleküler boyutta verdiği zararlarla kanser, diyabet, ateroskleroz gibi hastalıklara neden olur (Sarıkaya, 2020).

Oksidatif stres düzeyinin artması birçok moleküler boyutta hasara neden olsada, lipitler bu moleküller içinde ROS ların oluşturduğu toksik etkiye en duyarlı olan biyolojik yapılardır. ROS larla tepkimeye kolayca girerek peroksidasyon meydana getirir. Hücre membranına yerleşmiş doymamış yağ asitleri normal şartlarda membran akışkanlığını sağlar, oksidatif stres etkisiyle lipit peroksidasyonunun etkisi ile bu akışkanlık bozulur (De Zwart ve ark., 1999).



Şekil.1.10. Oksidatik Stresin Karaciğer Üzerindeki Etkisi (Delgado-Montemayor ve ark., 2015)

Oksidatif Stres Parametreleri

Total Antioksidan Kapasite (TAS)

Oksidatif stres, oksidan-antioksidan dengesinin oksidanlar tarafının ağır basması ile oluşur. Antioksidanları tek tek tayin edici yöntemler mevcut olsa da her birinin ayrı ayrı

değerlendirilmesi hem zaman anlamında hem maliyet açısından, hem de pratik olmamasından kaynaklı plazma, doku yada serumda genel antioksidan ölçüm yöntemi geliştirilmiş olup bu sisteme, total antioksidan kapasite (TAS) denir ve tüm oksidanların toplam etkisini yansıtır (Durmuş, 2015).

Plazmada bulunan antioksidanların ortak etkisi, ROS saldırılarına karşı tek bir antioksidanın koruyucu etkisinden daha fazla koruyucu etki yapar. Bundan dolayı biyolojik sıvılar içindeki total antioksidan seviyesi ölçümü hem bilimsel açıdan hem de hastalıkla ilgili tanımlama yapmak açısından önem arz eder (Sarıkaya, 2020).

Total Oksidan Kapasite (TOS)

Oksidatif stres, serbest radikallerin antioksidan sistemler tarafından yeterince bertaraf edilemediği durumlarda ortaya çıkmaktadır. Laboratuvar koşullarında çeşitli oksidanların tek tek ölçümü zaman ve maliyet açısından sıkıntı yaratabileceği için genel etkinlikleri tek seferde total oksidan kapatite (TOS) olarak ölçülmektedir (Ballur, 2022).

Oksidatif Stres İndeksi (Oİ)

TOS'un, TAS'a bölünmesiyle elde edilen değere oksidatif indeks adı verilmiştir. Vücuttaki oksidan ve antioksidan miktarları dengede ise oksidatif denge var demektir. ROS ve istenmeyen patolojik durumlar söz konusu olduğunda oksidatif denge bozulur ve bu durum da hastalıkları tetikleyen en önemli nedendir (Erel, 2004; Aslan, 2014).

Malondialdehit ve Lipit Peroksidasyonu

Organizmada oksijen kullanımının doğal bir sonucu olarak ROS oluşmaktadır. Enerji üretimi için gerekli mitokondri organelinin iç zarında bulunan ETZ'lerde, fagositik olaylar sırasında ve degredasyon tepkimeleri sonucunda endojen olarak ROS üretimi gerçekleşir ve vücudun kendi antioksidan mekanizması bunlarla baş edebilir. Ama bazı patojenik durumlarda vücudun antioksidan mekanizması, oksidanlarla baş etmeye gücü yetmez ve serbest radikal miktarı artmaya başlar. Bu burumda oksidatif stres meydana gelir ve bu durumda oluşan çeşitli mekanizmalar ile biyomolekkülerde çok ciddi hasarlar meydana getirir (Sarıkaya, 2020).

ROS'lar antioksidanlarla nötralize edilmekte sıkıntı yaşarlarsa proteinlere, karbonhidratlara, lipitlere ve DNA'ya ciddi zararlar verebilir. Bu zararlı etkenler ROS/ antioksidan dengesinin bozulduğu durumlarla meydana gelip, proteinler arası disülfit bağlarının oluşumu, lipit peroksidasyonu, DNA hasarı gibi istenmeyen hücre içi durumlara sebebiyet verebilir (Johansen ve ark., 2005).

ROS etkisi ile oluşan oksidatif stres birçok moleküler zarar verir fakat lipitler çok fazla hassastırlar ve büyük oranda etkilenirler. Hücrenin lipit membranına salrına ROS'lar buradan elektron alırlar ve lipit peroksidasyonunun erken evresi olan lipit hidroperoksitleri ni meydana getiriler. Lipit peroksidasyonu'nun gerçekleşmesiyle membran yapısının bozulması, permeabilite yükselmesi, hücre içi iyon yoğunluğunun sürdürülememesi gibi birçok zincirleme olaylar meydana gelmekte ve doku hasarları oluşmaktadır (Aslani ve. Ghobadi 2016).

Normal koşullarda hücre içinde oksijen kaynaklı ROS' lar tarafından az miktarda, hücrenin tolere edebileceği miktarlarda lipit peroksidasyonu meydana gelir. Antioksidan mekanizma ile etkisiz hale getirilebilir. Antioksidanların yetmediği durumlar olursa eğer hasar ortaya çıkar (De Zwart ve ark., 1999).

Peroksidasyon oluşumu, hücre membranında bulunan doymamış yağ hücreleri ROS' lar ile kolaylıkla etkileşerek peroksidasyon meyda getirebilirler. Fosfolipitlerin ve oksidatif yıkımı ve Lipit peroksidasyonu aşırı derecede zararlıdır, bu yolla oluşan hasar geri dönüşsüzdür. Peroksidasyon gerçekleşirseendoperoksitlerin siklizasyon reaksiyonu, yeni radikaller oluşturur ve en son aşamada MDA oluşur ve bu yolla oluşan hasar geri dönüşsüzdür (Aslani ve Ghobadi 2016). Lipit peroksidasyonunun en son aşamasında oluşan ürün MDA' dır ve MDA ölçümü hücresel boyuttaki hasarın tespiti için kullanılır (Sezer ve Keskin, 2014).

Lipit peroksidasyonu çok fazla hasar veren tehlikeli bir reaksiyondur, hücre zarı yapılarına doğrudan, üretilmesine sebep olduğu diğer reaktif aldehitlerle de dolaylı yoldan zarar verir. Hücre zarı akışkanlığı, geçirgenliği ve enzimatik fonksiyonları bozulur. Peroksidasyonun en son ürünü olan MDA hücre zarı yapılarının çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna sebebiyet verir. Artmış MDA düzeyi lipit peroksidasyonunun varlığının iyi bir göstergesidir. Hücre membranlarındaki fonksiyonların bu denli bozulması ile hücre ölümüne sebebiyet verebilecek hasarlar oluşturur. MDA varlığı ratlarda kanserojenik' tir (Aslani ve Ghobadi, 2016; Kocabaş, 2016).

MDA varlığı, ROS oluşumları için iyi bir göstergedir, hücresel boyuttaki hasar derecesini ölçmede kullanılır. Lipit peroksidasyonu dercelerini saptamak amacıyla MDA testleri uygulanır, kandaki miktarı oksidatif stres durumunu yansıtmaktadır (Sezer ve Keskin, 2014).

Karaciğer Enzimleri

Başlıca karaciğer enzimleri; aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), alkalen fosfotaz (ALP)'dir. Karaciğerin en önemli ana hücrelerinden olan hepatositlerde AST ve ALT sentezi yapılırken, safra kanalı epitel hücreler bünyesinde ise ALP sentezi yapılmaktadır. Bu enzimlerin kanda artışına akut ya da kronik karaciğer hasarı sebebiyet verir (Şentürk ve ark., 2004).

Karaciğer hasarının dercesini belirlemek amacı ile en yaygın kullanılan enzimler AST ve ALT' dir (Coşgun, 2019).

Aspartat aminotransferaz (AST)

Her ne kadar karaciğer hasarlarını tayin etmek için klinik amaçla serumda sıkça kullanılan bir yöntem olsa da AST enzimi yalnızca karaciğere özgü bir enzim değildir aynı zamanda kalp ve iskelet kasında, plasentada, böbreklerde, eritrositlerde ve pankreasta da mevcuttur. Serumdaki AST düzeyinin hangi organ tarafından yükseltildiğine dair tespit edici bir yöntem henüz mevcut değildir. Genel anlamda yumuşak dokularda bulunduğundan dolayı yükselişi yumuşak doku hasarını düşünmemizi gerektirirse de en çok hepatoselüler rahatsızlıklarda serumdaki seviyesi artar (Turgut, 2000).

Karaciğerin asıl hücresi olan hepatositlerin içindeki AST enziminin %20'si sitoplazmada, %80 'i mitokondride bulunur. AST' deki büyük artış hepatoselüler hastalıklarla beraber görülür. (Coşgun, 2019, Gencer, 2015). Ayrıca B6 vitaminin eksik alınması durumunda bu enzimin görevinde aksamalara neden olur (Bülbül, 2018).

Alanin Aminotransferaz (ALT)

AST sadece karaciğere özgü bir enzim değildir, diğer dokularda da bulunur fakat ALT yalnızca karaciğer hücrelerine ait bir enzim olup, diğer bölgelerde çok düşük miktarlarda bulunabilir. ALT hepatositlerin sitoplazmasında bulunan karaciğere özgü, spesifik bir enzimdir. Hepatositler vücudun en aktif, en çeşitlilik gösteren, en zengin enzimatik özellere sahip hücreleridir ve hepatositler herhangi bir nedenden dolayı yaralanma veya nekroza uğrama gibi bir durumla karşılaşırlarsa serumda ALT miktarı artar (Hayashi ve ark., 1993). Herhangi bir karaciğer hasarında serumda ALT enzimi AST enzimi ile birlikte yükselir ancak AST' de herhangi bir yükselme söz konusu değilken de ALT yükselebilir. Bu durum karaciğer yağlanması ve kronik hepatitin varlığını düşündürebilir (Coşgun, 2019). ALT enzimi de tıpkı AST enziminde olduğu gibi B6 vitamini eksikliğinde aktivitesinde azalma meydana gelir (Jansonius, 1998).

Hücre membranlarında oluşan hasarın şiddetine göre AST ve ALT seruma çıkarlar ve serumdaki değerlerini yükseltirler. Serumda bulunan AST, ALT'den daha hızlı gönderilir, bunun nedeninin ROS hücrelerinin AST'yi yıkılmadığıdır (Coşgun, 2019).

Karaciğerin asıl enzimi yani karaciğere en özgü olan enzim ALT enzimidir ve karaciğer hasarlanmasını düşündüren ana enzimdir, AST ise karaciğer hasralarında yükselmesine rağmen surumda artışı kalp rahatsızlıklarını bize düşündürmelidir (Bülbül, 2018) .

Alanin Fosfotaz (ALP)

ALP, alkali PH'da katalitik aktiviteye sahip olan; proteinler, nükleotitler ve alkaloidler gibi bir çok molekülden fosfat esterlerini hidrolize edebilme yeteneğine sahip bir hidroliz enzimidir, fosfat gruplarının transferinde gereklidir ve ATP defosforilasyonunu katalize etme yönüyle önem teşkil eden bir enzim türüdür (McIntyre, 1992).

Vücuttaki her hücrede bulunabilse de %80'i kemik ve karaciğerde yoğundur. ALP, hepatositlerin sinüsoidal yüzeylerinde ve safra kanallarında lokalizedir ve ALP'nin dışarı atılımı safra kanalı yolu iledir. Karaciğer, safra yolları ve kemik hastalıklarında ALP değeri anlamlı bir şekilde artış gösterir. Karaciğer toksitesi, safra yolları tıkanıklığı, kemik tümörleri ALP yükselmesine sebep olur (Onat, 2002; Aranda-Michel, ve Sherman, 1998; Pratt ve Kaplan, 2000).

Ratlarda Karaciğer Enzimlerinin Düzeylerinin Değiştiği Durumlar

Ratların kullanıldığı çalışmalarda, özellikle karaciğer ve böbrek hasarlarında, yüksek ısı, stres, açlık, toksik maddeler ve ksenobiyotiklerle yapılan toksitelerde, beslenme bozukluklarında AST, ALT ve ALP düzeyleri anlamlı şekilde değişmiş ve bu yapılan çalışmaların hepsi bunu doğrular nitelikte olmuştur (Lacavier ve ark., 1994; Hayashi ve ark., 1993).

AST ve ALP enzimlerinde ortak bir özellik, B6 vitamini kofaktördür. AST karaciğer hasarlarında anlamlı artış gösterse de özellikle kalp kası, böbrek, pankreas, beyin, akciğer, alyuvarlar ve akyuvarlarda da yoğun olarak bulunur fakat ALT' nin en yoğun formu karaciğerdir. Karaciğerin ana hücresi olan hepatositlerde bulunan AST %80 oranda mitokondrilere lokalize haldedir buna karşın ALT non mitokondrialdir. Sağlıklı bir karaciğere sahip serumda bakılana oranla hasarlı karaciğer serumunda AST ve ALT hatırı sayılır derecede yükseklik gösterir (Gencer, 2015).

Karaciğer yağlanmasında, karaciğer tümörlerinde, karaciğer kanserleri ve sirozda AST ve ALP düzeyleri artış göstermeye başlar ve hastalık oranı arttıkça daha ciddi bir hale

gelmeye başladığında mitokondri membranında hasar oluşur ve mitokondrial AST salınımı gerçekleşir. Böylece AST varlığı ALT'nin çok üstüne çıkmaya başlar (Dolar, 2002, Fickert ve Zatloukal, 2000).

Karaciğer toksitelerinde antioksidan seviyelerinin azalması ile dokularda bulunan malondialdehyde (MDA) seviyeleride artar. Karaciğer enzimleri ile bilirübinin arttığı da kaynaklaarda yerini almıştır (King, 2001; Oyagbemi, 2016).

2. AMAÇ

Dünya sağlık örgütünün verilerine göre karaciğer hastalığı sebepli 2,4 milyon insan ölümünün olduğu görülmektedir (Fathy ve ark, 2019). Karaciğer hastalığının önemi karaciğerin topoğrafik olarak vücudun. En büyük iç organlarından biri olması, hem endokrin, hem de ekzokrin. Bir bez olarak metabolik hemostazda önemli bir rol oynamasıdır.

İçerdiği safra kanalları, glikoz, glikoprotein ve globülin gibi proteinler, fibrinojen, albümin ve protrombin gibi sentez maddeleri üretip kana ve vücudun ilgili bölümlerine salgılaması sonucu karaciğer ciddi etkilere sahip olan bir organdır (Altınbaşak, 2019).

Bu bağlamda PIX yapılmış ve CCL4 ile karaciğer hasarı oluşturulmuş rat gruplarından (Kontrol, Sham PINX+mısır yağı, CCL4 (model), PINX, PINX+CCL4, PINX+melatonin, PINX+CCL4+melatonin grup) karaciğer hasarının biyokimyasal, histolojik ve immüno histokimyasal etkilerinin gözlemlenmesi ve güçlü bir antioksidan olan melatoninin eksikliğinin veya takviyesinin karaciğer dokusu üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

3. YÖNTEM

3.1. Çalışma Materyalleri

Çalışmamızda kullanılan mekanik malzemeler: hassas terazi, vortex, manyetik karıştırıcı, soğutmalı santrifüj (Nüve NF 1200R), otomatik pipetler, spektrofotometre (Thermo Fisher Multıskan Go 1510), soğutmalı santrifüj (Nüve NF 1200R), mikroplaka yıkayıcı (Thermo Fisher Wellwash 888, pH metre, mikrosantrifüj (Nüve NF 048), UV/VIS Spektrofotometre, sallayıcılı su banyosu (Nüve ST 30), homejenizatör (Hangzhou Bioprep-24).

Bu çalışma Kocaeli Üniversitesi BAP birimi tarafından TDK-2021-2695 numara ile desteklenmiştir.

3.2. CCI4'ün Hazırlanması

Deneysel karaciğer hasarı ve oksidatik stres oluşturmak amacı ile CCL4 kullanılmıştır (Gnanadessigan ve ark, 2019). Çalışmamızda karaciğer hasarı oluşturmak için 0,5 ml/kg CCL4, 1:1 oranında mısır yağı içinde çözdürülerek 15 gün boyunca gün aşırı verilmiştir (Cosgun, 2019).

3.3. Melatonin (MLT) Çözeltisinin Hazırlanması ve Enjeksiyonu

MLT, enjeksiyonu öncesinde etil alkol içerisinde çözdürülerek uygun konsantrasyona ayrılmıştır. Hazırlanan bu çözelti içerisindeki etil alkolün final konsantrasyonunun %5' den fazla olmamasına dikkat edildi. Sıçanlara çalışmanın birinci gününden itibaren 15 gün boyunca i.p. MLT enjeksiyonu yapılmıştır (Czechowska, 2015; Ballur, 2022).

3.4. Ratların Bakımı

Veri toplamak amacıyla çalışmamızda 250-300 gr ağırlığındaki 56 tane wistar albino türündeki erkek sıçanlar Zonguldak Bülent Ecevit üniversitesi Tıp fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi (ZBEÜN-DEHAM)' nden sağlanmıştır. Çalışmamızı yapmak için gerekli etik kurul onayı (Protokol No: KOÜ HADYEK 2021/07) Kocaeli Üniversitesi Hayvan Araştırmaları Etik Kurulundan alınmıştır. Sıçanlar 7 grup halinde (n:8) ayrılmıştır. Araştırma süresince 21±1 C sabit sıcaklıkta, 12 saat ışığın olduğu, 12 saat ışığın bulunmadığı, otomatik klimatize edilen ortamda sıçanlar muhafaza edilmişlerdir. Deney süresince sıçanlar standart besi yemi ile ad libitum olarak beslenecek ve su olarak çeşme suyu kullanılmıştır. Kafes temizliği gün aşırı yapılmış olup, her gün

suları düzenli olarak değiştirilmişitr. Deneysel prosedürler Hayvan Etik Kurulu Yönergelerine göre uygulanmıştır.

3.5. Rat Deney Protokolü

Araştırmamızın ilk gününden başlayarak gruplarımızda bulunan sıçanlara aşağıda belirttiğimiz aşamalardan geçirilmiştir.

1- Kontrol Grubu: Kontrol grubuna dahil ettiğimiz sıçanlara 15 gün boyunca her gün intraperitoneal (i.p) olarak melatonin çözücüsü (etil alkol % 0.5' ten az olmak kaydıyla) her gün verilmiştir.

2- Sham PİNX + Mısır yağı: Bu gruptaki sıçanlara sham PINX yapılacak (pinealektomi yapılmadan yalnızca kafa derisi kesip dikilmiştir) ve i.p. olarak gün aşırı 0.5 ml/kg mısır yağı verilmiştir.

3-CCl4 Grubu: Bu gruptaki sıçanlara 1:1 oranında CCI4, mısır yağı içerisinde çözdürülerek 15 gün boyunca i.p. olarak gün aşırı verilmiştir (Coşgun ve ark., 2019).

4- Pinealaktomi (PİNX) Grubu: Bu gruptaki sıçanlara PİNX yapılacak ve 15 gün boyunca gün aşırı i.p melatonin çözücüsü (etil alkol %0.5' ten az olmak kaydıyla) verilmiştir.

5- PİNX+CCl4 Grubu: Bu gruptaki sıçanlara PİNX yapılacak ve 1:1 oranında CCI4 mısır yağı içerisinde çözdürülerek 15 gün boyunca i.p. yolla gün aşırı verilmiştir.

6- PİNX + Melatonin Grubu: Bu gruptaki sıçanlara PİNX yapılacak ve 10 mg/kg melatonin, melatonin çözücüsünde (etil alkol % 0.5' ten az olmak kaydıyla) çözdürülerek 15 gün boyunca günlük olarak i.p olarak verilmiştir (Kim ve ark., 1998).

7- PİNX+CCl4+Melatonin Grubu: Bu gruptaki sıçanlara PİNX yapılacak ve 10 mg/kg melatonin, melatonin çözücüsünde çözdürülerek 15 gün boyunca i.p olarak verilecektir. İlave olarak 0.5 ml/kg CCI4 1:1 oranında CCI4 mısır yağı içerisinde çözdürülerek 15 gün boyunca i.p. olarak gün aşırı verilmiştir.

Melatonin uygulamaları 15 gün boyunca günlük devam etmiştir. CCl4 uygulamaları 15 gün boyunca gün aşırı devam etmiştir. 16.gün xylasin/ketamin anestezisi altında kesim yapılarak kan ve karaciğer dokuları alınmıştır.

3.6. Pinealektomi İşlemi

8 mg/kg xylazine ve 80 mg/kg ketamin intraperitoneal olarak uygulanarak, ratlar anestezi altına alınmıştır. Şıçan, sterotaksik çerçeveye sabitlenerek iki gözünün arasından doğru lambda ortaya çıkacak şekilde kafa derisine kesi yapılmıştır. Periost geriye doğru sıyrılarak çalışma için uygun hale getirilmiştir. 3 mm çapında dairesel bir kesi yapmak için kafa derisinin üzerindeki bölüme Proxxon MİCROMOT 50/E, Almanya markalı mikro

freze matkap kullanılarak ve lokalizasyon yeri olan venöz sinüsün alt kısmında bulunan gl.pinealis parçalanmadan tek bir parça halinde yerinden alınmıştır. İşlemler ZEHAM' da yapılmıştır (Ballur, 2022).

3.7. Ratlarda Karaciğer Toksitesi Modeli

Karbon tetraklorür, karaciğer toksitesi oluşturmak için başvurulan yöntmlerin içinde en sık kullanılanıdır (Koçak, 2019). CCI4 karaciğer hasarına neden olması ile deneylerde kullanılan bir madde olup rengi olmayan, şeffaf, uçucu bir sıvıdır. CCI4'ü reaktif toksik bir madde olan triklorometile, karaciğerdeki sitokrom P-450 enzim sistemi dönüştürür. Sonrasında oksijenle beraber triklorometilperoksi meydana gelir. Triklorometilperoksi reaktif toksik bir maddedir ve yağ asitleri ile reaksiyona girmesi sonucunda lipit peroksidasyonu başlatır ya da protein ve yağlara kovalent olarak bağlanması ile hücre zarı hasarlarına yol açar. Bu şekilde karaciğer hasarı meydana gelir. Karaciğer hasarı kuppfer hücrelerinin aktivasyonuna sebep olarak reaktif oksijen türleri gibi (ROS) özelliklede peroksinitritler ve hidrojen peroksitlerin (H2O2) oluşumundan sorumlu süperoksit anyonları gibi erken inflamasyon mediatörlerinin salınmasına neden olur ve böylece oksidatif stres oluşmuş olur (Koçak, 2019).

3.8. Ratlardan Numune Alınması

Deneyin son aşamasında anesteziye alınan sıçanların abdominal veninden kan alınmıştır, tüplere koyulmuş sonrasında şıçanlar öldürülmüştür. Karaciğer dokuları steril olarak alınmıştır ve fazlalık kanın uzaklaştırılmasını sağlamak için serum fizyolojik ile yıkanmıştır. Alınan karaciğer dokusu iki parçaya ayrılmıştır. Bölünen parçaların biri histolojik olarak değerlendirilmek için %10 luk formol içerisine koyulmuştur, diğer parçası ise biyokimyasal analizler için alüminyum folyoya sarılarak, derin dondurucuda -80 Cº saklanarak analiz gününe kadar bekletilmiştir. Alınan kan numuneleri pıhtılaşma olmaması için oda koşullarında 1 saat bekletilip, 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serumlar elde edilmiştir. Elde edilen serumlar tüplere alınarak analiz gününe kadar, karaciğer fonksiyon testleri için -80 ºC' de derin dondurucuda saklanmıştır (Ballur, 2022).

3.9. Biyokimyasal Analizler

3.9.1. Numunelerin Hazırlanma Aşamaları

Çalışma günü geldiğinde karaciğer dokuları derin dondurucudan çıkarılmış ve indirgenmiş glutatyon (GSH), malondialdehit (MDA), katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) analizi yapılarak toplam antioksidan seviyesi, oksidatif stres indeksi (OSI), toplam oksidan seviyesi (TOS) ve protein seviyelerini belirlemek için tartılmıştır. Dokulara %10'luk homojenatlar halini alması için fosfat tampon (pH:7,5) katılmıştır.

Homojenizasyon 3 dakika boyunca 10.000 rpm'de otomatik homojenizatör (Hangzhou Bioprep-24) aracılığı ile yapılmıştır. Bu homojenatlardan karaciğer dokusunda bulunan MDA seviyeleri değerlendirilmiş ve sonrasında süpernatant elde etmek amacıyla oluşturulan homojenatlar +4 ºC' de 30 dakika boyunca 5000 rpm' de santrifüj işlemine sokulmuştur. Oluşan süpernatantlar CAT, SOD, GSH, TAS, TOS, OSI ve protein seviyelerini tespit etmek üzere kullanılmıştır. Çalışma gününde derin donrucuda muhafaza ettiğimiz kan serum örnekleri dışarı çıkarılmış ve oda ısısına geldikten sonra, uygun kitler kullanılarak AST, ALT ve ALP seviyeleri belirlenmiştir (Ballur, 2022).

3.9.2. Oksidatif Stres Parametrelerin Değerlendirme Aşamaları

Serum Malondialdehit (MDA) Seviyesinin Ölçümü

Oluşturulan homojenatın MDA seviyesini belirlemek amacıyla Ohkawa ve arkadaşlarının izlediği kurallar baz alınmıştır. Oluşturulan homojenatlar %1'lik fosforik asit (H3PO4) ve %6'lık tiyobarbitürik asitle karıştırılarak kapaklı cam tüp içerisinde konulmuştur. İnkübasyon işlemi, alüminyum folyo ile kapatılan tüpler kaynar su banyosunda 45 dakika tutularak yapılmıştır ve sonrasında n-bütanol ile ekstrakte edilen karışım santrifüj işlemi ile çalışmadaki deney gruplarına göre mikroplakalardaki kuyucuklara yerleştirilmiştir. Dalga boyu olarak 535 nm seçilerek ELİSA okuyucularda MDA seviyesi ölçümü yapılmıştır. Kör olarak n-butanol ve standart bir şekilde tetrametoksipropan kullanılmış olup ve çıkan sonuçlar nmol/g şeklide kaydedilmiştir (Ohkawa, 1979, Ballur, 2022).

Karaciğer Dokusunun Redükte-Glutatyon (GSH) Seviyesinin Analizi

Ellman'ın (1959) izlediği yol kullanılarak, oluşturduğumuz süpernatlardaki GSH seviyesine bakılmış ve süpernatantlar deproteineze edilmiştir. Deproteinize ettiğimiz süpernatantlar 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoik asit aracılığıyla tepkimeye girmesi sağlanarak sarı-yeşilimsi bir renk oluşturmak için inklübasyona koyulmuş ve renk oluştuğunda mikroplakların kuyucuklarına çalışmaamızda yer alan araştırma gruplarına dikkat edilerek yerleştirilmiştir. 410 nm dalga boyunda seçilen ELİSA tespit edicilerde GSH düzeyini belirlemek için ölçüm yapılmıştır. 5mM/L'lik distile su kör şekliyle, GSH çözeltisinden düzenlenen değişik dilüsyonlar kullanılmıştır. Ölçüm sonrası elde edilen GSH sonuçları nanomol/g yaş doku şeklinde kaydedilmiştir (Ballur, 2022).

Karaciğer Dokusunun Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesi Seviyesinin Ölçümü

Sun (1988)' un izlediği yol baz alınarak oluşturduğumuz süpernatın SOD aktivitesi ölçümü yapılmıştır. Ksantin-ksantin oksidaz reaksiyonu kullanılarak uyguladığımız

metotla süperoksit radikalleri deney ortamında oluşturulmuştur. NBT'yi (nitro blue tetrazolium) indirgeyen radikaller ile mavi olan formazan oluşur ve bu formazon çalışmadaki araştırma gruplarına göre ayrılarak, yerleştirildiği mikroplaka kuyucuklarında 560 nm dalga boyu seçilen ELİSA okuyucuda SOD aktivitesi değerlendirilmiştir. SOD aktivitesi sonuçları U/g olarak kaydedilmiştir (Ballur, 2022).

Karaciğer Dokusunun Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesi Seviyesinin Ölçümü

Aebi (1992)' nin izlediği yöntem baz alınarak CAT enzim aktivite ölçümü oluşturduğumuz süpernatantlar üzerinde yapılmıştır. Hidrojen peroksit (H2O2) ihtiva eden fosfat tamponu ile süpernatant ile harmanlanmış ve CAT durumu, H2O2'yi H2O ve O2'e ayrışması 240 nm'de absorbans azalması ile oluşmuştur. Absorbanstaki görünen bu eksilme 1 dakika süresince izlenerek CAT durumu gözlemlenmiştir. CAT'ın izlenen aktivite sonuçları K/g protein şeklinde kaydedilmiştir (Burnie, 1992; Ballur, 2022).

Karaciğer Dokusunun Protein Seviyesinin Ölçümü

Lowry (1951)' nin izlediği yöntem baz alınarak protein seviyeleri tespit edilmiştir. Mavi renkli ürün 540nm dalga boyu seçilen ELİSA okuyucuda kör olmak kaydıyla ölçüm yapılarak protein içeriği kaydedilmiştir (Lowry, 1951).

Karaciğer Dokusunun Total Oksidan Seviyesinin (TOS) Seviyesinin Ölçümü

TOS seviyesi Erel'in (2005) yöntemine bağlı kalınarak çalışılmıştır. Total Oksidant Status kit (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep Turkey) uygulanarak, TOS seviyeleri karaciğer süpernatantında çalışılmıştır. ELİSA okuyucuda 530 nm dalga boyunda TOS seviyelerinin ölçülmüştür. H2O2 solusyonu 20 µmol/L'lik standart şekliyle katılmıştır. Ortaya çıkan TOS seviyesi verileri µmol H2O2 equiv /L şekliyle kaydedilmiştir (Erel, 2005).

Karaciğer Dokusunun Total Antioksidan (TAS) Seviyesinin Ölçümü

Erel'in (2004) belirlediği şekliyle TAS düzeyleri çalışılmıştır. Total antioksidan Seviye kiti (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep Turkey) kullanılarak, TAS seviyeleri karaciğer süpernatantında çalışılmıştır. Antioksidan moleküllerin renksizleşmesine dayanarak ölçümler yapılmıştır. Mikroplakalara yerleştirilen süpernataantlara reaktif 1 katılmıştır. Ardından 660 nm'de belirlenen şekliyle birinci okuma ve daha sonra reaktif 2 katılarak bir okuma işlemi daha yapılmıştır. Okunup belirlenen iki değer arasındaki fark tespit edilerek TAS seviyeleri hesaplanmıştır. Troloks, E vitamininin suda çözünebilen bir emsalidir ve işleme kalibratör olarak dahil edilmiştir. TAS seviyesi sonuçları mmol Trolox Equiv/L şekliyle kaydedilmiştir (Erel 2004, Ballur, 2022).

Karaciğer Dokusu Oksidatif Stres İndeksinin (OSI) Ölçümü

Erel'in (2004) metoduna göre karaciğer dokusundaki OSI düzeyleri incelenmiştir. TOS'un TAS'a bölünmesi ile OSI değeri belirlenmiştir. OSI (Arbitrary Unit) = TOS (μmol H2O2 eqv/1)/[(TAS (mmol Trolox eqv/l)x10]. Elde edilen sonuçlar Arbitrary Unit (AU) olarak belirtilmiştir (Erel, 2004; Ballur, 2022).

3.9.3. Karaciğer Fonksiyon Testlerinin Ölçümü

Analiz kitleri (Abbott, Abbott Park. Illinois, ABD) ve otoanalizör (Architect C8000) uygulamaları ile AST, ALT ve ALP düzeyleri kolorimetrik yöntemle belirlenmiştir. Çıkan sonuçlar mg/dl şekliyle kaydedilmiştir.

3.10. Melatonin Seviyelerinin Ölçümü

Bioassay Technology Laboratory'den (BT LAB, CHINA) satın alınan Rat Melatonin ELISA kiti (Cat.No: E0601Ra) ile serum melatonin seviyeleri ölçülmüştür. Sonuçlar ng/L olarak kaydedildi (Al Gburi, 2022).

3.11.Histopatolojik Analiz

Ketamin/ksilazin anestezi altında deney sonunda ratlar sakrifiye edilmiştir. Çıkardığımız karaciğer dokusunun fikse edilmesi amacıyla %10 içeriğinde nötral bir şekilde tamponlanan formaline (NTF) koyulmuştur. Bir gün sonrasında karaciğer dokuları 3-4 mm'lik bölümlere ayrılmış ve sonrasında takip kasetlerine yerleştirilerek NTF'de 24 saat boyunca fiksasyon işlemi yapılmıştır. Fiksasyon işlemi tamamlanınca bölümlediğimiz parçalar 24 saat süresince çeşme suyu altında banyo yaptırılmıştır. İşlediğimiz dokuların trimleri yapıldıktan sonra %70, %80, %95 ve %96'lık artan alkol serilerinden 2x45 dakika süresince geçirilmiştir. 2x30 dakika boyunca ksilol ile şeffaflama işlemi yapılmıştır. Sonrasında parafin varlığı içinde 2x30 dakika muhafaza edilmiştir. İşlediğimiz dokuları takip etmek için Leica TP 1020 aleti kullanılmıştır. Gömme işlemi yapıldıktan sonra bloklar soğuması için bırakılmıştır. Parafin bloklardan Leica FINESSE ME+ (Leica, GER) mikrotomu ile5 μm'lik kesitler ışık mikroskopik ve immunohistokimyasal yöntemler için jelatin kaplı lamlara alınmıştır. Hazırlamış olduğumuz lamlar, dokunun lama yapışabilmesini artırmak amacıyla 37°C'lik etüvde 2 saat boyunca durdurulmuştur. Genel histolojik yapıyı izleyebilmek için kesitlere boyama metodu olarak Hematoksilen-Eozin uygulanmıştır. Karaciğerdeki zararlı etkenler, histopatolojik farklılıkların derecesi ve sık görülme özelliğine göre semikantitatif olacak şekilde saptanmıştır. Kesitler konjesyon, sinüzoidal dilatasyonve inflamatuvar hücre infiltrasyonu bakımından 10 değişik bağlamda igözlemlenmiştir. İncelemede belirlenen hasarın oranına göre; 0 (değişiklik yok), 1 (hafif), 2 [61] ve 3 (ağır) olarak tespit edilmiştir. NikonEclipse 80i ışık mikroskobu ve Nikon görüntü analiz sistemi skorlama işlemi ve fotoğraf çekimi için kullanılan cihazlardır (Al Gburi, 2022; Ballur, 2022).

3.12. İmmünohistokimyasal Analiz

Deparafinizasyon işlemi için kesitler sırayla 60°C etüvde ve 60°C sıcaklıktaki ksilol bünyesinde 1 saat muhafaza edilmiştir. Daha sonra anti-GLUT-1 antikoruyla IHC boyama protokolü yapıldı. Entallen ile kapatılan preperatlar NikonEclipse80idigital kamera takılı ışık mikroskobu yardımıyla fotoğraflanmıştır.

IHC değerlendirme: Çalışmamıza dahil edilen her grup için, en az 100 hücre X20 büyütme alanında belirlenmiştir. Boyanma derecesi ve boyanan hücrelerin yüzdesinin baz alındığı kesitlerde semikantitatif metotla skorlama işlemi gerçekleştirildi ve sonuç olarak boyanma seviyeleri: 0 (boyanma yok), 1(zayıf boyanma), 2 (orta boyanma), 3 (güçlü boyanma) olarak değerlendirmeye alınmıştır.

İmmünohistokimyasal boyanma skorlaması her kesit için, H-Skoru diye adlandırılan ve (I x PC), (I: boyanmanın derecesi, PC: her derecede boyanan hücrelerin yüzdesi) yöntemi ile değerlendirilen bir skorlama işlemleyici suretiyle gerçekleştirilmiştir.

3.12. İstatistiksel Analiz

Grup karşılaştırılması için örneklem büyüklüğü belirlenirken G-Power 3.1.9.4 ücretsiz programı kullanılarak örneklem büyüklüğü belirlenmeye çalışılmıştır. Burada etki büyüklüğü, güç(¯B) ve 1. Tip hata. (alfa) değerleri belirlenirken literatürde yapılan benzer çalışmalar dikkate alınarak belirlenmişir (Demiralp, 2021). Grup sayısını 7 olan çalışmamızda toplam örneklem büyüklüğü 35 olarak belirlenmiştir. Çalışmanın gücünü artırmak için toplam örneklem büyüklüğü 56 olarak ele alınmıştır.

Çalışmamızdaki istatistiksel analizler IBM SPSS (IBM SPSS for Windows version 14.0) programı kullanılarak yapılmıştır. Ortaya çıkan tüm sonuçlar aritmetik ortalama ± standart hata (SE) olarak kaydedilmiştir. Çalışmaya dahil edilen gruplardaki ölçümü yapılabilen farklılıkları ShapiroWilk normallik testine uygun olarak normal dağılım göstermediği saptanmıştır ($p>0.05$). Bundan dolayı istatistiksel analiz yöntemi olarak parametrik olmayan testler arasında yer alan Kruskal Wallis varyans analizi tüm değişkenler açısından çalışmaya dahil edilen tüm grupların genel karşılaştırılmasında işleme dahil edilmiş, grupların aralarında ikili bir şekilde kıyası yapılırken ise Mann-Whitney*U* testi tercih edilmiştir. $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. BİYOKİMYA SONUÇLAR

4.1.1. Karaciğer Oksidatif Stres Parametrelerinin Düzeyi

Ratların pinealektomi sonrası CCl_4'e maruz kalmaları ile karaciğerde deneysel fibrozis modeli oluşturulmuş ve melatonin tedavisi yapılarak dokudaki toparlanma düzeyini belirlemek için deney sonunda hayvanlardan alınan karaciğer dokusunda oksidatif stres düzeyini saptayabilmek için MDA, GSH, TAS, TOS ve OSİ seviyeleri ile SOD ve CAT aktivite düzeyleri ölçülmüştür.

4.1.1.1. Karaciğer Dokusu MDA ve GSH Düzeyleri

Kontrol ve Sham için ayrılan sıçanların karaciğer MDA ve GSH düzeylerinde herhangi bir fark olmamasına rağmen hayvanlara pinealektomi yapılması melatonin yoksunluğu oluşturduğundan dolayı PINX grubunda MDA düzeylerinin kontrol ve Sham gruplarına göre ciddi artışa ($p< 0.001$) (Şekil 1), GSH düzeylerinde ise kontrol ($p< 0.01$) ve Sham ($p< 0.05$) gruplarına göre anlamlı düşüşler gözlenmesine neden olmuştur (Şekil 2). Öte yandan ratlara deney süresince CCl_4 uygulanması ise Kontrol, Sham ve PINX gruplarına kıyasla karaciğer MDA seviyelerinde dramatik artışlara ($p< 0.001$) sebep olurken GSH seviyelerinde ise ciddi düşüşlere ($p< 0.001$) sebep olmuştur. İlave olarak pinealektomi sonrası CCl_4 uygulanması (PINX+CCl_4) hayvanların karaciğer MDA ve GSH düzeylerinde hemen hemen aynı etkiyi ortaya koyduğu gözlenmiştir. Ancak pinealektomi ve CCl_4 ile birlikte melatonin tedavisi yapılması (PINX+CCl_4+MEL) karaciğer MDA düzeylerinde CCl4 ve PINX+CCl4 gruplarına kıyasla anlamlı düşüşlere ($p< 0.001$), GSH düzeylerinde ise ciddi toparlanmalara ($p< 0.001$) sebep olmuştur. Hayvanların karaciğer MDA ve GSH düzeyleri Tablo 1'de sunulmuştur.

Tablo.4.1. Ortalama karaciğer doku MDA ve GSH düzeyleri (nmol/g yaş doku).

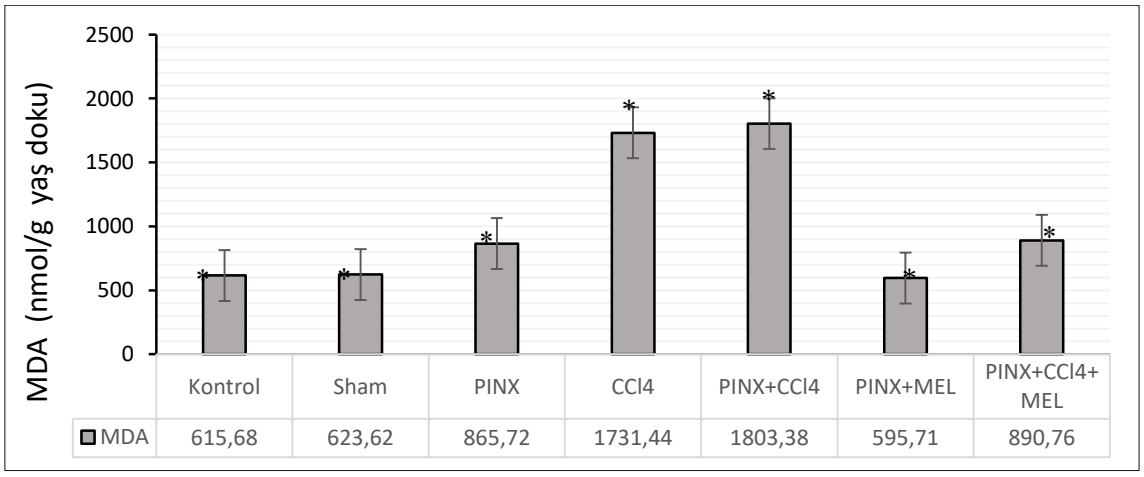
GRUPLAR	**MDA (nmol/g yaş doku)**	**GSH (nmol/g yaş doku)**
Grup 1: Kontrol	615.68±18.77	2849.48±184.40
Grup 2: Sham	623.62±24.56	2684.66±71.04
Grup 3: PINX	865.72±51.34[a,b]	2113.93±167.31[g,h]
Grup 4: CCl_4	1731.44±102.69[a,b,c]	1056.96±83.65[a,b,c]
Grup 5: PINX+CCl_4	1803.38±106.63[a,b,c]	851.96±46.51[a,b,c]
Grup 6: PINX+Melatonin	595.71±13.40[c,d,e]	2647.42±115.17[d,e]
Grup 7: PINX+CCl_4+Melatonin	890.76±57.21[a,b,d,e,f]	1333.23±61.11[a,b,c,e,f]

Bulgular aritmetik ortalama±standart hata olarak gösterildi (n=8).

[a] p< 0.001 - grup 1 [b] p< 0.001 - grup 2 [c] p< 0.001 - grup 3 [d] p< 0.001 - grup 4

[e] p< 0.001- grup 5 [f] p< 0.001 - grup 6 [g] p< 0.01 - grup 1 [h] p< 0.05 - grup 2

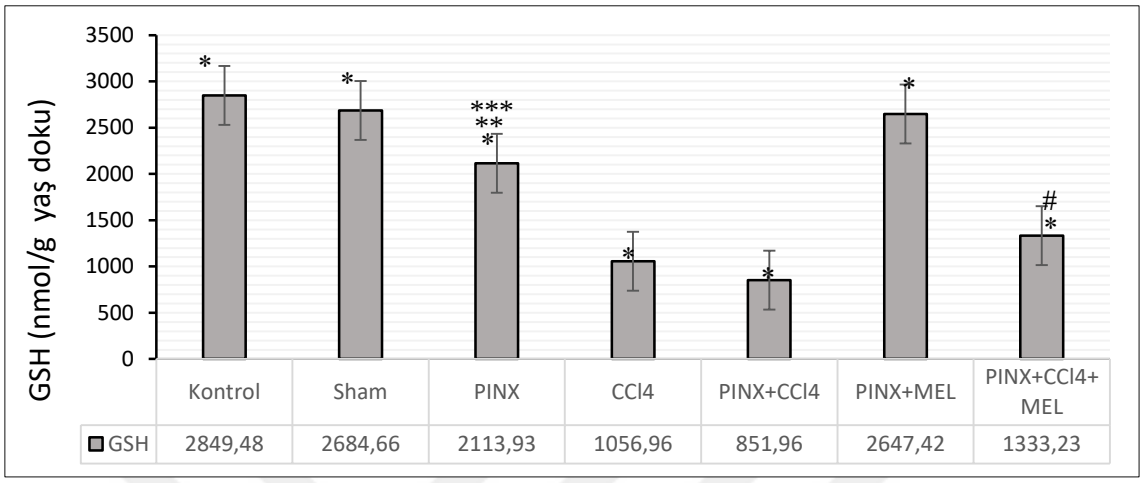
Şekil.4.1. Ortalama karaciğer doku MDA (nmol/g yaş doku).



Bulgular aritmetik ortalama±standart hata olarak gösterildi (n=8).

[*] p< 0.001 Grup 1 - grup 3,4,5,7. Grup 2 - grup 3,4,5,6,7. Grup 3 - grup 4,5,6. Grup 4 - grup 6,7. Grup 7 - grup 5, 6.

Şekil.4.2. Ortalama karaciğer doku GSH (nmol/g yaş doku).



Bulgular aritmetik ortalama±standart hata olarak gösterildi (n=8).

* p< 0.001 Grup 1 - grup 4,5,7. Grup 2 - grup 4,5,7. Grup 3 -grup 4,5.
Grup 4 - grup 6. Grup 5 - grup 6,7. Grup 6- grup 7.

** p< 0.01 Grup 1 -grup 3.

*** p< 0.05 Grup 3- grup 2,6

# p< 0.001 Grup 3 - grup 7.

4.1.1.2. Karaciğer Dokusu Antioksidan Enzim Aktivite Düzeyleri

Kontrol ve Sham için ayrılan sıçanların karaciğer SOD ve CAT aktivitelerinde herhangi bir değişiklik olmaz iken ratların pineal bezlerinin çıkarılması (PINX), Kontrol ve Sham gruplarına kıyasla karaciğer dokusu antioksidan enzimlerinden CAT (Şekil 3) ve SOD (Şekil 4) ve aktivitelerinde ciddi aktivite kaybına ($p<0.001$) neden olmuştur. Diğer yandan ratlara deney boyunca CCl_4 verilerek deneysel karaciğer hasarı oluşturulması SOD ve CAT aktivitelerinde kontrol sıçanlarına (Kontrol ve Sham) ve PINX grubuna göre ciddi düşüşler ($p<0.001$) görülmesine sebep olmuştur. İlave olarak, pinealektomi sonrası CCl_4 uygulanması aynı gruplara kıyasla benzer etkilerin gözlenmesine neden olmuştur. Bununla birlikte pinealektomili ve CCl_4 uygulanan sıçanların melatonin ile tedavi edilmesi (PINX+CCl_4+MEL), tedavi edilmeyen gruba (PINX+ CCl_4) kıyasla antioksidan enzimlerden SOD ($p<0.005$) ve CAT ($p<0.001$) aktivitelerinde ciddi iyileşmeler oluşturmuştur. Karaciğer dokusu antioksidan enzim aktiviteleri Tablo 2'de sunulmuştur.

Tablo.4.2. Ortalama karaciğer doku SOD ve CAT aktiviteleri.

GRUPLAR	SOD (U/g protein)	CAT (K/g protein)
Grup 1: Kontrol	42.01±2.17	51.71±1.23
Grup 2: Sham	38.49±3.19	52.76±1.30
Grup 3: PINX	24.61±1.19^{a,b}	32.86±1.72^{a,b}
Grup 4: CCl_4	15.33±2.75^{a,b,d}	16.40±2.33^{a,b,e}
Grup 5: PINX+CCl_4	13.22±0.76^{a,b,e}	9.02±0.95^{a,b,e,n}
Grup 6: PINX+Melatonin	38.17±2.28^{e,f,h}	45.44±1.50^{m,c,e,f,h}
Grup 7: PINX+CCl_4+Melatonin	26.51±2.00^{a,c,g,h,k}	30.29±1.00^{a,b,f,h,p}

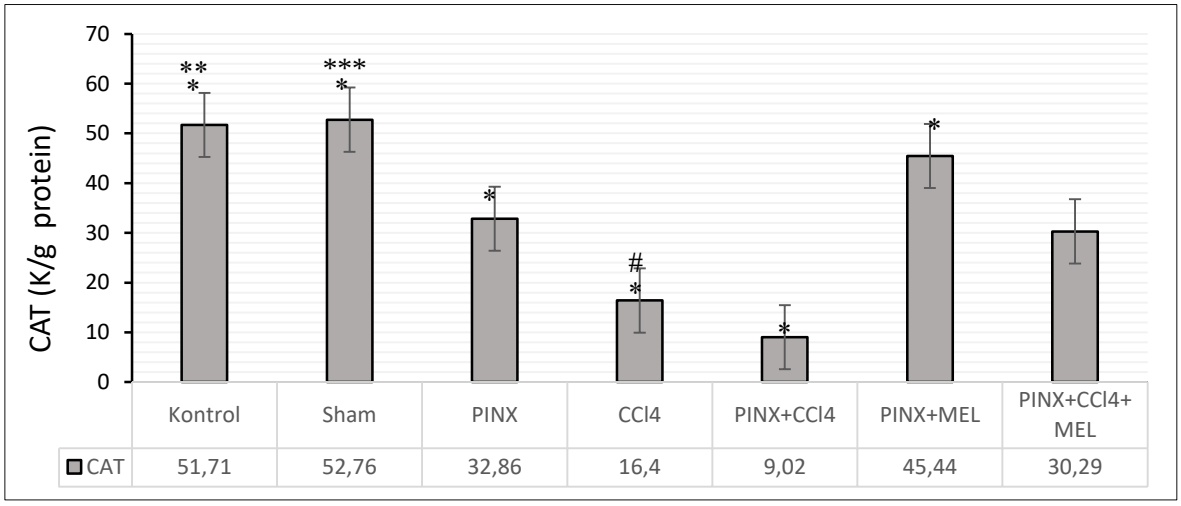
Bulgular aritmetik ortalama±standart hata olarak gösterildi (n=8).

^{a} p< 0.001 -grup 1 ^{b} p< 0.001- grup 2 ^{c} p< 0.005 - grup 2 ^{d} p< 0.005 - grup 3

^{e} p< 0.001 - grup 3 ^{f} p< 0.001 - grup 4 ^{g} p< 0.005 - grup 4 ^{h} p< 0.001- grup 5

^{k} p< 0.005 - grup 6 ^{m} p< 0.01 - grup 1 ^{n} p< 0.05 - grup 4 ^{p} p< 0.001 - grup 6

Şekil.4.3. Ortalama karaciğer doku CAT değerleri (K/g protein).



Bulgular aritmetik ortalama±standart hata olarak gösterildi (n=8).

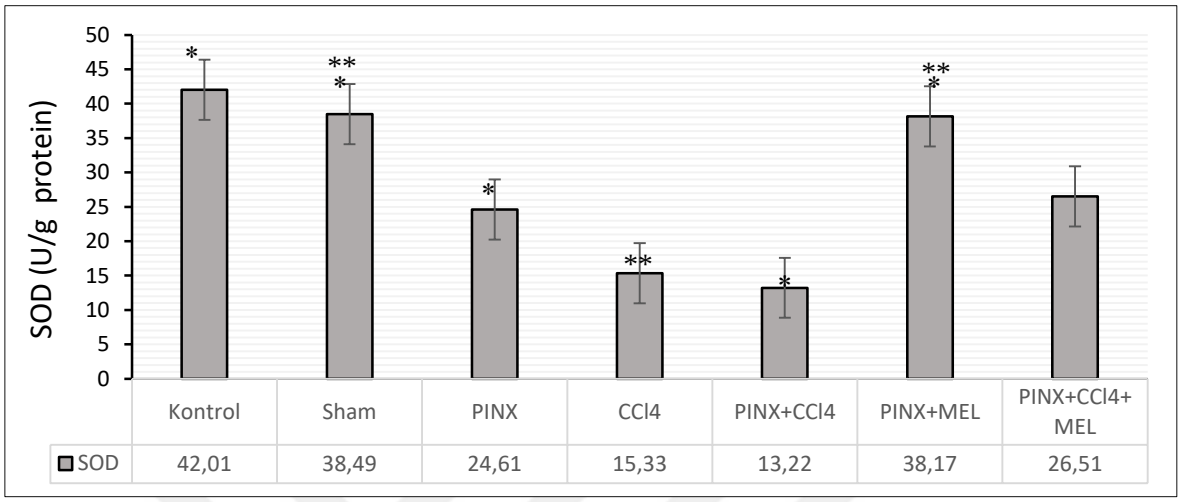
* p< 0.001 Grup 1 - grup 3,4,5,7. Grup 2 - grup 3,4,5,7. Grup 3 - grup 4,5,6.
Grup 4 - grup 6,7. Grup 5 - grup 6,7. Grup 6 - grup 7.

** p< 0.01 Grup 1 - grup 6.

*** p< 0.005 Grup 2 - grup 6.

[#] p< 0.05 Grup 4 - grup 5.

Şekil.4.4. Ortalama karaciğer doku SOD değerleri (U/g protein).



Bulgular aritmetik ortalama±standart hata olarak gösterildi (n=8).

[*] p< 0.001 Grup 1 - grup 3,4,5,7. Grup 2 - grup 3,4,5. Grup 3 - grup 5,6. Grup 6 - grup 4,5. Grup 5 - grup 7.

[**] p< 0.005 Grup 2 - grup 7 Grup 4 -grup 3,7. Grup 6 -grup 7.

4.1.1.3. Karaciğer dokusu Oksidan/Antioksidan Düzeyleri

Ratların pinealektomi altına alınması (PINX), Kontrol ve Sham için ayrılan sıçanlara kıyasla karaciğer dokusu oksidan/antioksidan dengesini bozarak TAS (p< 0.001) (Şekil 5), TOS (p< 0.05) (Şekil 6) ve OSİ (p< 0.001) (Şekil 7) düzeylerinin değişmesine neden olmuştur. Diğer yandan hayvanlara CCl_4 uygulanması ile oluşan karaciğer hasarıyla doğru orantılı olarak doku TAS, TOS ve OSİ değerlerinde dramatik değişiklikler (p< 0.001) dikkat çekmiştir. İlave olarak pinealektomi sonrası CCl_4 uygulanması (PINX+CCl_4) pinelektomi yapılmadan CCl_4 verilmesine kıyasla (CCl_4) TAS (p< 0.005), TOS (p< 0.01) ve OSİ (p< 0.001) değerlerinin değişmesine neden olmuştur. Ancak pinealektomili ve CCl_4 uygulanan sıçanların melatonin ile tedavi edilmesi (PINX+CCl_4+MEL), tedavi edilmeyen gruba (PINX+ CCl_4) kıyasla doku TAS, TOS ve OSİ düzeylerinde ciddi iyileşme (p< 0.001) oluşmasına neden olmuştur. Karaciğer dokusuna ait TAS, TOS ve OSİ düzeyleri Tablo 3'te sunulmuştur.

Tablo.4.3. Ortalama karaciğer TAS, TOS ve OSI düzeyleri.

GRUPLAR	TAS (nmol Trolox Equiv/L)	TOS (µmol H_2O_2 Equiv/L)	OSI (Arbitrary Unit)
Grup 1: Kontrol	1.84±0.03	18.11±0.64	990.01±49.61
Grup 2: Sham	1.61±0.02[a]	19.66±0.72	1224.20±51.77[m]
Grup 3: PINX	1.22±0.02[a,b]	20.36±0.73[m]	1666.74±77.50[a,b]
Grup 4: CCl_4	0.52±0.03[a,b,d]	35.06±2.31[a,b,d]	6792.00±377.46[a,b,d]
Grup 5: PINX+CCl_4	0.38±0.02[a,b,d,e]	45.73±1.58[a,b,d,p]	12028.65±697.26[a,d,f]
Grup 6: PINX+Melatonin	1.79±0.03[c,d,f,g]	18.61±1.24[f,g]	1040.91±74.16[d,f,g]
Grup 7: PINX+CCl_4+Melatonin	1.10±0.01[a,b,d,f,g,h]	30.55±2.00[b,n,g,h]	2744.77±156.52[a,b,d,f,g,h]

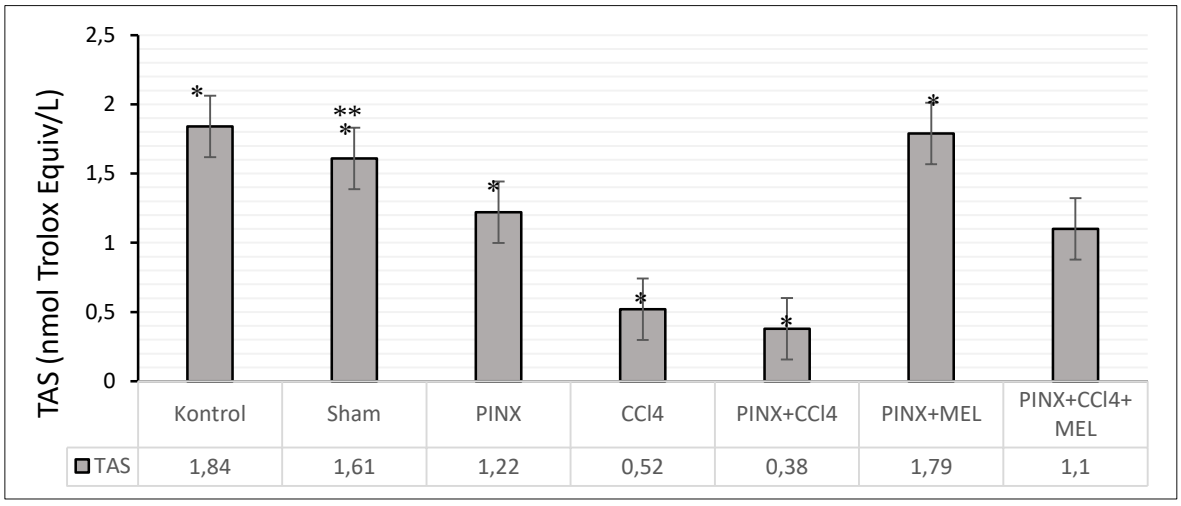
Bulgular aritmetik ortalama±standart hata olarak gösterildi (n=8).

[a] p< 0.001 - grup 1 [b] p< 0.001 - grup 2 [c] p< 0.005 - grup 2 [d] p< 0.001 -grup 3

[e] p< 0.005 - grup 4 [f] p< 0.001 - grup 4 [g] p< 0.001 -grup 5 [h] p< 0.001 -grup 6

[m] p< 0.05 - grup 1 [n] p< 0.001 - grup 3 [p] p< 0.01 - grup 4

Şekil.4.5. Ortalama karaciğer TAS değerleri (nmol Trolox Equiv/L).



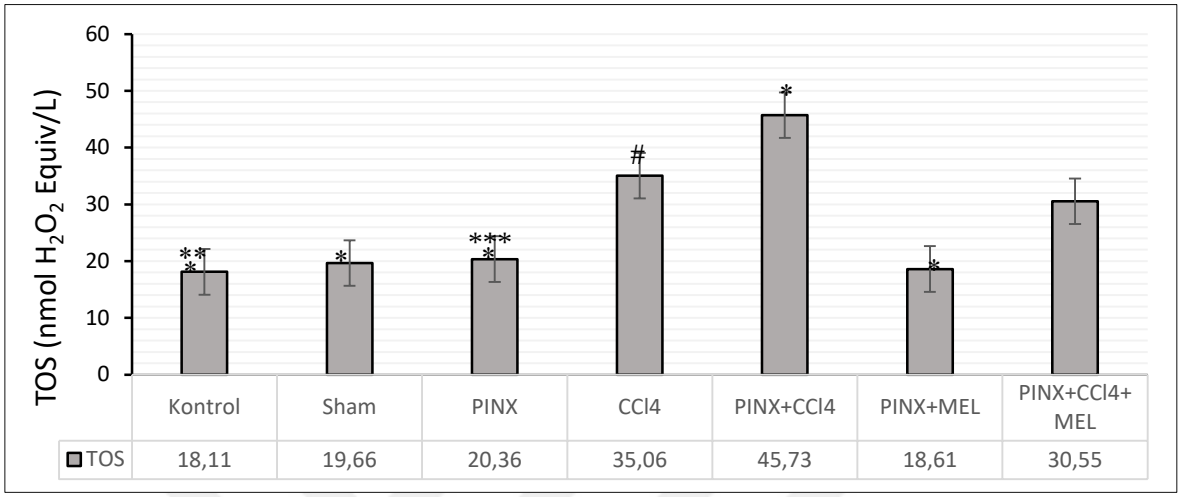
Bulgular aritmetik ortalama±standart hata olarak gösterildi (n=8).

[*] p< 0.001 Grup 1 - grup 2,3,4,5,7. Grup 2 - grup 3,4,5,7. Grup 3 - grup 4,5,6,7.

Grup 4 - grup 6,7. Grup 5 - grup 6,7. Grup 6- grup 7.

** p< 0.005 Grup 2 -grup 6.

Şekil.4.6. Ortalama karaciğer TOS değerleri (nmol H_2O_2 Equiv/L).



Bulgular aritmetik ortalama±standart hata olarak gösterildi (n=8).

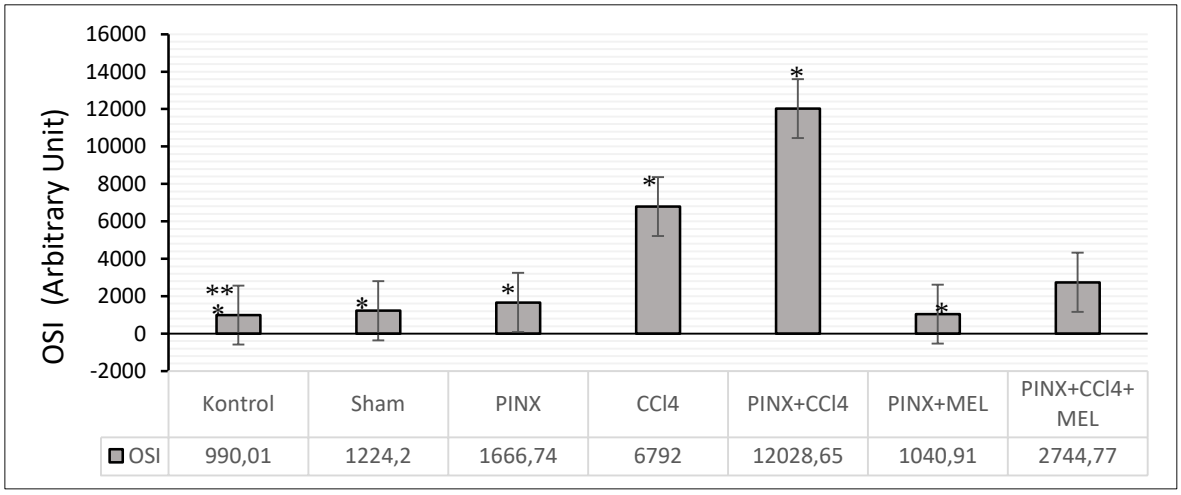
* p< 0.001 Grup 1 - grup 4,5. Grup 2 - grup 4,5,7. Grup 3 - grup 4,5. Grup 6 -grup 4,5,7. Grup 5 - grup 7.

** p< 0.05 Grup 1 - grup 3.

*** p< 0.005 Grup 3 -grup 7.

# p< 0.01 Grup 4 - grup 5.

Şekil.4.7. Ortalama karaciğer OSI değerleri (Arbitrary Unit).



Bulgular aritmetik ortalama±standart hata olarak gösterildi (n=8).

* p< 0.001 Grup 1 - grup 3,4,5,7. Grup 2 - grup 3,4,5,7. Grup 3 -grup 4,5,6.
Grup 4 - grup 5,6,7 Grup 5 - grup 6,7. Grup 6 - grup 7.

** p< 0.01 Grup 1 - grup 2.

4.1.1.4. Serum Karaciğer Fonksiyon Testlerinin Düzeyleri

Kontrol, Sham ve PINX için ayrılan sıçanların serum ALT (Şekil 8) ve AST (Şekil 9) düzeyleri arasında herhangi bir farklılık gözlenmez iken, PINX grubunun ALP (Şekil 10) seviyeleri Kontrol grubuna kıyasla artış (p< 0.001) gözlenmiştir. Diğer yandan sıçanlara deney süresince CCl_4 uygulanması karaciğer hasarına neden olmasıyla serum ALT, AST ve ALP düzeylerinde Kontrol, Sham ve PINX grublarına göre dramatik artışlar (p< 0.001) ortaya çıkarmıştır. Sıçanlara pinealektomi sonrası CCl_4 uygulanması (PINX+CCl_4) kontrol grublarına (Kontrol ve Sham) kıyasla yalnız CCl_4 uygulanmasındaki benzer etkiyi oluşturmuştur. Ancak pinealektomi sonrası CCl_4 uygulanması (PINX+CCl_4), sadece CCl4 verilen gruba kıyasla serum ALT ve ALP düzeylerinde anlamlı artış (p< 0.05), AST düzeylerinde ise anlamlı olmayan bir artış ortaya koymuştur. İlave olarak pinealektomili ve CCl_4 uygulanan sıçanların melatonin ile tedavi edilmesi (PINX+CCl_4+MEL), tedavi edilmeyen gruba (PINX+ CCl_4) kıyasla serum ALT (p< 0.005), AST (p< 0.05) ve ALP (p< 0.001) düzeylerinde melatoninin karaciğer hasarını azaltmasına bağlı olarak ciddi iyileşmeler ortaya koymuştur. Serum ALT, AST ve ALP düzeyleri Tablo 4'te sunulmuştur.

Tablo.4.4. Ortalama serum ALT, AST ve ALP düzeyleri.

GRUPLAR	ALT	AST	ALP
Grup 1: Kontrol	54.37±2.56	139.00±10.63	115.25±6.27
Grup 2: Sham	54.87±2.27	137.87±11.00	149.87±11.07^{h}
Grup 3: PINX	55.75±2.99	140.12±8.53	184.75±11.32^{a}
Grup 4: CCl_4	298.50±59.93^{a,b,c}	382.37±56.12^{a,b,c}	295.87±20.71^{a,b,c}
Grup 5: PINX+CCl_4	453.12±63.60^{a,b,c,d}	502.50±96.64^{a,b,c}	473.25±70.84^{a,b,c,d}
Grup 6: PINX+Melatonin	48.62±1.84^{e,f}	106.25±5.09^{e,f,h,m}	143.00±10.50^{h,e,f,m}
Grup 7: PINX+CCl_4+Melatonin	222.00±29.72^{a,b,c,g,r}	261.25±39.47^{h,k,m,p,s}	145.25±13.87^{e,f,m}

Bulgular aritmetik ortalama±standart hata olarak gösterildi (n=8).

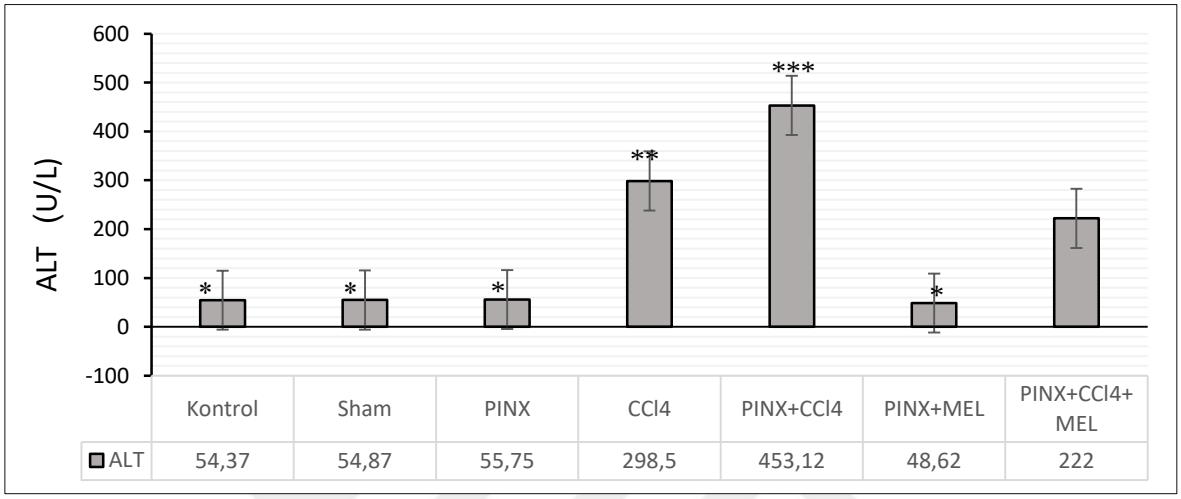
^{a} p< 0.001 - grup 1 ^{b} p< 0.001 - grup 2 ^{c} p< 0.001 - grup3 ^{d} p< 0.05 - grup 4

^{e} p< 0.001 - grup 4 ^{f} p< 0.001-s grup 5 ^{g} p< 0.005 - grup 5 ^{h} p< 0.05 - grup 1

^{k} p< 0.01 - grup 2 ^{m} p< 0.01 - grup 3 ^{p} p< 0.05 - grup 5 ^{r} p< 0.001 - grup 6

^{s} p< 0.005 - grup 6

Şekil.4.8. Ortalama serum ALT düzeyleri.



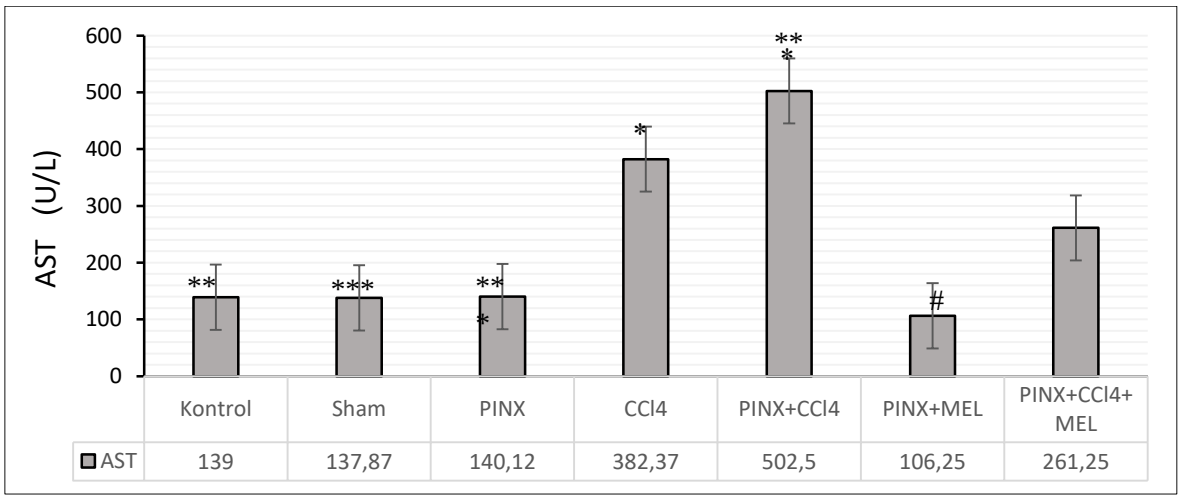
Bulgular aritmetik ortalama±standart hata olarak gösterildi (n=8).

* p< 0.001 Grup 1 - grup 4,5,7. Grup 2 - grup 4,5,7. Grup 3 - grup 4,5,7.
Grup 6 - grup 4,5,7.

** p< 0.05 Grup 4 - grup 5.

*** p< 0.005 Grup 5 - grup 7.

Şekil.4.9. Ortalama serum AST düzeyleri.



Bulgular aritmetik ortalama±standart hata olarak gösterildi (n=8).

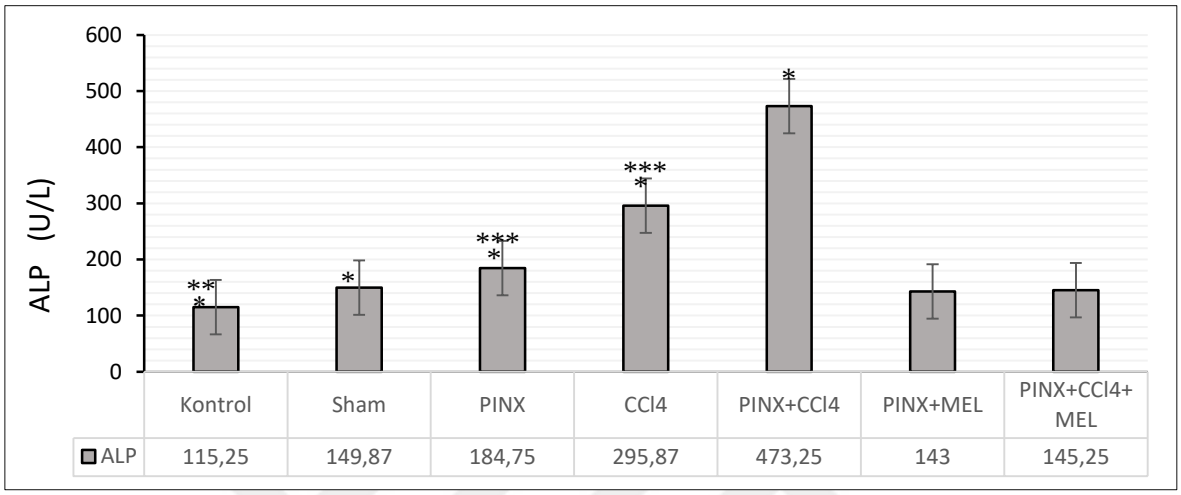
* p< 0.001 Grup 5 - grup 1,2,3,6. Grup 4- grup 1,2,3,6.

** p< 0.05 Grup 1 - grup 6,7. Grup 5 -grup 7.

*** p< 0.01 Grup 2 - grup 7. Grup 3 -grup 6.

[#] p< 0.005 Grup 6 - grup 7.

Şekil.4.10. Ortalama serum ALP düzeyleri.



Bulgular aritmetik ortalama±standart hata olarak gösterildi (n=8).

[*] p< 0.001 Grup 1 vs grup 3,4,5. Grup 2 - grup 4,5. Grup 3 - grup 4,5. Grup4 -grup 6,7. Grup 5 -grup 6,7.

[**] p< 0.05 Grup 1 - grup 2.

[***] p< 0.01 Grup 3 - grup 6,7. Grup 4 - grup 5.

4.1.1.5. Karaciğer Dokusu İnflamasyon Belirteç Düzeyi

Kontrol ve Sham için ayrılan sıçanların karaciğer dokusu IL-6 (Şekil 11) ve IL-1β (Şekil 12) düzeyleri arasında herhangi bir fark gözlenmez iken sıçanların pinealektomi altına alınarak melatonin yoksunluğu oluşturulması karaciğer IL-1β ve IL-6 düzeylerinde kontrol gruplarına (Kontrol ve Sham) kıyasla ciddi artışlara ($p<0.001$) neden olmuştur. Deneysel fibrozis oluşturmak için sıçanlara CCl_4 uygulanması kontrol grubuna kıyasla karaciğer IL-1β ve IL-6 düzeylerinde dramatik artışlara ($p<0.001$) neden olmuştur. Diğer yandan sıçanlara pinealektomi sonrası CCl_4 uygulanması (PINX+CCl_4) kontrol grublarına (Kontrol ve Sham) kıyasla yalnız CCl_4 uygulanmasındaki benzer etkiyi oluşturmuştur. Ancak pinealektomili ve CCl_4 uygulanan sıçanların melatonin ile tedavi edilmesi (PINX+CCl_4+MEL), tedavi edilmeyen gruba (PINX+ CCl_4) kıyasla karaciğer IL-1β ve IL-6 düzeylerinde ciddi toparlanma ($p<0.001$) oluşturduğu gözlenmiştir.

Tablo.4.5. Ortalama IL-1β ve IL-6 düzeyleri.

GRUPLAR	IL-1β	IL-6
Grup 1: Kontrol	2.51±0.40	6.24±0.24
Grup 2: Sham	2.86±0.68	6.35±0.32
Grup 3: PINX	6.60±0.93^{a,b}	9.35±0.43^{a,c}
Grup 4: CCl_4	13.29±1.70^{a,c,d}	19.05±0.96^{a,c,e}
Grup 5: PINX+CCl_4	18.68±2.93^{a,c,e}	22.19±0.88^{a,c,e,g}
Grup 6: PINX+Melatonin	3.36±0.49^{d,f,h}	7.45±0.29^{m,d,f,p,h}
Grup 7: PINX+CCl_4+Melatonin	8.04±0.87^{a,b,g,h,k}	13.52±0.55^{c,n,a,h,r}

Bulgular aritmetik ortalama±standart hata olarak gösterildi (n=8).

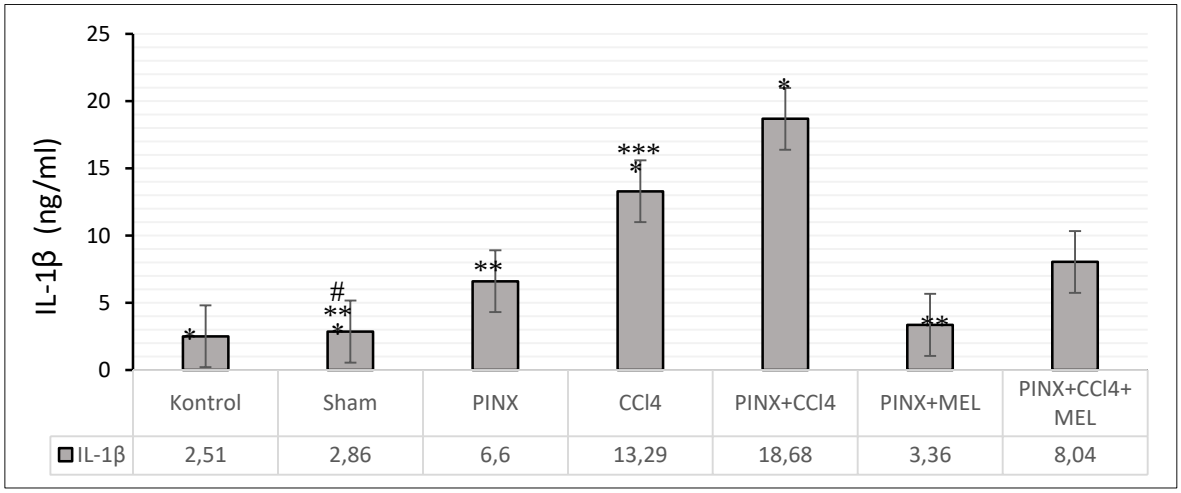
^{a} p< 0.001 - grup 1 ^{b} p< 0.005 - grup 2 ^{c} p< 0.001 - grup 2 ^{d} p< 0.005 - grup 3

^{e} p< 0.001 - grup 3 ^{f} p< 0.001 - grup 4 ^{g} p< 0.05 - grup 4 ^{h} p< 0.001 - grup 5

^{k} p< 0.005 - grup 6 ^{m} p< 0.01 -grup 1 ^{n} p< 0.005 - grup 4 ^{p} p< 0.01 - grup 2

^{r} p< 0.001 - grup 6

Şekil.4.11. Ortalama serum IL-1β düzeyleri.



Bulgular aritmetik ortalama±standart hata olarak gösterildi (n=8).

* p< 0.001 Grup 1 -grup 3,4,5,7. Grup 2 - grup 4,5. Grup 5- grup 3,6,7.

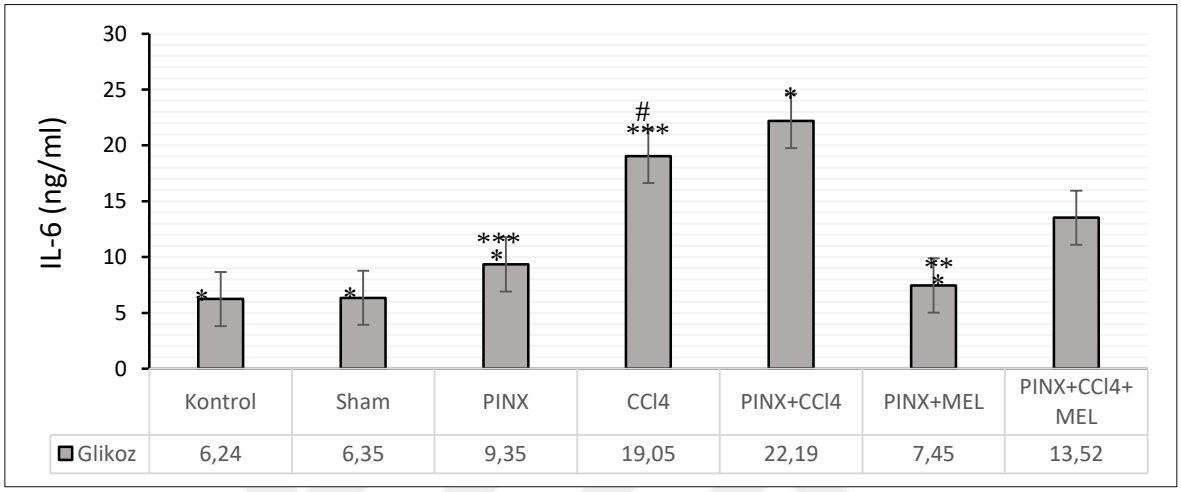
Grup 4 - grup 6.

** p< 0.005 Grup 2 - grup 7. Grup 3 - grup 4,6. Grup 6 - grup 7.

*** p< 0.05 Grup 4 -grup 7.

# p< 0.01 Grup 2 - grup 3.

Şekil.4.12. Ortalama IL-6 düzeyleri.



Bulgular aritmetik ortalama±standart hata olarak gösterildi (n=8).

* p< 0.001 Grup 1- grup 3,4,5,7. Grup 2 - grup 3,4,5,7. Grup 3 -grup 4,5,7. Grup 6-grup 4,5,7. Grup 5 - grup 7.

** p< 0.01 Grup 6-grup 1,2.

*** p< 0.005 Grup 3 -grup 6. Grup 4 -grup 7. # p< 0.05 Grup 4 -grup 5.

4.2. Histopatolojik Bulgular

Kontrol ve Sham grubuna ait karaciğer kesitleri normal histolojik görünümdeydi (Resim 1A, B). PINX grubunda ise normale yakın bir görünüm mevcuttu (Resim 1C). Bu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (p>0.05). CCl_4 ve PINX+CCl_4 gruplarında hepatositlerde vakuolizasyon ve yağlı değişim, konjesyon alanları, sinüzoidal dilatasyon ve yer yer inflamatuvar hücre infiltrasyonuna rastlandı. Yağlı değişim dışında hepatositler bazı alanlarda nekroza uğramıştı ve çok miktarda piknotik hepatosit görüldü (Resim 2). CCl_4 grubunun ortalama histopatolojik hasar skoru 6.37±0.37, PINX+CCl_4 grubunun ortalama histopatolojik hasar skoru ise 7.37±0.32 idi. PINX+CCl_4 grubunda hasarın şiddeti daha fazlaydı. CCl_4 ve PINX+CCl_4 grupları karşılaştırıldığında hasar skorunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (p>0.05). Kontrol, Sham ve PINX grupları ile CCl_4 ve PINX+CCl_4 grupları grupları karşılaştırıldığında hasar skorunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulundu (p<0.001, hepsi için). Melatonin uygulanan PINX ve PINX+CCl_4 gruplarında hasar skorunun azaldığı tespit edildi (Resim 3). PINX+CCl_4+Melatonin grubunun ortalama histopatolojik hasar

skoru 2.00±0.37 idi. Kontrol, Sham, PINX grupları ile PINX+Melatonin uygulanan grup karşılaştırıldığında hasar skorunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p>0.05$, hepsi için). CCl_4 ve PINX+CCl_4 grupları ile PINX+CCl_4+Melatonin uygulanan grup karşılaştırıldığında hasar skorunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edildi ($p<0.001$, hepsi için). Her bir grup için ortalama histopatolojik hasar skoru Tablo 1' de verildi.

Tablo.4.6. Ortalama histopatolojik hasar skoru.

Gruplar	Hasar Skoru
Grup 1: Kontrol	0.12±0.12
Grup 2: Sham	0.25±0.16
Grup 3: PINX	$0.87±0.22^{a}$
Grup 4: CCl_4	$6.37±0.37^{b,c,d}$
Grup 5: PINX + CCl_4	$7.37±0.32^{b,c,d}$
Grup 6: PINX + Melatonin	$0.50±0.18^{f,g}$
Grup 7: PINX + CCl_4 + Melatonin	$2.00±0.37^{b,c,e,f,g,h}$

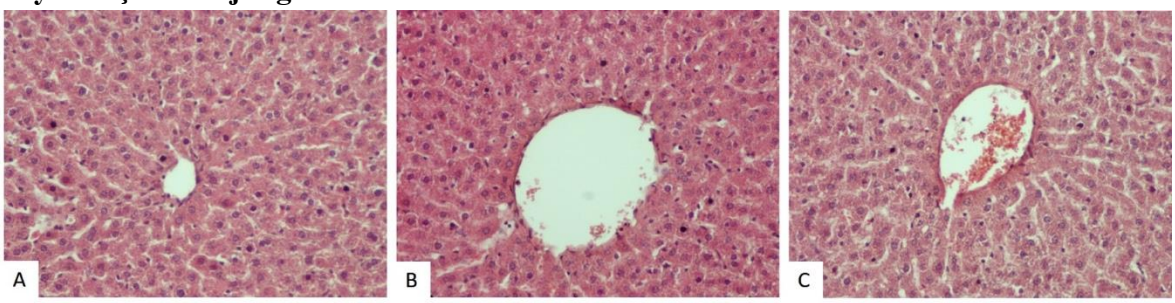
Bulgular aritmetik ortalama±standart hata olarak gösterildi (n=8).

[a] $p< 0.05$ -grup 1 [b] $p< 0.001$- grup 1 [c] $p< 0.001$-grup 2

[d] $p< 0.001$ - grup 3 [e] $p< 0.05$-grup 3 [f] $p< 0.001$-grup 4

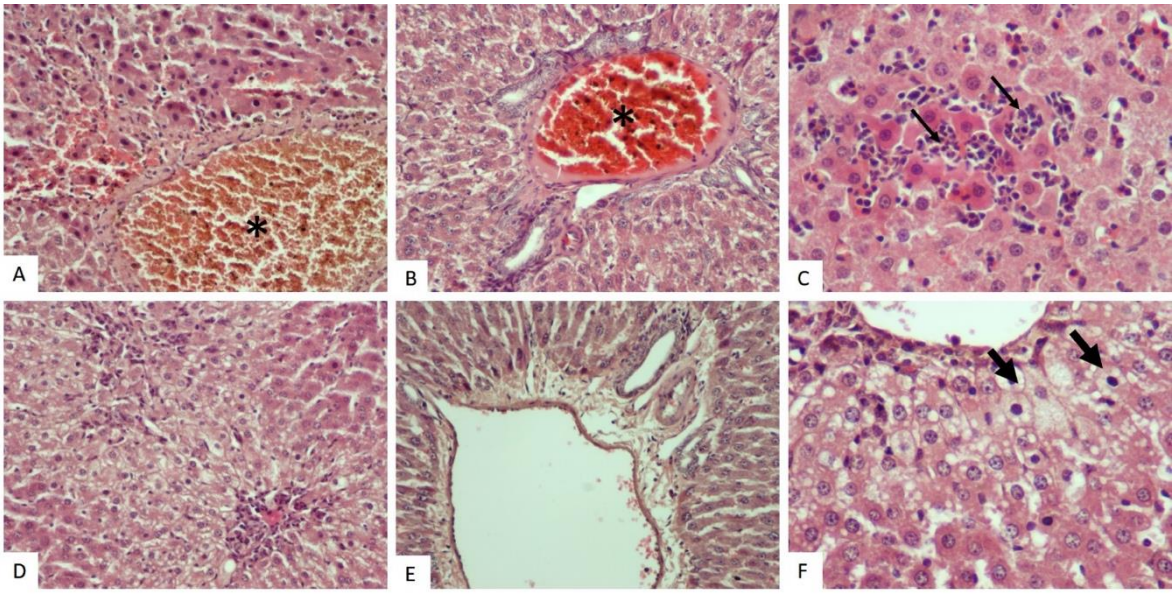
[g] $p< 0.001$ -grup 5 [h] $p< 0.005$-grup 6

Şekil.4.13. Kontrol grubu, Sham ve PINX grubuna ait hemotoksilin eosin ile boyanmış histolojik görüntüler



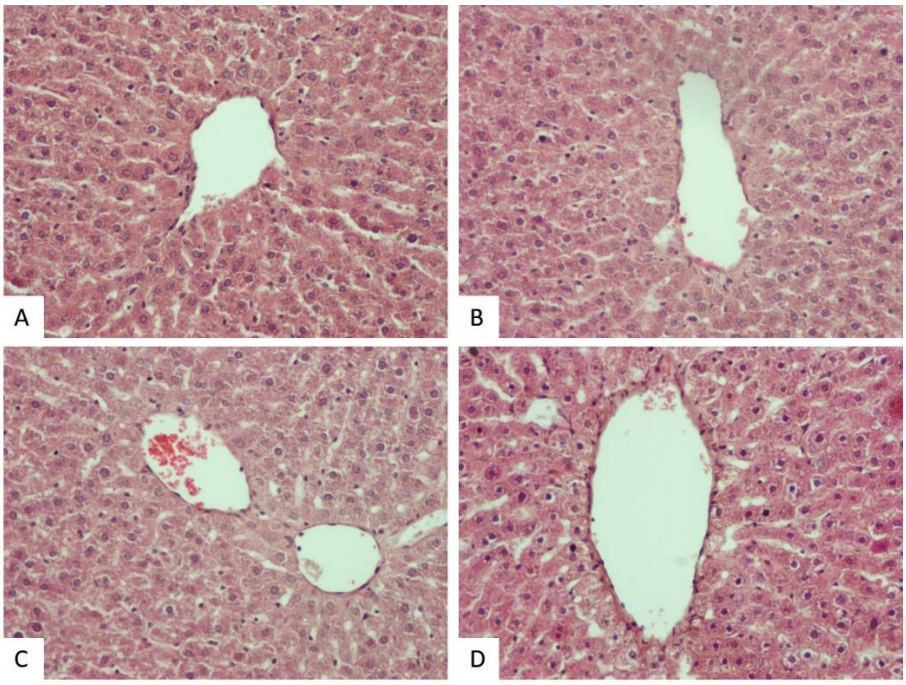
Kontrol ve Sham gruplarına ait karaciğer kesitleri normal histolojik görünümdeydi. PINX grubunda da normale yakın bir görünüm mevcuttu. **A.** Kontrol grubu; H-E X20, **B.** Sham grubu; H-E X20, **C.** PINX grubu; H-E X20.

Şekil.4.14. CCL4 ve. PINX+CCL4 grubuna ait hemotoksilin eosin ile boyanmış histolojik görüntüler



CCl_4 ve PINX + CCl_4 gruplarında hepatositlerde vakuolizasyon ve yağlı değişim (kalın ok), konjesyon (asterisk), sinüzoidal dilatasyon ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu (ince ok) ve nekroz alanları tespit edildi. **A.** CCl_4 grubu; H-E X20, **B.** CCl_4 grubu; H-E X20, **C.** CCl_4 grubu; H-E X40, **D.** PINX + CCl_4 grubu; H-E X20. **E.** PINX + CCl_4 grubu; H-E X20. **F.** PINX + CCl_4 grubu; H-E X40.

Şekil.4.15. PINX ve PINX+CCL4 grubuna ait melatonin uygulaması grubu



Melatonin uygulanan gruplarda hasarın azaldığı görüldü. **A.** PINX + Melatonin grubu; H-E X20, **B.** PINX + Melatonin grubu; H-E X20, **C.** PINX + CCl_4 + Melatonin grubu; H-E X40. **D.** PINX + CCl_4 + Melatonin grubu; H-E X20.

4.3. İmmünohistokimyasal bulgular

Kontrol, Sham, PINX ve PINX+Melatonin grupları anti-TGF-β1 antikoru ile zayıf boyanmıştı. CCl_4 ve PINX+CCl_4 gruplarına ait karaciğer dokularındaki TGF-β1 ekspresyonunun artmış olduğu tespit edildi. PINX+CCl_4+Melatonin grubunda TGF-β1 eskpresyonu orta şiddetteyken, PINX+CCl_4 grubunda ise ekspresyonun en yüksek şiddette olduğu görüldü. Melatonin uygulamasının TGF-β1 ekspresyonunu azalttığı tespit edildi. PINX+CCl_4 grubu ile PINX+CCl4+Melatonin grubu karşılaştırıldığında, ekspresyonun şiddetinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü ($p<0.001$). TGF-β1 immün boyamasına ait H-Skoru Tablo 2' de verildi.

Tablo.4.7. TGF-β1 immünreaktivitesi için ortalama H-Skoru.

Gruplar	H-Skoru
Grup 1: Kontrol	139.25±6.09
Grup 2: Sham	$166.25±8.85^{a}$
Grup 3: PINX	$190.00±7.07^{b}$
Grup 4: CCl_4	$249.37±7.58^{b,c,f}$
Grup 5: PINX + CCl_4	$280.62±5.12^{b,c,f,h}$
Grup 6: PINX + Melatonin	$203.12±1.31^{b,d,g,k}$

Grup 7: PINX + CCl_4 + Melatonin	$198.75 \pm 8.33^{b,e,h,k}$

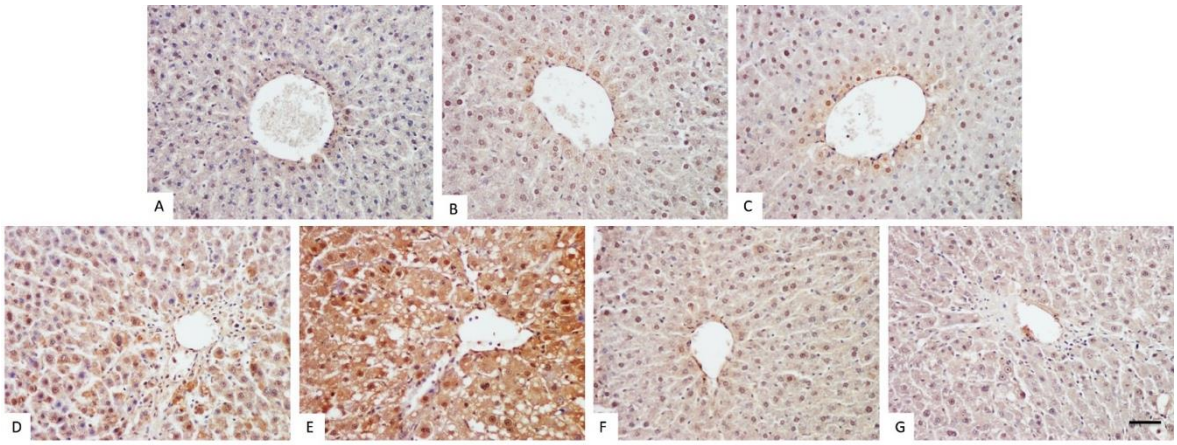
Bulgular aritmetik ortalama±standart hata olarak gösterildi (n=8).

[a] p< 0.05- grup 1 [b] p< 0.001-grup 1 [c] p< 0.001- grup 2

[d] p< 0.05 -grup 2 [e] p< 0.01- grup 2 [f] p< 0.001-grup 3

[g] p< 0.001-grup 4 [h] p< 0.005-grup 4 [k] p< 0.001- grup 5

Şekil.4.16. Doku örneklerine ait anti TGF B1 antikorunun immünohistokimyasal yöntemlerle boyanmış histolojik görüntüleri



Dokular anti-TGF-β1 antikoru ile immünühistokimyasal yöntemle boyandı. Kontrol, Sham, PINX ve PINX+Melatonin grupları zayıf boyanmıştı. PINX+CCl_4 grubunda ise ekspresyonun en yüksek şiddette olduğu görüldü. **A.** Kontrol grubu, **B.** Sham grubu, **C.** PINX grubu, **D.** CCl_4 grubu, **E.** PINX + CCl_4 grubu, **F.** PINX+Melatonin grubu, **G.** PINX + CCl_4 + Melatonin grubu. Anti- TGF-β1; X20. Bar: 20 µm.

5. TARTIŞMA

Karaciğerin, biyokimyasal ve fizyolojik rolü ile toksik maddelerin inhibisyonunda önemli rolü vardır. Kimyasal olaylar meydana gelirken karaciğerde bazı hasarlar oluşabilmektedir. Oksidatif stres ve bunun sonucunda oluşan serbest radikallerin etkisi ile karaciğer hasarlarının oluştuğu kanıtlanmıştır (Ning ve ark., 2006). Karaciğerde patolojik değşikliklere neden olan bir çok kimyasal ajan vardır ve bunlardan biri de CCL_4' tür (Robbins ve ark., 2003). Hepatotoksin özelliği ile serbest radikal üretimine sebep olur ve doku hasarına yol açar (Pietta, 2000). Antioksidanlar ve oksidanlar arasındaki dengenin oksidanların lehine kayması durumunda oksidatif stres oluşmaktadır (Sies, 1997). Oksidatif stresle birlikte oluşan ROS çok fazla reaktiftir ve DNA'nın, lipitlerin ve proteinlerin oksidasyonuna neden olurlar ve hasar meydana getirirler (Sánchez-Valle, 2012). Oksidatif stresin artması ile hepatik fibrozisin ilerlemesi de artar (Poli, 2000).

Oksidatif stresin artışının karaciğer toksitesi oluşumunda önemli rolü vardır (McGee ve ark., 2003). Serbest radikal oluşturan CCl_4, çok toksik bir maddedir (StarkelveLeclercq, 2011). CCL_4'ün hepatotoksik etkisi, sitokrom P450 ile hepatik mikrozomal enzim tarafından meydana getirilen triklorometil peroksit ve triklorometile dayalıdır (Ingawale, 2014). CCL_4 ile oluşturulan karaciğer hasarı, redüktif deholojenasyon, radikallerin kovalent bağlanması, protein sentezinin inhibisyonu, yağ birikimi, kalsiyum sekestrasyonunda kayıp, apoptoz ve fibrozis basamaklarını içermektedir (Hong ve ark.,

2009). Oluşan bu radikaller lipitlere, hücre membranı proteinlerine bağlanır ve lipit pereksidaysonunu uyararak, karaciğer hasarı oluşturmaktadır (Debnath, 2013).

Çalışmamızda pinealektomi işlemi yapılmış ve CCL_4 ile karaciğer hasarı modeli oluşturulmuş ratlarda meydana gelen karaciğer hasarını gözlemlemeyi ve en güçlü antioksidanlardan biri olan melatoninin karaciğer hasarı üzerinde iyileştirici etkilerinin olup olmadığını histoloji ve biyokimya incelemeleriyle görmeyi amaçladık.

Artan oksidatif stresin karaciğer hasarında etkili olduğu bilinmektedir (Parola ve Robino, 2001; Gochee ve ark., 2003). Karaciğer dokusunda farklı dozlarda ve farklı uygulama yöntemleri ile CCL_4 indüklenmesinin yapılması, lipit peroksidasyonu arttırmakta ve GSH seviyelerini ise azaltmaktadır (Güven ve gülmez, 2003). Lipit peroksidasyonunu belirleyen ölçümlerden biri de MDA'dır (Basu, 2003). MDA seviyesi, oksidatif stres arttığı durumlarda yükselmektedir (Kuş ve ark. 2012). GSH ise serbest radikallerin kötücül etkilerine karşı hücreleri korumaktadır. Sun ve Chen'in yaptığı bir çalışmada CCL_4 ile indüklenmiş ratların GSH seviyelerinde anlamlı olarak azalma saptanmıştır. Kepekçi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada CCL_4 indüklenmesi ile oluşturulan hasardan 24 saat sonra aldıkları karaciğer numunelerinde MDA seviyesinde artış gözlemlenmiştir. Karakuş'un yaptığı çalışmada, İnsektisit Fenthion kullanarak oluşturulan karaciğer hasarında İnsektisit Fenthion kullanılan grupta oksidatif stres belirteçlerinden olan MDA düzeyi anlamlı artış göstermiştir. Bizim çalışmamızda ise gün aşırı olmak suretiyle CCL_4 uygulanmıştır ve CCL_4 uygulanan ratlarda MDA seviyelerinde çok ciddi artış gözlemlenirken GSH seviyelerinde anlamlı bir şekilde azalma saptanmıştır.

Antioksidan sistemin ilk basamağında süperoksitin H_2O_2'ye dismutasyonunu sağlayan SOD enzimi rol oynamaktadır. SOD, oksijen radikalinin zararlı etkilerine karşı, aerobik hücreleri koruyan çok önemli bir antioksidandır. Süperoksit dismutaz enzimi ile tepkime sonrasında oluşan toksik ürün birikimini CAT enzimi önlemektedir (Halliwell, 1994; Kılınç, 1985). Süperoksit radikalinin artması SOD ve CAT enzimlerini inhibe etmektedir. Karaciğer toksitesi oluşturulmuş ratlarda yapılan çalışmalarda SOD ve CAT değerlerinde anlamlı azalmalar meydana gelmiştir (Altınbaşak, 2019; Tür, 2008; Cui ve ark., 2013). Bizim yaptığımız çalışmada da CCL_4 uygulanan ratlarda SOD ve CAT enzim seviyelerinde ciddi ölçüde düşüş gözlenmiştir.

TAS ve TOS değerleri ile ölçülen OSI değeri, oksidatif stresin önemli belirteçlerindendir. Yapılan çalışmalarda, CCL_4'ün neden olduğu serbest radikallerin artmasına bağlı olarak TAS seviyelerinin düştüğü ve TOS seviyelerinin yükseldiği gözlenmiştir. Dertli ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada CCL_4 uygulanan karaciğer

dokularında TAS seviyelerinin azaldığı, TOS seviyelerinin ise arttığı görülmüştür. Sürücü ve arkadaşlarının yapmış olduğu başka çalışmada da aynı şekilde TAS seviyeleri azalmış ve TOS seviyeleri yükselmiştir. Bunlara paralel bir şekilde bizim çalışmamızda da CCL_4 uygulanan ratlarda TAS seviyeleri ciddi şekilde azalmış, TOS seviyelerinde de dramatik bir artış olduğu gözlenmiştir.

Karaciğerde yapılan biyokimyasal analizler, karaciğerin fonksiyonel durumunu, karaciğer hasarını ve karaciğer hasarına neden olan faktörleri saptamak açısından çok önemlidir (Gianni, 2005). Lin ve arkadaşlarının (2012) yaptığı çalışmada ratlara 12 hafta süresince CCL_4 uygulanmış ve AST, ALT, ALP değerlerinde anlamlı yükselişler tespit edilmiştir. Özerkan ve arkadaşlarının CCL_4 ile yaptıkları başka bir çalışmada karaciğer toksitesinde AST, ALT, ALP değerleri CCL_4 grubunda yüksek bulunmuştur. Aynı şekilde bizim yaptığımız çalışmada da 15 gün boyunca CCL_4 uygulanan ratlarda AST, ALT ve ALP değerlerinde ciddi ölçüde yükseliş söz konusu olmuştur.

Herhangi bir konakçı veya mikroorganizma ile karşılaşılması durumunda doğal bağışıklık süreçleri başlar ve mononükleer hücrelerle proinflamatuar sitokin üretimi başlatılır. Buna yönelik salgılanan sitokinler olarak IL-1, IL-6, TNF alfa ve IL-1beta sayılabilir (Chaudhry ve ark., 2013). Karaciğer kuppfer hücreleri, hem bakterilerin hem de bakteriyel ürünlerin zararlı etkilerini ortadan kaldırmada görev alır. Aynı zamanda hepatik hücrelerin metabolik etkinliklerini sitokinler de değişitirmektedir (Dhainaut, 2001). Karaciğer hasarında sitokin seviyelerinin artar ve sitokin seviyelerinin artması inflamasyon varlığını göstermektedir. Chen ve arkadaşlarının (2014) yaptığı çalışmada, CCL_4 ile oluşturulan karaciğer hasarında IL-6 ve TNF alfa düzeylerinin anlamlı bir şekilde arttığı görülmüştür. Aynı şekilde Lin ve arkadaşlarının (2012) yaptıkları çalışmada CCL_4 ile oluşturulan karaciğer toksite modelinde TNF alfa ve IL-6 seviyelerinde ciddi artışlara rastlanmıştır. Çalışmamızda IL-1beta ve IL-6 değerlerini inceledik. Yapmış olduğumuz çalışmada literatür örneklerine benzer bir şekilde IL-6 ve IL1-beta düzeylerinin CCL_4 uygulanan gruplarda anlamlı bir şeklide arttığını tespit ettik.

Melatonin tedavi edici özelliğinden yararlanılan çok kuvvetli bir antioksidandır (Tahan, 2010). Karaciğer toksitesi ile meydana gelen lipit peroksidasyonuna karşı koruyucu etkisinin olduğu çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (Hong, 2009). CCL_4 indüklenmesi ile oluşan hasara karşı sadece karaciğeri değil böbrek ve akciğeri de koruduğuna dair çeşitli çalışmalar vardır (Ogetturk, 2005, Taslidere, 2014). Ayrıca melatonin dolaylı olarak süperoksit dismutaz, glutatyon redüktaz ve glutatyon peroksidaz

antioksidanlarının etkilerini daha da artırmaktadır (Nishida, 2005). Özerkan (2014) yapmış olduğu çalışmada, CCL_4 uygulanan grupta MDA' daki artışın, melatonin uygulanması ile azaldığını tespit etmiştir. Yine aynı çalışmada CCL_4 grubundaki GSH seviyeleri anlamlı derecede azalırken, 12 hafta boyunca melatonin verilen CCL_4 grubundaki GSH seviyesi neredeyse kontrol grubuna yakın bulmuştur. 10 hafta melatonin verilen CCL_4 grubundaki ALT, ALP düzeylerinde de anlamlı bir azalma söz konusuyken, 12 hafta uygulanan melatonin grubunda nredeyse kontrol grubuna yakın değerler elde edilmiştir. Özerkanın yapmış olduğu çalışma melatoninin iyileştirici özelliğini kanıtlar niteliktedir. Çalışmadaki histolojik bulgularda melatoninin karaciğeri koruduğunu destekler niteliktedir. 10 hafta melatonin uygulanan CCL_4 grubundaki balonlaşmış hepatosit hücre kitleleri, sinüzoidal dilatasyon, retiküler lif kalınlaşması ve fibrozisi azaltırken; 12 hafta melatonin uygulanan CCL_4 grubunda ise neredeyse kontrol grubuna en yakın doku görüntüsü tespit edilmiştir. Başka çalışmalarda da melatonin antioksidanının anti-fibrotik etkisi kanıtlanmıştır (Hong, 2009; Tahan, 2010). Wang ve arkadaşları (2005) yaptıkları çalışmada melatonin uygulanan CCL_4 grubunda yalnız CCL_4 uygulanan gruba göre MDA seviyelerinin azaldığını, SOD düzeylerinin ise artış gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Histolojik yönden incelemelerinin sonucunda ise CCL_4 grubunda inflamasyon, nekroz, balonlaşmış hücreler ve steatozise rastlamışlardır. Ogeturk ve arkadaşlarının (2004) yaptıkları bir çalışmada ALT, AST ve ALP seviyelerinin arttığı ve melatonin takviyesi ile bu değerlerin azaldığı tespit edilmiştir. Kuş ve arkadaşlarının (2005) yaptıkları başka bir çalışmada, serum ALT, ALP seviyelerinin arttığı ve melatonin uygulaması ile bu değerlerin azaldığı gözlemlenmiştir. Histolojik yönden ise fibrozis, mononükleer hücre infiltrasyonu, yağlı dejenerasyon, nekroz, hemoraj ve de hepatositlerde hipotik dejenerasyon tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da CCL_4 grubumuzda melatonin uygulanması ile MDA seviyelerinde anlamlı düşüşler, GSH seviyelerinde ise ciddi toparlanmalar söz konusu olmuştur. Aynı şekilde melatonin ile tedavi edilmeyen gruba göre, melatonin verilen CCL_4 grubunda SOD ve CAT enzimlerinde ciddi iyileşmeler tespit edilmiştir. Melatonin ile tedavi edilen grupta TAS, TOS ve OSI değerlerinde iyileşmeler ölçümlenmiştir. AST, ALT ve ALP değerlerindeki iyileşmeler de ortaya konmuştur. Melatonin ile tedavi edilen grupta IL-1B ve IL-6 düzeylerinde de ciddi iyileşmeler söz konusudur. Histolojik olarak değerlendirdiğimizde de CCL_4 grubumuzda hepatositlerde vakoulizasyon ve yağlı değişim, sinüzoidal dilatasyon, konjesyon alanları ve yer yer inflamatuar hücre infiltrasyonuna rastlanmıştır. Yağlı değişim dışında hepatositler bazı alanlarda nekroza uğramıştı ve çok

miktarda piknotik hepatosit görülmüştür. Melatoninin tedavi edici etkisi ile kullandığımız CCL_4 gruplarında hasar skorunda anlamlı bir azalma gözlemlendi.

Hadisoewignyo ve arkadaşlarının (2019) yaptığı çalışmada CCL_4 indüklenmesi ile oluşturdukları karaciğer hasarındaki histolojik değişikliklerde kontrol grubuna göre nekrotik hücre sayılarının daha fazla olduğu saptanmıştır. CCL_4 nekrotik hücre sayısında anlamlı bir artışa sebep olmuştur. Şişen hücrelerde hidropik dejenerasyon, yağ, su veya glikojenden oluşabilen berrak vokuollerle dolu sitoplazmaya rastlamışlardır. Bu berrak boşluklar hücre çekirdeğini kenara itebilir. Wang ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada CCL_4 ile oluşturulan karaciğer toksitesinde oksidatif stresin artmasıyla yapılan ölçümlerde karaciğer morfolojisinde steatoz, inflamasyon, nekroz ve hepatosit balonlaşmalarına rastlanmıştır ve melatonin uygulaması sonucunda CCL_4 gruplarında anlamlı bir iyileşme söz konusu olmuştur. Yine aynı çalışmada CCL_4 gruplarında anlamlı bir şekilde artan TNF alfa ve IL1-beta anlamlı bir şekilde artmış olup, melatonin uygulanan CCL_4 gruplarında ise bu değerlerde anlamlı azalmalar meydana gelmiştir. Bizim çalışmamızda da benzer bir şekilde melatonin gruplarında IL-1 beta değerinde anlamlı azalmalar kaydedilmiştir. Bu deneylerden elde edilen sonuçlarda, melatonin tarafından CCl_4'ün oluşturduğu karaciğer hasarına karşı önemli bir koruma sağladığı açıkça gösterilmiştir. CCL_4 hepatik fibrogenezin erken evrelerini indüklemektedir. Melatoninin sadece hepatosit hasarına karşı korumadığı aynı zamanda kollajen birikimini azalttığı, oksidatif stresi iyileştirdiği ve proinflamasyonu inhibe ettiği çalışmalarda gözlemlenmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Biyokimyasal Sonuçlar

Çalışmamızda grup 4 (CCL4) MDA sonuçları ile kontrol, sham ve PINX grupları arasında artış yönünde istatiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 3 (PINX) MDA sonuçları ile kontrol ve sham grupları arasında anlamlı sonuçlar saptanmıştır. Grup 5 (PINX+CCL4) MDA sonuçları ile kontrol, sham ve PINX grupları arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 6 (PINX+Melatonin) MDA sonuçları ile PINX, CCL4, PINX+CCL4 grupları arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). GRUP 7 (PINX+CCL4+Melatonin) MDA sonuçları ile kontrol, sham, CCL4, PINX+CCL4, PINX+Melanonin grupları arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$).

Çalışmamızda grup 3 (PINX) GSH sonuçları ile kontrol ve sham grupları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 4 (CCL4) GSH sonuçları ile kontrol, sham ve PINX grupları arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. Grup 5 (PINX+CCL4) GSH sonuçları ile kontrol, sham ve PINX grupları arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 6 (PINX+Melatonin) GSH sonuçları ile CCL4 ve PINX+CCL4 arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 7

(PINX+CCL4+Melatonin) GSH sonuçları ile kontrol, sham, PINX, PINX+CCL4 grupları arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$).

Çalışmamızda grup 3 (PINX) SOD bulguları ile kontrol ve sham grupları arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 4 (CCL4) SOD sonuçları ile kontrol, sham ve PINX grupları arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 5 (PINX+CCL4) SOD sonuçları ile kontrol, sham, PINX grupları arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 6 (PINX+Melatonin) SOD bulguları ile PINX, CCL4 ve PINX+CCL4 grupları arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 7 (PINX+CCL4+Melatonin) SOD bulguları ile kontrol, sham, CCL4, PINX+CCL4 ve PINX+Melatonin arasında anlamlı sonuçlar elde edilmiştir ($p<0.05$).

Çalışmamızda grup 3(PINX) CAT bulguları ile kontrol ve sham grupları arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 4 (CCL4) CAT sonuçları ile kontrol, sham ve PINX grupları arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 5 (PINX+CCL4) CAT bulguları ile kontrol, sham ve PINX grupları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 6 (PINX+Melatonin) CAT bulguları ile CCL4, PINX ve PINX+CCL4 grupları arasında artış yönünde anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 7 (PINX+CCL4+Melatonin) CAT sonuçları ile kontrol, sham, CCL4, PINX+CCL4 ve PINX+Melatonin grupları arasında anlamlı farklılıklar bulunmuştur ($p<0.05$).

Çalışmamızda kontrol grubu ve sham grupları arasında TAS sonuçları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 3(PINX) TAS seviyeleri ile kontrol ve sham grupları arasında anlamlı farklar bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 4 (CCL4) TAS sonuçları ile kontrol, sham ve PINX grupları arasında anlamlı farklar bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 5 (PINX+CCL4) TAS sonuçları arasında azalma yönünde anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 6 (PINX+Melatonin) TAS sonuçları ile sham, PINX, CCL4 vePINX+CCL4 grupları arasında anlamlı sonuçlar kaydedilmiştir ($p<0.05$). Grup 7 (PINX+CCL4+ Melatonin) TAS sonuçları arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$).

Çalışmamızda grup 3 (PINX) TOS sonuçları ile kontrol grubu arasına anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 4 (CCL4) TOS sonuçları ile kontrol, sham, PINX grupları arasında artış yönünde istatiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 5 (PINX+CCL4) TOS sonuçları ile kontrol, sham, PINX, CCL4 grupları arasında anlamlı farklar bulunmuştur ($p<0.05$).Grup 6 (PINX+Melatonin) TOS seviyeleri ile CCL4 ve PINX+CCL4 grupları arasında azalma yönünde anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$).

Grup 7 (PINX+CCL4+Melatonin) TOS seviyeleri ile sham, PINX, PINX+CCL4 ve PINX+Melatonin grupları arasında anlamlı farklar bulunmuştur ($p<0.05$).

Çalışmamızda sham grubu OSI sonuçları ile kontrol grubu arasında artış yönünde istatiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 3 (PINX) OSI sonuçları ile kontrol ve sham gruplar arasında anlamlı bir sonuç bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 4 (CCL4) OSI sonuçları ile kontrol, sham, PINX grupları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 5 (PINX+CCL4) OSI sonuçları ile kontrol, PINX, CCL4 grupları arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 6 (PINX+Melatonin) OSI sonuçları ile PINX, CCL4 ve PINX+CCL4 grupları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 7 (PIX+CCL4+Melatonin) OSI sonuçları ile kontrol, sham, PINX, CCL4, PINX+CCL4 ve PINX+Melatonin grupları arasında anlamlı farklar bulunmuştur ($p<0.05$).

Çalışmamızda grup 4 (CCL4) AST, ALT ve ALP sonuçları ile kontrol, sham, PINX gruplarında artış yönünde istatiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 5 (PINX+CCL4) AST, ALT ve ALP sonuçları ile kontrol, sham, PINX ve CCL4 grupları arasında anlamlı farklar bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 6 (PINX+Melatonin) AST, ALT ve ALP sonuçları ile CCL4 ve PINX+CCL4 grupları arasında azalma yönünde anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 7 (PINX+CCL4+Melatonin) AST, ALT ve ALP sonuçları ile PINX, CCL4 ve PINX+CCL4 grupları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$).

Çalışmamızda grup 3 (PINX) IL-1Bve IL-6 sonuçları ile kontrol ve sham grupları arasında artış yönünde istatiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 4 (CCL4)) IL-1Bve IL-6 sonuçları ile kontrol ve PINX grupları arasında anlamlı farklar bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 5 (PINX+CCL4)) IL-1Bve IL-6 sonuçları ile kontrol, sham, PINX grupları arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 6 (PINX+Melatonin) sonuçları ile PINX, CCL4, PINX+CCL4 grupları arasında azalma yönünde anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 7 (PINX+CCL4+Melatonin) IL-1Bve IL-6 sonuçları ile kontrol ve PINX+CCL4 grupları arasında anlamlı farklar bulunmuştur ($p<0.05$).

Histopatolojik sonuçlar

Çalışmamızda kullanılan PINX (grup 3) grubunun histopatolojik sonuçlarına bakıldığında bu grubun hasar skorunun kontrol grubuna göre artış yönünde istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0.05$).

Çalışmamızda CCL4 grubunun (grup 4) histopatolojik sonuçlarına bakıldığında bu grubun hasar skorunun kontrol, sham ve CCL4 grubuna göre artış yönünde istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0.05$).

Çalışmamızda PINX+CCL4 grubunun (grup 5) histopatolojik sonuçlarına bakıldığında bu grubun hasar skorunun kontrol, sham ve CCL4 grubuna göre artış yönünde istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0.05$).

Çalışmamızda PINX+Melatonin grubunun (grup 6) histopatolojik sonuçlarına bakıldığında bu grubun hasar skorunun CCL4 ve PINX+CCL4 grubuna göre azalış yönünde istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0.05$).

Çalışmamızda PINX+CCL4+Melatonin grubunun (grup 7) histopatolojik sonuçlarına bakıldığında bu grubun hasar skorunun kontrol, sham, PINX, CCL4, PIX+CCL4, PINX+Melanonin gruplarıyla istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0.05$).

İmmünohistokimyasal Bulgular

Çalışmamızda immünohistokimyasal bulgular incelendiğinde sham grubunun H skorunun kontrol grubuna göre artış yönünde istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0.05$).

Çalışmamızda immünohistokimyasal bulgular incelendiğinde PINX grubunun H skorunun kontrol grubuna göre artış yönünde istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0.05$).

Çalışmamızda immünohistokimyasal bulgular incelendiğinde CCL4 grubunun H skorunun kontrol, sham ve PINX grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0.05$).

Çalışmamızda immünohistokimyasal bulgular incelendiğinde PINX+CCL4 grubunun H skorunun kontrol, sham, CCL4 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0.05$).

7. KAYNAKLAR

Acuña-Castroviejo, D., Escames, G., Venegas, C., Díaz-Casado, M. E., Lima-Cabello, E., López, L. C., ... & Reiter, R. J. (2014). Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cellular and molecular life sciences*, *71*(16), 2997-3025.

Agnez-Lima, L. F., Melo, J. T., Silva, A. E., Oliveira, A. H. S., Timoteo, A. R. S., Lima-Bessa, K. M., ... & Menck, C. F. (2012). DNA damage by singlet oxygen and cellular protective mechanisms. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, *751*(1), 15-28.

Akkuş, İ. (1995). Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. *Mimoza Yayınları, Konya*, *1*, 57-63.

Akkuş, İ., Kalak, S., Vural, H., Çaglayan, O., Menekşe, E., Can, G., & Durmuş, B. (1996). Leukocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and serum and leukocyte vitamin C levels of patients with type II diabetes mellitus. *Clinica chimica acta*, *244*(2), 221-227.

Akyüz, E. (2007). *Polygonum bistorta ssp. carneum bitki ekstraktlarının kromatografik yöntemlerle kimyasal bileşiminin belirlenmesi ve antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri*(Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).

Al Gburı, M. R. A. (2022). *Pinealektomi Ve Eksojen Melatoninin Sıçanlarda A-Naftiltiyoüre Tarafından İndüklenen Pulmoner Ödem Üzerine Etkilerinin Araştırılması* (Doctoral dissertation).

Alexander, C. (1998). Cutting weight, losing life. *News & Observer*, *8*

Altinbaşak, M. (2019). *Karbontetraklorür (CCl4) ile deneysel oksidatif stres ve karaciğer harabiyeti oluşturulan sıçanlarda alıç (Crataegus orientalis) bitkisinin meyve liyofilize ekstraktının karaciğer koruyucu ve antioksidan rolünün araştırılması* (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).

Altinoz, E. (2017). Hepatoprotective effects of crocin on biochemical and histopathological alterations following acrylamide-induced liver injury in Wistar rats. *Biomedicine & pharmacotherapy*, *95*, 764-770.

A Ö. Temel Ve Klinik Bilimler Ders Kitapları: Gastroenterohepatoloji. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2001 Arıncı K EA. Anatomi. 1 ed. Ankara: Güneş Kitabevi; 2006.

Aslan, R., Kutlu, R., Civi, S., & Tasyurek, E. (2014). The correlation of the total antioxidant status (TAS), total oxidant status (TOS) and paraoxonase activity (PON1) with smoking. *Clinical biochemistry*, *47*(6), 393-397.

Aslani, B. A., & Ghobadi, S. (2016). Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the immune system. *Life sciences*, *146*, 163-173.

Aslan, S. (2010). Karaciğer nakli vericilerinde kontrollü hipotansiyon.

Aranda-Michel, J., & Sherman, K. E. (1998). Tests of the liver: use and misuse. *The Gastroenterologist*, *6*(1), 34-43.

Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. Oxidative medicine and cellular longevity. 2014; 2014: 360438.

Ballur, A. F. H. (2022). *Pinealektomi Yapılmış Sıçanlarda Monosodyum Ürat Kristal Kaynaklı Gut Artiriti Üzerine Eksojen Melatoninin Etkileri*(Doctoral Dissertation).

Bansal, M., & Kaushal, N. (2014). *Oxidative stress mechanisms and their modulation* (Vol. 9, pp. 978-981). Springer India.

Basu S., 2003. Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: Eiocosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients. Toxicology, 00: 1-15

Baykal, Y. (2000). Kocabalkan F. *Serbest radikaller ve hücre hasarı. Sendrom*, *9*, 31-9.

Bayraktar, M., Kılıç, S., Özdemir, İ., Aydemir, S., & Ulu, R. (2005). The investigation of serum malondialdehyde levels and erythrocyte antioxidant enzymes in hypertension patients. *J Healt Sci*, *14*(2), 76-81.

Baz, H. (2014). *Streptozotocinle İndüklenen Diyabetli Ratlar Üzerinde Myrtus Communis L. Yaprağı Su Ekstresi Etkilerinin Araştırılması* (Doctoral Dissertation).

Beal, A. L., & Cerra, F. B. (1994). Multiple organ failure syndrome in the 1990s: systemic inflammatory response and organ dysfunction. *Jama*, *271*(3), 226-233.

Bilgiç, S., Özerol, E., Iraz, M., Şahin, N., Tanbek, K., & Çığlı, A. (2016). Karaciğeri rejenere olan ve olmayan sıçanlarda, karbontetraklorürle indüklenen akut karaciğer hasarı ve n-asetilsisteinin koruyucu etkisi.

Boll, M., Weber, L., Becker, E., Stampfl A., 2001. Mechanism of carbon tetrachloride-inducedhepatotoxicity. Hepatocellular damage by reactive carbon tetrachloride metabolites. Z Naturforsch, 560: 649-659.

Brattin, W. J., Glende Jr, E. A., & Recknagel, R. O. (1985). Pathological mechanisms in carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Journal of free radicals in biology & medicine*, *1*(1), 27-38.

Bolduc, J. A., Collins, J. A., & Loeser, R. F. (2019). Reactive oxygen species, aging and articular cartilage homeostasis. *Free Radical Biology and Medicine*, *132*, 73-82.

Brzezinski, A. (1997). Melatonin in humans. *New England journal of medicine*, *336*(3), 186-195.

Burçak, G., & Andican, G. (2004). Oksidatif dna hasari ve yaşlanma. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, *35*(4).

Burnie, J. P., Coke, A., & Matthews, R. C. (1992). Restriction endonuclease analysis of Aspergillus fumigatus DNA. *Journal of clinical pathology*, *45*(4), 324-327.

Bülbül, G. Y., Leyla, M. İ. S., Şengül, E., YILDIRIM, S., Çelebi, F., & ÇINAR, A. (2018). Cyclophosphamide İle İndüklenmiş Ratlarda Karaciğer Enzimleri (AST, ALT, ALP) ve Histopatolojisi Üzerine Naringin'in Protektif Etkileri. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, *13*(2), 182-190.

Bülbüller, N., Doğru, O., Umaç, H., Gürsu, F., & Akpolat, N. (2005). The effects of melatonin and pentoxiphylline on L-arginine induced acute pancreatitis. *Ulusal Travma ve Acil Cerrahi Dergisi= Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery: TJTES*, *11*(2), 108-114.

Büyükuslu, N., & Yiğitbaşı, T. (2015). Reaktif oksijen türleri ve obezitede oksidatif stres. *Clinical and Experimental Health Sciences*, *5*(3), 197-203.

Canbek, M., Uyanoglu, M., Canbek, S., Ceyhan, E., Ozen, A., Durmus, B., & Turgak, O. (2017). The effect of geraniol on liver regeneration after hepatectomy in rats. *in vivo*, *31*(2), 209-213.

Cardinali, D. P., Ladizesky, M. G., Boggio, V., Cutrera, R. A., & Mautalen, C. (2003). Melatonin effects on bone: experimental facts and clinical perspectives. *Journal of pineal research*, *34*(2), 81-87.

Chaudhry, H., Zhou, J., Zhong, Y. I. N., Ali, M. M., McGuire, F., Nagarkatti, P. S., & Nagarkatti, M. (2013). Role of cytokines as a double-edged sword in sepsis. *In vivo*, *27*(6), 669-684.

Chen, M., Huang, W., Wang, C., Nie, H., Li, G., Sun, T., ... & Gong, Q. (2014). High-mobility group box 1 exacerbates CCl4-induced acute liver injury in mice. *Clinical immunology*, *153*(1), 56-63

Colak, E., Ustuner, M. C., Tekin, N., Colak, E., Burukoglu, D., Degirmenci, I., & Gunes, H. V. (2016). The hepatocurative effects of Cynara scolymus L. leaf extract on carbon tetrachloride-induced oxidative stress and hepatic injury in rats. *SpringerPlus*, *5*(1), 1-9.

Cornelli, U. (2009). Antioxidant use in nutraceuticals. *Clinics in dermatology*, *27*(2), 175-194.

Cosgun, B. E., Erdemli, M. E., Gul, M., Gul, S., Bag, H. G., Erdemli, Z., & Altinoz, E. (2019). Crocin (active constituent of saffron) improves CCl4-induced liver damage by modulating oxidative stress in rats. *Turkish Journal of Biochemistry*, *44*(3), 370-378.

Cui, Y., Han, Y., Yang, X., Sun, Y., & Zhao, Y. (2013). Protective effects of quercetin and quercetin-5', 8-disulfonate against carbon tetrachloride-caused oxidative liver injury in mice. *Molecules*, *19*(1), 291-305.

Çapan, Z., & FÖ, Y. (2010). Karaciğer hastalıkları ve anestezi. *Organ sistemleri ve Anestezi. Güneş Tıp Kitabevleri*, 125-41.

Çavdar, C., Sifil, A., & Çamsarı, T. (1997). Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Türk nefroloji diyaliz ve transplantasyon dergisi*, *3*(4), 92-95.

Çimen, Ç., Çiğdem, Ö. T. E. R., Demir, H., & Savran, A. (2005). Rat Eritrositlerinden Elde Edilen Katalaz Enziminin Karekterizasyonu Ve Kinetiğinin İncelenmesi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, *16*(1), 15-20.

Czechowska, G., Celinski, K., Korolczuk, A., Wojcicka, G., Dudka, J., Bojarska, A., & Reiter, R. J. (2015). Protective effects of melatonin against thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. *J Physiol Pharmacol*, *66*(4), 567-79.

Debnath, S., Ghosh, S., & Hazra, B. (2013). Inhibitory effect of Nymphaea pubescens Willd. flower extract on carrageenan-induced inflammation and CCl4-induced hepatotoxicity in rats. *Food and chemical toxicology*, *59*, 485-491.

Delgado-Montemayor, C., Cordero-Pérez, P., Salazar-Aranda, R., & Waksman-Minsky, N. (2015). Models of hepatoprotective activity assessment. *Medicina universitaria*, *17*(69), 222-228.

Demiralp, T. (2021). *Sıçanlarda karbon tetraklorürün (CCl4) böbrekte oluşturduğu hasara karşı dekspantenolün (provitamin B5) koruyucu etkisinin biyokimyasal açıdan araştırılması*(Master's thesis, İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü).

Deniz, A., Baltaci, S. B., Baltaci, A. K., Mogulkoc, R., & Avunduk, M. C. (2018, January). The Effect Of Pinealectomy And Melatonin Application On Metallothionin, Znt3 And ZIP2 Levels İn Rat Brain Tissue. In *Neuroendocrınology* (Vol. 107, Pp. 13-13). Allschwılerstrasse 10, Ch-4009 Basel, Swıtzerland: Karger.

Dertli, B. (2012). *Farelerde karbon tetraklorür ile karaciğer hasarı oluşturulması üzerine proanthocyanidinin koruyucu etkisinin araştırılması* (Master's thesis, Sağlık Bilimleri Enstitüsü).

De Zwart, L. L., Meerman, J. H., Commandeur, J. N., & Vermeulen, N. P. (1999). Biomarkers of free radical damage: applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, *26*(1-2), 202-226.

Dhainaut, J. F., Marin, N., Mignon, A., & Vinsonneau, C. (2001). Hepatic response to sepsis: interaction between coagulation and inflammatory processes. *Critical care medicine*, *29*(7), S42-S47.

Dinler, K., HASDEMİR, A., Cavit, Ç. Ö. L., GÜNDÜZ, B., BUĞDAYCI, G., & KÜKNER, A. (2008) İNTRAPERİTONEAL MELATONİN ENJEKSİYONU VE PİNEALEKTOMİNİN DENEYSEL AKUT PANKREATİTE ETKİSİ. *Journal of Istanbul Faculty of Medicine*, *72*(3).
Calvo, J., & Boya, J. (1985). Ultrastructure of the rat pineal stalk. *Cells Tissues Organs*, *123*(3), 172-177.

Diplock, A. (1998). Healty lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. *ILSI Europe concise monograph series*, *59*.

Dolar E (2002). Klinik Karaciğer Hastalıkları, Nobel&Güneş Tıp Kitabevi, 1.Baskı, 4, 133-146.

DUYGU FEVZİYE Vural, D. F., Cebesoy, S., Ozerkan, D., & Eyison, H. M. (2017). The effect of melatonine on rats gastrocnemius muscle applied with carbon tetrachloride (CCl4). *J Entomol Zool Stud*, *5*(3), 441-7.

Düzgüner, V. (2005). *Deneysel olarak diyabet oluşturulan tavşanlarda çinkonun LİPİD peroksidasyonu ve antioksidan sisteme etkisi* (Master's thesis, Sağlık Bilimleri Enstitüsü).

Colak, E., Ustuner, M. C., Tekin, N., Colak, E., Burukoglu, D., Degirmenci, I., &
Gunes, H. V. (2016). The hepatocurative effects of Cynara scolymus L. leaf extract on carbon tetrachloride-induced oxidative stress and hepatic injury in rats. *SpringerPlus*, *5*(1), 1-9.

Ellman, G. L. (1959). Arch Biochem Biophys, № 82.

Erel, O. (2004). A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical biochemistry*, *37*(2), 112-119.

Erel, O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical biochemistry*, *38*(12), 1103-1111.

Esteban-Zubero, E., López-Pingarrón, L., Alatorre-Jiménez, M. A., Ochoa-Moneo, P., Buisac-Ramon, C., Rivas-Jimenez, M., ... & Reiter, R. J. (2017). Melatonin's role as a co-adjuvant treatment in colonic diseases: A review. *Life sciences*, *170*, 72-81.

Fahmy, S. R., Hamdi, S. A., & Abdel-Salam, H. A. (2009). Curative effect of dietary freshwater and marine crustacean extracts on carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity. *Aust J Basic Appl Sci*, *3*, 2118-2129.

Fathy, M., Khalifa, E. M., & Fawzy, M. A. (2019). Modulation of inducible nitric oxide synthase pathway by eugenol and telmisartan in carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *Life sciences*, *216*, 207-214.

Fausto, N., & Campbell, J. S. (2003). The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mechanisms of development*, *120*(1), 117-130.

Federico, A., Morgillo, F., Tuccillo, C., Ciardiello, F., & Loguercio, C. (2007). Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *International journal of cancer*, *121*(11), 2381-2386.

Ferguson, S. A., Rajaratnam, S. M., & Dawson, D. (2010). Melatonin agonists and insomnia. *Expert review of neurotherapeutics*, *10*(2), 305-318.

Fickert P, Zatloukal K (2000). Pathogenesis of alcoholic liver disease, handbook of Alcoholism (Editors Zernig G, Saria A, Kurz M, O'Malley SS) Boca Raton, FL CRCPress, 317-323.

Freeman, B. A., & Crapo, J. D. (1982). Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, *47*(5), 412-426.

Friedman, S. L. (2008). Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiological reviews*, *88*(1), 125-172.

Forster, P., Ramaswamy, V., Artaxo, P., Berntsen, T., Betts, R., Fahey, D. W., ... & Van Dorland, R. (2007). Changes in atmospheric constituents and in radiative forcing. Chapter 2. In *Climate change 2007. The physical science basis*.

Galano, A., Tan, D. X., & Reiter, R. J. (2011). Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. *Journal of pineal research*, *51*(1), 1-16.

Gedik, S., Erdemli, M. E., Gul, M., Yigitcan, B., Bag, H. G., Aksungur, Z., & Altinoz, E. (2017). Hepatoprotective effects of crocin on biochemical and histopathological alterations following acrylamide-induced liver injury in Wistar rats. *Biomedicine & pharmacotherapy*, *95*, 764-770.

Geerts, A. (2001). History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. In *Seminars in liver disease* (Vol. 21, No. 03, pp. 311-336). Copyright© 2001 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA. Tel.:+ 1 (212) 584-4662.

GENCER, Y., ÇINAR, D. A., & COMBA, B. (2015). Stresin ratlarda bazı karaciğer enzimleri (AST, ALT, ALP) üzerine etkilerinin araştırılması. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, *10*(1), 21-26.

Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F., & Scaccini, C. (2000). Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radical Biology and Medicine*, *29*(11), 1106-1114.

Giannini, E. G., Testa, R., & Savarino, V. (2005). Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *Cmaj*, *172*(3), 367-379.

Gnanadesigan, M., Ravikumar, S., & Anand, M. (2017). Hepatoprotective activity of Ceriops decandra (Griff.) Ding Hou mangrove plant against CCl4 induced liver damage. *Journal of Taibah University for Science*, *11*(3), 450-457.

Gochee, P. A., Jonsson, J. R., Clouston, A. D., Pandeya, N., Purdie, D. M., & Powell, E. E. (2003). Steatosis in chronic hepatitis C: Association with increased messenger RNA expression of collagen I, tumor necrosis factor-α and cytochrome P450 2E1. *Journal of gastroenterology and hepatology*, *18*(4), 386-392.

Gómez-Moreno, G., Guardia, J., Ferrera, M. J., Cutando, A., & Reiter, R. J. (2010). Melatonin in diseases of the oral cavity. *Oral diseases*, *16*(3), 242-247.

Grays, H. (1985). Anatomy of the human body. 30th American edition. Clemente C, editor.

Gutteridge, J. M. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical chemistry*, *41*(12), 1819-1828.

Gürdöl, F., & Ademoğlu, E. (2010). Biyokimya. *İkinci baskı. Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti*.

Güven, A., Gülmez. M., 2003. The effect of kefir on the activities of GSH-Px, GST, CAT, GSH and LPO levels in carbon tetrachloride-induced mice tissues. J Vet Med B, 50: 412–416.

Güven, A., Güven, A., & Gülmez, M. (2003). The effect of kefir on the activities of GSH-Px, GST, CAT, GSH and LPO levels in carbon tetrachloride-induced mice tissues. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, *50*(8), 412-416.

GÜVEN, A., & YILMAZ, S. (2005). The effect of carbon tetrachloride $(CCl_4) $ AND ETHANOL $(C_2H_5OH) $ on the determination of levels glutathione peroxidase, catalase, glucose-6-phosphate dehidrogenase and lipid peroxidation liver and kidney in the goose. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, *11*(2), 113-117.

Gyamfi, M. A., Ohtani, I. I., Shinno, E., & Aniya, Y. (2004). Inhibition of glutathione S-transferases by thonningianin A, isolated from the African medicinal herb, Thonningia sanguinea, in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, *42*(9), 1401-1408.

Hadisoewignyo, L., Soeliono, I., Hartono, S. B., Hestianah, E. P., & Mahanani, S. R. (2019). Hepatoprotective effects of Curcumin-Mesoporous Silica Nanoparticles on CCl 4-induced Hepatotoxicity Wistar rats. *Indonesian Journal of Pharmacy*, *30*(2), 114-121.

Halliwell, B., & Gutteridge, J. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical journal*, *219*(1), 1.

Halliwell, B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *The American journal of medicine*, *91*(3), S14-S22.

Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?. *The lancet*, *344*(8924), 721-724.

Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press, USA.

Hayashi, M., Yamamoto, K., Yoshimura, M., Kishimoto, T., & Shitara, A. (1993). Effects of fasting on distribution and excretion of lead following long-term lead exposure in rats. *Archives of environmental contamination and toxicology*, *24*(2), 201-205.

Hayes, J. D., & McLellan, L. I. (1999). Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free radical research*, *31*(4), 273-300.

Hernandez-Munoz, R., Diaz Munoz, M., Lopez, V., Lopez-Barrera, F., Yanez, L., Virdio, S., 1997. Balance between oxidative damage and proliferative potential in anexperimental rat model of CCl4-induced cirrhosis, protective role of adonesineadministration. Hepatology, 26: 1100-1110.

Hirsch-Rodriguez, E., Imbesi, M., Manev, R., Uz, T., & Manev, H. (2007). The pattern of melatonin receptor expression in the brain may influence antidepressant treatment. *Medical hypotheses*, *69*(1), 120-124.

Hong, R. T., Xu, J. M., & Mei, Q. (2009). Melatonin ameliorates experimental hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *World journal of gastroenterology: WJG*, *15*(12), 1452.

Hsiao, G., Lin, Y. H., Lin, C. H., CHOU, D. S., LIN, W. C., & SHEU, J. R. (2001). The protective effects of PMC against chronic carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in vivo. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *24*(11), 1271-1276.

Ingawale, D. K., Mandlik, S. K., & Naik, S. R. (2014). Models of hepatotoxicity and the underlying cellular, biochemical and immunological mechanism (s): a critical discussion. *Environmental toxicology and pharmacology*, *37*(1), 118-133.

Jing, Y., Diao, Y., & Yu, X. (2019). Free radical-mediated conjugation of chitosan with tannic acid: Characterization and antioxidant capacity. *Reactive and Functional Polymers*, *135*, 16-22.

Johansen, J. S., Harris, A. K., Rychly, D. J., & Ergul, A. (2005). Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovascular diabetology*, *4*(1), 1-11.
Jansonius, J. N. (1998). Structure, evolution and action of vitamin B6-dependent enzymes. *Current opinion in structural biology*, *8*(6), 759-769.

Joshi, B. C., Prakash, A., & Kalia, A. N. (2015). Hepatoprotective potential of antioxidant potent fraction from Urtica dioica Linn.(whole plant) in CCl4 challenged rats. *Toxicology reports*, *2*, 1101-1110.

Jung, J., Zheng, M., Goldfarb, M., & Zaret, K. S. (1999). Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science*, *284*(5422), 1998-2003.

Junqueira, L. C., & Carneiro, J. (2003). Basic Histology, text & atlas, MC Graw Hill

Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Basic histology: text & atlas: McGraw-Hill New York; 2003.

Kaplowitz, N., Fernandez-Checa, J. C., & Oochktens, N. (1989). Glutathione, alcohol and hepatotoxicity in nutrition and origins of disease. *Halsted CH, Rucker RB*.

Karabulut, H., & Gülay, M. Ş. (2016). Antioksidanlar. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 1 (1), 65-76.

KARAKAN, M., & NAZLIKUL, H. (2017). Oksidatif stres ve serbest radikallerin vücut üzerindeki etkisi. *Bilimsel Tamamlayıcı Tıp Regülasyon ve Nöral Terapi Dergisi*, *11*(2), 7-11.

Karbownik, M., Tan, D. X., Manchester, L. C., & Reiter, R. J. (2000). Renal toxicity of the carcinogen δ-aminolevulinic acid: antioxidant effects of melatonin. *Cancer letters*, *161*(1), 1-7.

Karadeniz, A., Yıldırım, A., Karakoç, A., Kalkan, Y. I. L. D. I. R. A. Y., & Celebi, F. (2009). Protective effect of Panax ginseng on carbon tetrachloride induced liver, heart and kidney injury in rats. *Rev Med Vet*, *160*(5), 237-243.

Kuş, İ., & Sarsılmaz, M. (2002). Pineal bezin morfolojik yapısı ve fonksiyonları. *T Klin J Med Sci*, *22*, 221-226.

Karakuş, F. (2015). *Endojen Melatoninin ve Pinealektomili Ratlarda Eksojen Melatoninin Organofosfat* İnsektisit Fenthion *ile Oluşturulan Toksisite Üzerine Koruyucu Etkisi* (Master's thesis, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü).

Karaöz E (2002) Özel Histoloji, SDÜ Basımevi, Isparta.

Kasnak, C., & Palamutoğlu, R. (2015). Doğal antioksidanların sınıflandırılması ve insan sağlığına etkileri. *Türk tarım-gıda bilim ve teknoloji dergisi*, *3*(5), 226-234.

Kayaalp, O. 2002. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 10. Baskı, Hacettepe Taş.

Kepekçi, R. A., Polat, S., Çelik, A., Bayat, N., & Saygideger, S. D. (2013). Protective effect of Spirulina platensis enriched in phenolic compounds against hepatotoxicity induced by CCl4. *Food chemistry*, *141*(3), 1972-1979.

Keskin, A. (2020). EGZERSİZ YAPTIRILAN RATLARDA MELATONİN VE NİASİN DESTEĞİNİN LİPİT PEROKSİDASYONU VE ANTİOKSİDAN SİSTEME ETKİSİ.

Kılınç, K. (1985). Oksijen radikalleri: üretilmeleri, fonksiyonları ve toksik etkileri. *Biyokimya Dergisi*, *10*, 60-89.

King, P. D., & Perry, M. C. (2001). Hepatotoxicity of chemotherapy. *The oncologist*, *6*(2), 162-176.

Kleszczynski, K., & Fischer, T. W. (2012). Melatonin and human skin aging. *Dermato-endocrinology*, *4*(3), 245-252.

Koçak, Y. (2019). Sıçanlarda karbon tetraklorür ile oluşturulan karaciğer hasarında allium schoenoprasum L.(sirmo) bitkisi etanol ekstresinin antioksidan ve sitoprotektif etkilerinin incelenmesi.

KOÇAK, Y., Gökhan, O. T. O., MERCAN, U., YAŞAR, S., & ARİHAN, O. (2019). Karbon tetraklorür ile Oluşturulan Doku Hasarında Allium schoenoprasum L. Uygulamasının Karaciğer ve Böbrek dokusunda Total Antioksidan ve Total Oksidan Düzeyine Etkisi. *Van Sağlık Bilimleri Dergisi*, *12*(3), 1-10.

Konturek, S. J., Konturek, P. C., Brzozowska, I., Pawlik, M., Sliwowski, Z., Cześnikiewicz-Guzik, M., ... & Pawlik, W. W. (2007). Localization and biological activities of melatonin. *J. Physiol. Pharmacol*, *58*(3), 381-405.

Kose, N., Yamamoto, K., Sai, Y., Isawa, M., Suwa, T., & Nakashima, E. (2005). Prediction of theophylline clearance in CCl4-treated rats using in vivo CYP1A2 and CYP3A2 contents assessed with the PKCYP test. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, *20*(3), 168-176.

Korkmaz, A., Topal, T., Tan, D. X., & Reiter, R. J. (2009). Role of melatonin in metabolic regulation. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, *10*(4), 261-270.

Köykun, Z. (2012). *Sıçanlarda pinealektomi ve melatonin uygulamasının kan ve dokulardaki çeşitli element düzeyleri üzerine etkisi* (Master's thesis, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü).

Kumar, V., Abbas, A., Fausto, N., 2005. Pathologic Basis of Disease. 7nd Ed. China:

Elsevier Saunders. 1525

Larsen, W. J., Schoenwolf, G. C., Bleyl, S. B., Brauer, P. R., & Francis-West, P. H. (2009). *Larsen's human embryology*. Churchill Livingstone.

Lavanya, G., Sivajyothi, R., Manjunath, M., Parthasarathy, PR., 2009. Fate of biomoleculesduring carbon tetrachloride induced oxidative stress and protective nature of ammoniac baccifera linn. A natural antioxidant. Int J Green Pharma, 3: 300-305

Lecavalier, P. R., Chu, I., Villeneuve, D., & Valli, V. E. (1994). Combined effects of mercury and hexachlorobenzene in the rat. *Journal of Environmental Science & Health Part B*, *29*(5), 951-961.

Lee, K. J., Choi, J. H., & Jeong, H. G. (2007). Hepatoprotective and antioxidant effects of the coffee diterpenes kahweol and cafestol on carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. *Food and Chemical Toxicology*, *45*(11), 2118-2125.
Li, C., & Zhou, X. (2015). Melatonin and male reproduction. *Clinica Chimica Acta*, *446*, 175-180.

Lin, X., Zhang, S., Huang, Q., Wei, L., Zheng, L., Chen, Z., ... & Huang, R. (2012). Protective effect of Fufang-Liu-Yue-Qing, a traditional Chinese herbal formula, on CCl4 induced liver fibrosis in rats. *Journal of ethnopharmacology*, *142*(2), 548-556.

Lingli , A. L., Li, G. H., Li, Y. R., Wu, X. Y., Ren, D. M., Lou, H. X., ... & Shen, T. (2019). Lignan and flavonoid support the prevention of cinnamon against oxidative stress related diseases. *Phytomedicine*, *53*, 143-153.

Lowry, O.H., et al., (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent", *Journal of biological chemistry*, 193: p. 265-275

McIntyre, N., & Rosalki, S. (1992). Biochemical investigations in the management of liver disease. In *Hepatobiliary diseases* (pp. 39-71). Springer, Berlin, Heidelberg.

McCord, J. M. (1993). Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clinical biochemistry*, *26*(5), 351-357.

Mc Gee, S. A., Wıggıns, S. A., & Pıerce, D. (2003). What advanced practise nurses to know about free radicals. *The internet journal of advanced nursing practice*, *6*, 1-10.

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

Messner, D. J., Murray, K. F., & Kowdley, K. V. (2012). Mechanisms of hepatocyte detoxification. In *Physiology of the gastrointestinal tract* (pp. 1507-1527). Academic Press.

Mitchell, J. B., & Russo, A. (1987). The role of glutathione in radiation and drug induced cytotoxicity. *The British journal of cancer. Supplement*, *8*, 96.

Moore, K. L., Dalley, A. F. (2007). Klinik Yönleriyle Anatomi. K. Şahinoğlu (Çev.), İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri.

Naaz, F., Javed, S., & Abdin, M. Z. (2007). Hepatoprotective effect of ethanolic extract of Phyllanthus amarus Schum. et Thonn. on aflatoxin B1-induced liver damage in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, *113*(3), 503-509.

Ning, Qian-Ji, Shao-Wei Qin, and Cun-Shuan Xu. "Expression patterns and action analysis of genes associated with drug-induced liver diseases during rat liver regeneration." *World Journal of Gastroenterology: WJG* 12.43 (2006): 6966.

Nishida, S. (2005). Metabolic effects of melatonin on odative stress and dbetes mellitus. *Endocrine*, *27*(2), 131-135.

Northover JM, Terblanche J. A new look at the arterial supply of the bile duct in man and its surgical implications. The British journal of surgery. 1979;66(6):379-84.

Nordberg, J., & Arnér, E. S. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free radical biology and medicine*, *31*(11), 1287-1312.

Ogeturk, M., Kus, I., Kavakli, A., Oner, J., Kukner, A., & Sarsilmaz, M. (2005). Reduction of carbon tetrachloride-induced nephropathy by melatonin administration. *Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease*, *23*(2), 85-92.

Oh, W. Y., Pyo, S., Lee, K. R., Lee, B. K., Shin, D. H., Cho, S. I., & Lee, S. M. (2003). Effect of Holotrichia diomphalia larvae on liver fibrosis and hepatotoxicity in rats. *Journal of ethnopharmacology*, *87*(2-3), 175-180.

Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, *95*(2), 351-358.

Olakunle Ajiboye, T. (2011). In vivo antioxidant potentials of Piliostigma thonningii (Schum) leaves: studies on hepatic marker enzyme, antioxidant system, drug detoxifying enzyme and lipid peroxidation. *Human & experimental toxicology*, *30*(1), 55-62.

Onat, T., Emerk, K., & Sözmen, E. Y. (2002). İnsan biyokimyası. *Palme yayıncılık*, *666*.
Orrego, H. J. L. A., Blake, J. E., Blendis, L. M., & Medline, A. (1987). Prognosis of alcoholic cirrhosis in the presence and absence of alcoholic hepatitis. *Gastroenterology*, *92*(1), 208-214.

Oyagbemi, A. A., Omobowale, O. T., Asenuga, E. R., Akinleye, A. S., Ogunsanwo, R. O., & Saba, A. B. (2016). Cyclophosphamide-induced hepatotoxicity in wistar rats: the modulatory role of gallic acid as a hepatoprotective and chemopreventive phytochemical. *International journal of preventive medicine*, *7*.

Ozougwu, J. C. (2017). Physiology of the liver. *International Journal of Research in Pharmacy and Biosciences*, *4*(8), 13-24

Ozturk, I. C., Ozturk, F., Gul, M., Ates, B., & Cetin, A. (2009). Protective effects of ascorbic acid on hepatotoxicity and oxidative stress caused by carbon tetrachloride in the liver of Wistar rats. *Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease*, *27*(5), 309-315.

Ögetürk, M., Çolakoğlu, N., Kuş, M. A., Kuş, İ., & Sarsilmaz, M. (2009). Karbon tetraklorür ile oluşturulan deneysel akciğer hasarında kafeik asit fenetil esterin koruyucu etkinliği. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi*, *23*(2), 57-61.

Ölmez, E., Şahna, E., Ağkadir, M., & Acet, A. (2000). Melatonin: Emeklilik Yaşı 80 Olur mu?.

Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G., & Yönden, Z. (2015). Oksidatif stres ve hücre içi lipit, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, *6*(3), 331-336.

Özerkan, D., Özsoy, N., & Yılmaz, E. (2015). Vitamin D and melatonin protect the cell's viability and ameliorate the CCl4 induced cytotoxicity in HepG2 and Hep3B hepatoma cell lines. *Cytotechnology*, *67*(6), 995-1002.

Öztürk, A. (2017). *Pinealektomize edilmiş septik sıçanlarda karaciğer ve böbrek TNF-α, IL-6, IL-10 VE IL-1β gen ekspresyonu ve plazma düzeylerindeki değişimlerin araştırılması*(Master's thesis, Sağlık Bilimleri Enstitüsü).

Pancar, Z. (2020). Sıçanlarda enerji içeceği uygulaması ile treadmill egzersizinin angptl8, elabela, serbest radikaller, antioksidanlar ve lipit metabolizması üzerine etkisi.

Parola, M., & Robino, G. (2001). Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *Journal of hepatology*, *35*(2), 297-306.

Parola, M., Marra, F., & Pinzani, M. (2008). Myofibroblast–like cells and liver fibrogenesis: emerging concepts in a rapidly moving scenario. *Molecular aspects of medicine*, *29*(1-2), 58-66.

Perek S SK. Karaciğer hastalıkları. Cerrahi Gastroenteroloji. 7 ed. Değerli Ü EY, editor. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2005.

Pereira, N., Naufel, M. F., Ribeiro, E. B., Tufik, S., & Hachul, H. (2020). Influence of dietary sources of melatonin on sleep quality: a review. *Journal of food science*, *85*(1), 5-13.

Poli, G. (2000). Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Molecular aspects of medicine*, *21*(3), 49-98.

Pratt, D. S., & Kaplan, M. M. (2000). Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients. *New England Journal of Medicine*, *342*(17), 1266-1271.

Quiroz, Y., Ferrebuz, A., Romero, F., Vaziri, N. D., & Rodriguez-Iturbe, B. (2008). Melatonin ameliorates oxidative stress, inflammation, proteinuria, and progression of renal damage in rats with renal mass reduction. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, *294*(2), F336-F344.

Ross, M. H., & Pawlina, J. L. (2014). Histology A Text and Atlas: Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas. *Gastrointestinal Sistem Histolojisi içinde*, *6*, 622-626.

Reiter, R. J. (1991). Melatonin: that ubiquitously acting pineal hormone. *Physiology*, *6*(5), 223-227.
Reiter, R. J. (1993). Electromagnetic fields and melatonin production. *Biomedicine & pharmacotherapy*, *47*(10), 439-444.

Reiter, R. J., Tan, D. X., Manchester, L. C., & Qi, W. (2001). Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species. *Cell biochemistry and biophysics*, *34*(2), 237-256.

Reiter, R. J., Carneiro, R. C., & Oh, C. S. (1997). Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Hormone and Metabolic Research*, *29*(08), 363-372.

Rezzani, R., Rodella, L. F., Favero, G., Damiani, G., Paganelli, C., & Reiter, R. J. (2014). Attenuation of ultraviolet A-induced alterations in NIH 3 T 3 dermal fibroblasts by melatonin. *British Journal of Dermatology*, *170*(2), 382-391.

Rodriguez, C., Mayo, J. C., Sainz, R. M., Antolín, I., Herrera, F., Martín, V., & Reiter, R. J. (2004). Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *Journal of pineal research*, *36*(1), 1-9.

Roseboom, P. H., Coon, S. L., Baler, R., McCune, S. K., Weller, J. L., & Klein, D. C. (1996). Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. *Endocrinology*, *137*(7), 3033-3044.

Ross MH, Pawlina W. Histoloji / Konu Anlatımı ve Atlas, İlişkili Hücre Biyolojisi ve Moleküler Biyoloji ile. 6 ed. Ankara: Palme Yayıncılık; 2014

Ross, M. H., & Pawlina, J. L. (2014). Histology A Text and Atlas: Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas. *Gastrointestinal Sistem Histolojisi içinde*, *6*, 622-626.

S S. Gray's Anatomy – International Edition 40 ed: Elsevier Publishing; 2008.

Sadler, T. W. (2018). *Langman's medical embryology*. Lippincott Williams & Wilkins.

Salehi, B., Sharopov, F., Fokou, P. V. T., Kobylinska, A., Jonge, L. D., Tadio, K., ... & Iriti, M. (2019). Melatonin in medicinal and food plants: occurrence, bioavailability, and health potential for humans. *Cells*, *8*(7), 681.

Sánchez-Valle, V., C Chavez-Tapia, N., Uribe, M., & Méndez-Sánchez, N. (2012). Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review. *Current medicinal chemistry*, *19*(28), 4850-4860.

Sarikaya, E. (2020). Abortus imminens hastalarında lipid peroksidasyonu (MDA) ve bazı antioxidant (Sod, gsh, gpx ve cat) aktivitelerin araştırılması.

Sefi, M., Troudi, A., Hamida, F. B., Soudani, N., Boudawara, T., & Zeghal, N. (2013). Protective effects of Artemisia campestris upon fenthion-induced nephrotoxicity in adult rats and their progeny. *General physiology and biophysics*, *32*(4), 577-588.

Seven, A., & Candan, G. (1996). Antioksidant defense systems. *Cerrahpaşa J Med*, *27*, 41-50.

Sezer, K., & Keskin, M. (2014). Serbest oksijen radikallerinin hastalıkların patogenezisindeki rolü. *FÜ Sağ. Bil. Vet. Dergisi*, *28*(1), 49-56.

Sheweita, S. A., Abd, El-Gabar M., and Bastaway, M. 2001. Carbon Tetrachloride Changes the Activity of Cytochrome p450 System in the Liver of Male Rats: Role of Antioxidants.Toxicology , 169; 83-92.

Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology: Translation and Integration*, *82*(2), 291-295.

Sifuentes-Franco, S., Pacheco-Moisés, F. P., Rodríguez-Carrizalez, A. D., & Miranda-Díaz, A. G. (2017). The role of oxidative stress, mitochondrial function, and autophagy in diabetic polyneuropathy. *Journal of diabetes research*, *2017*.

Stanciu, A. E., Zamfir-Chiru-Anton, A., Stanciu, M. M., Stoian, A. P., Jinga, V., Nitipir, C., ... & Drakoulis, N. (2020). Clinical significance of serum melatonin in predicting the severity of oral squamous cell carcinoma. *Oncology letters*, *19*(2), 1537-1543.

Starkel, P., & Leclercq, I. A. (2011). Animal models for the study of hepatic fibrosis. *Best practice & research Clinical gastroenterology*, *25*(2), 319-333.

Stokkan, K. A., Reiter, R. J., Nonaka, K. O., Lerchl, A., Yu, B. P., & Vaughan, M. K. (1991). Food restriction retards aging of the pineal gland. *Brain research*, *545*(1-2), 66-72.
Sürücü, N. M. (2018). *Sıçan karaciğerinde karbon tetraklorür (CCl4)ün oluşturduğu hasara karşı doğu çitlembiğinin (celtis tournefortii) koruyucu etkisi* (Master's thesis, Eğitim Bilimleri Enstitüsü).

Sun, Y. I., Oberley, L. W., & Li, Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical chemistry*, *34*(3), 497-500.

Szymonik-Lesiuk, S., Czechowska, G., Stryjecka-Zimmer, M., Słomka, M., MĄldro, A., Celiński, K., & Wielosz, M. (2003). Catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activities in various rat tissues after carbon tetrachloride intoxication. *Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery*, *10*(4), 309-315.

Şener, G. (2010). Karanlığın hormonu: melatonin. *Marmara Pharmaceutical Journal*, *14*(3), 112-120.

Şentürk, H., Canbakan, B., & Hatemi, İ. (2004). Karaciğer enzim yüksekliklerine klinik yaklaşım. *İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Gastroenteroloji Klinik Yaklaşım Sempozyum Dizisi, İstanbul*, *38*, 9-13.

Tahan, G., Akin, H., Aydogan, F., Ramadan, S. S., Yapicier, O., Tarcin, O., ... & Zengin, K. (2010). Melatonin ameliorates liver fibrosis induced by bile-duct ligation in rats. *Canadian Journal of Surgery*, *53*(5), 313.

Tan, D. X. (1993). Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr j*, *1*, 57-60.

Taner, D. (Ed.) (2017). Fonksiyonel Anatomi Ekstremiteler ve Sırt Bölgesi (11. Baskı). Ankara: HYB Basım Yayın.

Taslidere, E., Esrefoglu, M., Elbe, H., Cetin, A., & Ates, B. (2014). Protective effects of melatonin and quercetin on experimental lung injury induced by carbon tetrachloride in rats. *Experimental lung research*, *40*(2), 59-65.

Tekkes, Y. (2006). Streptozotosin ile diabet oluşturulmuş farelerde aspirin ve E vitaminin dokularda lipid peroksidasyonu ve antioksidan sisteme etkisinin araştırılması. *Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*.

Thrall, K. D., Vucelick, M. E., Gies, R. A., Zanger, R. C., Weitz, K. K., Poet, T. S., Springer, D. L., Grant, D. M., Benson, J. M., 2000. Comparative metabolism of carbon tetrachloride in rats, mice, and hamsters using gas uptake and PBPK modeling. Journal of Toxicology and Environmental Health A, 60: 531-548.

Tirkey, N., Pilkhwal, S., Kuhad, A., and Chopra, K. 2005. Hesperidin, a citrus bioflavonoid, decreases the oxidative stres produced by carbontetrachloride in rat liver and kidney. BioMed Central pharmacology & toxicology, 5; 2.

Trefts E, Gannon M, Wasserman DH. Primer The liver. Current Biology. 2017; 27: 1141– 55.

Turgut, K. (2000). Veteriner klinik laboratuvar teşhis. *Bahçıvanlar Basım Sanayi AŞ. Konya*, *885*.

Turgut, M., Baka, M., & Yurtseven, M. (2002). Pineal gland'dan salgılanan bir nörohormon olan melatoninin etkileri. *Arşiv*, *11*, 453-70.

Tür, L. (2008). Karbon Tetraklorür ile Karaciğer Hasarı Oluşturulan Ratlarda Matricaria Chamomilla L. nin Karaciğer Üzerine Koruyucu Etkilerinin Araştırılması.

Ustuner, D., Colak, E., Dincer, M., Tekin, N., Burukoglu Donmez, D., Akyuz, F., ... & Ustuner, M. C. (2018). Posttreatment effects of Olea europaea L. leaf extract on carbon tetrachloride-induced liver injury and oxidative stress in rats. *Journal of medicinal food*, *21*(9), 899-904.

Van Eyken, P., & Desmet, V. J. (1993). Cytokeratins and the liver. *Liver*, *13*(3), 113-122.

Weissbach, H. (1960). Biosynthesis of melatonin: enzymic conversion of serotonin to Nacetylserotonin. *Biochem. Biophys. Acta*, *43*, 352-353.

Wu, J. Q., Kosten, T. R., & Zhang, X. Y. (2013). Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *46*, 200-206.

Wang, H., Wei, W., Wang, N. P., Gui, S. Y., Wu, L., Sun, W. Y., & Xu, S. Y. (2005). Melatonin ameliorates carbon tetrachloride-induced hepatic fibrogenesis in rats via inhibition of oxidative stress. *Life sciences*, *77*(15), 1902-1915.

Yang, S. Q., Lin, H. Z., Lane, M. D., Clemens, M., & Diehl, A. M. (1997). Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *94*(6), 2557-2562.

YILDIZ, H., & ÖZTÜRK, E. (2020). Histopathological and Biochemical Effects of Eugenol on Alcohol-Treated Rat Liver. *Adıyaman University Journal of Science*, *10*(1), 83-99.

Zorn, A. M. (2008). Liver development. StemBook, ed the stem cell research community, StemBook.

8. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Derya ACAR
Bilimsel etkinlikler	
Makaleler	Keel, R.M.A.H., Elbe, H., Gömceli, Y.B., Yiğittürk, G., Koca, O., Karayakali, M., Acar, D., Altınöz, E. (2022) "Treatment with crocin suppresses diabetic nephropathy progression via modulating TGF-β1 and oxidative stress in an experimental model of pinealectomized diabetic rats", Chemico-Biological Interactions, 351 (0) [SCI Expanded] DOI Çolak, T., Erdoğan, M., Acar, D., Rahova, G. (2021) "EVALUATION OF THE QUALITY OF LIFE LEVELS OF UNDERGRADUATE AND ASSOCIATE DEGREE STUDENTS STUDYING IN HEALTH DEPARTMENTS", ASEAN Journal of Psychiatry, 22 (7) pp. 1-7 [ESCI] Çolak, T., Erdoğan, M., Acar, D., Rahova, G., Çolak, S. (2021) "Comparison of the problem solving skills levels of health department students educed at undergraduate and associate degree level", Asean Journal of Psychiatry, 22 (7) pp. 1-7 [ESCI] Acar, D., Sivri, İ., Tavas, O., Çolak, T., Yener, M.D., Bamaç, B., Çolak, S. (2018) "Comparison Of Healthy Life Behavior Forms Of Undergraduate And Associate Students", TOJET: The Turkish Online Journal of Educational Technology, (0) pp. 312-316 Acar D., Çolak T., Çolak S., Güngör T., Yener M. D., Aksu E., … Örs A. (2017). "The Comparison of Self-Efficacy Belief Levels on Anatomy Education between the Undergraduate Students from Physical Therapy and Rehabilitation Department and the Associate Students from Vocational School of Health Services in Western Black Sea Region". Journal of Education and Learning, 6(3), 151-156. (Yayın No: 3846895 (İndeks: Eric) Özmen, T., Aydoğmuş, M., Doğan, H., Acar, D., Zoroğlu, T., Willems, M. (2016) "The Effect of Kinesio Taping on Muscle Pain Sprint Performance and Flexibility in Recovery from Squat Exercise in Young Adult Women", Journal of Sport Rehabilitation, 25 (1) pp. 7-12 [SCI Expanded]
Bildiriler	Acar, D., Sivri, İ., Tavas, O., Çolak, T., Yener, M.D., Bamaç, B., Çolak, S. (2018) ""“Comparison Of Healthy Life Behavior Forms Of Undergraduate And Associate Students”", INTE International Conference On New Horizons In Education , Paris, Fransa, (Temmuz 2018)

	Acar, D., Çolak, T., Çolak, S., Güngör, T., Yener, M.D., Aksu, E., Güzelordu, D. (2016) "Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon lisans ve Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu ön lisans öğrencilerinin Anatomi Eğitimi öz yeterlilik inanç düzeylerinin karşılaştırılması", International Congresses on Education ERPA , Saray Bosna, Bosna Hersek, (Haziran 2016) Özmen, T., Zoroğlu, T., Acar, D. (2015) "Futbolcularda gövde stabilitesi dinamik denge ve sıçrama performansı arasındaki ilişki", VIII. Ulusal Spor Fizyoterapistleri Kongresi , Türkiye, (Kasım 2015) Özmen, T., Gündüz, R., Doğan, H., Zoroğlu, T., Acar, D. (2014) "Kronik Bel Ağrılı Hastalarda Kinezyofobi ve Yaşam Kalitesi Arasındaki İlişki", XV. Fizyoterapide Gelişmeler Kongresi , Türkiye, (Nisan 2014)