

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**SIÇAN KARACİĞERİNDE KARBON TETRAKLORÜR (CCl₄) HASARINA
KARŞI MELATONİN VE D VİTAMİNİNİN OKSİDATİF STRES VE MMP-9
ÜZERİNE İN VİVO, İN VİTRO VE HİSTOKİMYASAL İNCELEMELER**

Dilşad ÖZERKAN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2014**

Her hakkı saklıdır

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

20.10.2014

Dilşad ÖZERKAN

ÖZET

Doktora Tezi

SIÇAN KARACİĞERİNDE KARBON TETRAKLORÜR (CCl₄) HASARINA KARŞI MELATONİN VE D VİTAMİNİNİN OKSİDATİF STRES VE MMP-9 ÜZERİNE İN VİVO, İN VİTRO VE HİSTOKİMYASAL İNCELEMELER

Dilşad ÖZERKAN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nesrin ÖZSOY ERDAŞ

Bu çalışmada CCl₄ ile oluşturulan karaciğer hasarına karşı melatonin (MEL) ve D Vitamininin (D Vit) iyileştirici ve koruyucu etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, 180-220gr ağırlığında 42 adet Wistar-Albino erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar, kontrol grupları (G1, G2), CCl₄ (G3), CCl₄+MEL (I) (G4), CCl₄+MEL (II) (G5), CCl₄+D Vit (I) (G6) ve CCl₄+D Vit (II) (G7) olmak üzere 7 gruba ayrıldı. Hepatik fibrozis CCl₄ verilerek oluşturuldu. CCl₄ enjeksiyonunun başlangıcından itibaren, G4 ve G5'e MEL; G6 ve G7'ye D Vit verildi. CCl₄ enjeksiyonunun kesilmesinin ardından, 2 hafta daha G5'e MEL ve G7'ye D Vit uygulamasına devam edildi. Deney sonunda sıçanlardan intrakardiyak kan alınarak, karaciğer dokuları çıkarıldı. Hepatik hasar, kan serum örneklerinin biyokimyasal analizi ve doku örneklerinde histopatolojik incelemelerle değerlendirildi. Doku homojenatlarında glutatyon (GSH), malondialdehit (MDA) ve süperoksit dismutaz (SOD) seviyeleri ölçüldü. MMP-9 ve dezmin aktiviteleri immünohistokimyasal incelemelerle saptandı. HepG2 ve Hep3B hücrelerinde canlılık MTT yöntemi ile belirlendi. Sonuç olarak, CCl₄ grubunda MDA seviyesinin arttığı GSH seviyesinin azaldığı izlendi. ALT, ALP, GGT, CHOL seviyeleri artarken, BA ve ALB değerlerinin düştüğü gözlemlendi. Histokimyasal olarak hepatosit dejenerasyonu, lobular dizilim bozukluğu, sinüzoidal dilatasyon, fokal nekrotik alanlar, hiperemi, glikojen kayıpları ve retiküler lif kalınlaşması belirlendi. Portal alan ve sentral ven çevresinde hepatik fibrozis gözlemlendi. Portal venler arasında köprüleşen fibröz septa izlendi. MMP-9 ve dezmin aktivitelerinde artış saptandı. Melatonin ve D Vitamini uygulamalarının hasarı kısmen telafi edilebildiği görüldü. *In vitro* olarak ta, hücre canlılığının korunduğu saptandı. Elde edilen bulgulara göre, CCl₄ ile oluşturulan karaciğer hasarına karşı hem melatoninin hem de D Vitamininin lipit peroksidasyonunu azalttığı ve antifibrotik rol oynayabildiği ileri sürülebilir.

Ekim 2014, 122 sayfa

Anahtar Kelimeler: Hepatik hasar, fibrozis, oksidatif stres, melatonin, D Vitamini, matriks metalloproteinaz-9

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

IN VIVO, IN VITRO AND HISTOCHEMICAL OBSERVATIONS OF
MELATONIN AND VITAMIN D ON OXIDATIVE STRESS AND MMP-9
AGAINST CARBON TETRACHLORIDE (CCl₄) DAMAGE IN RAT LIVER

Dilşad ÖZERKAN

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Nesrin ÖZSOY ERDAŞ

In this study investigation of the curative and protective effects of melatonin (MEL) and Vitamin D (Vit D) against liver injury induced by CCl₄ was aimed. 42 Wistar-Albino male rats weighing 180-220g were used in the experiment. Rats were divided into 7 groups: Controls (G1, G2), CCl₄ (G3), CCl₄+MEL (I) (G4), CCl₄+MEL (II) (G5), CCl₄+D Vit (I) (G6) and CCl₄+D Vit (II) (G7). Hepatic fibrosis was induced by giving CCl₄. At the beginning of CCl₄ injection, MEL to G4 and G5; Vit D to G6 and G7 were applied. Following the cessation of CCl₄ injection, MEL application to G5 and Vit D administration to G7 was continued for two weeks. At the end of the experiment, intracardiac blood was taken and liver tissues were removed. Hepatic damage was evaluated by biochemical analysis of liver serum samples and histopathological examinations in tissue samples. The levels of malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) and superoxide dismutase (SOD) were investigated in tissue homogenates. MMP-9 and desmin activities were performed with immunohistochemical observations. The viability in HepG2 and Hep3B was determined by MTT assay. As a result, increase in MDA level and decrease in GSH content were detected in the CCl₄ group. Rise in the levels of ALT, ALP, GGT and CHOL levels, while decrease in the values of BA and ALB were monitored. Hepatocyte degeneration, lobular malalignment, sinusoidal dilatation, focal necrotic areas, hyperemia, glycogen losses and reticular fiber thickening were observed histochemically. Hepatic fibrosis was detected around the portal area and central vein. Bridging fibrous septa was observed between portal veins. Rise in MMP-9 and desmin activities were determined. Relatively compensated damage in liver tissue was observed in melatonin and Vitamin D applied groups. As *in vitro*, protection in the cell viability were determined. According to the findings obtained, it can be proposed that melatonin as well as vitamin D reduce lipid peroxidation and play antifibrotic role against the liver injury induced by CCl₄.

October 2014, 122 pages

Key Words: Hepatic damage, fibrosis, oxidative stress, melatonin, Vitamin D, matrix metalloproteinase-9

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Çalışmalarımı yönlendiren, araştırmalarımın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek akademik ortamda olduğu kadar beşeri ilişkilerde de engin fikirleriyle yetişme ve gelişme katkıda bulunan danışman hocam Prof. Dr. Nesrin ÖZSOY ERDAŞ'a (Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı), çalışmalarım süresince maddi manevi desteklerini esirgemeyen Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. K. Gonca AKBULUT'a, çalışmalarım sırasında önemli katkılarda bulunan ve yönlendiren Prof. Dr. Zekiye SULUDERE (Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü) ve Doç. Dr. Şevin GÜNEY'e (Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji ABD), bilimsel çalışmalarım yanında her aşamada pratik çözümleriyle bir hoca bir arkadaş olarak destek olan Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Zooloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Suna CEBESOY'a, doktora başladığım günden bu yana her zaman yanımda olan ve laboratuvar imkanlarını sonuna kadar kullandığım Kastamonu Üniversitesi Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden Doç. Dr. Talip ÇETER ve Doç. Dr. Ergin Murat ALTUNER'e, hücre kültürü konusunda kendilerinden çok şeyler öğrendiğim Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü öğretim üyelerinden Doç. Dr. Erkan YILMAZ'a, projeler kapsamında birlikte çalıştığım arkadaşlarım Araş. Gör. Gülizar AYDOĞDU, Duygu VURAL ve Safa Mohammed Elmustafa Osman ELMUBARAK ile laboratuvarında birlikte çalıştığım tüm arkadaşlarıma, çalışmalarım süresince birçok fedakârlıklar göstererek beni destekleyen değerli eşime, anneme, babama, kardeşime ve kayınvalideme en derin duygularla teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, “Karbon tetraklorür (CCl₄) Toksisitesine Karşı Melatonin ve D Vitamininin Hücre Proliferasyonu ve Oksidatif Stres Üzerine Etkilerinin in vitro İncelenmesi (Ankara Üniversitesi BAP-12B4240012)” ve “Sıçan Karaciğerinde Karbon tetraklorür (CCl₄) Hasarına Karşı Melatonin ve D Vitamininin Oksidatif Stres ve MMP-9 Üzerine Etkisi (Ankara Üniversitesi BAP-13L4240006)” konulu projeler tarafından desteklenmiştir.

Dilşad ÖZERKAN

Ankara, Ekim 2014

SİMGELER DİZİNİ

CCl ₄	Karbon tetraklorür
CO ₂	Karbondioksit
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	Di-Sodyum Hidrojen Fosfat Dihidrat
Nm	Nanometre
°C	Santigrat
Rpm	Dakikada Devir
gr	Gram
ml	Mililitre
nm	Nanometre
µl	Mikrolitre

Kısaltmalar

EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
DMSO	Dimetil Sülfoksit
PBS	Fosfat Tamponu

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
1.GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1 Karaciğer Anatomisi ve Histolojisi.....	4
2.2 Karaciğer Fibrozisi Oluşum Mekanizması.....	5
2.2.1 Miyofibroblastların tanımı ve köken aldığı hücreler.....	5
2.2.2 Ekstraselüler matriks (ESM) artışında ve fibrozis oluşumunda matriks metalloproteinazların rolü	8
2.2.3 Akut ve kronik karaciğer hasarı mekanizması	9
2.2.4 Deneysel olarak hepatik fibrozis oluşturma	12
2.3 Karbon Tetraklorit (CCl ₄)	12
2.3.1 Tanımı ve kullanım alanları.....	12
2.3.2 Vücuda alımı ve etki mekanizması	13
2.4 Karaciğer Hasarında Oluşan Biyokimyasal Değişiklikler	14
2.5 Serbest Radikal Üretimi ve Sonucunda Oluşan Lipit Peroksidasyonu	16
2.6 Serbest Oksijen Radikallerine Karşı Antioksidan Savunma Mekanizması	16
2.7 Melatonin	17
2.7.1 Melatoninin tanımı ve biyosentezi	17
2.7.2 Melatoninin etkileri ve antioksidan özelliği.....	19
2.8 D VİTAMİNİ	21
2.8.1 D Vitamini tanımı ve biyosentezi	21
2.8.2 D Vitamininin etkileri	22
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	23

3.1 Deney Hayvanları.....	23
3.2 Uygulanan Yöntemler	23
3.2.1 Araştırma planı	23
3.2.2 Dokuda malondialdehit (MDA) tayin yöntemi.....	24
3.2.3 Dokuda glutatyon (GSH) tayin yöntemi	25
3.2.4. Dokuda süperoksit dismutaz (SOD) tayin yöntemi	25
3.2.5 Serum örneklerinde karaciğer enzim tayini.....	25
3.2.6 Histokimyasal inceleme	25
3.2.6.1 Hematoksilen & Eozin (H&E) Boyama Yöntemi.....	26
3.2.6.2 Masson trikrom boyama yöntemi.....	27
3.2.6.3 Periyodik asit schiff (PAS) boyama	28
3.2.6.4 Retikülin (gümüşleme) boyama	28
3.2.7 İmmunohistokimyasal inceleme.....	29
3.2.8 Hücre kültürü	30
3.2.8.1 Hücre besiyeri.....	30
3.2.8.2 Hücrelerin inkübasyonu ve bakımı	30
3.2.8.3 Deney planı	31
3.2.8.4 MTT ölçümü	33
3.2.9 İstatistiksel analiz.....	33
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	34
4.1 Malondialdehit (MDA)	34
4.2 Glutatyon (GSH)	35
4.3 Süperoksit Dismutaz (SOD)	36
4.4 Biyokimyasal Sonuçlar	37
4.4.1 Alkalin fosfataz (ALP)	38
4.4.2 Alanin aminotransferaz (ALT)	39
4.4.3 Gama glutamil transferaz (GGT)	40
4.4.4 Safra asidi (BA)	41
4.4.5 Total bilirubin (TBIL)	42
4.4.6 Albumin (ALB).....	42
4.4.7 Kolesterol (CHOL).....	43
4.5 Histokimyasal Sonuçlar	45

4.5.1 Hematoksilen-Eosin (H&E)	45
4.5.2 Masson-Trikrom	52
4.5.3 Periyodik Asit-Schiff (PAS).....	58
4.5.4 Gümüşleme (Retikülin).....	62
4.6 İmmunohistokimyasal Sonuçlar	66
4.6.1 Matriks-metalloproteinaz-9 (MMP-9)	66
4.6.2 Dezmin.....	71
4.7 <i>In vitro</i> Sonuçlar	76
4.7.1 CCl₄ sitotoksitesi.....	76
4.8.2 Hücre canlılığı bulguları.....	77
4.8.2.1 HepG2	77
4.8.2.2 HEP3B.....	81
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	85
KAYNAKLAR	98
ÖZGEÇMİŞ.....	120

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Normal ve fibrotik karaciğerin genel görüntüsü	11
Şekil 2.2 Melatonin Biyosentezi.....	18
Şekil 2.3 D Vitamini Sentezi.....	21
Şekil 4.1 Karaciğer dokusunda MDA aktivitesi.....	35
Şekil 4.2 Karaciğer glutatyon (GSH) aktivitesi.....	36
Şekil 4.3 Karaciğer SOD aktivitesi.....	37
Şekil 4.4 Gruplar arasında ALP değerlerinin karşılaştırılması.....	39
Şekil 4.5 Gruplar arasında ALT değerlerinin karşılaştırılması.....	40
Şekil 4.6 Gruplar arasında GGT değerlerinin karşılaştırılması.....	41
Şekil 4.7 Gruplar arasında BA değerlerinin karşılaştırılması.....	41
Şekil 4.8 Gruplar arasında TBIL değerlerinin karşılaştırılması.....	42
Şekil 4.9 Gruplar arasında ALB değerlerinin karşılaştırılması.....	43
Şekil 4.10 Gruplar arasında CHOL değerlerinin karşılaştırılması.....	43
Şekil 4.11 Kontrol grubu (mısır yağı) sıçan karaciğerinin histolojik yapısı.....	44
Şekil 4.12 Kontrol grubu (PBS+etanol) sıçan karaciğerinde portal ven.....	45
Şekil 4.13 CCl ₄ uygulanmış karaciğer dokusunda dejeneratif sentral ven.....	46
Şekil 4.14 CCl ₄ grubuna ait sıçana ait karaciğer dokusu.....	46
Şekil 4.15 CCl ₄ grubu sıçanların karaciğer dokusunda portal alanda seyrek oranda mononükleer hücre infiltrasyonu.....	47
Şekil 4.16 CCl ₄ grubunda dejenere sentral ven (SV) çevresinde fokal nekrotik alanlar.....	47
Şekil 4.17 CCl ₄ grubunda hasarlı karaciğer lobülü.....	48
Şekil 4.18 10 hafta melatonin uygulanmış CCl ₄ grubunda sentral ven.....	49
Şekil 4.19 12 hafta melatonin uygulanmış CCl ₄ grubu sıçan karaciğerinin genel görüntüsü.....	49
Şekil 4.20 10 hafta D Vitamini uygulanmış CCl ₄ grubu sıçan karaciğerinin genel görüntüsü.....	50
Şekil 4.21 CCl ₄ +D Vit (12 hafta) grubu sıçan karaciğerinde sentral venlerin etrafında bulunan hepatositler.....	50
Şekil 4.22 Kontrol (mısır yağı) grubu sıçanlarda sentral ven.....	51
Şekil 4.23 Kontrol (PBS+Etanol) grubu sıçanlarda portal alan. Portal ven.....	52
Şekil 4.24 CCl ₄ ile hasar oluşturulan sıçanlarda portal ven.....	52
Şekil 4.25 CCl ₄ uygulanmış sıçan karaciğerinde portal ven.....	53
Şekil 4.26 CCl ₄ verilen grupta 2 portal ven (PV) arasında fibrozis (ok) oluşumu.....	53
Şekil 4.27 CCl ₄ uygulanmış sıçan karaciğerinde sentral ven.....	54
Şekil 4.28 10 hafta melatonin uygulanmış CCl ₄ grubu sıçan karaciğerinde sentral ven (SV) ve etrafında ışınsal dizilmiş hepatosit kordonları.....	55

Şekil 4.29 CCl ₄ +MEL (12 hafta) deney grubunda portal alan ve çevresinde yer yer dejeneratif hepatositler izlenmekte. Portal ven.....	55
Şekil 4.30 CCl ₄ +D Vit (10 hafta) deney grubunda portal ven.....	56
Şekil 4.31 12 hafta D Vitamini uygulanmış CCl ₄ grubunda karaciğerin genel görüntüsü.....	56
Şekil 4.32 Kontrol (mısır yağı) grubuna ait karaciğer dokusunun genel görüntüsü.....	57
Şekil 4.33 Kontrol (PBS+Etanol) grubu sıçanların karaciğer dokusunda sentral ven.....	57
Şekil 4.34 CCl ₄ grubuna ait karaciğer dokusunda sentral ven.....	58
Şekil 4.35 CCl ₄ +MEL (10 hafta) deney grubunda sentral venleri.....	59
Şekil 4.36 12 hafta melatonin uygulanmış CCl ₄ grubuna ait karaciğer dokusunda sentral ven çevresinde PAS pozitif hepatositlerin genel görüntüsü.....	59
Şekil 4.37 CCl ₄ +D Vit (10 hafta) grubuna ait karaciğer dokusunda yer yer PAS pozitif hepatositler.....	60
Şekil 4.38 12 hafta D Vitamini uygulanmış CCl ₄ grubuna ait karaciğer dokusunda PAS pozitif hepatositlerin dağılımı.....	60
Şekil 4.39 Kontrol (mısır yağı) grubuna ait karaciğer dokusunda portal alan etrafında retiküler lifler gözlenmekte. Portal ven.....	61
Şekil 4.40 Kontrol (PBS+etanol) grubunda sentral ven (SV) ve sinüzoidlerin (S) duvarında retiküler lif dağılımı.....	61
Şekil 4.41 CCl ₄ uygulanmış grubuna ait karaciğer dokusunda portal alan çevresinde retiküler lif kalınlaşması.....	62
Şekil 4.42 CCl ₄ grubuna ait sıçan karaciğerinde sentral ven.....	62
Şekil 4.43 CCl ₄ uygulanmış grupta portal alan çevresinde kalınlaşmış retiküler Lifler.....	63
Şekil 4.44 CCl ₄ +MEL (10 hafta) grubu. Sentral ven.....	63
Şekil 4.45 12 hafta melatonin uygulanmış CCl ₄ grubunda portal alan çevresinde retiküler lif dağılımı.....	64
Şekil 4.46 10 hafta D Vitamini uygulanmış CCl ₄ grubunda seyrek dağılım gösteren retiküler lifler.....	64
Şekil 4.47 12 hafta D Vitamini uygulanmış CCl ₄ grubunda sentral ven (SV) çevresinde ve sinüzoidlerin (S) duvarında retiküler lif dağılımı.....	65
Şekil 4.48 Kontrol (mısır yağı) grubu karaciğer dokusunun genel görüntüsü.....	65
Şekil 4.49 Kontrol (PBS+Etanol) grubu sıçan karaciğerinin genel görüntüsü.....	66
Şekil 4.50 CCl ₄ grubu sıçan karaciğerinde sentral venleri.....	67
Şekil 4.51 CCl ₄ uygulanmış grupta sentral ven.....	67
Şekil 4.52 CCl ₄ grubunda portal alan ve sinüzoidlerin (S) çevresinde sitoplazması MMP-9 pozitif reaksiyon gösteren hepatositlerin görüntüsü.....	68

Şekil 4.53 CCl ₄ +MEL (10 hafta) grubunda portal alan çevresinde zayıf MMP-9 İmmünreaktivite.....	68
Şekil 4.54 12 hafta melatonin uygulanmış CCl ₄ grubunda MMP-9 negatif reaksiyon.....	69
Şekil 4.55 10 hafta D Vitamini uygulanmış CCl ₄ grubunda yer yer MMP-9 (+) reaksiyon gösteren hücreler.....	69
Şekil 4.56 CCl ₄ +D Vit (12 hafta) grubu karaciğer dokusunun genel görüntüsü.....	70
Şekil 4.57 Kontrol (mısır yağı) grubunda zayıf immünreaktivite gösteren dezmin (+) hücreler	70
Şekil 4.58 Kontrol (PBS+etanol) grubu sıçanlarda sentral ven.....	71
Şekil 4.59 CCl ₄ uygulanmış grupta sentral ven.....	71
Şekil 4.60 CCl ₄ grubunda sentral ven (SV) çevresinde ve sinüzoidlerin duvarında kuvvetli dezmin (+) immünreaktivite gösteren hücreler.....	72
Şekil 4.61 CCl ₄ grubu sıçanların karaciğer dokusunda portal ven çevresinde ve parankimada dezmin (+) immünreaktivite.....	72
Şekil 4.62 CCl ₄ +MEL (10 hafta) grubunda parankimatik dokuda dezmin (+) İmmünreaktivite.....	73
Şekil 4.63 CCl ₄ +MEL (12 hafta) grubunda dezmin pozitif immünreaktivite gösteren hücrelerin dağılımı.....	73
Şekil 4.64 CCl ₄ +D Vit (10 hafta) grubunda dezmin (+) immünreaktivite.....	74
Şekil 4.65 CCl ₄ +D Vit (12 hafta) grubunda karaciğer lobülünde dezmin (+) hücreler izlenmekte. Sentral ven.....	74
Şekil 4.66 Farklı dozlarda CCl ₄ 'e maruz bırakılan HepG2 hücrelerinin canlılık yüzdesi.....	75
Şekil 4.67 Farklı dozlarda CCl ₄ 'e maruz bırakılan Hep3B hücrelerinin canlılık yüzdesi.....	76
Şekil 4.68 HepG2 2. saatin sonunda hücre canlılığı yüzdesi.....	77
Şekil 4.69 HepG2 24.saatin sonunda hücre canlılığı yüzdesi.....	78
Şekil 4.70 HepG2 48.saatin sonunda hücre canlılığı yüzdesi.....	78
Şekil 4.71 HepG2 hücrelerinin bütün grupların 2. 24. ve 48. saatlerdeki canlılık yüzdeleri.....	79
Şekil 4.72 Hep3B 2.saatin sonunda hücre canlılığı yüzdesi.....	81
Şekil 4.73 Hep3B 24.saatin sonunda hücre canlılığı yüzdesi.....	81
Şekil 4.74 Hep3B 48.saatin sonunda hücre canlılığı yüzdesi.....	82
Şekil 4.75 HEP3B hücrelerinin bütün grupların 2. 24. ve 48. saatlerdeki canlılık yüzdeleri.....	83

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1 Karaciğer MDA aktivitesi.....	34
Çizelge 4.2 Karaciğer GSH Aktivitesi	36
Çizelge 4.3 Karaciğer SOD aktivitesi.....	37
Çizelge 4.4 Karaciğer enzimlerinin gruplar arasında karşılaştırılması.....	38
Çizelge 4.5 HepG2 hücre hattının gruplardaki hücre sayısı ortalamaları ve standart sapma gösterilmiştir.....	77
Çizelge 4.6 Hep3B hücre hattının gruplardaki hücre sayısı ortalamaları ve standart sapma gösterilmiştir.....	80

1. GİRİŞ

Hepatik fibrozis karaciğerde, ekstraselüler matriks (ESM) bileşenlerinin aşırı birikimi olarak tanımlanmaktadır (Xia vd. 2006, Prosser vd. 2006, Török 2008). Viral hepatit, alkol alımı, ilaçlar, metabolik hastalıklar ve hepatositlerin otoimmün cevabına karşı oluşur (Friedman 2000). Karaciğer hastalıklarının çoğunun sonucunda hepatik fibrozis gözlenir (Parola ve Robino 2001, Friedman 2003, Bataller ve Brenner 2005, Wang vd. 2007, Friedman 2008a, Parola vd. 2008, Mormone vd. 2011).

Hepatosit stellat hücrelerin (HSH), fibrozisde merkezi rol oynadığı iyi bilinmektedir (Moreira 2007, Iwaisako vd. 2008, Krizhanovsky vd. 2008). Hepatosit ve sinüzoidal endotelial hücreler arasındaki Disse aralığında yer alırlar (Friedman 2008b). Normal karaciğerde HSH'ler hareketsizdir ve A Vitaminini depo ederler. Dezmin eksprese ederler (Moreira 2007, Yamaguchi vd. 2008). Ayrıca HSH'ler bazal membranın şekillenmesi için ESM bileşenlerinin bir kısmını üretirler (Schuppan vd. 2001). Karaciğer viral hepatit, alkolizm ve toksik maddeler gibi çevresel hasarlara maruz kaldığında, HSH aktifleşir, α -sma'yı (α - düz kas aktini) eksprese eder (Rockey vd. 1992) ve miyofibroblast tipi fenotipe sahip olurlar. Proliferatif, pro-fibrojenik, hareketli ve kasılabilir hale gelir (Gressner 1996).

ESM'nin birikimi ayrıca, kollajen sentezinin artması ve ESM elemanlarının yıkımının azalması sonucu oluşur (Arthur 2000). Matriks metalloproteinazlar (MMP), ESM elemanlarını yıkan endopeptidaz ailesine ait elemanlardır (Egeblad ve Werb 2002). Hücre membranı yüzeyinde bulunur ve katalitik aktivitelerini membran proteinleriyle sınırlandırır. Embriyonik gelişim, inflamasyon, bağışıklık, kronik yaralar, eklem iltihabı, kanser gibi birçok fizyolojik ve patolojik durumda MMP'ler bulunur (Stamenkovic 2000, Vu ve Werb 2000, Gill ve Parks 2008). Bağ dokunun bozulması ile karakterize edilen patolojik durumlarda MMP üyelerinin ekspresyonunda artış gözlenir (Matrisian 1994). MMP ve MMP spesifik inhibitörleri sunan MMP doku inhibitörlerinin (TIMP) ekspresyonlarındaki dengenin bozulması fibrozis oluşumuna neden olur (Hemmann vd. 2007).

Birçok çalışmada, hepatik fibrozisin etiopatolojisinde oksidatif stresin önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir (Castilla vd. 1997, Parola ve Robino 2001, Ogeturk vd. 2008, Hong vd. 2009). Eksojen yollarla vücuda alınan toksik maddelerin organizmada metabolize edilememesi sonucu hücrelerde açığa çıkan serbest radikaller karaciğer hasarına sebep olurlar. Karbon tetraklorür (CCl₄), hepatoksisite modeli oluşturmak için deneysel çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Lee vd. 2003, Ding vd. 2005, Zhang vd. 2011, Huang vd. 2014). CCl₄ hepatoksisitesi, hepatik mikrozomal enzim (CYP2E1) tarafından parçalanarak metabolitlerine, CCl₃'e ve CCl₃O₂'ye bağlıdır (Basu 2003, Manibusan vd. 2007, Nada vd. 2010, Ingawale vd. 2014). Stabil olmayan bu metabolitler hücre membranı proteinlerine ve lipitlerine bağlanarak lipit peroksidasyonunu tetikler ve karaciğer hasarı oluşturur (Debnath vd. 2013, Ingawale vd. 2014).

Serbest radikallerin vücutta oluşturdukları hasarın en aza indirilmesinde antioksidanların büyük rolü olduğu bilinmektedir (Valko vd. 2006, Jomova ve Valko 2011, Aprioku 2013). Melatonin endokrin, nöral ve immün fonksiyonları düzenleyen ve antioksidan özelliğinde olan bir indolamindir (Reiter 2003, Reiter vd. 2009). Çeşitli reaktif oksijen ve nitrojen türlerini ortadan kaldırma yeteneğindedir. Melatoninin antioksidan rolü, antioksidan enzimleri düzenlemesiyle (Rodriguez vd. 2004) ve serbest radikal oluşumunu sağlayan diğer enzimleri inhibe etmesiyle artar (Bettahi vd. 1996). Aynı zamanda, küçük molekül ağırlığına sahip olan melatonin hidrofilik yapısı nedeniyle de hücre membranlarından geçebilme kapasitesine sahiptir (Menendez-Pelaez ve Reiter 1993). *In vivo* ve *in vitro* araştırmalarda, safrol, lipopolisakkarit (LPS), CCl₄, iskemi-reperfüzyon ve iyonize radyasyon gibi serbest radikal oluşturan çok çeşitli ajanlar tarafından tetiklenen oksidatif hasara karşı melatoninin, hücreleri, dokuları ve organları koruyabildiği gösterilmiştir. Melatoninin glutatyon peroksidaz (GPx), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon (GSH) gibi potansiyel antioksidanların seviyelerini arttırarak dolaylı yoldan antioksidan etkisi gösterdiği de saptanmıştır (Menendez-Pelaez ve Reiter 1993, Costa vd. 1995, Bettahi vd. 1996). Melatonin aynı zamanda MMP geninin regülasyonunu ve aktivasyonunu da sağlar (Swarnakar vd. 2011). Dolayısıyla melatoninin karaciğer fibrozisinde rol oynayabileceğini düşünülmektedir.

D Vitamininin antioksidan özelliği hakkında çok az çalışma vardır ve bu çalışmalar arasında çelişkili sonuçlar bulunmaktadır (Lee ve Youn 1998, Banakar vd. 2004, Ekici vd. 2009, Sezgin vd. 2013). D vitamini bir prohormondur. Karaciğerde ve böbrekte sıralı enzimatik modifikasyona uğrar. Böylece 1,25(OH₂)D₃ olarak maksimum biyolojik aktiviteye ulaşır. D vitamini etkilerini D vitamini reseptörü (VDR) aracılığıyla gerçekleştirir. VDR, ligand bağımlı transkripsiyon faktörü olup, nükleer hormon reseptör süper familyasına aittir. VDR, HSH'lerde eksprese edilir (Abramovitch vd. 2011). 1,25(OH₂)D₃'ün yüzlerce farklı geni düzenlediği, normal ve kanser hücrelerinde proliferasyonu, farklılaşmayı ve apoptozisi düzenlediği ve aynı zamanda immunomodülatör, anti-inflamatuvar etkilerinin olduğu da gösterilmiştir (Munger vd. 2006, Holick vd. 2007, Wang vd. 2008, Giovannucci vd. 2008, Adams ve Hewison 2010, Jenab vd. 2010). Son yapılan çalışmalarda, 1,25(OH₂)D₃'ün renal, akciğer fibrozisi ve Tiyoasetamid (TAA) ile muamele edilmiş sıçanlarda karaciğer fibrozisinde inhibitör etkilerinin olduğu saptanmıştır (Tan vd. 2006, Ramirez vd. 2010, Zhang vd. 2010a, Abramovitch vd. 2011).

Bu çalışmada sıçanlarda CCl₄ ile hepatik hasar oluşturularak, melatonin ve D Vitamininin hem iyileştirici hem de koruyucu etkilerinin biyokimyasal, histokimyasal, immunohistokimyasal ve antioksidan aktivite tayin yöntemleri kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır. İlave olarak, HepG2 ve Hep3B, insan hepatoma hücre hatlarında CCl₄ sitotoksitesine karşı melatonin ve D Vitamininin hücre canlılığına etkisi *in vitro* olarak ta değerlendirilmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Karaciğer Anatomisi ve Histolojisi

Karaciğer vücudun deriden sonra en büyük organı ve en büyük bezidir. Ağırlığı yaklaşık 1,5 kg'dır. Diyaframın altında abdominal boşlukta yerleşmiştir. Karaciğer, sindirim kanalından emilen besinlerin işlendiği ve vücudun diğer kısımları tarafından kullanılmak üzere depolandığı bir organdır. Bu yüzden sindirim sistemi ile kan arasında geçiş bölgesi oluşturur. Organa kanın %70-80'i portal venden gelir; geri kalan az bir bölümü hepatik arterle sağlanır. İnce bağırsaktan emilen maddelerin çoğu portal ven yoluyla karaciğere ulaşır, sadece şilomikronlar lenf damarlarıyla taşınır. Karaciğerin dolaşım sistemindeki konumu, metabolitlerin biraraya getirilmesi, dönüştürülmesi, biriktirilmesi ve toksik maddelerin nötralize ve elimine edilmesi için uygundur (Solakoglu ve Aytekin 2006).

Stroma: Karaciğer, hilumda kalınlaşan Glisson kapsülü ile örtülüdür. Hilumda, organa portal ven ve hepatik arter girer, sağ ile sol hepatik kanallar ve lenfatikler çıkar. Bu damarlar ve kanallar, karaciğer lobcukları arasında sonlandıkları portal alanlara kadar bağ dokusu ile çevrilmiştir. Bu alandan itibaren ince bir retiküler lif ağı karaciğer lobçuklarındaki hepatositlere ve sinüzoidal endotelial hücrelerine destek sağlar (Solakoglu ve Aytekin 2006).

Karaciğer lobülü: Karaciğerin temel yapı elemanı birbirleriyle bağlantılı plaklar halinde gruplaşmış olan hepatositlerdir. Karaciğer lobçuklarının köşelerinde portal triadları içeren portal alanlar adı verilen bölgeler bulunur. Her bir portal triad bir venül, bir arteriyol, safra kanalı ve lenfatik damarlardan oluşmuştur. Bu yapıların hepsi bağ dokusu kılıfıyla çevrelenmiştir (Solakoglu ve Aytekin 2006).

Karaciğer lobülü içindeki hepatositler plak oluşturacak şekilde ışımsal olarak dizilmiştir. Bu hücre plakları lobülün periferinden merkezine doğru yönlenmişlerdir. Plaklar arasındaki boşlukta karaciğer sinüzoidleri yer alır. Sinüzoidal kapiller kesintili,

pencereli endotel hücrelerinden oluşmuş damarlardır. Endotel hücreleri hepatositlerden Disse aralığı denilen subendotelyal boşlukla ayrılmıştır. Bu aralıkta retiküler lifler ve hepatositlerin mikrovillusları bulunur. Kan endotel duvarından kolayca geçer ve hepatosit yüzeyi ile temas eder. Böylece, sinüzoid lümeni ile hepatositler arasında makromolekül alışverişi kolaylıkla sağlanır. Sinüzoidler ince bir retiküler lif kılıfıyla sarılıp desteklenmiştir. Sinüzoidler Kupffer hücreleri adı verilen makrofajları da içerir. Disse aralığında (perisinüzoidal aralık) Hepatosit Stellat Hücreleri (HSH) olarak ta bilinen, yağ depolayan İto hücreleri de yer alır (Solakoglu ve Aytekin 2006).

2.2 Karaciğer Fibrozisi Oluşum Mekanizması

Karaciğer fibrozisi ya da hepatik fibrozis, karaciğer hasarı sonucunda, ekstraselüler matriksin (ESM) birikimi ile tanımlanan, geri dönüşümlü yara iyileşme cevabıdır (Hernandez-Gea ve Friedman 2011). Kronik viral hepatit (HBV, HCV), alkol kullanımı, otoimmün ve parazitik hastalıklar, sarılık, obezite, metabolik bozukluklar, toksinlere ve kimyasallara maruz kalma gibi nedenlerden dolayı, karaciğer hasarı oluşur, hasara karşı yara iyileşmesi cevabının tekrarlanması ile oksidatif stres oluşur ve bu durum karaciğer fibrozisine sebep olur (Parola ve Robino 2001, Friedman 2003, Bataller ve Brenner 2005, Friedman 2008a, Parola vd. 2008, Mormone vd. 2011). Karaciğer fibrozisi oluşumunda miyofibroblastlar anahtar rol oynar (Guyot vd. 2006, Wynn 2008, Friedman 2008a).

2.2.1 Miyofibroblastların tanımı ve köken aldığı hücreler

Miyofibroblastlar (MF), iğ veya yıldız şeklindeki hücrelerdir. Perisellüler matriks ile çeşitli fibrotik genlerin (α -sma, fibronektin, vimentin) ekspresyonunda görev alırlar. İnce yapı düzeyinde düz endoplazmik retikulumları (DER) ve iyi gelişmiş Golgi kompleksleri mevcuttur. İlave olarak, periferik miyofilamentler, fibroneksuslar ve sıkı bağlantı bölgeleri gözlenir. Yara iyileşmesinde ve fibroproliferatif hastalıklarda görev

alırlar (Eyden 2008). TGF- β 1 gibi fibrojenik bir uyararı olduğunda, dokularda yerleşik bulunan miyofibroblastlar α -sma'yı eksprese ederler; fibronektin, tip I ve tip III kollajen gibi ESM bileşenlerini salgırlar ve kasılabilir özellik kazanırlar (Kisseleva ve Brenner 2008). Karaciğerdeki hasarın göstergesi olan esas hücrelerdir (Cassiman vd. 2002, Parola vd. 2008, Novo vd. 2009). Dokuya yerleşik miyofibroblastların akciğer, deri, böbrek ve karaciğerde kollajen üreten hücrelerin esas kaynağı olduğu belirtilmiştir (Remuzzi ve Bertani 1998, Phan 2002, Desmouliere vd. 2005, Qi vd. 2006, Lama ve Phan 2006, Hinz 2007, Hinz vd. 2007).

Antijen profiline ve/veya dokudaki yerleşimlerine göre MF'ler 3'e ayrılırlar. Bunlar; portal/septal MF'ler, geçiş veya ara MF'ler ve aktive olmuş MF benzeri hepatik stellat hücreler (HSH)'dir.

- a. Portal/septal MF (PS/MF): Çok sayıda antijen eksprese ederler. Çoğunlukla portal alanların etrafındaki bağ dokuda ve fibrotik septanın iç taraflarında bulunurlar (Povero vd. 2010).
- b. Geçiş veya ara MF'ler (IF/MF): Genelde aktif olarak fibrogenezin oluştuğu yerlerde görülürler. Burası da fibrotik septayla etrafındaki parankima arasındaki bölgede bulunur (Povero vd. 2010).
- c. Aktive olmuş miyofibroblast benzeri hepatosit stellat hücreleri (HSH/MF)/ α -sma (+) hücreler: Bu fibrotik/sirotik karaciğerin sinüzoidleri içinde veya etrafında bulunurlar (Povero vd. 2010).

Karaciğer etiyojisine bağlı olarak, profibrojenik hepatik MF'lerin farklı hücre tiplerinden köken aldığı gösterilmiştir (Friedman 2008a, Parola vd. 2008).

a. Hepatosit Stellat Hücreler (HSH)

Disse aralığında yer alan ve çok fazla sayıda retinoid ve yağ damlacıkları içeren perisinüzoidal hücrelerdir (Geerts 2001, Iredale 2007). HSH'ların ayrıca "karaciğere özgü perisitler" olarak davrandığı ve hepatosit büyüme faktörü (HGF) salgılayarak,

hepatosit gelişimi ve rejenerasyonuna önemli katkıda bulunduğu ifade edilmiştir (Friedman 2008b). Dezmin gibi markerları eksprese ederler ve A Vitaminini depo ederler. Fizyolojik koşullar altında HSH'lar hareketsiz fenotiptedir (Geerts 2001). Karaciğer hasar gördüğünde, HSH'ler aktifleşerek HSH/MF'lere dönüştüğünde, morfolojilerinde ve fenotiplerinde değişiklik meydana gelir. Depolama fenotiplerini değiştirerek, A Vitamini sentezini azaltır ve kasılabilme yeteneğini kazanırlar. α -sma'yı eksprese eder ve ESM bileşenlerini (Tip I ve III kollajen, fibronektin) salgılar (Parola vd. 2008).

b. Portal Fibroblastlar

Portal alanda yer alan iğ şeklindeki hücrelerdir. Normal koşullar altında, fizyolojik ESM oluşumu ve yıkımına katkıda bulunurlar (Guyot vd. 2006, Parola vd. 2008). Karaciğer hasarında çoğalarak, portal alan çevresine kollajen biriktirirler (Wells vd. 2004). Septal MF'lerin kökenini oluştururlar (Povero vd. 2010).

c. Kemik iliği kökenli mezenşimal hücreler

Mezenşimal kök hücrelerinden köken alırlar (Russo vd. 2006; Kallis ve Forbes 2009). Doku MF'lerine dönüşerek fibrozise katkıda bulunurlar (Iredale 2007, Russo vd. 2006, Kisseleva ve Brenner 2008). Fibrotik akciğer ve karaciğerde gösterilmiştir (Hashimoto vd. 2004, Russo vd. 2006).

d. Hepatositler ve Biliyer Epitelyal Hücreler

Yapılan çalışmalarda, epitelyal-mezenşimal geçişlerde (EMT), MF'lerin bu hücrelerden de köken alabileceği saptanmıştır. Bu süreç, embriyonik ve fetal gelişimde, kanser hücre invazyonunda ve organ fibrogenezisinde gösterilmiştir (Zeisberg vd. 2007, Dooley vd. 2008).

e. Fibrositler

Subkutan yaralardaki doku tamiri ile ilişkili fibroblast benzeri özellikleriyle kan dolaşımında bulunan kemik iliği kökenli hücrelerdir (Bucala vd. 1994).

2.2.2 Ekstraselüler matriks (ESM) artışında ve fibrozis oluşumunda matriks metalloproteinazların rolü

ESM'nin birikimi kollajen sentezinin artması ve ESM elemanlarının yıkımının azalması sonucu oluşur (Arthur 2000). "Matriksinler" olarak bilinen matriks metalloproteinazlar (MMP), ESM elemanlarını yıkan Ca^{++} bağımlı endopeptidaz ailesine ait enzimlerdir (Egeblad ve Werb 2002). Hücre membranı yüzeyinde bulunurlar ve katalitik aktivitelerini membran proteinleriyle sınırlandırır. Çok sıkı bir şekilde düzenlenirler ve substrat özgünlüğüne göre 5'e ayrılırlar: interstitial kollajenler (MMP-1, -8, -13), jelatinazlar (MMP-2, -9), stromelisinler (MMP-3, -7, -10, -11), membran tipi (MMP-14, -15, -16, -17, -24, -25) ve metalloelastazlar (MMP-12). ESM proteinlerinin aşırı birikimi karaciğerin normal yapısını ve fonksiyonunu bozarak patofizyolojik hasara yol açar. Normal karaciğerde ESM üretimi ile yıkımı oranları eşittir ve bunun sonucunda matriks oluşmaz. Fibrojeniz, ESM oluşumu ve yıkımı arasında bir dengesizliğin olduğu süreçte meydana gelir (Hernandez-Gea ve Friedman 2011).

MMP'ler inaktif proenzimler olarak bulunurlar ve karmaşık bir transkripsiyonel kontrol mekanizması mevcuttur. MMP modülasyonu, MMP doku inhibitörleri (TIMP) olarak bilinen endojen proteinaz inhibitör familyası tarafından düzenlenir (Iredale 1997, McCrudden ve Iredale 2000, Henderson ve Iredale 2007). 4 adet TIMP üyesi (TIMP1, TIMP2, TIMP3 ve TIMP4), MMP'lere karşı farklı afiniteye sahiptir. MMP'lerin aktif kısmına geri dönüşümlü olarak bağlanırlar. Böylece TIMP'ler, karaciğer hasarı süresince MMP'lerin aktivitesini antagonize ederek, matriks birikimini önlemede önemli bir role sahiptir. Bunlar içinde hepatik fibrozis mekanizmasında en önemli yeri olanı TIMP1' dir (Iredale 1997). HSH'ler üzerinde anti-apoptotik bir etkiye sahiptir, hasar süresince HSH'lerin aktifleşmesini engellerler (Murphy vd. 2002). HSH'ler

özellikle MMP-2, MMP-3, MMP-9 ve MMP-13'ün dahil olduğu bir grup MMP'nin esas kaynağını oluştururlar (Hernandez-Gea ve Friedman 2011).

Embriyonik gelişim, inflamasyon, bağışıklık, kronik yaralar, eklem iltihabı, kanser gibi birçok fizyolojik ve patolojik durumda MMP'ler bulunur (Stamenkovic 2000, Vu ve Werb 2000, Gill ve Parks 2008). Bağ dokunun bozulması ile karakterize edilen patolojik durumlarda MMP üyelerinin ekspresyonunda artış gözlenir (Matrisian 1994). MMP ve MMP spesifik inhibitörleri sunan MMP doku inhibitörlerinin (TIMP) ekspresyonlarındaki dengenin bozulması fibrozis oluşumuna neden olur (Hemmann vd. 2007).

2.2.3 Akut ve kronik karaciğer hasarı mekanizması

Hasar veren durumlara karşı, karaciğerin çeşitli cevap şekilleri vardır.

- **Dejenerasyon ve Hücre içi Birikimler**

Toksik veya immunolojik nedenlerle orta derecede hücre şişmesi meydana gelir. Hepatositlerde oluşan daha ağır hasar balonlaşma dejenerasyonuna yol açar. Ayrıca bakır, demir, safra materyali gibi bazı maddeler hepatosit sitoplazmasında birikebilir. Hepatositlerde yağ damlacıklarının birikimine **steatoz** denir. Hepatositlerde çekirdeğin yerini değiştirmeyen çok sayıda küçük yağ damlacığının bulunmasına **mikrovezikuler steatoz** denir. Alkolik karaciğer hastalığı, Reye sendromu ve gebelik gibi durumlarda gözlemlenebilir. Hepatositlerde çekirdeğin tek büyük yağ damlacığının bulunmasına ise **makrovezikuler steatoz** adı verilir. Makrovezikuler steatoz ise alkolik karaciğer hastalığında, diyabette ve obezite varlığında görülebilir (Kumar vd. 2011).

- **Nekroz ve Apoptozis**

Karaciğerde hasara yol açan herhangi bir durum hepatosit harabiyetine yol açabilir. Koagülatif nekrozda, soluk boyanan mumyalaşmış hepatositler görülür. Apoptoziste

ise, izole hepatositler büzülmüş, piknotik, koyu eozinofilik görünümündedir. İlaç ve toksik maddelerin etkileri sonucunda genellikle sentral ven etrafında hepatosit nekrozu gözlemlenir. Hepatik hasara yol açan birçok durumda, hem inflamasyon hem de hücre ölümü gerçekleşir. Hücre ölümü parankim içerisinde veya periportal parankim ile inflamasyonlu portal bölgeler arasındaki hücrelerde gözlenebilir. Daha ağır bir iltihabi veya toksik hasar oluştuğunda ise, apoptozis ya da nekroz, birbirlerine komşu lobülleri, portal-portal, portal-sentral veya sentral-sentral bağlantılar ile birleştirebilir (Kumar vd. 2011).

- **İnflamasyon**

Akut veya kronik inflamatuvar hücrelerin karaciğerde toplanması ile ilişkili hepatosit hasarı **hepatit** olarak tanımlanır. İnflamasyon sadece portal bölgelerde sınırlı olabileceği gibi tüm parankimaya da dağılabilir (Kumar vd. 2011).

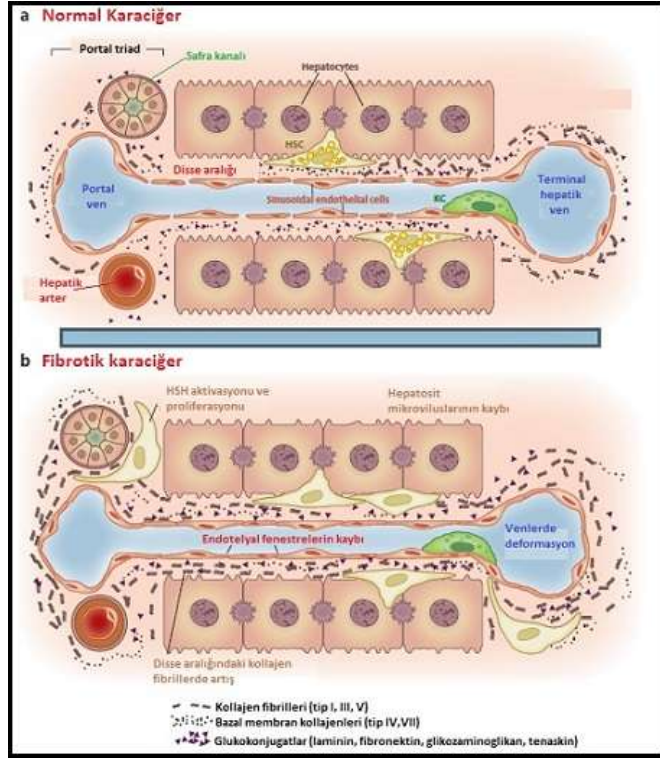
- **Sinuzoid kapilarizasyonu**

Hepatik sinüzoidlerdeki değişimler “sinüzoidal kapilarizasyon” olarak adlandırılır. Disse aralığında ESM birikimine bağlı olarak endotelial hücrelerindeki fenestrasyonların azalması sinüzoidal fibroze yol açar. Sinuzoid kapilarizasyonu plazma ve hepatositler arasındaki metabolik değişimi bozar. Bu durum, karaciğer fonksiyon bozukluğuna ve devamında karaciğer hastalıklarına neden olur (Neubauer vd. 2001, Hernandez-Gea ve Friedman 2011). Kapilarizasyon portal ve sentral ven, iki sentral ven veya iki portal alan arasında bulunan sinüzoidlerde meydana gelir (Neubauer vd. 2001).

- **Fibrozis ve Siroz**

Normal karaciğerde ESM'nin sentezi ve yıkımı arasında bir denge mevcuttur. ESM kollajenler, glikoproteinler ve proteoglikanlardan oluşur (Schuppan vd. 2001, Hernandez-Gea ve Friedman 2011). Normal karaciğerin kapsül kısmında, geniş

damarların çevresinde ve portal triadda tip V ve VI kollajenler bulunur. Karaciğer hasarı sonucu, ESM'nin periportal ve perisinuzoidal bölgelerinin kompozisyonunda nitel ve nicel değişiklikler olur. Bu durum fibrozis oluşumuna yol açar (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Normal ve fibrotik karaciğerin genel görüntüsü (Hernandez-Gea ve Friedman 2011)

Karaciğer fibrojenesi boyunca, nekro-inflamatuvar bölgelerin ve fibröz septanın içinde fibronektin ve tenaskin artar. Fibronektin geçici bir matriks oluşturarak, inflamatuvar ve matriks üreten hücrelerin etkileşimini ve proliferasyonunu etkiler. Karaciğer hasarı devam ettiğinde ilk olarak tip III kollajen artar, daha sonra tip I kollajen ile yer değiştirir. Tip I kollajen sirotik karaciğerdeki toplam kollajenin %60-70'ini oluşturur. Alkolik karaciğer hastalığında ise, fibrotik septanın ana bileşenini tip III kollajendir (Seyer vd. 1977, Neubauer vd. 2001).

2.2.4 Deneysel olarak hepatik fibrozis oluşturma

Deneysel olarak karaciğer fibrozisi, karaciğere tekrarlanan şekilde hepatoksinlerin verilmesiyle sağlanır. En yaygın olarak kullanılan hepatoksinler; karbon tetraklorür (CCl_4), tiyo-asetamid (TAA) ve dimetil veya dietil nitrozamin (DMN veya DEN) dir (Starkel ve Leclercq 2011).

TAA, periportal alanda, diğer toksinlerden daha fazla hasar oluşturur. Ancak önemli oranda fibrozis oluşumu için daha fazla zamana ihtiyaç vardır ve dokuya yayılma eğiliminde değildir (Salguero vd. 2008, Starkel ve Leclercq 2011).

DMN ve DEN, CCl_4 'e benzer şekilde fibrozis oluşumunu sağlar. Karaciğerde CYP2E-1 enzim sistemi tarafından oluşturulan toksik metabolitler aktif metilenmiş parçaların oluşumuna neden olarak, hepatoksisiteye sebep olur. Birkaç hafta oral veya *i.p* olarak DMN ya da DEN verilifi ile periportal alanda ve sentro-portal bōlgede fibrozis oluşur. Fakat uzun süreli DEN verilmesi hepatoselüler karsinom (HCC) oluşumuna neden olur (Poirier 1975, Schiffer vd. 2005, Newell vd. 2008, Starkel ve Leclercq 2011, Yi vd. 2014). Karsinojenik potansiyelinden ötürü, fibrozis oluşturmak için bu model tercih edilmemektedir (Starkel ve Leclercq 2011).

2.3 Karbon Tetraklorit (CCl_4)

2.3.1 Tanımı ve kullanım alanları

Ksenobiyotik olan karbon tetraklorür (CCl_4) renksiz, berrak ve uçucu bir sıvıdır. CCl_4 , temizlik maddelerinin ve solventlerin yapımında, tahılların ilalanmasında ve kloroflorokarbonların sentezinde ara ürün olarak yaygın bir şekilde kullanılmakta iken, toksisitesinin keşfedilmesiyle üretimi azaltılmıştır. Günümüzde petrol ürünleri, çeşitli yağlar, vernik, cila, reçine çözücüsü olarak ve organik bileşiklerin imalatında kullanılmaktadır (Faroon vd. 2005).

Çevreden insan vücuduna günlük ortalama 0,1µg CCl₄ girişi olduğu tahmin edilmektedir. Birleşik Devletler Çevre Koruma Dairesi (EPA) hayvan deneylerinden elde edilen sonuçlara dayanarak CCl₄'ü insan için olası kanserojen sınıfına (Grup B2) dahil etmiştir (Faroon vd. 2005).

2.3.2 Vücuda alımı ve etki mekanizması

CCl₄ havadan, sudan ve topraktan vücuda girer. Karaciğer, beyin, böbrek, kaslar, yağ dokusu ve kanda daha yüksek konsantrasyonlarda olmak üzere tüm dokulara dağılır (Sanzgiri vd. 1997, Weber vd. 2003) Vücuttan atılımı başta solunum yoluyla ve çok az miktarda dışkı ve idrar yoluyla olmaktadır (Faroon vd. 2005).

CCl₄ tipik bir toksik ajandır ve toksik etkisi serbest radikal üretimi ile olmaktadır. Yağda çözünebildiği için hücre zarından geçebilir. Karaciğerde perivenüler hepatositler tarafından eksprese edilen sitokrom P450 enzim sisteminde bulunan CYP2E1 CCl₄'ü, CCl₃[•] radikaline dönüştürür (Starkel ve Leclercq 2011). Bu radikal, hemen oksijen ile reaksiyona girerek triklorometil peroksit (CCl₃O₂[•]) radikaline dönüşür. Bu reaktif serbest radikaller iki temel mekanizma ile hücre hasarına yol açarlar. Bu mekanizmalardan birincisi, hücre membran lipitlerine kovalent bağlanma ve diğeri lipit peroksidasyonudur (Kanter vd. 2003).

Farelere ve sıçanlara düşük dozlarda ve tekrarlanan bir biçimde CCl₄ verildiğinde, akut karaciğer hasarı ve devamında karaciğer fibrozisi oluşur. CCl₄, intraperitoneal (*i.p*), subkutan (*s.c*), oral gavaj ve inhalasyon yoluyla verilmektedir (Starkel ve Leclercq, 2011). Mısır yağında, zeytin yağında veya mineral yağlarda 1:1 ile 1:8 oranında değişen oranlarda çözülür ve 0,2-1 ml/kg vücut ağırlığında haftada 2 veya 3 kez verilir (Mederacke 2013).

mRNA düzeyinde tek doz CCl₄ enjeksiyonu sonrasında bile fibrojenizasyon saptanabilir. Ancak histolojik olarak fibrozis, en erken 4 enjeksiyon sonrasında gelişir ve tipik olarak sentrolobülerdir. Daha ilerleyen zamanlarda ise, portal alanlar birbirleriyle birleşmeye

başlar. Köprüleşme gösteren fibrozis en az 8 enjeksiyon sonrasında belirginleşir, birkaç ay sonrasında ise siroz meydana gelir (Starkel ve Leclercq 2011, Mederacke 2013). Fibrozis ve siroz oluşumu süresi canlının türüne ve soyuna, CCl₄ dozunun verilmiş sıklığı ve miktarına göre değişkenlik gösterir (Starkel ve Leclercq 2011).

2.4 Karaciğer Hasarında Oluşan Biyokimyasal Değişiklikler

Kimyasallar, ilaçlar, lipopolisakkaritler, mikotoksinler ve ağır metaller gibi çeşitli hepatotoksinler karaciğer hasarına neden olur. Birçok enzim karaciğerde üretilir ve karaciğer hücrelerine dağılmış halde bulunur. Bu yüzden karaciğer toksisitesini belirlemek amacıyla karaciğer enzimleri belirteç olarak kullanılmaktadır (Ingawale vd. 2014).

- a) **Alanin Aminotransferaz (ALT):** Aminoasit metabolizmasında rol oynayan aminotransferaz ya da transaminazdır. Bu enzimin etkisi ile alaninin alfa amino grubu alfa-ketoglutarata aktarılarak glutamik asit ve pirüvik asit oluşmaktadır. Hepatositlerin sitozolünde bulunur. Karaciğerde yüksek miktarlarda bulunur. Bundan dolayı ALT enzimi, karaciğer hasarına özel bir belirteç olarak kullanılmaktadır (Giannini vd. 2005, Özdemir 2009).
- b) **Alkali fosfataz (ALP):** Bir izoenzim grubundan oluşan ALP, fosfat gruplarının transferinde görevlidir. Karaciğer, kemik, plasenta, bağırsak, böbrek ve lökositlerde bulunmaktadır. En yüksek oranda karaciğer ve kemikte bulunur. Karaciğerde safra epitelinde bulunur. Hepatik ALP, diğer dokulardan kaynaklanan ALP'den gamma glutamil transferaz (GGT) tayini ile ayırt edilebilmektedir (Giannini vd. 2005, Özdemir 2009).
- c) **Gamma Glutamil Transferaz (GGT):** Glutatyondan diğer peptitlere gamma gruplarının transferini katalizleyen bir enzimdir. GGT, hepatosit ve safra epitelinde yer alır. Karaciğere özelleşmiş bir enzim değildir. Ayrıca kalp, beyin, böbrek, pankreas ve dalak gibi organların hücre membranlarında da

bulunmaktadır. Bundan dolayı, GGT seviyesi artışı ile bu organlarla ilgili hastalıkların varlığı belirlenebilmektedir (Goldberg 1980, Giannini vd. 2005, Özdemir 2009).

- d) **Bilirubin (TBIL):** Bilirubin hemoglobinin son yıkım ürünüdür ve serumda bulunur. Artan serum bilirubin düzeyi, kronik karaciğer hastalıklarının prognostik göstergesi olarak önem taşımaktadır (Özdemir 2009).
- e) **Albumin (ALB):** Karaciğer albumin, fibrinojen, alfa-1-antitripsin, haptoglobulin, transferrin ve protrombin gibi proteinlerin yapım yeridir. Serum albumin düzeyi, rutin olarak karaciğerin sentez potansiyelini araştırmak için sık kullanılan testlerden biridir. Yarı ömrü yaklaşık 20 gündür. Bu yüzden, serum albumin düzeyi akut karaciğer hastalıklarının ortaya konmasında yeterli olmamaktadır (Özdemir 2009).
- f) **Safra asiti (BA):** Safra asitleri sadece karaciğerde yapılmaları ve safra yolları ile barsağa döküldükten sonra ince barsağın son kısmından emilerek tekrar karaciğere gelmeleri nedeniyle karaciğer fonksiyonlarının değerlendirilmesi amacıyla kullanılır (Üçok vd. 2010).
- g) **Kolesterol (CHOL):** Kolesterol safrada litrede 1 gr kadar bulunur. Normalde kolesterol ve lesitin suda çözünmezler. Ancak safra tuzlarının oluşturduğu misellerin içinde çözünebilirler. Eğer safra tuzlarında bir azalma olursa, kolesterol çökerek safra taşlarını oluşturur. Düzensiz beslenme, obezite ve fazla alkol kullanımı karaciğerde yağlanmaya ve kolesterolün yükselmesine neden olabilir. Bu yağlanma zamanla karaciğer fonksiyonlarının bozulmasına yol açabilir (Noyan 2004).

2.5 Serbest Radikal Üretimi ve Sonucunda Oluşan Lipit Peroksidasyonu

Serbest radikal, bir orbitalde bir veya birden fazla ortaklanmamış elektron içeren atom, atom grubu veya moleküller olarak ifade edilir. Organizmada normal oksijen metabolizması sırasında oluşan serbest radikaller, antioksidanlar tarafından etkisiz hale getirilirler. Fakat bu dengenin sağlanamadığı durumlarda oksidatif stres oluşur. Başta lipitler olmak üzere, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi önemli hücresel bileşenler hasar görmeye başlar. Süperoksit ve hidroksil radikali sitoplazma, mitokondri, endoplazmik retikulum ve nukleus membranlarında lipit peroksidasyonunu başlatarak geçirgenliğini artırır. Biyomembranlar ve hücre içi organellerin membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünlerini meydana getirirler. Lipit peroksidasyonu sonucu oluşan son ürünler malondialdehit (MDA), 4-Hidroksinonenal (HNE) ve 4-Hidroksihekzenal (HHE) dir (Catala 2009). Dolayısıyla bu ürünler, lipit peroksidasyonunun belirteci olarak kullanılmaktadır (De Zwart vd. 1999).

2.6 Serbest Oksijen Radikallerine Karşı Antioksidan Savunma Mekanizması

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunlara bağlı hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizması geliştirilmiştir. Bunlar antioksidanlardır (Valko vd. 2007).

Antioksidanlar, şu şekillerde koruma sağlarlar (Spletstoesser ve Werner 2002);

- ❖ Tek oksijen gibi reaktif metabolitleri etkisiz hale getirerek,
- ❖ Serbest radikallerle direk kimyasal reaksiyona girerek,
- ❖ Reaktif metabolitleri ortadan kaldırarak veya bu radikallerin daha az reaktif ya da toksik olmayan ürünlere dönüşümünü sağlayarak,
- ❖ Radikal üreten enzimleri inaktif hale getirerek.

Antioksidanlar, enzimatik yapıda olabilecekleri gibi non-enzimatik yapıda da olabilirler (Rahman vd. 1999). Enzimatik yapıda olanlar arasında süperoksit dismutaz (SOD),

katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) sayılabilir. Glutatyon (GSH), C Vitamini, α -tokoferol, karotinoidler ve flavinoidler ise enzimatik yapıda olmayan antioksidanlardır (Valko vd. 2007).

Glutatyon (γ -glutamilsisteinilglisin), hemen hemen tüm hayvan hücrelerinde tiyol grubu içeren bir tripeptiddir. DNA ve protein sentezi, enzim aktivitesinin düzenlenmesi, hücre içi ve dışı taşıma gibi hücrel fonksiyonları vardır. Ayrıca başlıca antioksidan olarak hücrelerin korunmasında görev alır (Meister 1994). GSH, hepatosit içerisinde bulunan başlıca antioksidanttır (Yuan ve Kaplowitz 2009).

Süperoksit Dismutaz (SOD) enzimi, 1969 yılında McCord ve Fridovich tarafından sığır eritrositlerinden izole edilmiştir. Substrat olarak serbest oksijen radikallerini kullanarak süperoksit anyonunu hidrojen peroksit ve oksijene dönüştürür. Bu sistem sayesinde oksidatif stres kontrol altında tutulmaktadır (Carillon vd. 2013).

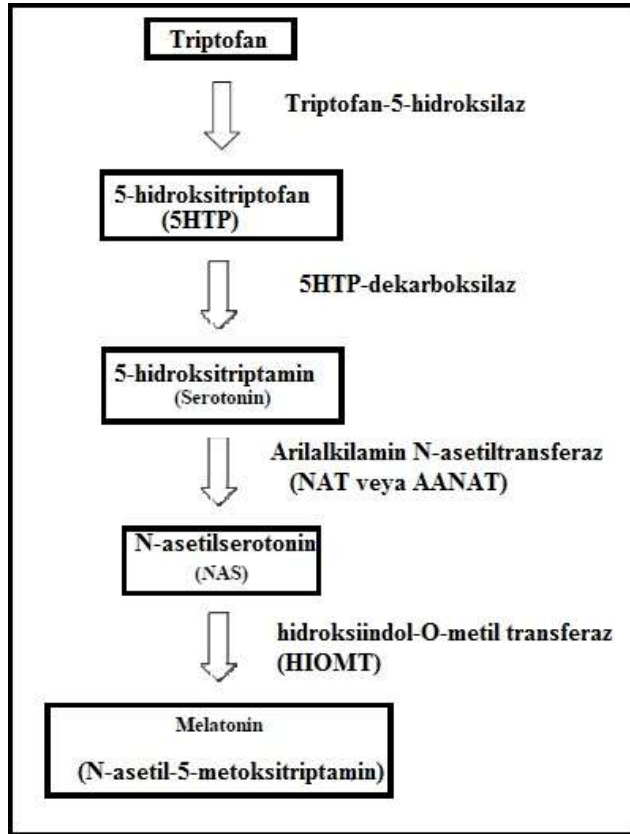
2.7 Melatonin

2.7.1 Melatoninin tanımı ve biyosentezi

Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptofan), memelilerin pineal bezinde üretilen endojen bir hormondur (Reiter 2003). Ayrıca over, kemik iliği hücreleri, lens, safra ve gastrointestinal sistem tarafından da sentezlenip salgılanır (Reiter vd. 1995). Tek hücrelilerden yüksek omurgalılara kadar olan canlı gruplarında (Manchester vd. 1995, Hardeland ve Poeggeler 2003, García vd. 2014) ve ilave olarak bitkilerde de (Tan vd. 2003, Paredes vd. 2009, García vd. 2014) tanımlanmıştır.

Melatonin biyosentezi ve salgılanması, süprakiazmatik nukleus (SKN) kontrolünde, aydınlık/karanlık döngü ile gerçekleşir. SKN, karanlık boyunca melatonin üretimini ve salgılanmasını uyarır. Böylece gün boyunca insan serum melatonin konsantrasyonu düşükken, gece boyunca kanda yüksek seviyeye ulaşır (Dziegiel vd. 2008, Stehle vd. 2011).

Melatonin sentezlendikten sonra depo edilmeyip, kapillere gönderilir. Pinealositler kandan triptofanı alarak, hidroksilasyon ve dekarboksilasyon ile serotonine dönüştürürler. Serotonin N-asetil transferaz (NAT) tarafından N-asetil serotonine çevrilir. N-asetil serotonin ise, hidroksiindol-O-metil transferaz (HIOMT) enzimi ile metillenerek melatonine dönüştürülür (Şekil 2.2) (Macchi ve Bruce 2004).



Şekil 2.2 Melatonin Biyosentezi (Macchi ve Bruce 2004)

Melatonin metabolizmasının esas gerçekleştiği yer olan karaciğerde, dolaşan melatoninin %90'dan fazlası temizlenmektedir. Dolaşan melatonin karaciğerde hidroksillenir. Hidroksillendikten sonra, üre içerisine sülfat ve çok az miktarda glukronit konjugatları şeklinde salgılanır (Francis vd. 1987, Claustrat vd. 2005).

Melatoninin farmakolojik olarak tanımlanmış iki membran reseptörü bulunmaktadır (Maldonado vd. 2009). ML1, yüksek affiniteli (pikomolar konsantrasyonlarda) bağlanma yeri olup, a ve b alt tipleri gösterilmiştir. ML2 ise, düşük affiniteli (nanomolar konsantrasyonlarda) bağlanma yerleri olarak tanımlanmıştır. ML1 reseptörlerinin

aktivasyonu, G proteini üzerinden, adenilat siklazı inhibe ederek, hedef hücrelerde siklik AMP (cAMP) düzeyini düşürür. Bu reseptörler, muhtemelen, retinal fonksiyonların, sirkadiyen ritimlerin ve üremenin regülasyonunda rol oynamaktadır. ML2 reseptörlerinin aktivasyonu ve dağılımı hakkında henüz kesin bilgi mevcut değildir (Reppart vd. 1996).

2.7.2 Melatoninin etkileri ve antioksidan özelliği

Melatonin reseptöre bağımlı ya da bağımlı olmayan mekanizmalarla çeşitli fizyolojik durumlarda görev alır.

Melatoninin başlıca etkileri şunlardır:

- ❖ Jetlag ve uykunun düzenlenmesi (Dijk ve Cajochen 1997, Parry 2002, Reiter 2003, Hardeland vd. 2011),
- ❖ Üremenin kontrol edilmesi (Tamura vd. 2014),
- ❖ İmmun fonksiyonların düzenlenmesi (Guerrero ve Reiter 2002, Esteban vd. 2013, Vishwas vd. 2013),
- ❖ Anti-tümoral etki (Nakamura vd. 2008, Hardeland vd. 2011),
- ❖ Anti-fibrotik etki (Tahan vd. 2004, Hong vd. 2009, Gómez-Florit vd. 2013).
- ❖ Antioksidan etki

Melatoninin ideal bir antioksidan olduğu şu şekilde özetlenebilir;

- 1) Melatoninin hem oksijen kaynaklı hemde nitrojen kaynaklı serbest radikalleri ortadan kaldırması sebebiyle, geniş spektrumlu bir antioksidan olduğu ileri sürülmektedir (Tan vd. 2002, Galano vd. 2011).
- 2) Biyolojik bariyerleri kolayca ve hızlıca geçebilme yeteneğidir (Karbownik ve Reiter 2000, Galano vd. 2011). Melatonin lipofilik ve hidrofilik özelliindedir

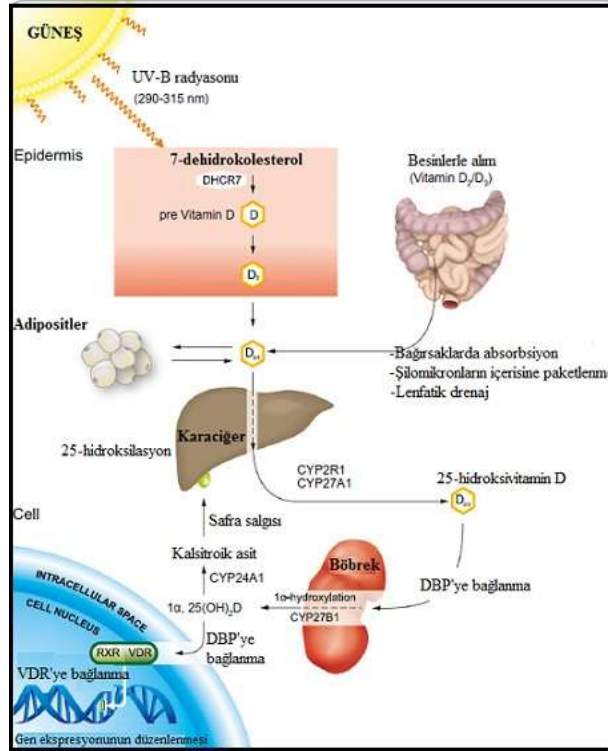
(Shida vd. 1994, Macchi ve Bruce 2004, Kandimalla vd. 2010). Bu özellikleri sayesinde fizyolojik bariyerleri geçerek, hızlı bir şekilde hücelere girebilmekte ve serbest radikal hasarını azaltmaktadır (Reiter 1995, Reiter vd. 2003, Galano vd. 2011).

- 3) Kolay elde edilebilir olmasıdır. İhtiyaç duyulduğunda, besinlerden elde edilebilmelidir veya endojen kaynaklardan üretilmelidir. Melatonin endojen olarak üretilir ve aynı zamanda birçok meyve, sebze ve kuruyemiş gibi besinlerden alınabilir (Paredes vd. 2009, Iriti vd. 2010, Murch vd. 2010).
- 4) Antioksidanların rejenere olabilmesidir. Bir antioksidan ile serbest radikalın etkileşimi sonucu, okside yapıda bir antioksidan oluşur. Bu yeni oluşan yapı, orijinal formundan daha az topalayıcı etki gösterir. Bu yüzden bazı antioksidanlar fizyolojik olarak reaktifliklerini azaltarak veya okside formlarını serbest radikallerle etkileşime sokarak etkinliklerini sürdürebilirler. Melatonin serbest radikallerle etkileşime girdikten sonra, değişik yollarla rejenere olabilir (Mahal vd. 1999, Pandi-Perumal vd. 2006, Galano vd. 2011). Ayrıca glutatyon gibi hücre içi antioksidanların üretimlerini ve rejenere olmalarını da arttırırlar (Sahin vd. 2004).
- 5) Antioksidan hücre ve dokularda toksik olmamalıdır (Rose ve Bode 1993). Melatoninin farklı dozları uygulanmış hayvanlarda, toksisite kayda alınmayacak derecede düşük bulunmuştur (Jahnke vd. 1999, Galano vd. 2011). Sadece *in vitro* olarak kanser hücrelerinde yapılan araştırmalarda, melatoninin dozuna ve inkübasyon süresine bağlı olarak pro-oksidan olduğu saptanmıştır (Osseni vd. 2000, Albertini vd. 2006, Buyukavci vd. 2006).

2.8 D Vitamini

2.8.1 D Vitamini tanımı ve biyosentezi

D vitamini önemli bir sekosteroid hormondur. Deride bulunan 7-dehidrokolesterol güneş ışığının etkisiyle previtamin D₃'e dönüşür. Previtamin D₃, ısıya bağımlı bir reaksiyon ile hızlı bir şekilde Vitamin D₃'e dönüşür. Güneş ışığına aşırı miktarda maruz kalındığında, previtamin D₃ ve Vitamin D₃ inaktif hale dönüştürülür. Besinlerden alınan Vitamin D₂ (ergokalsiferol) ve D₃ (kolekalsiferol) absorbe edilerek intestinal lümeneye katılır, enterositler tarafından absorbe edilir ve şilomikronlar halinde paketlenerek lenfatik dolaşıma gönderilir. Deriden sentezlenen ve besin kaynaklarından alınan D Vitamini adipositlerde depo edilir ve bu hücreler tarafından salgılanır. Dolaşımda bulunan D Vitamini, D Vitamini bağlayıcı proteine (DBP) bağlanarak, karaciğerde 25(OH)D'ye dönüşür. Bu reaksiyon mikrozomal CYP2R1 ve mitokondriyal CYP27A1 enzimlerini içeren sitokrom P450 izoformlarından 25-hidroksilaz enzimi tarafından gerçekleştirilir. Kalsidiol olarak ta bilinen 25(OH)D (D Vitamininin inaktif formu), 2-3 haftalık yarılanma ömrüne sahiptir ve insan serumunda D Vitamini seviyesinin ölçülmesinde kullanılır (Kitson ve Roberts 2012). D Vitamini sentezindeki en son adım, 1 α -hidroksilasyonudur. Bu olay ağırlıklı olarak böbrek proksimal tübülünde ve daha az miktarda da lenfositler ve paratiroid dokuda gerçekleşir. 1- α hidroksilaz (CYP27B1) aracılığıyla aktif form 1 α ,25(OH)₂D veya kalsitriol oluşturulur. Kalsitriolün yarı ömrü 4 saattir. 1 α ,25(OH)₂D Vitamin D Reseptörünü (VDR) aktiveleştirir ve retinoid x reseptörüyle bir heterodimer oluşturur. Bu heterodimer, hedef genlerin promotor bölgelerindeki D Vitamini yanıt elemanlarına bağlanır (Şekil 2.3) (Kitson ve Roberts 2012). D Vitamini mekanizması parathormon (PTH) tarafından indüklenirken, osteositlerde üretilen fibroblast büyüme faktörü 23 (FGF23) tarafından inhibe edilir (Quarles 2008).



Şekil 2.3 D Vitamini Sentezi (Kitson ve Roberts 2012)

2.8.2 D Vitamininin etkileri

1,25(OH)₂D₃'ün etki mekanizması diğer steroid hormonların etki mekanizmasına benzemektedir. 1,25(OH)₂D₃ intraselüler reseptör proteinleriyle non-kovalent bağ yapar. Bu steroid- reseptör kompleksi hedef hücrelerin nükleusunun DNA'sıyla birlikte bulunur ve gen transkripsiyonunu selektif bir tarzda hızlandırır (Akyıldızlar 2014). Vitamin D reseptörü (VDR), karaciğer, pankreas gibi dokularda ve monositler, makrofajlar, T ve B lenfositler, doğal öldürücü hücreler ve dendritik hücreler gibi immün hücrelerde eksprese edilir. Bu ekspresyon en çok gastrointestinal sistemde bulunan epitel hücrelerinde gerçekleşir (Kitson ve Roberts 2012). 1,25(OH)₂D'nin VDR'ye bağlanarak aktifleşmesiyle, direkt veya dolaylı olarak 200'den fazla genin ekspresyonu düzenlenir. Bu genler, hücre proliferasyonu, farklılaşması, apoptozisini ve anjiyogenezi düzenler (Holick 2007, Kitson ve Roberts 2012). D Vitamininin farklı dokularda fibrozisi önlediği de saptanmıştır. (Tan vd. 2006, Ramirez vd. 2010, Zhang vd. 2010a, Abramovitch vd. 2011).

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

Bu çalışma 17.01.2012 tarih ve G.Ü. ET-12.010 kodlu etik kurul kararı ile Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi.

3.1 Deney Hayvanları

Çalışmada kullanılan 42 adet 200-220 gr ağırlığında erkek Wistar Albino sıçanlar Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi'nden (GÜDAM) alındı. Hayvanlar sabit sıcaklıkta, 12 saat aydınlık-karanlık periyodunda ayarlanan odalarda tutulmuş ve standart pellet yem ve su ile beslendi.

3.2 Uygulanan Yöntemler

3.2.1 Araştırma planı

Sıçanlar her grupta 6 hayvan olacak şekilde 7 gruba ayrıldı.

Deney grupları

- 1) Kontrol grubu (Mısır yağı)
- 2) Kontrol grubu (PBS+Etanol)
- 3) CCl₄
- 4) CCl₄+MEL (I) (10 hafta)
- 5) CCl₄+MEL (II) (12 hafta)
- 6) CCl₄+D Vit (I) (10 hafta)
- 7) CCl₄+D Vit (II) (12 hafta)

Fibrozis oluşturabilmek için bir ön çalışma planlandı. Bunun için etik kuruldan alınan 3 hayvandan 1. sine 6 hafta, 2. sine 8 hafta, 3. süne ise 10 hafta CCl₄ uygulaması yapıldı. Hayvanlardan alınan kan ve karaciğer dokularında 10 hafta uygulamasının fibrozis

oluşturduğu belirlendi. Diğer verilecek maddelerin uygulama süreleri buna göre belirlendi.

1. grup sıçanlara CCl₄ ve D Vitamini çözücüsü olan mısır yağı 1,5 ml/kg 10 hafta boyunca subkutan (s.c) olarak haftada iki kez uygulandı. 2. kontrol grubuna ise melatonin çözücüsü olan %1 oranında PBS+etanol 10 hafta boyunca her gün s.c yoldan verildi. 3. gruba hepatik fibrozis oluşturmak amacıyla, 10 hafta boyunca haftada 2 kez 1:1 oranında mısır yağında çözünmüş steril CCl₄, 1,5 ml/kg olacak şekilde s.c olarak enjekte edildi. 4. ve 5. gruplara CCl₄ enjeksiyonunun başlangıcından itibaren günde 10mg/kg dozunda melatonin s.c olarak verilirken, 5. grup hayvanlara 10. haftanın sonunda CCl₄ verilmesi sona erdirildi, ancak MEL 12. haftanın sonuna kadar verilmeye devam edildi. 6. ve 7. gruplara 0,5 µg/kg dozunda 1,25(OH)₂D₃ intraperitoneal (i.p) yoldan verildi. 6. ve 7. grup hayvanlara 10. haftanın sonunda CCl₄ verilmesi sona erdirildi, ancak 7. gruba 1,25(OH)₂D₃ 2 hafta daha verildi. Deney sonunda sıçanlardan ketamin/rompun anestezisi altında intrakardiyak kan alınarak, karaciğer dokuları çıkarıldı. Etilendiamin tetraasetikasit (ETDA)'li tüplere alınan kanlar 3000 g'de 5 dakika santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. Alınan karaciğer doku numunelerinin bir kısmı ve plazma sıvı azotta dondurularak çalışmaya kadar -80 °C'de derin dondurucuda saklandı. Dokuların bir kısmı ise, histokimyasal ve immunohistokimyasal incelemeler için %10'luk formol solüsyonuna alınarak tespit edildi.

3.2.2 Dokuda malondialdehit (MDA) tayin yöntemi

Doku örnekleri homojenizatör ile soğuk trikloroasetik asit (TCA) (1 g doku + 9 ml %10'luk TCA) içinde buzlu ortamda homojenize edildi. Daha sonra 15 dakika süreyle 4000 rpm de santrifüj edildi ve süpernatant alınarak 4000 rpm de 8 dakika tekrar santrifüj edildi. Örnekten 750 mikrolitre alınarak üzerine 750 mikrolitre % 0.67'lik tiobarbitrik asit (TBA) eklendi. Daha sonra örnekler 100°C de kaynayan su banyosunda 15 dakika bekletildi. Daha sonra soğutularak 4000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant alınarak her bir örneğin absorbanansı 532 nm'de tayin edildi. Karaciğer dokusu lipid peroksidasyon düzeyi $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ katsayısı kullanılarak MDA eşdeğeri olarak ifade edildi (Casini vd. 1986).

3.2.3 Dokuda glutatyon (GSH) tayin yöntemi

Karaciğer dokuları homojenize edilip santrifüj edildikten sonra, 2 hacim süpernatant, 8 hacim 0.3M Na₂HPO₄.2H₂O ve 1 hacim ditiyobisnitrobenzoat (0.4 mg/ml % 1'lik sodyum sitrat) çözeltisi ile karıştırıldı. Örnekler oda ısısında 5-10 dk inkübe edildi. Daha sonra spektrofotometrede karışımın 412 nm dalga boyunda absorbanansı ölçüldü ve glutatyon düzeyleri 13.600 M⁻¹ cm⁻¹ katsayısı kullanılarak hesaplandı (Aykaç vd.1985).

3.2.4. Dokuda süperoksit dismutaz (SOD) tayin yöntemi

100 mg doku 1/10 oranında (w/v) 20 mM HEPES (2-[4-(2-hidroksietil)piperazin-1-yl]ethanesulfonik asit) (pH:7,2) tamponunda buzlu su banyosu içinde homojenizatör ile homojenize edildi. 1500 x g'de +4°C'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatantlar Cayman marka SOD kiti ile 460 nm dalga boyunda ölçüldü.

3.2.5 Serum örneklerinde karaciğer enzim tayini

Alkalin fosfataz (ALP), Albumin (ALB), Alanin aminotransferaz (ALT), Safra Asidi (BA), Kolesterol (CHOL), Gama glutamil transferaz (GGT), Total bilirubin (TBİL) serum aktiviteleri memeli karaciğer profili rotoru ile VetScan marka Biyokimya Analizatörü'nde ölçüldü ve istatistiksel analizleri yapıldı.

3.2.6 Histokimyasal inceleme

Doku örnekleri %10'luk formole alınarak tespit edildi. Yaklaşık bir gece akarsu altında kaldıktan sonra %70'lik alkole alınıp bekletildi. Alkol ve parafin serilerinden geçirildi. Bloklama yapıldı.

Alkol serileri

1- %80 alkol 1 saat

- 2- %95 alkol 1 saat
- 3- Absolü alkol 1 saat
- 4- Absolü alkol 1 saat
- 5- Ksilen 1,5 saat
- 6- Ksilen 1,5 saat
- 7- 45⁰'lik parafin 1,5 saat (2 defa)
- 8- 55⁰'lik parafin 1,5 saat (2 defa)
- 9- 55⁰'lik parafin ile blok yapıldı.

Bloklanmış doku örneklerinden Thermo-Scientific marka mikrotom yardımı ile 4-5 µm kalınlığında kesitler histokimyasal inceleme için normal lamlara, immunohistokimyasal inceleme için ise poli-lizin kaplı lamlara alındı. Histopatolojik inceleme için dokular Hematoksilen-Eozin (H&E) ile boyandı. H&E ile genel doku morfolojisi incelendi. Fibrosiz (Tip I kollajen) Masson-Trikrom boyama ile, glikojen miktarı Periyodik Asit Shift (PAS) boyama ile, retiküler lifler (Tip III kollajen) ise gümüşleme (retikülin) yöntemi ile gösterildi.

3.2.6.1 Hematoksilen & Eozin (H&E) Boyama Yöntemi

1. Parafinin uzaklaştırılması için kesitler iki defa ksilenden geçirildi.
 1. min 30 dakika
 2. min 30 dakika
2. Ksilenin uzaklaştırılması ve doku suyunun çekilmesi için azalan alkol serilerinden geçirildi.

Absolü etil alkol	5 dakika
Absolü etil alkol	5 dakika
%95 etil alkol	5 dakika
3. Çeşme suyundan geçirildi.
4. Harris hematoksileninde boyandı (10-15 dakika).
5. Çeşme suyundan geçirildi.

6. Asit alkolde diferansiye edildi (batırılıp çıkarıldı).
7. Tekrar çeşme suyundan geçirildi.
8. Scott'un solusyonunda 5-10 dakika mavileştirildi.
9. Birkaç dakika suda yıkandı.
10. 1-3 dakika kadar eosinle zıt boyama yapıldı.
11. Bir dakika kadar eosinin fazlası gidene kadar akarsuda yıkandı.
12. Kesitlerin suyunu almak için yükselen alkol serilerinden geçirildi.
 - %95 etil alkol – 5 dakika
 - Absolü etil alkol -5 dakika
 - Absolü etil alkol -5 dakika
13. Alkolu uzaklaştırmak ve parlaklaştırmak için ksilenden geçirildi.
 - Ksilol 1-2 saat
14. Entellan ile kapatıldı.

3.2.6.2 Masson trikrom boyama yöntemi

1. Ksilol (iki kez en az 2-3 dakika), saf alkol, %95'lik alkol, %70'lik alkol serilerinden geçirililerek ve parafinden kurtarıldı ve distile suda yıkandı.
2. 56°C'de 15 dakika Bouin solüsyonunda mordanlandı.
3. Kesitler soğutulduktan sonra 5 dakika akan suda tutuldu.
4. Distile sudan geçirildi.
5. Weigert'in Demirli Hematoksilen solüsyonunda 5 dakika tutuldu.
6. Tekrar çeşme suyunda 5-10 dakika yıkandı.
7. Deiyonize sudan geçirildi.
8. Diferensiyasyon için Biebrich asit fuksin solüsyonunda 5 dakika tutuldu.
9. Deiyonize sudan geçirildi.
10. Fosfomolibdik-fosfotungstik asit solüsyonunda 5 dakika şeffaflaştırıldı.
11. Anilin mavisi solüsyonunda 5 dakika tutuldu.
12. Distile sudan geçirildi.
13. %1 'lik asetik asit solüsyonunda 2 dakika tutuldu.
14. %95'lik alkol, saf alkol ve ksilolden (her birinden 2'şer kez ve 5 dakika) geçirilerek şeffaflaştırıldı ve entellan ile kapatıldı.

3.2.6.3 Periyodik asit schiff (PAS) boyama

1. Deparafinizasyon işlemlerinden sonra kesitler distile su ile yıkandı.
2. Periyodik asit solüsyonunda 5 dk tutuldu.
3. Çeşme suyundan geçirildikten sonra distile su ile yıkandı.
4. Schiff solüsyonunda 15 dk bekletildi.
5. Çeşme suyundan geçirildikten sonra distile su ile yıkandı.
6. Gill III Hematoksilen solüsyonunda 2 dk tutuldu.
7. Çeşme suyundan geçirildi.
8. %95'lik alkol, saf alkol ve ksilolden (her birinden 2'şer kez ve 5 dakika) geçirilerek şeffaflaştırıldı ve entellan ile kapatıldı.

3.2.6.4 Retikülin (gümüşleme) boyama

1. Deparafinizasyon işlemlerinden sonra kesitler distile su ile yıkandı.
2. Asidifiye Potasyum Permanganat ile kesitler 5 dk okside edildi.
3. Çeşme suyu ile yıkandı.
4. Oksalik asit solüsyonunda kesitler 1 dk süre ile şeffaflaştırıldı.
5. Çeşme suyu ile yıkandı.
6. Ferrik amonyum sülfat solüsyonunda 15 dk tutuldu.
7. Distile su ile 2-3 kere yıkandı.
8. Amonyak gümüş solüsyonunda 12-15 sn tutuldu.
9. Distile su ile 2-3 kere yıkandı.
10. %10'luk formalin solüsyonunda 1-2 dk tutuldu.
11. Distile su ile yıkandı.
12. Sodyum tiyosülfat solüsyonunda 5 dk tutuldu.
13. Sırasıyla %90'lık etanol, %100'lük etanolde 5'er dk, ksilende ise 2'şer kere 30 dk süre ile bekletildi, entellan ile kapatıldı.

3.2.7 İmmunohistokimyasal inceleme

Poli-lizin kaplı lamlara alınan doku kesitlerinde MMP-9 ve dezmin immunohistokimyasal boyaması, Biotin-Avidin-HRP yöntemi kullanılarak yapıldı.

Boyama Protokolü

1. Kesitler 1 saat deparafinizasyon işleminden geçirildi.
2. Distile su ile 5 dakika yıkandı.
3. Hidrofobik bir bariyer oluşturmak amacıyla doku kesitlerinin arasına Pap Pen[®] kullanılarak paralel çizgiler çizildi.
4. %3'lük H₂O₂'de 10 dakika inkübe edildi.
5. TBS (Tween Tampon Solüsyonu) ile yıkandı.
6. Bloklama solüsyonu ile 5 dk inkübe edildi.
7. TBS (Tris Tampon Solüsyonu) ile yıkandı.
8. Primer antikor (anti-MMP-9/anti-dezmin) ile 10 dk inkübe edildi.
9. TBS (Tris Tampon Solüsyonu) ile yıkandı.
10. Sekonder antikor ile 10 dakika inkübe edildi.
11. TBS (Tris Tampon Solüsyonu) ile yıkandı.
12. Streptavidin HRP ile 10 dakika inkübe edildi.
13. TBS (Tris Tampon Solüsyonu) ile yıkandı.
14. Kromojen solüsyonu ile 10 dakika inkübe edildi.
15. TBS (Tris Tampon Solüsyonu) ile yıkandı.
16. Zıt boya olarak Mayer's hematoksilen 1 dakika inkübe edildi.
17. TBS (Tris Tampon Solüsyonu) ile yıkandı.
18. Distile sudan geçirildi.
19. Özel kapatma maddesi ile kapatma işlemi gerçekleştirildi.

3.2.8 Hücre kültürü

Çalışmada kullanılan HepG2 ve Hep3B hücre hatları Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Öğretim Üyesi Doç.Dr. Erkan YILMAZ'dan sağlandı.

HepG2 daimi hücre hattı, hepatoselüler karsinoma hastalığına sahip 15 yaşında ergenlik çağında olan bir erkekten alınarak hazırlanmıştır (Anonymous 2014a). Hep3B hücre hattı ise, hepatoselüler karsinomalı 8 yaşında zenci erkek çocuğundan izole edilmiştir. Bu hücre hattı Hepatit B Virüs genomunu içerir (Anonymous 2014b). HepG2 toksikolojik çalışmalar için uygun bir model olarak kullanılmaktadır (Dehn vd. 2004). HepG2 ve Hep3B hücre hatları çeşitli plazma apoproteinlerini salgırlar (Knowles vd. 1980, Zannis vd. 1981). Bu apoproteinler insan karaciğerinde sentezlenen apoproteinlere benzer özelliklere sahiptir (Zannis vd. 1981).

3.2.8.1 Hücre besiyeri

Hep3B ve HepG2 hücreleri için DMEM (Dulbecco's Minimum Essential Medium) (Sigma-Aldrich, USA), %10 inaktif FBS (fötal bovin serum) ve %1 antibiyotik-antimikotik (Penisilin/Streptomisin) karışımı içeren besiyeri kullanıldı.

Çalışmada kullanılan hazır olarak inaktive edilmemiş serumlar 56°C'de 30 dk inaktive edildi, ancak inaktive edilenlerde bu işlem uygulanmadı. Uygulamalardan önce besiyeri 0.22 µm çapında steril filtreden geçirildi.

3.2.8.2 Hücrelerin inkübasyonu ve bakımı

Çalışmada belirtilen hücre kültürleri 75 cm²'lik flasklarda üretildi. Hücrelerin besiyerleri iki üç gün aralıklarla değiştirildi; çalışma boyunca her gün besiyerinin rengi (pH için özellikle önemli olduğundan), hücrelerin morfolojik görünümleri ve çoğalma hızları ışık mikroskobu ile kontrol edildi. Pasajlayabilmek amacıyla, hücreler steril PBS ile yıkanarak tripsine edildi. Farklı hücrelere göre değişen 2-5 dakikalık tripsin

inkübasyonundan sonra, besiyeri eklenmesi yapıldı ve flask üzeri pipete edilerek yıkandı ve yeni steril flasklara aktarıldı. Pasajlama işlemi hücrelerin üreme hızına göre haftada bir yapıldı. Laminar kabinin ultraviyole ışığı çalışmadan önce ve sonra 10-20 dakika açık bırakıldı, her kullanım öncesi ve sonrası çalışma ortamı %70'lik etanol ile temizlendi. Kabine alınan sarf malzemelerinin üzeri de %70'lik etanol ile temizlendi.

3.2.8.3 Deney planı

Çalışmada, platalere aktarılacak hücrelerin sayısını belirlemek amacıyla hemositometre lamı kullanıldı. Lamın üzerinin ince bir lamel ile kapatılmasından sonra steril ependorf içerisinde 10 µl örnek 200 µl besiyeri ile seyreltildi ve lamelin kenarına 10 µl konuldu. Bu sonuç hücre sayısı $X10^4$ olarak ifade edildi ve mililitre süspansiyon başına hücre sayısını elde etmek için seyreltme faktörü olan 20 ile çarpıldı. Buna göre, 100 µl hücre-besiyeri karışımı, $5X10^4$ hücre/kuyucuk (kuyucuk alanı 0.32 cm²) olacak şekilde 96 kuyucuklu platalere aktarıldı. 37°C, %5 CO₂'li inkübatörde bir gün boyunca bekletildi.

Çalışma Çözeltileri

1. MTT (0.5 mg/ml): 5 mg MTT tartıldı ve 10 ml steril PBS'de çözdürüldü ve alüminyum folyoya sarılarak +4°C buzdolabında saklandı.
2. CCl₄: CCl₄ non-polar bir madde olduğu için çözücü olarak DMSO kullanıldı ve besiyerine eklendi. 10 ml DMEM (FBS içermeyen) besiyeri içerisine, 25 µl DMSO eklendi. Üzerine 40 µl CCl₄ eklenir. Alüminyum folyoya sarılarak +4°C buzdolabında saklandı.
3. Melatonin (10X): % 0,01 PBS+Etanol karışımında çözüldü. +4°C buzdolabında saklandı.
4. D Vitamini (10X): $2,5X10^{-6}$ M olacak şekilde hazırlandı. 1,152 ml 1,25 (OH)₂D₃ 10 ml DMEM besiyeri içerisinde çözüldü. +4°C buzdolabında saklandı.
5. PBS+Etanol (10X): 10 ml PBS içerisine 10 µl Etanol koyuldu. +4°C buzdolabında saklandı.

6. DMSO (10X): 10 ml DMEM (FBS içermeyen) besiyeri içerisine, 25 µl DMSO eklendi. +4°C buzdolabında saklandı.
7. Lizis Solüsyonu: 100 ml izopropil alkol üzerine %1 oranında deterjan (Triton-x) ve 0,1 N HCl eklendi. Oda sıcaklığında tutuldu.

Hücre besiyerleri, fosfat tampon solüsyonu (PBS), tanımlama gereçleri (MTT ayırıcı) ve bazı sarf malzemeleri (DMEM) 2-8°C'lik buzdolabında; fötal bovin serum, L-glutamin antibiyotik solüsyonları -20°C'de; hemen kullanılacak hücre stokları -80 °C'de, hücre stokları ise -196°C'lik azot tanklarında saklandı.

Gruplar;

1. Kontrol grubu (DMEM)
2. PBS+Etanol
3. Melatonin
4. D Vitamini
5. DMSO
6. CCl₄
7. CCl₄+Melatonin
8. CCl₄+D Vitamini olacak şekilde düzenlenmiştir. Çalışmada 3 adet 96 kuyucuklu platelerden besiyerleri çekilmiştir. Deney grupları, her grupta son hacim 100µl olacak şekilde tasarlanmıştır. Sırasıyla kontrol grubuna, DMEM besiyeri; 2. gruba %10 PBS+Etanol; 3. gruba %10 Melatonin; 4. gruba %10 D Vitamini, 5. gruba %10 DMSO, 6. gruba %50 CCl₄; 7. gruba %50 CCl₄ ve %10 Melatonin; 8. gruba ise %50 CCl₄ ve %10 D Vitamini ilave edilmiştir. Deneyde melatonin çözücüsü olan PBS+Etanol ve CCl₄ çözücüsü olan DMSO, hücre yaşamını etkileyip etkilemediğinin anlaşılması açısından ayrı gruplar halinde eklenmiştir.

3.2.8.4 MTT ölçümü

Hücre çoğalmasının saptanması için tetrazolium tabanlı kolorimetrik bir yöntem olan MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid, sarı tetrazol) yöntemi kullanılmıştır. Zamana ve doza bağlı olarak çeşitli etken maddeler ile inkübasyona bırakılmış hücrelerin MTT ile muamele edildiğinde canlı hücrelerin formazan kristalleri oluşturması esasına dayanır. Madde uygulamalarının ardından 2. 24. ve 48. saatin sonunda hücrelerin üzerine 10 µl MTT çalışma solüsyonu eklenmiştir. İki saatlik inkübasyondan sonra mikroskopik inceleme yapıldı ve takibinde 100 µl lizis solüsyonu ilave edilmiştir. Işığa duyarlı bir yöntem olduğundan çalışmalar karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir. Platelere, optik dansiteleri mikroplate okuyucuda 470 nm dalga boyunda okunmuştur.

Yapılan denemeler sonucu, hücre canlılığı yüzdesi aşağıdaki eşitlik ile belirlenmiştir.

$$[\text{Canlılık Oranı (\%)} = \frac{\text{Denev Grubu}}{\text{Kontrol Grubu}} \times 100]$$

3.2.9 İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizler için SPSS 20.0 programı kullanıldı. Ölçümle elde edilen değişkenler bakımından bağımsız ikiden fazla grubun karşılaştırıldığında, parametrik test varsayımlarının sağlanmaması nedeniyle Kruskal-Wallis varyans analizi kullanıldı. Kategorik değişkenler bakımından ilişki ya da gruplar arası farklılık incelemesinde çoklu karşılaştırma (Post-hoc) testi uygulandı. Tanımlayıcı istatistik olarak nitel değişkenlerde oran, nicel değişkenlerde ise ortalama (minimum-maksimum) verildi. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

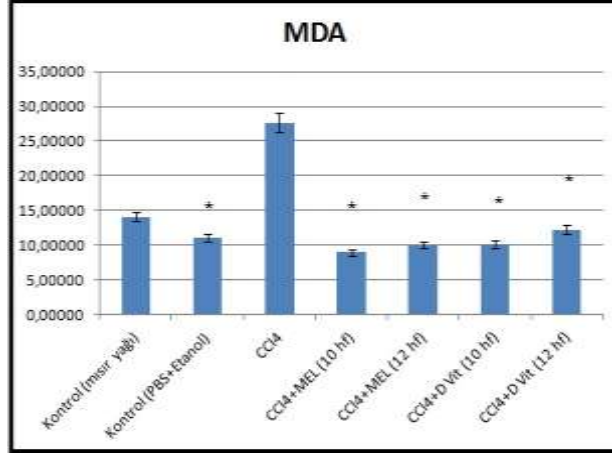
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Malondialdehit (MDA)

Karaciğer dokusu MDA düzeyleri için gruplar karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,047$; $p<0,05$). Farklılığı yaratan grupların bulunması amacıyla çoklu karşılaştırma testlerinden yararlanılmış ve olası tüm ikili kombinasyonlar arasında farklılık aranmıştır. Buna göre, kontrol (PBS+ethanol) ile CCl_4 grupları ($p=0,014$); CCl_4 ile CCl_4 +MEL (10 hf) grupları ($p=0,003$); CCl_4 ile CCl_4 +MEL (12 hf) grupları ($p=0,003$); CCl_4 ile CCl_4 +D Vit (10 hf) grupları ($p=0,007$) ve CCl_4 ile CCl_4 +D Vit (12 hf) grupları ($p=0,025$) birbirinden farklı bulunmuştur. Gruplardaki MDA değerleri ve standart sapmaları Çizelge 4.1’ de gösterilmektedir. CCl_4 verilen grupta MDA aktivitesinde artış gözlenmiştir. Bunun aksine melatonin ve D Vitamini verilen CCl_4 gruplarında kontrol grubuna yakın değerler saptanmıştır (Şekil 4.1).

Çizelge 4.1 Karaciğer MDA aktivitesi

GRUPLAR	Ortalama (min-max.)	Standart Sapma
1. Kontrol grubu (mısır yağı)	14,12 (6,27-22,14)	$\pm 7,532522$
2. Kontrol grubu (PBS+Etanol)	11,03 (6,9-16,76)	$\pm 4,300051$
3. CCl_4	27,63 (12,67-51,45)	$\pm 13,06445$
4. CCl_4 +MEL (10 hafta)	9,02 (4,99-18,04)	$\pm 4,561364$
5. CCl_4 +MEL (12 hafta)	10,02 (4,48-17,28)	$\pm 5,324349$
6. CCl_4 +D Vit (10 hafta)	10,17 (4,86-17,15)	$\pm 5,139005$
7. CCl_4 +D Vit (12 hafta)	13,46 (3,84-24,32)	$\pm 7,717738$



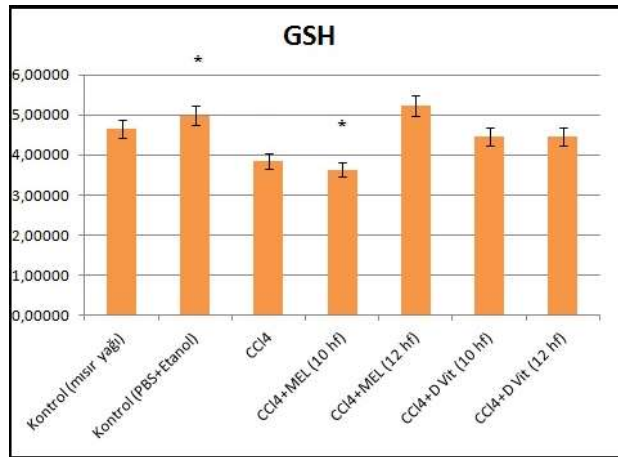
Şekil 4.1 Karaciğer dokusunda MDA aktivitesi. (* $p < 0,05$, CCl₄ grubu ile diğer gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir).

4.2 Glutatyon (GSH)

Çalışmada 7 grup arasında karaciğer dokularında yapılan GSH tayini sonucunda gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,015$; $p < 0,05$). Farklılığı yaratan grupların bulunması amacıyla çoklu karşılaştırma testlerinden yararlanılmış ve olası tüm ikili kombinasyonlar arasında farklılık aranmıştır. Buna göre, kontrol (PBS+ethanol) ile CCl₄ grupları ($p=0,020$); kontrol (mısır yağı) ile CCl₄+MEL (10 hf) grupları ($p=0,043$); kontrol (PBS+etanol) ile CCl₄+MEL (10 hf) grupları ($p=0,006$) ve CCl₄ ile CCl₄+MEL (10 hf) grupları ($p=0,006$) birbirinden farklı bulunmuştur. Gruplardaki GSH değerleri ve standart sapmaları çizelge 4.2’de gösterilmektedir. CCl₄ verilen grupta GSH değerinde azalma gözlenmiştir. 10 hafta melatonin verilen CCl₄ grubunda da GSH değeri düşük bulunmuştur. Fakat 12 hafta melatonin verilen CCl₄ grubu ve 12 hafta D Vitamini verilen CCl₄ gruplarındaki GSH değerleri ise kontrol gruplarına yakın çıkmıştır (Şekil 4.2).

Çizelge 4.2 Karaciğer GSH Aktivitesi

GRUPLAR	Ortalama (min-max.)	Standart Sapma
1. Kontrol grubu (mısır yağı)	4,65 (3,8-6,1)	±0,897684
2. Kontrol grubu (PBS+Etanol)	4,98 (4,12-6,01)	±0,783615
3. CCl ₄	3,84 (3,04-4,8)	±0,479225
4. CCl ₄ +MEL (10 hafta)	3,63 (2,9-4,16)	±0,716217
5. CCl ₄ +MEL (12 hafta)	5,24 (4,41-6,06)	±0,668054
6. CCl ₄ +D Vit (10 hafta)	4,46 (3,45-5,04)	±0,895675
7. CCl ₄ +D Vit (12 hafta)	4,47 (3,61-5,65)	±0,868811



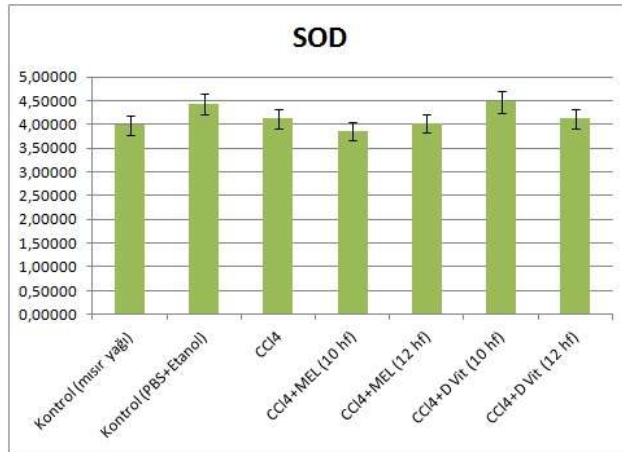
Şekil 4.2 Karaciğer glutasyon (GSH) aktivitesi. (* $p < 0,05$, CCl₄ grubu ile diğer gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir)

4.3 Süperoksit Dismutaz (SOD)

Karaciğer dokusu SOD düzeyleri için gruplar karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0,527$; $p>0,05$). Gruplardaki SOD değerleri ve standart sapmaları çizelge 4.3'de gösterilmektedir. Tüm gruplardaki SOD aktivitesi birbirine yakın gözlenmiştir (Şekil 4.3).

Çizelge 4.3 Karaciğer SOD aktivitesi

GRUPLAR	Ortalama (min-max.)	Standart Sapma
1. Kontrol grubu (mısır yağı)	3,98 (3,6-4,37)	±0,286630
2. Kontrol grubu (PBS+Etanol)	4,43 (3,8-4,86)	±0,453487
3. CCl ₄	4,12 (3,54-4,82)	±0,526061
4. CCl ₄ +MEL(10 hafta)	3,85 (2,62-5,55)	±0,999384
5. CCl ₄ +MEL(12 hafta)	4,02 (3,42-4,65)	±0,403858
6. CCl ₄ +D Vit(10 hafta)	4,47 (3,83-5,77)	±0,715896
7. CCl ₄ +D Vit(12 hafta)	4,12 (2,99-5,28)	±0,792342



Şekil 4.3 Karaciğer SOD aktivitesi

4.4 Biyokimyasal Sonuçlar

Kan serum örnekleri incelenerek, karaciğer enzimleri değerlendirilmiştir. Buna göre, ALP (p=0,004), ALT (p=0,004), GGT (p=0,000), BA (p=0,009), TBIL (p=0,009), ALB (p=0,020) ve CHOL (p=0,019) enzimlerinde gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4 Karaciğer enzimlerinin gruplar arasında karşılaştırılması

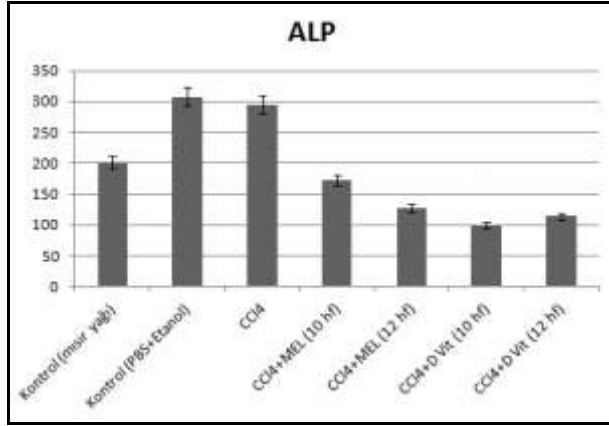
	Kontrol grubu (mısır yağı)	Kontrol (PBS+ Etanol)	CCl ₄	CCl ₄ +MEL (10 hf)	CCl ₄ +MEL (12 hf)	CCl ₄ +D Vit (10 hf)	CCl ₄ +D Vit (12 hf)	Gruplar arası farklılık (p)*
ALP	201,33 (92-438) ±51,3	307,33 (190-490) ±46,4	294,17 (103-562) ±70,5	173,18 (72-447) ±61,5	127,17 (94-163) ±9,8	98,83 (75-160) ±12,5	114,17 (61-236) ±25,3	,004*
ALT	62,67 (44-80) ±5,6	76,5 (58-120) ±10,1	92,67 (61-186) ±19,5	72,17 (60-91) ±4,7	58,0 (45-89) ±6,7	46,67 (36-54) ±2,6	49,83 (30-78) ±6,6	,004*
GGT	5,00 (5-5) ±0,01	3,33 (3-5) ±0,3	10,67 (3-41) ±6,01	7,17 (3-28) ±4,2	3,00 (3-3) ±0,00	3,00 (3-3) ±0,00	3,00 (3-3) ±0,00	,000*
BA	12,00 (9-21) ±1,9	9,33 (5-12) ±1,05	3,83 (1-9) ±1,3	11,37 (4,1-22,2) ±2,7	23,18 (6,6-40,7) ±5,7	10,03 (6,6-14,6) ±1,5	6,40 (4,1-10,4) ±0,9	,009*
TBIL	0,28 (0,2-0,3) ±0,02	0,30 (0,3-0,3) ±0,00	0,22 (0,04-0,3) ±0,04	0,06 (0,03-0,08) ±0,01	0,06 (0,04-0,08) ±0,01	0,06 (0,05-0,07) ±0,01	0,05 (0,03-0,06) ±0,01	,000*
ALB	4,18 (3,8-4,5) ±0,1	3,87 (3,1-4,2) ±0,2	3,13 (1,1-4) ±0,4	3,22 (2,1-3,7) ±0,2	3,68 (3,4-3,8) ±0,1	3,68 (3,4-3,9) ±0,1	3,45 (2,8-3,8) ±0,1	,020*
CHOL	35,17 (30-37) ±1,1	34,83 (32-38) ±0,8	41,17 (26-62) ±5,2	41,83 (39-46) ±0,9	38,83 (33-44) ±1,7	39,50 (34-44) ±1,5	35,50 (30-38) ±1,1	,019*

*p<0.05

4.4.1 Alkalin fosfataz (ALP)

Tüm grupların ALP (U/L) düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (p=0,004). Farklılığı yaratan grupların bulunması amacıyla çoklu karşılaştırma testlerinden yararlanılmış ve olası tüm ikili kombinasyonlar arasında farklılık aranmıştır. Buna göre, kontrol (PBS+ethanol) ile CCl₄+D Vit (10 hafta) grupları (p=0,016) birbirinden farklı bulunmuştur. 1. kontrol (mısır yağı) grubuna göre, 2. kontrol grubunda ALP değerleri yüksek bulunmuştur. CCl₄ grubunda (Grup 3) da, 2. kontrol grubuna benzer şekilde yüksek değerler izlenmiştir. Melatonin (Grup 4,5) ve D

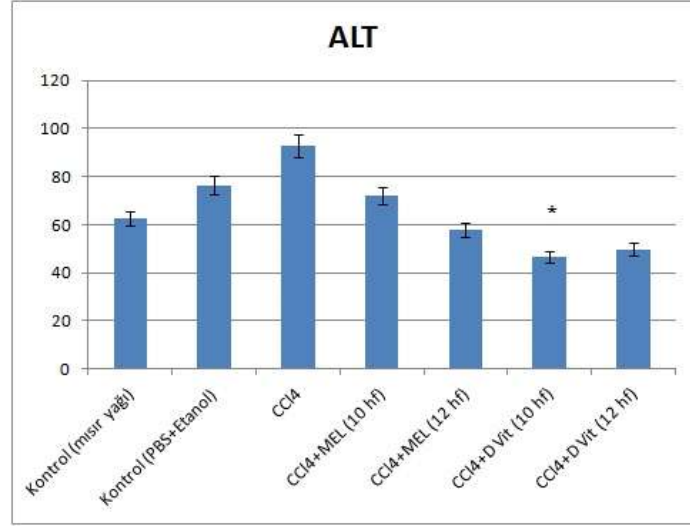
Vitamini (Grup 6,7) uygulanmış tedavili gruplarda bu oranın düştüğü gözlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 Gruplar arasında ALP değerlerinin karşılaştırılması

4.4.2 Alanin aminotransferaz (ALT)

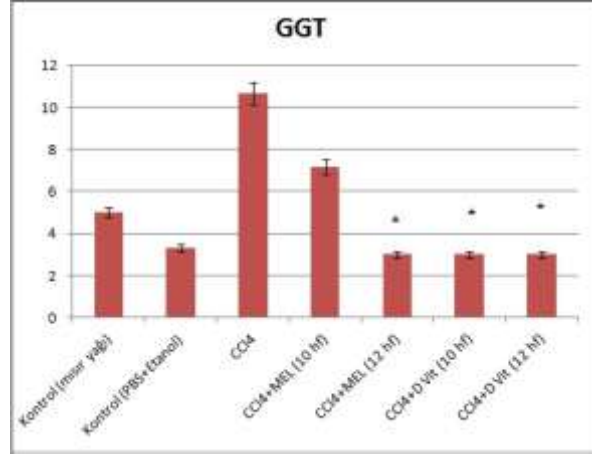
ALT (U/L) düzeyleri CCl₄ grubunda (Grup 3), kontrol gruplarına (Grup 1, 2) kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Melatonin (Grup 4,5) ve D Vitamini (Grup 6,7) uygulanmış tedavili gruplarda bu oranın düştüğü ve kontrol gruplarına yakın olduğu gözlenmiştir (p=0,004) (Şekil 4.5). Farklılığı yaratan grupların bulunması amacıyla çoklu karşılaştırma testlerinden yararlanılmış ve olası tüm ikili kombinasyonlar arasında farklılık aranmıştır. Buna göre, CCl₄ ile CCl₄+D Vit (10 hafta) grupları (p=0,022) birbirinden farklı bulunmuştur.



Şekil 4.5 Gruplar arasında ALT değerlerinin karşılaştırılması (* p<0,05). (* p<0,05, CCl₄ grubu ile diğer gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir)

4.4.3 Gama glutamil transferaz (GGT)

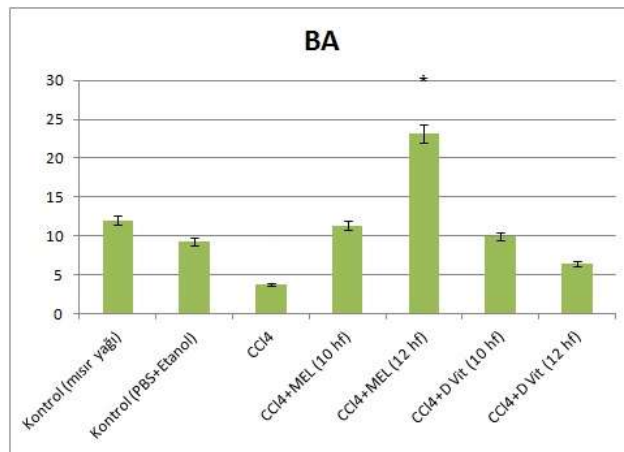
GGT (U/L) düzeyleri CCl₄ grubunda (Grup 3), kontrol gruplarına (Grup 1, 2) kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Melatonin (Grup 4,5) ve D Vitamini (Grup 6,7) uygulanmış tedavili gruplarda bu oranın düştüğü ve kontrol gruplarına yakın olduğu gözlenmiştir (p=0,000) (Şekil 4.6). Farklılığı yaratan grupların bulunması amacıyla çoklu karşılaştırma testlerinden yararlanılmış ve olası tüm ikili kombinasyonlar arasında farklılık aranmıştır. Buna göre, CCl₄ ile CCl₄+MEL (12 hafta) grupları (p=0,039); CCl₄ ile CCl₄+D Vit (12 hafta) grupları (p=0,039); CCl₄ ile CCl₄+D Vit (12 hafta) grupları (p=0,039) birbirinden farklı bulunmuştur.



Şekil 4.6 Gruplar arasında GGT değerlerinin karşılaştırılması (* p<0,05). (* p<0,05, CCl₄ grubu ile diğer gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir)

4.4.4 Safra asidi (BA)

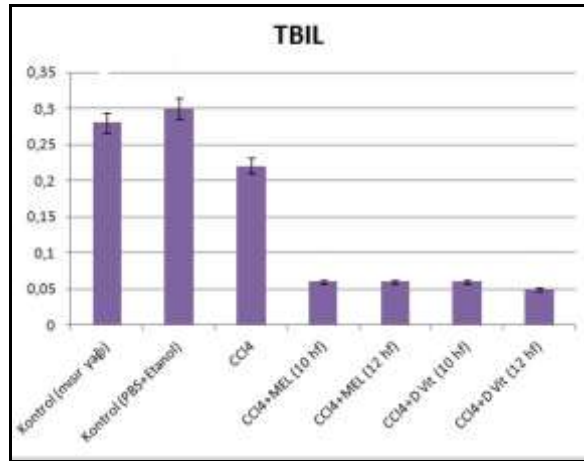
BA (mol/L) düzeyleri, CCl₄ grubunda (Grup 3), kontrol gruplarına (Grup 1, 2) kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Melatonin (Grup 4, 5) ve D Vitamini (Grup 6,7) uygulanmış tedavili gruplarda bu oranın yükseldiği ve kontrol gruplarına yakın olduğu gözlenmiştir (p=0.009) (Şekil 4.7). Farklılığı yaratan grupların bulunması amacıyla çoklu karşılaştırma testlerinden yararlanılmış ve olası tüm ikili kombinasyonlar arasında farklılık aranmıştır. Buna göre, CCl₄ ile CCl₄+MEL (12 hafta) grupları (p=0,015) birbirinden farklı bulunmuştur.



Şekil 4.7 Gruplar arasında BA değerlerinin karşılaştırılması (* p<0,05). (* p<0,05, CCl₄ grubu ile diğer gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir)

4.4.5 Total bilirubin (TBIL)

TBIL (mg/dl) düzeyleri CCl_4 grubunda (Grup 3), kontrol gruplarına (Grup 1, 2) kıyasla istatistiksel olarak birbirine yakın bulunmuştur. Melatonin (Grup 4, 5) ve D Vitamini (Grup 6, 7) uygulanmış tedavili gruplarda bu oranın düşük olduğu saptanmıştır ($p=0.000$) (Şekil 4.8). Farklılığı yaratan grupların bulunması amacıyla çoklu karşılaştırma testlerinden yararlanılmış ve olası tüm ikili kombinasyonlar arasında farklılık aranmıştır. Buna göre, kontrol (mısır yağı) ile CCl_4 +D Vit (12 hafta) grupları ($p=0,010$); kontrol (PBS+Etanol) ile CCl_4 +MEL (10 hafta) ($p=0,032$) grupları birbirinden farklı bulunmuştur.

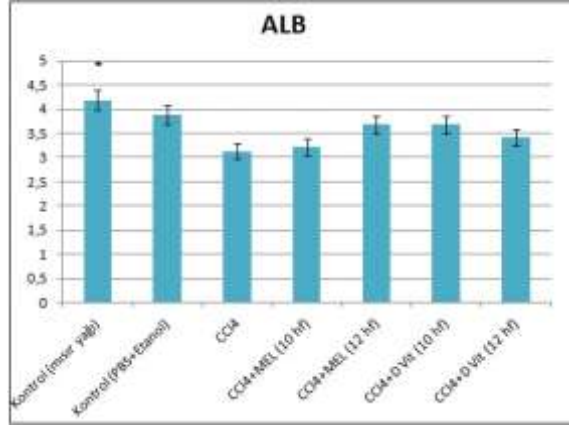


Şekil 4.8 Gruplar arasında TBIL değerlerinin karşılaştırılması

4.4.6 Albumin (ALB)

ALB (U/L) düzeyleri CCl_4 grubunda (Grup 3), kontrol gruplarına (Grup 1, 2) kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Melatonin (Grup 4, 5) ve D Vitamini (Grup 6, 7) uygulanmış tedavili gruplarda bu oranın yüksek olduğu gözlenmiştir ($p=0,002$) (Şekil 4.9). Farklılığı yaratan grupların bulunması amacıyla çoklu karşılaştırma testlerinden yararlanılmış ve olası tüm ikili kombinasyonlar arasında farklılık aranmıştır. Buna göre, kontrol (mısır yağı) ile CCl_4 grupları ($p=0,032$); kontrol

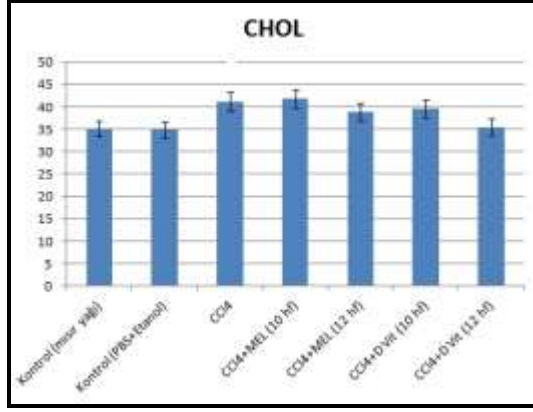
(mısır yağı) ile CCl₄+MEL (10 hafta) grupları (p=0,003); kontrol (mısır yağı) ile CCl₄+D Vit (12 hafta) (p=0,031) grupları birbirinden farklı bulunmuştur.



Şekil 4.9 Gruplar arasında ALB değerlerinin karşılaştırılması (*p<0,05). (*p<0,05, CCl₄ grubu ile diğer gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir)

4.4.7 Kolesterol (CHOL)

CHOL (U/L) düzeyleri CCl₄ grubunda (Grup 3), kontrol gruplarına (Grup 1, 2) kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. 10 hafta melatonin (Grup 4) ve D Vitamini (Grup 6) uygulanmış tedavili gruplarda bu oranın çok fazla etkilenmediği, ancak 12 hafta melatonin (Grup 5) ve D Vitamini (Grup 7) kolesterol değerlerinin düştüğü ve kontrol gruplarına yakın olduğu gözlenmiştir (p=0.019) (Şekil 4.10). Farklılığı yaratan grupların bulunması amacıyla çoklu karşılaştırma testlerinden yararlanılmış ve olası tüm ikili kombinasyonlar arasında farklılık aranmıştır. Buna göre anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.

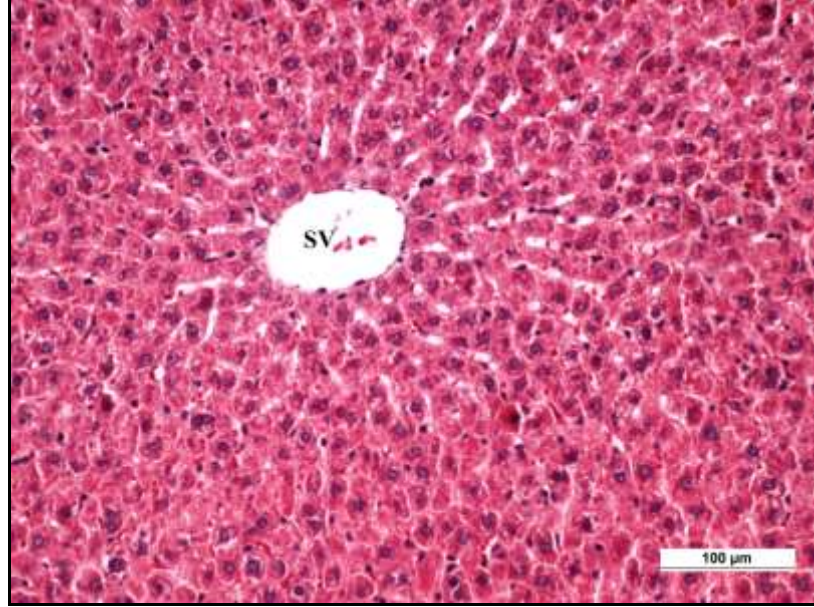


Şekil 4.10 Gruplar arasında CHOL değerlerinin karşılaştırılması

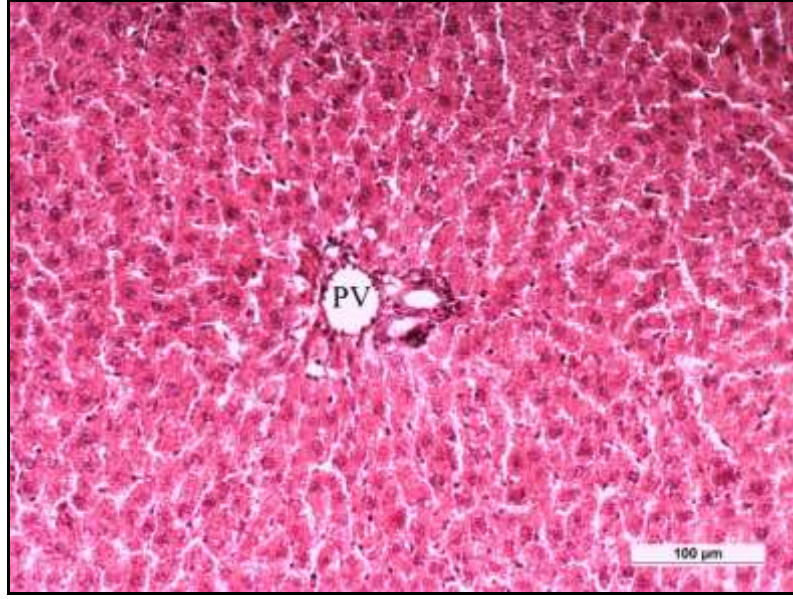
4.5 Histokimyasal Sonuçlar

4.5.1 Hematoksilen-Eosin (H&E)

Kontrol grubu (Grup 1, 2) sıçanların karaciğer doku kesitleri incelendiğinde, hepatositler sentral ven çevresinde ışınsal olarak dizilmiş ve aralarında sinüzoidler yerleşmiştir (Şekil 4.11). Hematoksilen eozin ile boyanmış kesitlerde sinüzoidler açık ve hepatositler koyu renkte boyanmıştır. Bu gruplarda karakteristik olarak hepatic arter, safra kanalı ve portal ven içeren portal alan da gözlenmiştir (Şekil 4.12).

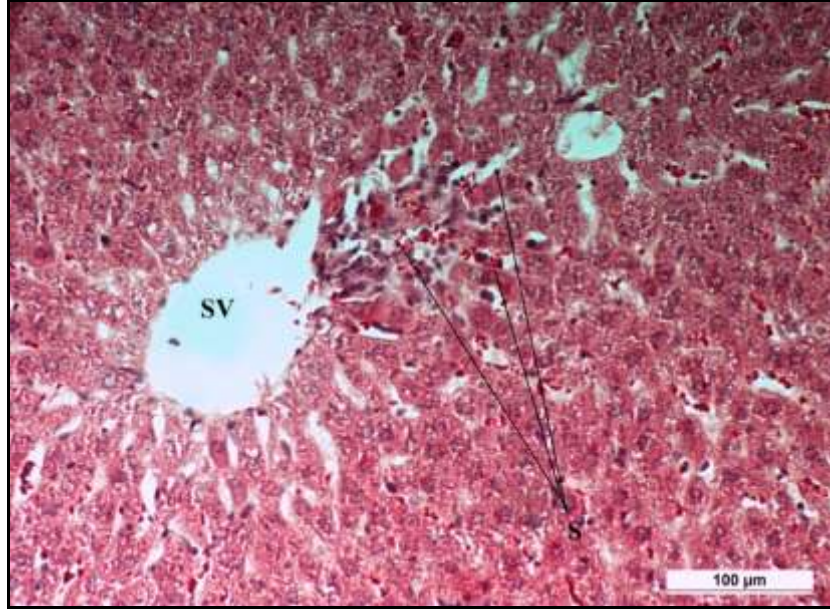


Şekil 4.11 Kontrol grubu (mısır yağı) sıçan karaciğerinin histolojik yapısı. Sentral ven (SV), H&E Bar:100μm

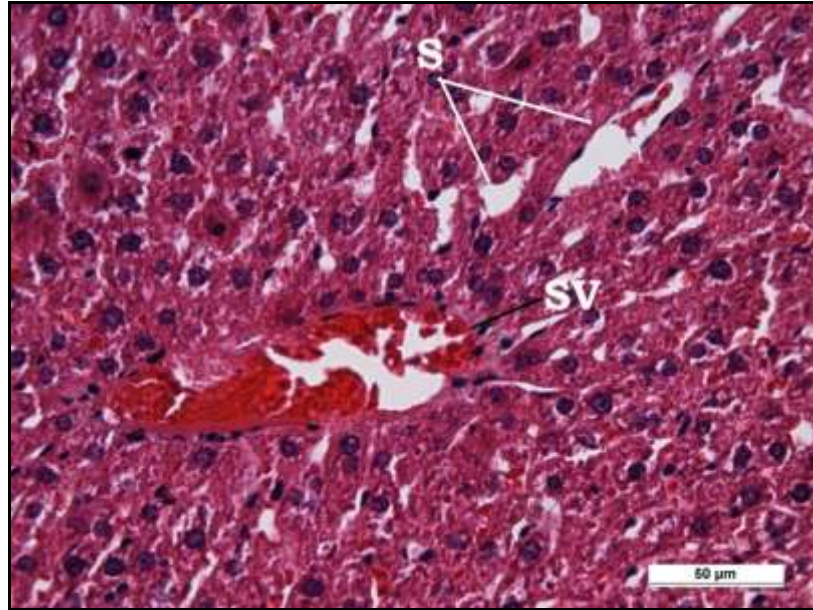


Şekil 4.12 Kontrol grubu (PBS+etanol) sıçan karaciğerinde portal ven (PV) H&E
Bar:100µm

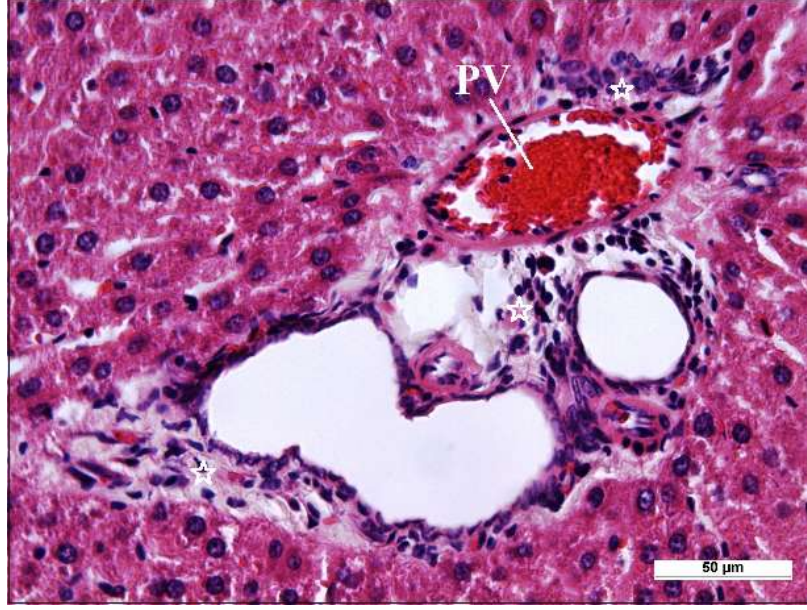
CCl₄ grubu sıçanların karaciğer dokuları incelendiğinde lobular dizilim bozukluğu, sentral ven yapısında hasar tespit edilmiştir. Sinüzoidlerin normal şekillerini kaybederek dilate olduğu gözlenmiştir. Sentral vende ve sinüzoidlerde hiperemiye rastlanmıştır (Şekil 4.13-4.14). Portal alanda seyrek oranda mononükleer hücre infiltrasyonu ve özellikle portal vende hiperemi dikkati çekmiştir (Şekil 4.15). Ayrıca sitoplazması boşalmış, hayalet görünümlü hepatositlerin yer aldığı fokal nekrotik alanlar tespit edilmiştir (Şekil 4.16-4.17).



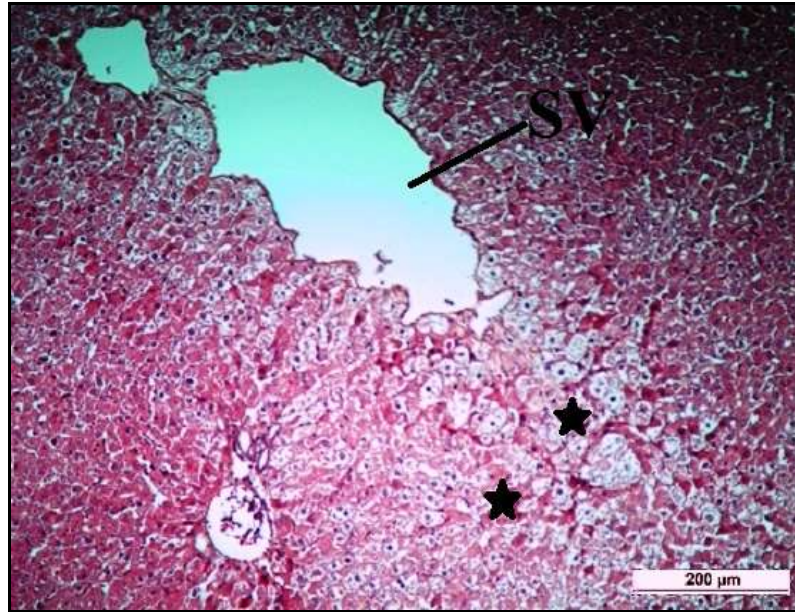
Şekil 4.13 CCl₄ uygulanmış karaciğer dokusunda dejeneratif sentral ven (SV) duvarı, lobular dizilim bozukluğu ve sinüzoidal dilatasyonlar izlenmektedir. Sinüzoidler (S) içerisinde hiperemi saptanmıştır. H&E Bar:100µm



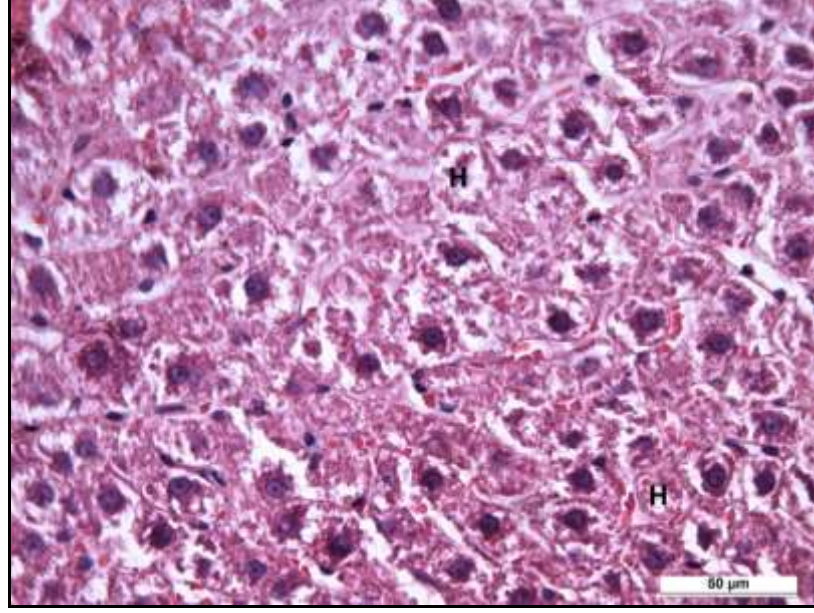
Şekil 4.14 CCl₄ grubuna ait sıçana ait karaciğer dokusu. Sentral vende (SV) hiperemi izlenmekte. Bazı sinüzoidlerde (S) daha bariz dilatasyon dikkati çekmekte. H&E Bar:50µm.



Şekil 4.15 CCl_4 grubu sıçanların karaciğer dokusunda portal alanda seyrek oranda mononükleer hücre infiltrasyonu (yıldız) ve portal vende (PV) hiperemi dikkati çekmekte. H&E Bar:50µm

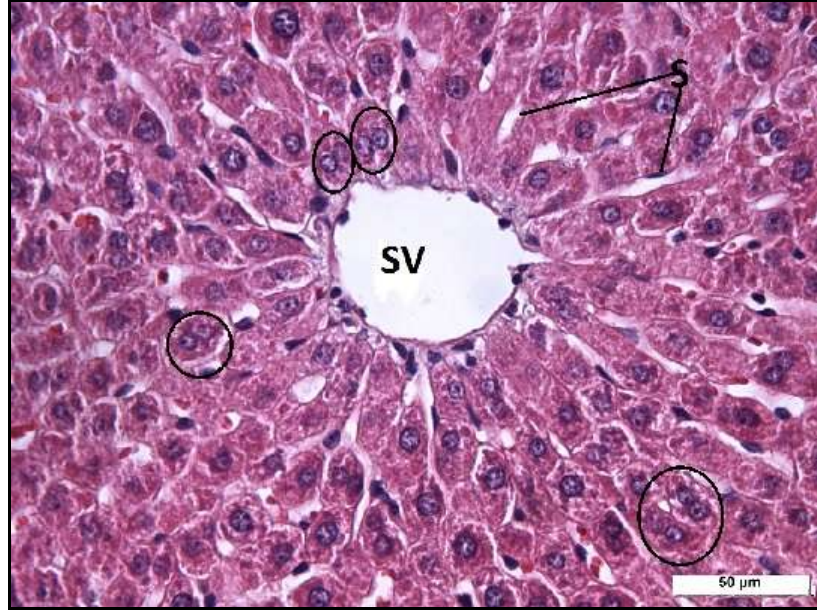


Şekil 4.16 CCl_4 grubunda dejenere sentral ven (SV) çevresinde fokal nekrotik alanlar (yıldız). H&E Bar:200µm

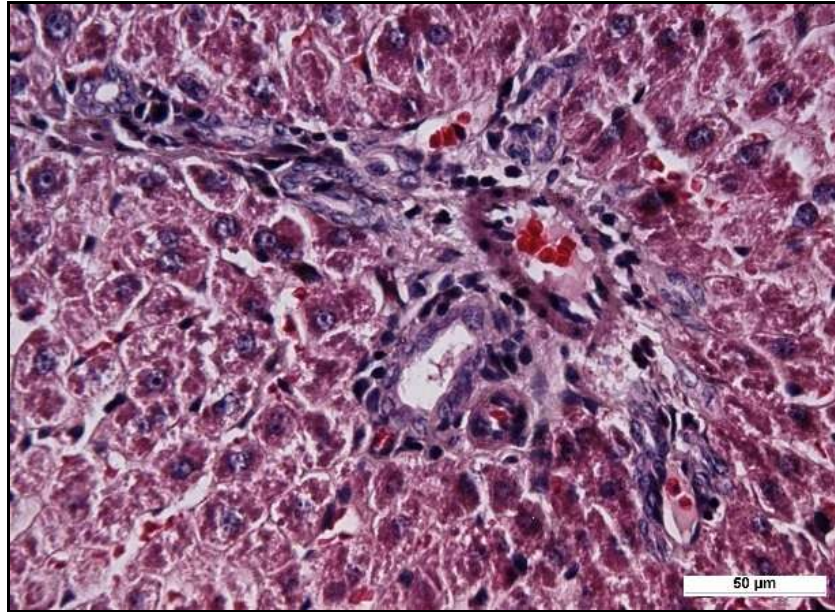


Şekil 4.17 CCl₄ grubunda hasarlı karaciğer lobülü. Dejeneratif alanlardaki sitoplazmaları boşalmış, saydamsı ve şişmiş görünümlü balonlaşmış hepatositler (H). H&E Bar:50µm

10 hafta melatonin uygulanmış CCl₄ grupları incelendiğinde CCl₄'lü gruba göre doku bütünlüğünün kısmen korunduğu saptanmıştır. Hepatositler sentral ven çevresinde ışınsal olarak dizilmiş ve bazı bölgelerde binükleer hepatositler izlenmiştir. Sinüzoidlerin duvarında tipik endotel hücreleri gözlenebilmiştir (Şekil 4.18). 12 hafta melatonin uygulanan CCl₄ grubunda ise, karaciğer dokusunun 10 hafta melatonin uygulanmış CCl₄ grubuna göre doku bütünlüğünün daha iyi korunduğu belirlenmiştir (Şekil 4.19).

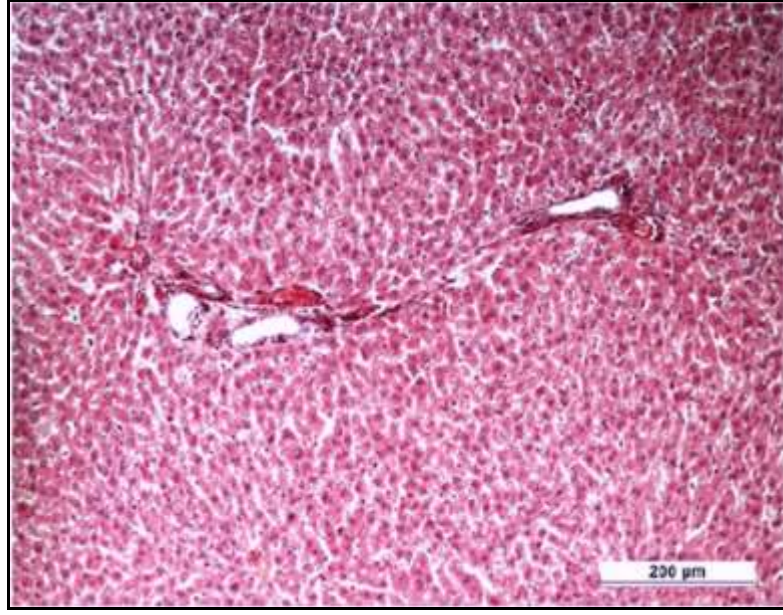


Şekil 4.18 10 hafta melatonin uygulanmış CCl₄ grubunda sentral ven (SV) etrafında izlenmekte olan hepatosit kordonları, sinüzoidler (S) ve binükleer hepatositler (yuvarlak). H&E Bar:50µm

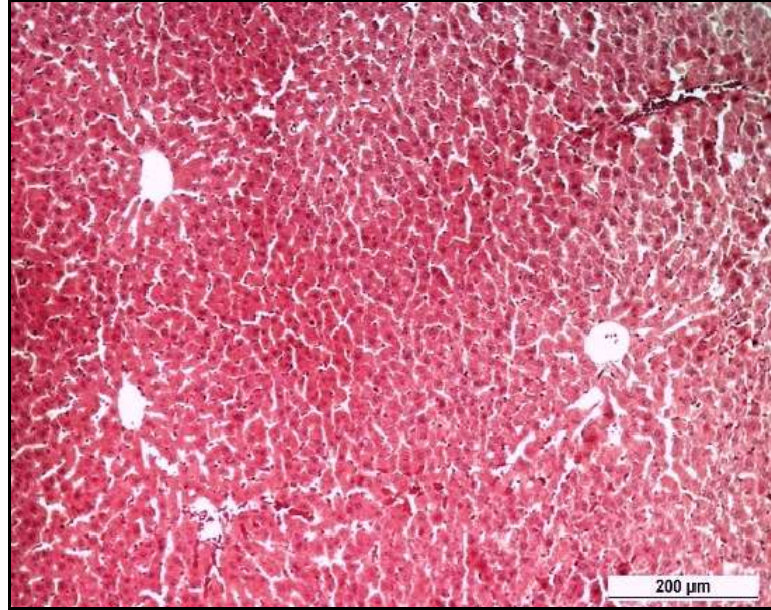


Şekil 4.19 12 hafta melatonin uygulanmış CCl₄ grubu sıçan karaciğerinin genel görüntüsü. H&E Bar:50µm

10 hafta D Vitamini uygulanmış CCl₄ grubu (Grup 6) incelendiğinde, doku bütünlüğünün kısmen korunduğu gözlenmiştir. 12 hafta D Vitamini uygulanan CCl₄ grubunda (Grup 7) ise, CCl₄ ile beraber 10 hafta D Vitamini uygulanan gruba göre karaciğerdeki genel görünümün kontrole yakın olduğu saptanmıştır (Şekil 4.20, 4.21).



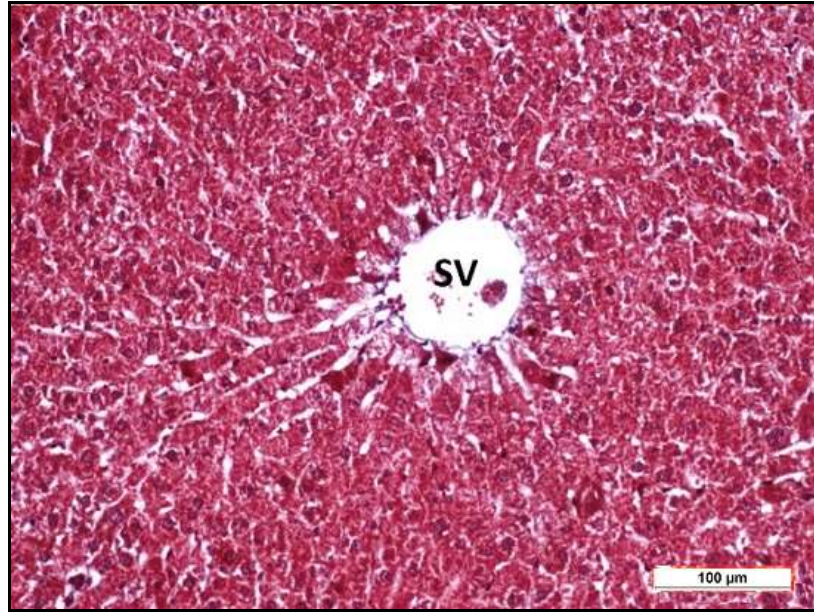
Şekil 4.20 10 hafta D Vitamini uygulanmış CCl_4 grubu sıçan karaciğerinin genel görüntüsü. H&E Bar:200 μ m



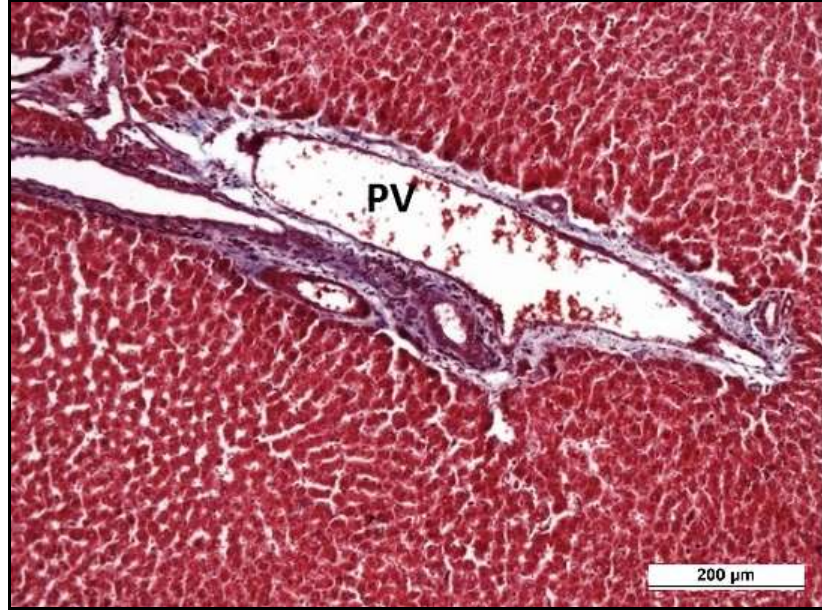
Şekil 4.21 CCl_4 +D Vit (12 hafta) grubu sıçan karaciğerinde sentral venlerin etrafında bulunan hepatositler. H&E Bar:200 μ m

4.5.2 Masson-Trikrom

Masson-trikrom ile boyanmış kesitlerde hepatosit sitoplazması kırmızı, çekirdeği siyah ve kollajen lifler ise mavi renkte boyanmıştır. Kontrol grubunda kollajen liflerin sentral ven çevresinde seyrek olarak izlendiği (Şekil 4.22) ve portal ven etrafında ise daha yoğun olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.23).

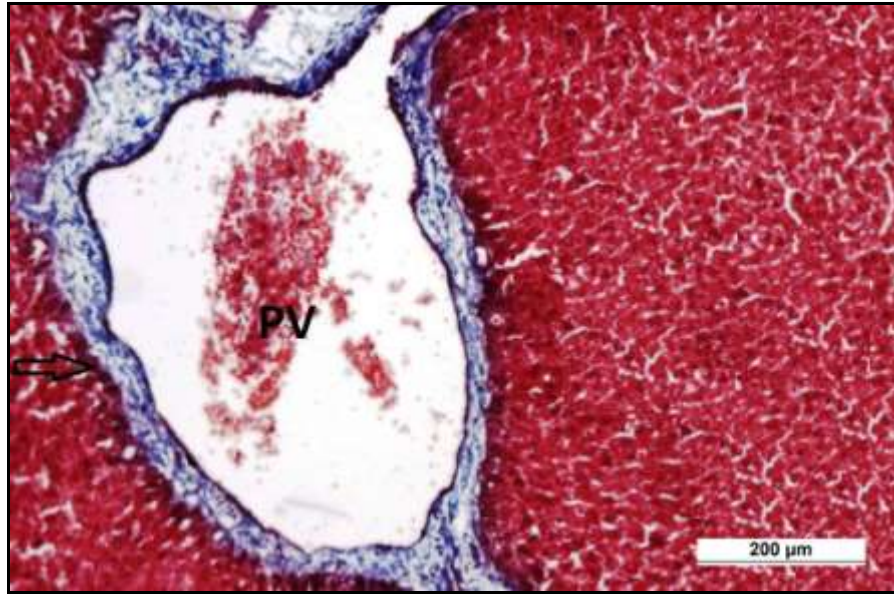


Şekil 4.22 Kontrol (mısır yağı) grubu sıçanlarda sentral ven (SV) ve çevresinde karaciğer hücre kordonları görülmekte. Masson-Trikrom Bar:100µm

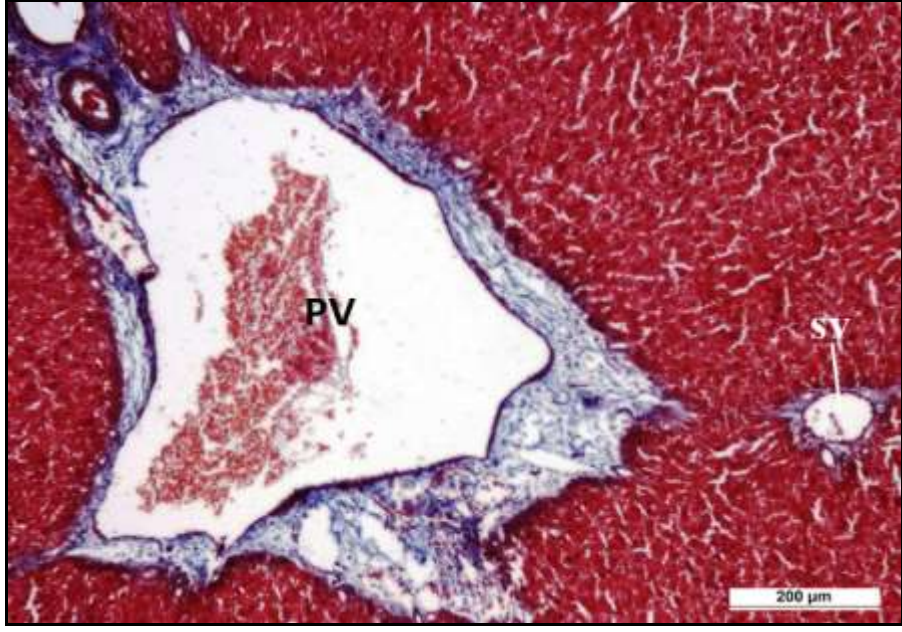


Şekil 4.23 Kontrol (PBS+Etanol) grubu sıçanlarda portal alan. Portal ven (PV). Masson-Trikrom Bar:200μm

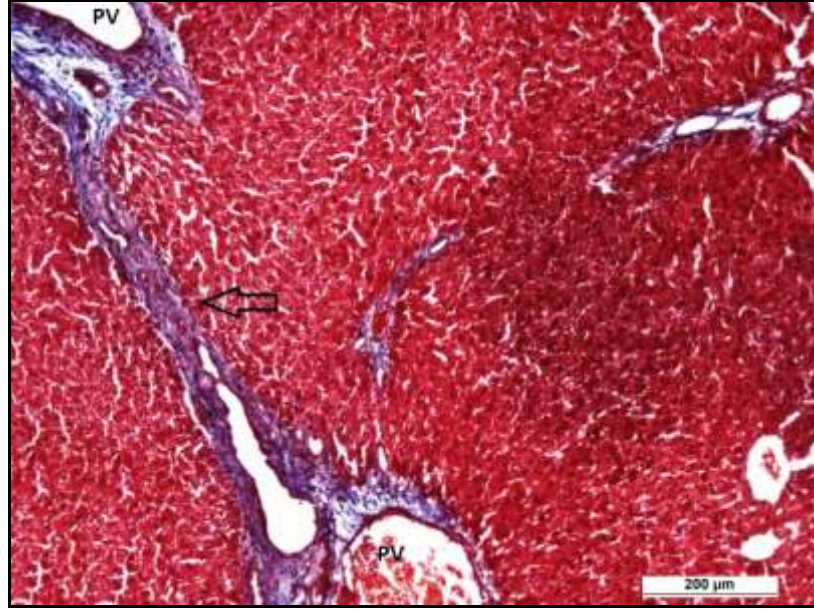
CCl₄ uygulanan grupta, portal alan ve sentral ven çevresinde kollajen lif artışı (fibrozis) gözlenmiştir (Şekil 4.24-4.25). Portal venler arasında köprüleşen fibröz septa oluşumu belirlenmiştir (Şekil 4.26). Ayrıca sinüzoidal dilatasyonlar da bariz bir şekilde izlenmiştir (Şekil 4.27).



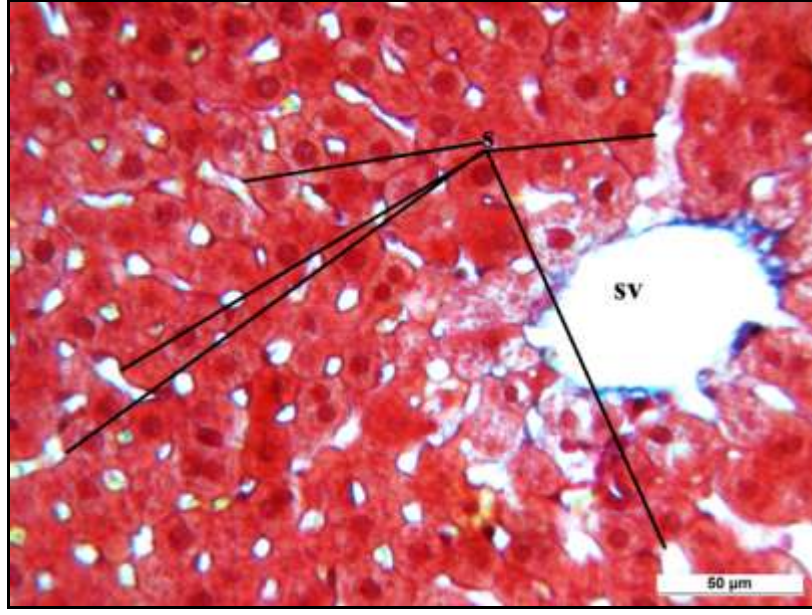
Şekil 4.24 CCl₄ ile hasar oluşturulan sıçanlarda portal ven (PV) çevresinde fibrozis oluşumu izlenmekte (ok). Masson-Trikrom Bar:200μm.



Şekil 4.25 CCl_4 uygulanmış sıçan karaciğerinde portal ven (PV) ve sentral ven (SV) çevresinde bağ doku artışı. Masson-Trikrom Bar:200 μm

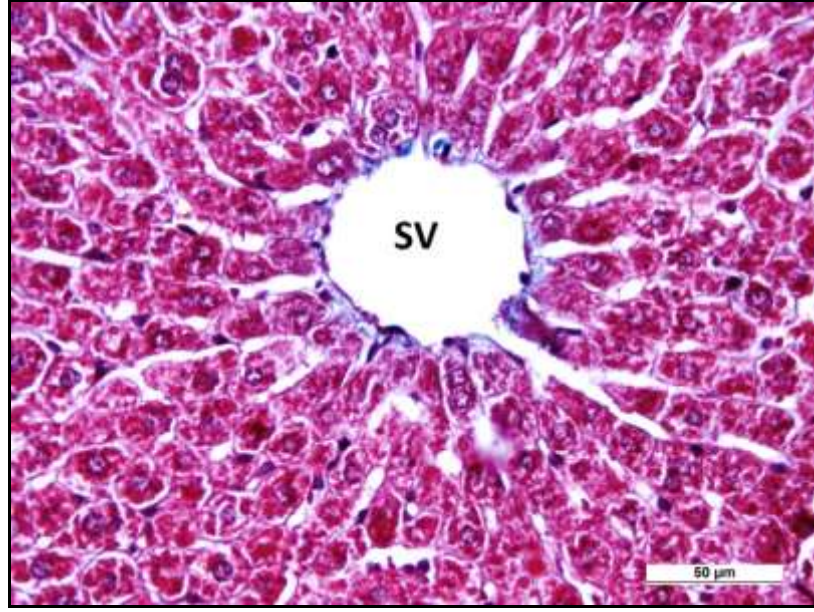


Şekil 4.26 CCl_4 verilen grupta 2 portal ven (PV) arasında fibrozis (ok) oluşumu. Masson-Trikrom Bar:200 μm

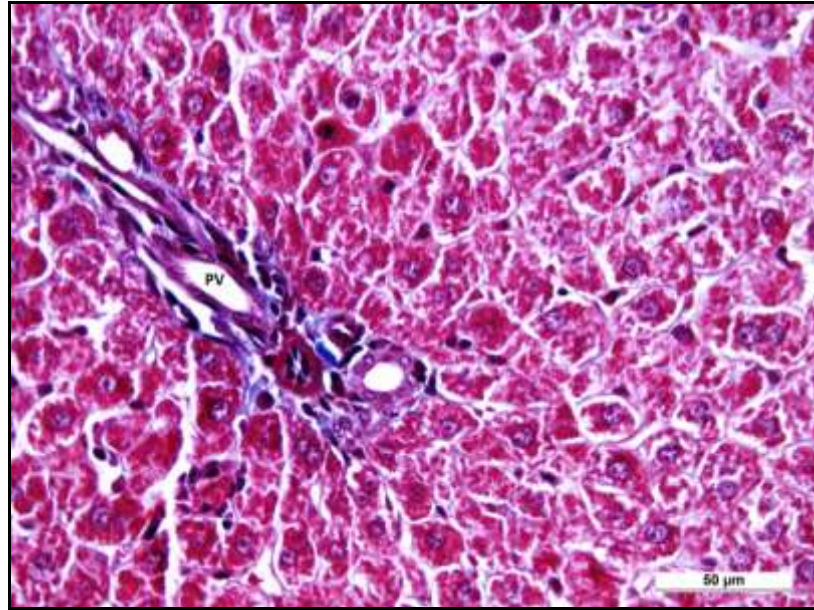


Şekil 4.27 CCl₄ uygulanmış sıçan karaciğerinde sentral ven (SV) çevresinde fibrozis, sinüzoidal dilatasyon ve şişmiş hepatositler dikkati çekmekte. Sinüzoidler (S). Masson-Trikrom Bar:50µm

Melatonin verilen gruplarda (Grup 4, 5) fibrozise rastlanmamıştır. Doku bütünlüğü kısmen korunmuş, 10 hafta melatonin uygulanan CCl₄ grubunda (Grup 4) sentral ven çevresinde hepatositlerin ışınal dağılımı izlenebilmiş, ancak sentral ven etrafında kollajen birikimi ve yer yer sinüzoidal dilatasyonlar tespit edilmiştir (Şekil 4.28). 12 hafta melatonin verilen CCl₄ grubunda, hepatosit dejenerasyonunun kısmen devam ettiği dikkati çekmiştir (Şekil 4.29). Anti-fibrotik yönden değerlendirildiğinde hem 10 haftalık hem de 12 haftalık gruplarda kontrole yakın sonuçlar elde edilmiştir.



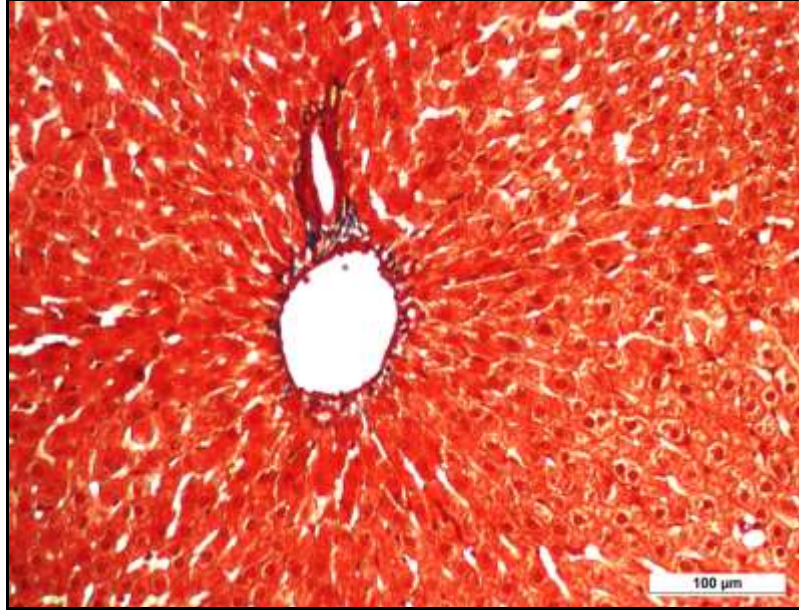
Şekil 4.28 10 hafta melatonin uygulanmış CCl_4 grubu sıçan karaciğerinde sentral ven (SV) ve etrafında ışımsal dizilmiş hepatosit kordonları. Masson-Trikrom Bar:50µm



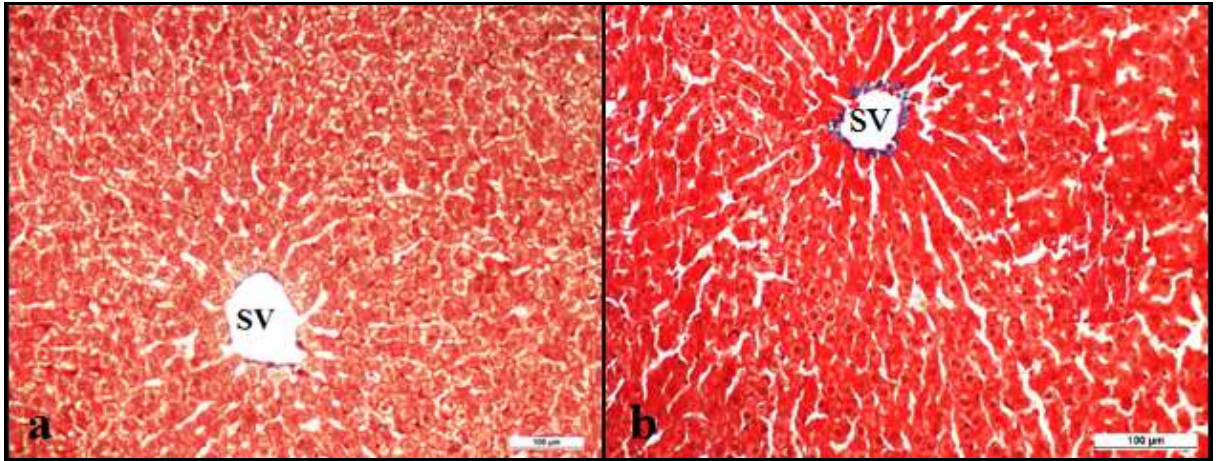
Şekil 4.29 CCl_4 +MEL (12 hafta) deney grubunda portal alan ve çevresinde yer yer dejeneratif hepatositler izlenmekte. Portal ven (PV). Masson-Trikrom Bar:50µm

D Vitamini uygulamalı gruplarda da (Grup 6, 7) fibrozis oluşumu gözlenmemiştir. 10 hafta D Vitamini uygulanan CCl_4 grubunda (Grup 6), yer yer sinüzoidal dilatasyonlar

gözenmiştir (Şekil 4.30). 12 hafta D Vitamini uygulanan grupta (Grup 7), bazı kesitlerde sentral ven yapısı korunurken bazılarında kollajen birikimi dikkati çekmiştir. Ayrıca sentral ven çevresinde bir kısım hepatositlerde dejenerasyonun devam ettiği tespit edilmiştir (Şekil 4.31 a,b). Ancak, anti-fibrotik yönden değerlendirildiğinde, D Vitamini uygulamalı her iki grupta da kontrole yakın görünüm izlenebilmiştir.



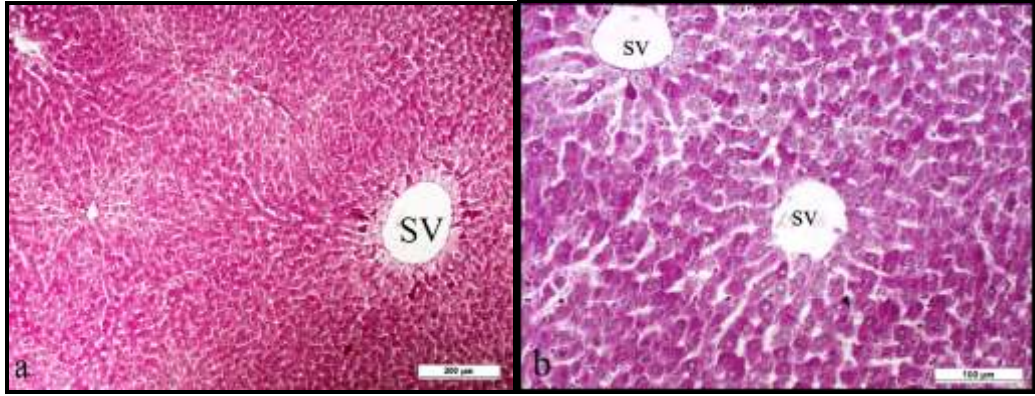
Şekil 4.30 CCl₄+D Vit (10 hafta) deney grubunda portal ven (PV). Masson-Trikrom Bar:100µm



Şekil 4.31 12 hafta D Vitamini uygulanmış CCl₄ grubunda karaciğerin genel görüntüsü
a. Normal yapısı korunmuş sentral ven (SV), b. Sentral ven duvarında kollajen birikimi. Sentral ven (SV). Masson-Trikrom Bar:100µm

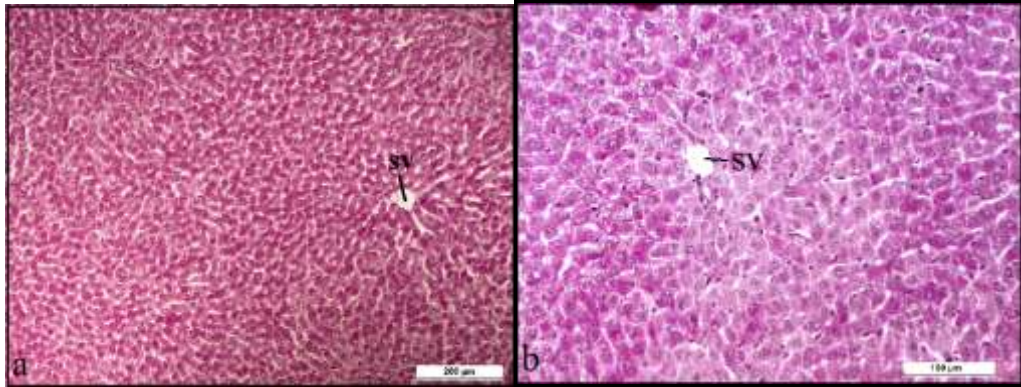
4.5.3 Periyodik Asit-Schiff (PAS)

Kontrol gruplarındaki (Grup 1, 2) sıçanların karaciğer dokusu incelendiğinde, hepatositlerin PAS pozitif reaksiyon gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.32a,b- 4.33a,b).



Şekil 4.32 Kontrol (mısır yağı) grubuna ait karaciğer dokusunun genel görüntüsü. Sentral ven (SV) çevresinde ışınal dizilim gösteren PAS pozitif hücreler izlenmekte

a. PAS Bar:200µm. b. PAS Bar:100µm

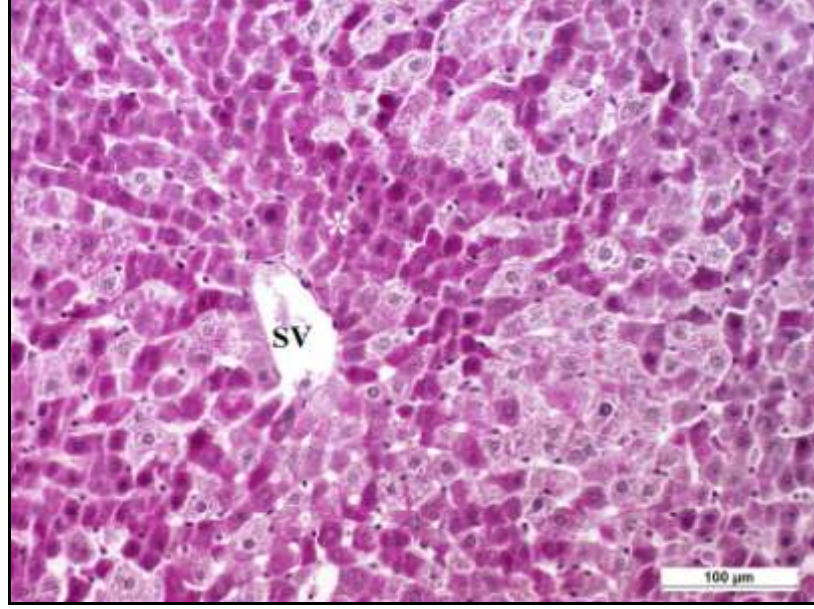


Şekil 4.33 Kontrol (PBS+Etanol) grubu sıçanların karaciğer dokusunda sentral ven (SV) çevresinde PAS pozitif hepatositler

a. PAS Bar:200µm. b. PAS Bar:100µm

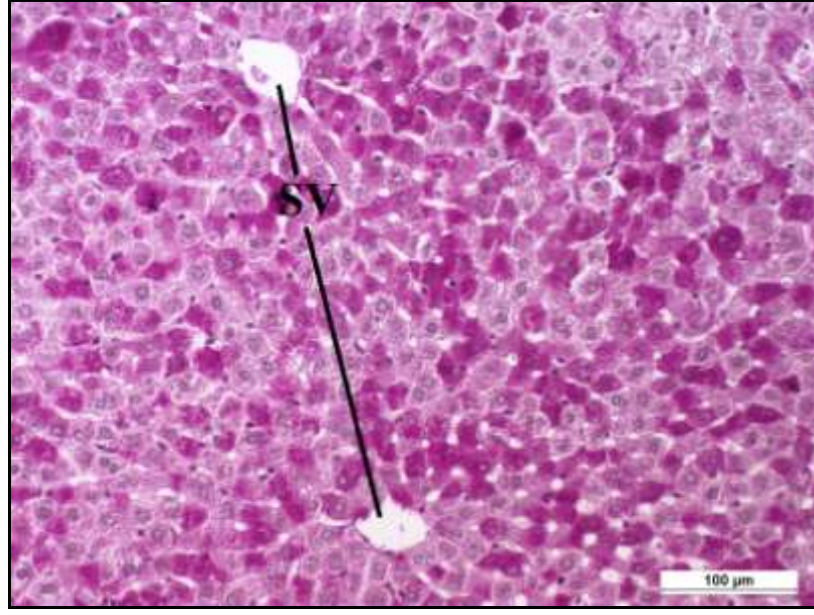
PAS ile boyanmış olan CCl_4 grubu sıçanların karaciğer kesitleri incelendiğinde sentral ven çevresinde PAS pozitif hepatositler ve PAS negatif fokal nekrotik alanlar

izlenmiştir. Glikojen içeriği boşalmış hücrelerin şişmiş olduğu dikkati çekmiştir (Şekil 4.34).

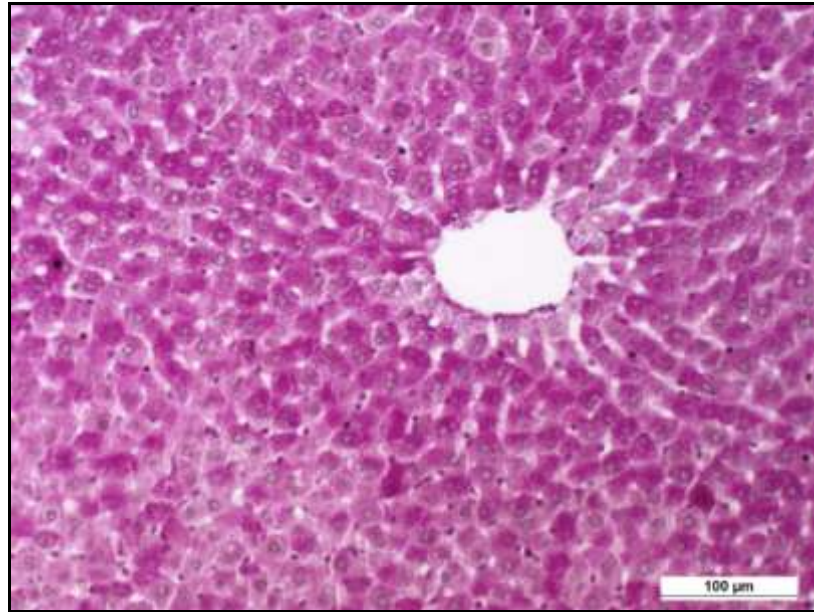


Şekil 4.34 CCl₄ grubuna ait karaciğer dokusunda sentral ven (SV) çevresinde PAS pozitif hücreler (yıldız) ve PAS negatif fokal nekrotik alanlar izlenmekte. Glikojen içeriği boşalmış hücrelerde şişme gözlenmekte. PAS Bar:100µm

Melatonin uygulanmış CCl₄ gruplarına (Grup 4,5) ait karaciğer doku kesitleri incelendiğinde sentral ven, sinüzoidler ve portal alan çevresinde daha seyrek dağılım gösteren PAS pozitif hücreler tespit edilmiştir (Şekil 4.35). 12 hafta melatonin uygulanan grupta, 10. haftaya göre PAS pozitif hücre dağılımının daha fazla olduğu izlenmiştir (Şekil 4.36).

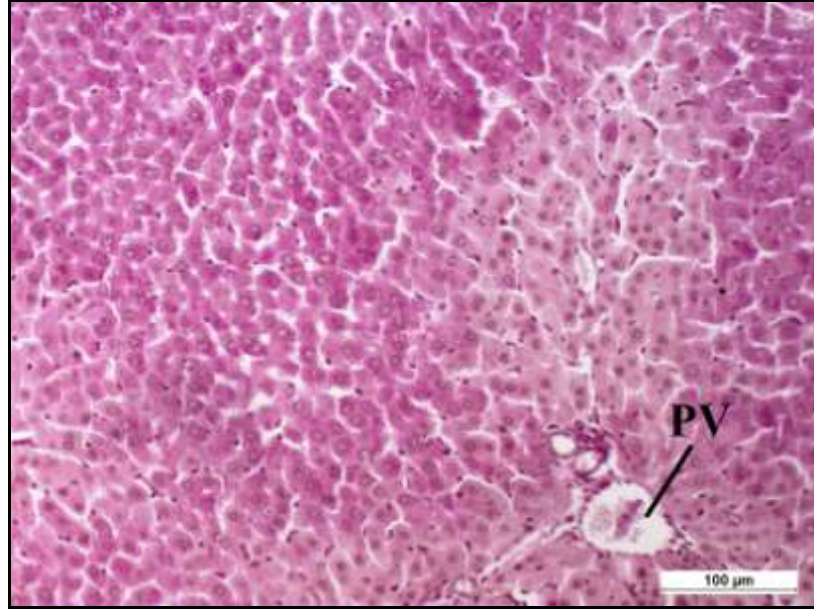


Şekil 4.35 CCl₄+MEL (10 hafta) deney grubunda sentral venlerin (SV) etrafında yer yer PAS pozitif hücreler göze çarpmakta. PAS Bar:100µm

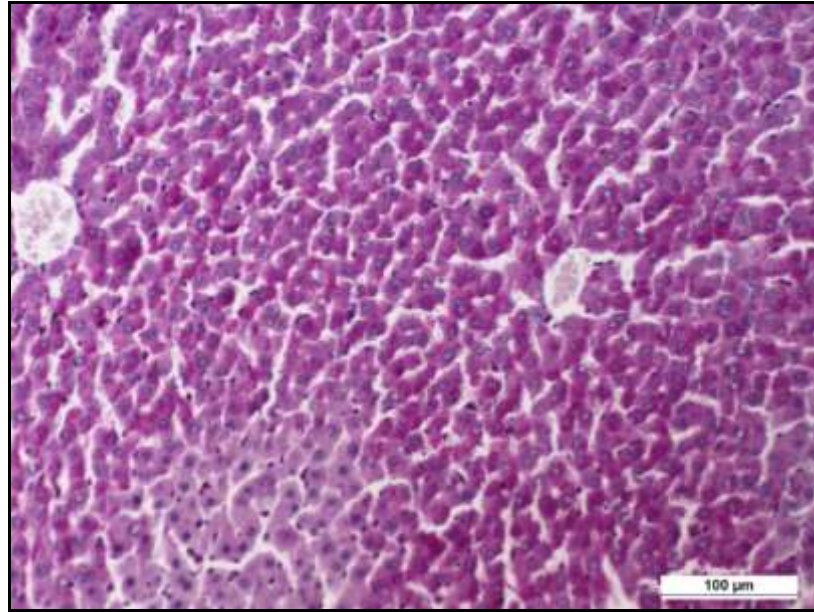


Şekil 4.36 12 hafta melatonin uygulanmış CCl₄ grubuna ait karaciğer dokusunda sentral ven çevresinde PAS pozitif hepatositlerin genel görüntüsü. PAS Bar:100µm

D Vitamini uygulanmış gruplarda (Grup 6, 7) yer yer PAS pozitif hücre dağılımı gözlenmiştir (Şekil 4.37-4.38).



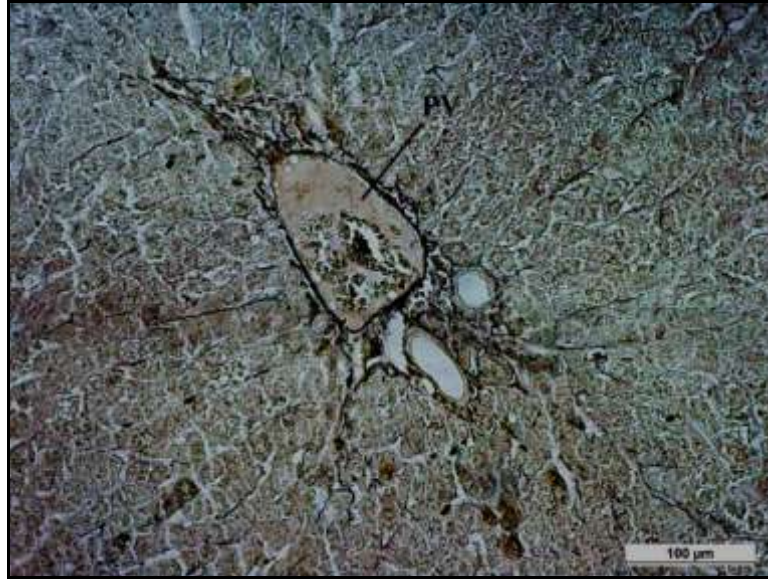
Şekil 4.37 CCl₄+D Vit (10 hafta) grubuna ait karaciğer dokusunda yer yer PAS pozitif hepatositler. Portal ven (PV). PAS Bar:100µm



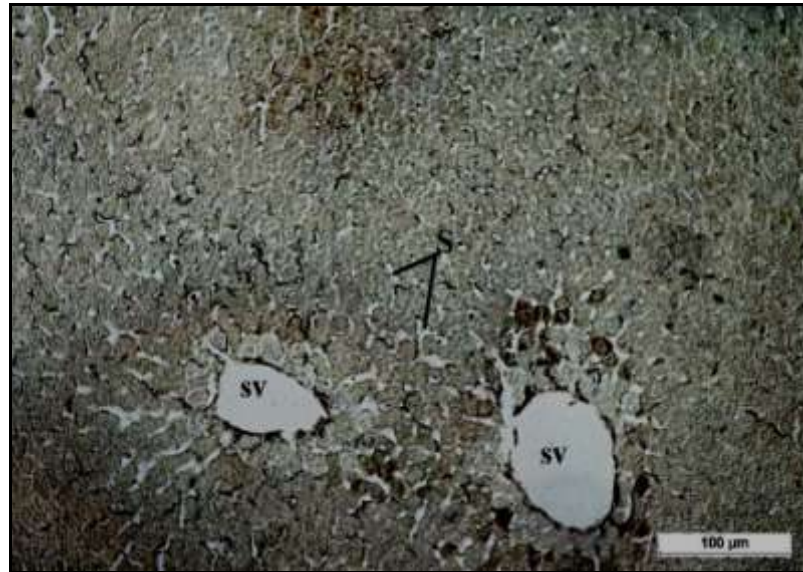
Şekil 4.38 12 hafta D Vitamini uygulanmış CCl₄ grubuna ait karaciğer dokusunda PAS pozitif hepatositlerin dağılımı. PAS Bar:100µm

4.5.4 Gümüşleme (Retikülin)

Kontrol gruplarındaki (Grup 1, 2) sıçanların karaciğer doku kesitleri incelendiğinde, retiküler liflerin sinüzoidlerin duvarında, sentral ven ve portal alan çevresinde dağılım gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.39-4.40).



Şekil 4.39 Kontrol (mısır yağı) grubuna ait karaciğer dokusunda portal alan etrafında retiküler lifler gözlenmekte. Portal ven (PV). Gümüşleme Bar:100µm



Şekil 4.40 Kontrol (PBS+etanol) grubunda sentral ven (SV) ve sinüzoidlerin (S) duvarında retiküler lif dağılımı. Gümüşleme Bar:100µm

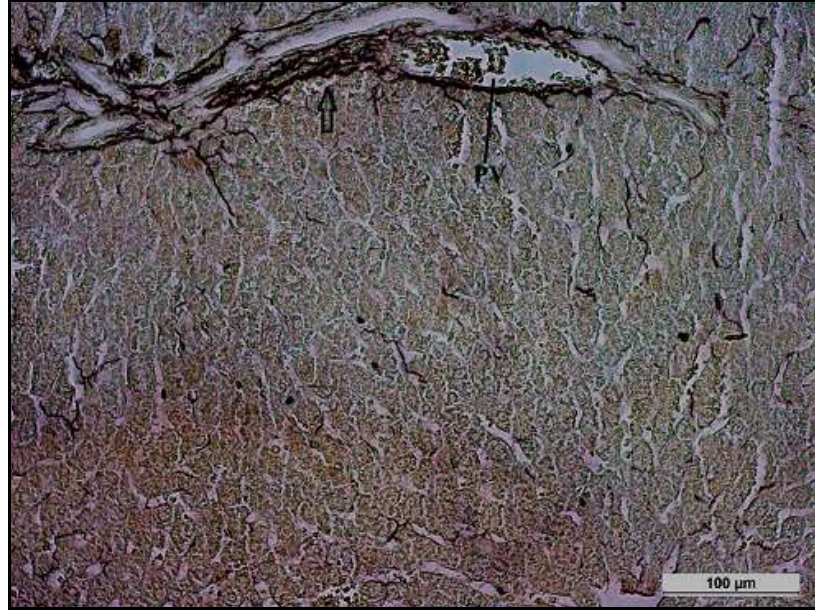
CCl₄ grubu sıçanların karaciğer dokusundaki retiküler liflerin kontrol gruplarına kıyasla kalınlaştığı ve dağılımlarının daha yoğun olduğu belirlenmiştir. Bazı kesitlerde de ağsı görünümün tam olarak izlenemediği tespit edilmiştir (Şekil 4.41-4.43).



Şekil 4.41 CCl₄ uygulanmış grubuna ait karaciğer dokusunda portal alan çevresinde retiküler lif kalınlaşması (ok) dikkati çekmekte. Gümüşleme Bar:100µm

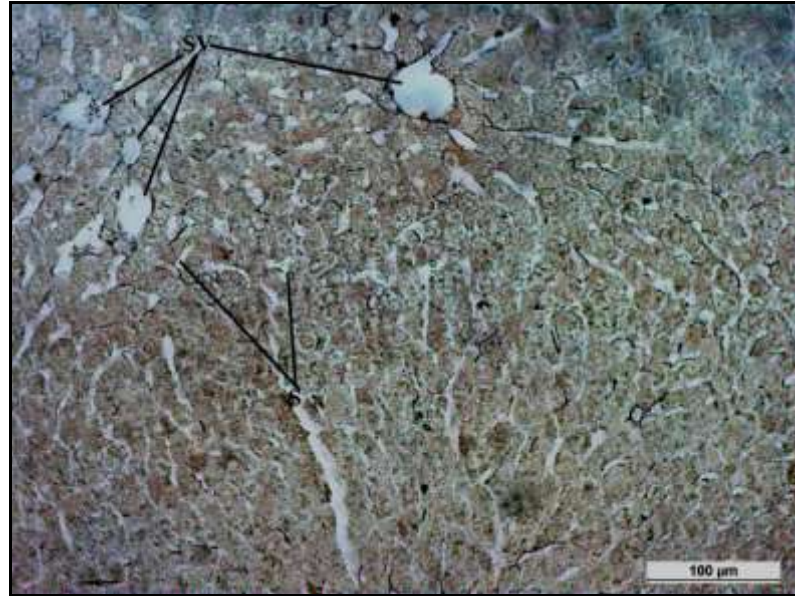


Şekil 4.42 CCl₄ grubuna ait sıçan karaciğerinde sentral ven (SV) çevresinde ve sinuzoidlerin (S) duvarında oryantasyonu bozulmuş ve devamlılığını kaybetmiş retiküler liflerin (ok) histolojik görüntüsü. Gümüşleme Bar:100µm

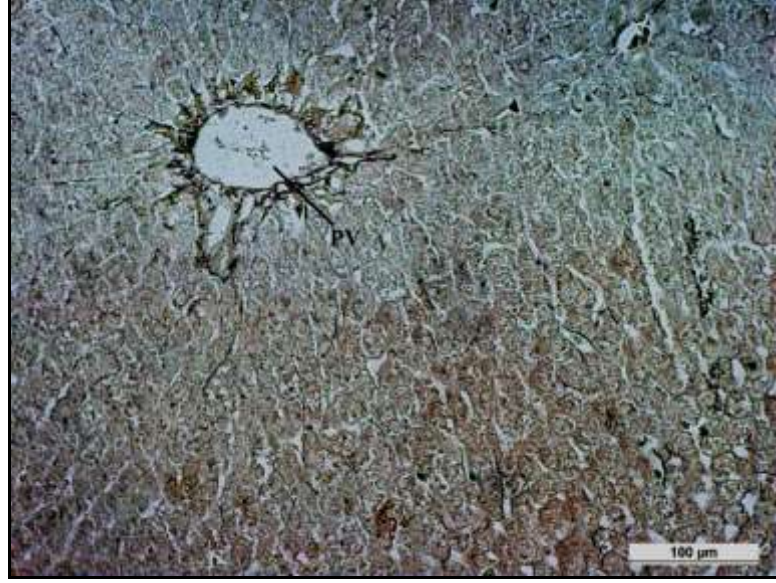


Şekil 4.43 CCl₄ uygulanmış grupta portal alan çevresinde kalınlaşmış retiküler lifler (ok) izlenmekte. Portal ven (PV). Gümüşleme Bar:100µm

Melatonin uygulanmış CCl₄ deney grupları (Grup 4, 5) incelendiğinde, her iki grupta da sentral ven ve sinüzoidlerin duvarında seyrek ve ince (Şekil 4.44), portal alanın etrafında ise daha yoğun retiküler lif ağı izlenmiştir (Şekil 4.45).



Şekil 4.44 CCl₄+MEL (10 hafta) grubu. Sentral ven (SV) ve sinüzoidlerin (S) duvarlarında retiküler liflerin genel görüntüsü. Gümüşleme Bar:100µm

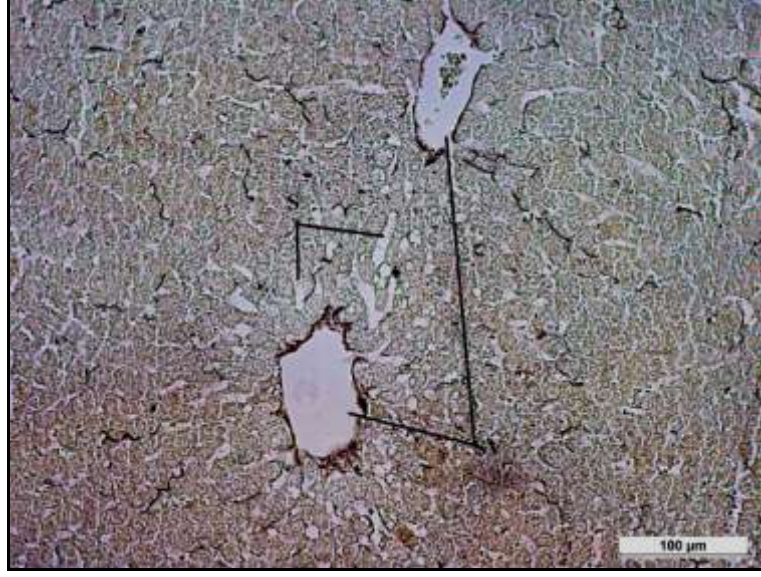


Şekil 4.45 12 hafta melatonin uygulanmış CCl_4 grubunda portal alan çevresinde retiküler lif dağılımı. Portal ven (PV). Gümüşleme Bar:100 μ m

D Vitamini uygulanmış CCl_4 gruplarında (Grup 6, 7), sinüzoidler, sentral ven ve portal alan çevresinde retiküler lifler izlenmiştir. 10 hafta D Vitamini verilen CCl_4 grubunda (Grup 6), retiküler liflerin nispeten korunduğu (Şekil 4.46); 12 hafta D Vitamini uygulanmış grupta ise retiküler lif şeklinin ve dağılımının kontrole yakın olduğu gözlenmiştir. (Şekil 4.47).



Şekil 4.46 10 hafta D Vitamini uygulanmış CCl_4 grubunda seyrek dağılım gösteren retiküler lifler. Sentral ven (SV). Gümüşleme Bar:100 μ m

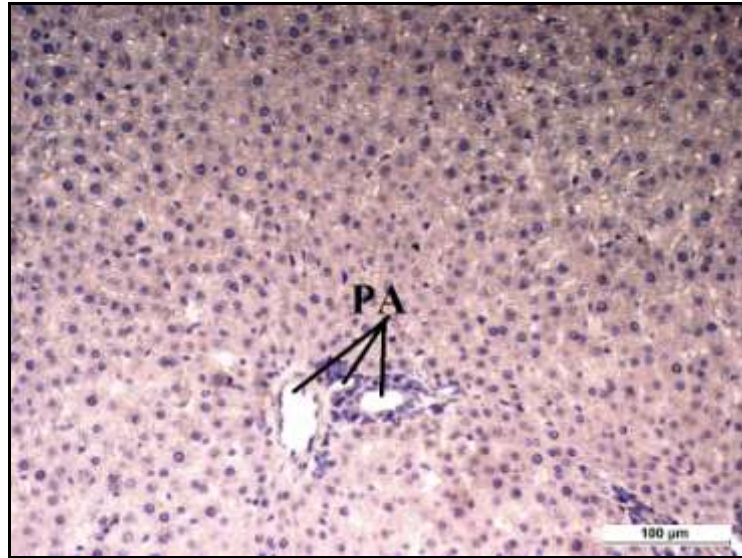


Şekil 4.47 12 hafta D Vitamini uygulanmış CCl_4 grubunda sentral ven (SV) çevresinde ve sinüzoidlerin (S) duvarında retiküler lif dağılımı. Gümüşleme Bar:100 μ m

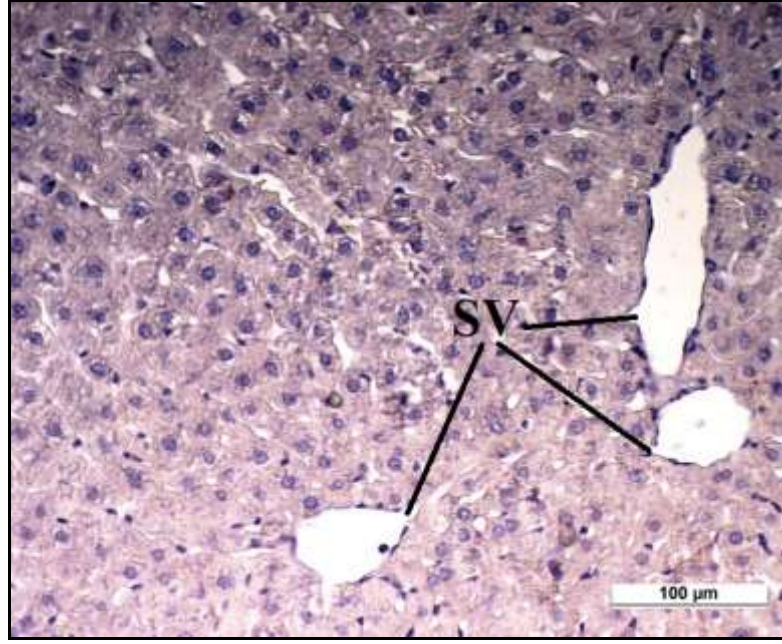
4.6 İmmunohistokimyasal Sonuçlar

4.6.1 Matriks-metalloproteinaz-9 (MMP-9)

Kontrol gruplarındaki (Grup 1, 2) sıçanların karaciğer lobülleri incelendiğinde, hücrelerin MMP-9 reaksiyonu göstermediği tespit edilmiştir (Şekil 4.48- 4.49).

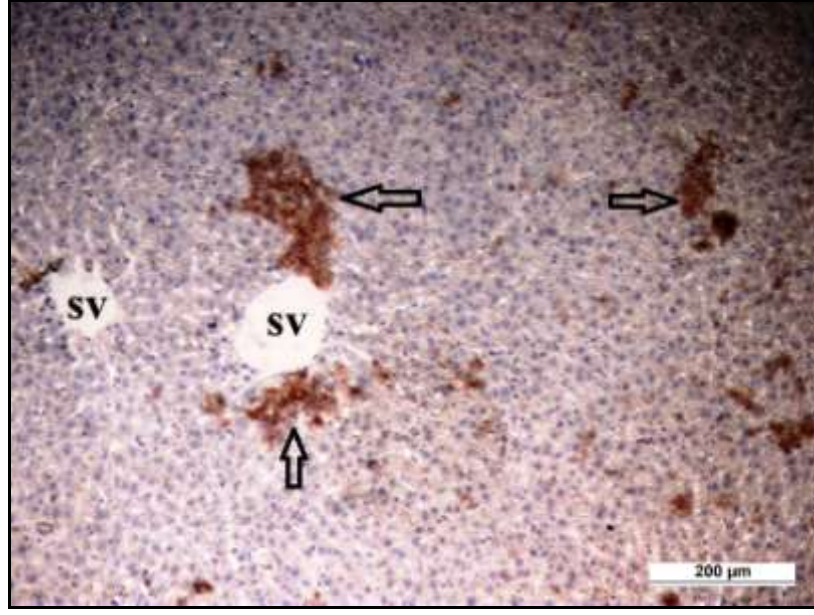


Şekil 4.48 Kontrol (mısır yağı) grubu karaciğer dokusunun genel görüntüsü. Portal alan (PA). MMP-9 Bar:100 μ m

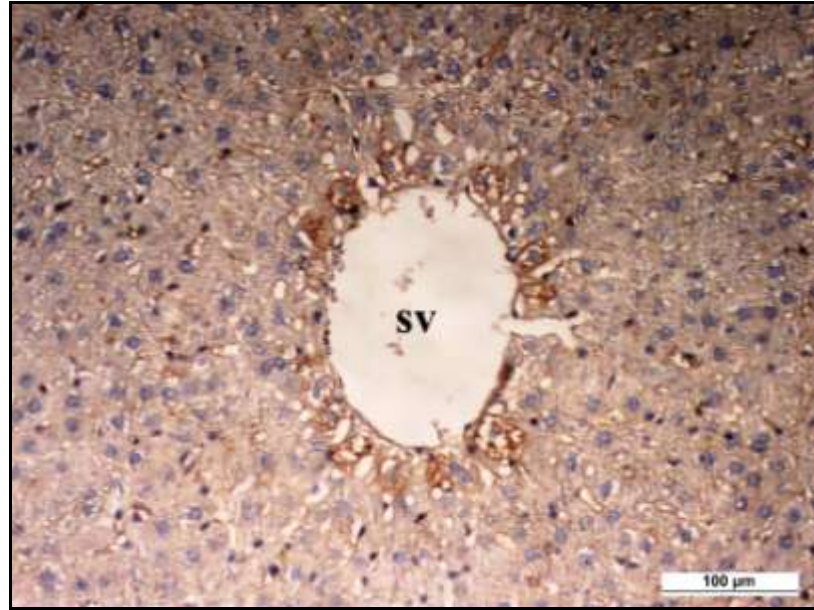


Şekil 4.49 Kontrol (PBS+Etanol) grubu sıçan karaciğerinin genel görüntüsü. Sentral ven (SV). MMP-9 Bar:100μm

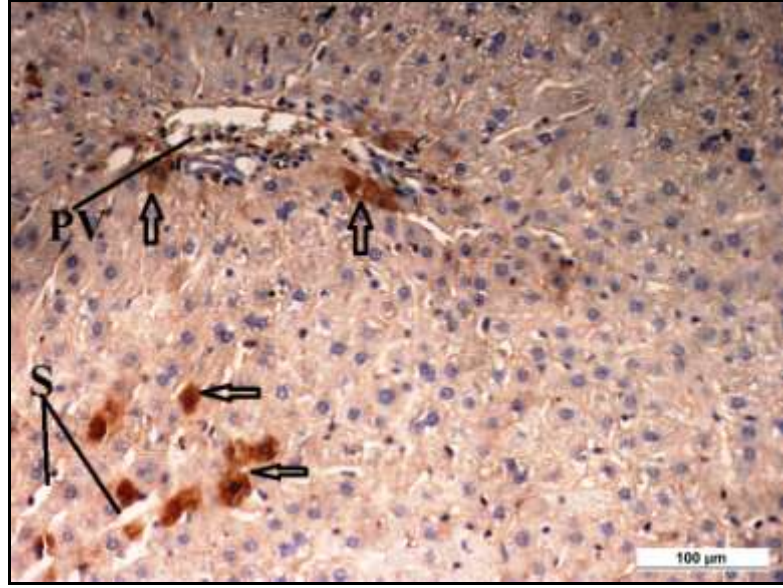
CCl₄ grubu sıçanların doku kesitleri incelendiğinde, karaciğer lobüllerinde MMP-9 pozitif reaksiyon gösteren hücreler tespit edilmiştir. Bu grupta özellikle sentral ven etrafında, sinüzoidler ve portal alanların çevresinde bölgesel olarak pozitif boyanmış hücreler bulunmuştur. MMP-9'un hepatositlerin sitoplazmasında lokalize olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.50-4.52).



Şekil 4.50 CCl₄ grubu sıçan karaciğerinde sentral venlerin (SV) etrafında MMP-9 (+) boyanmış hücreler (ok). MMP-9 Bar:200μm

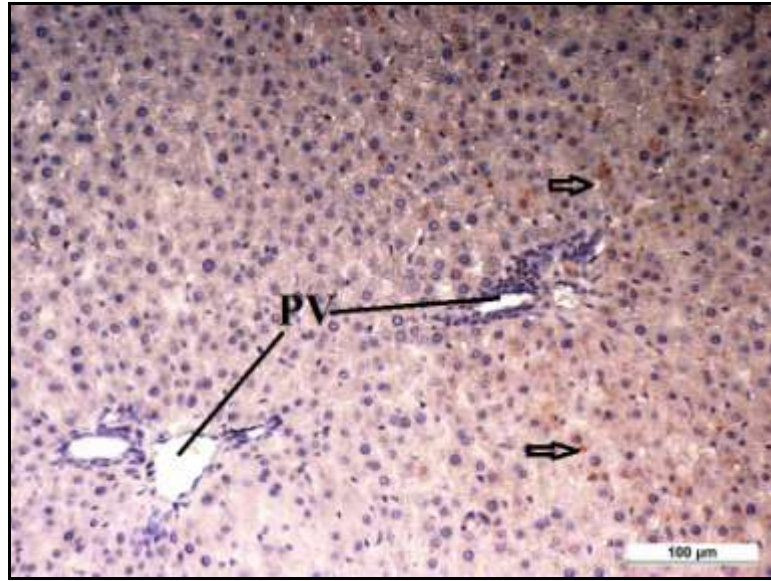


Şekil 4.51 CCl₄ uygulanmış grupta sentral ven (SV) çevresinde MMP-9 immünreaktivite. MMP-9 Bar:100μm

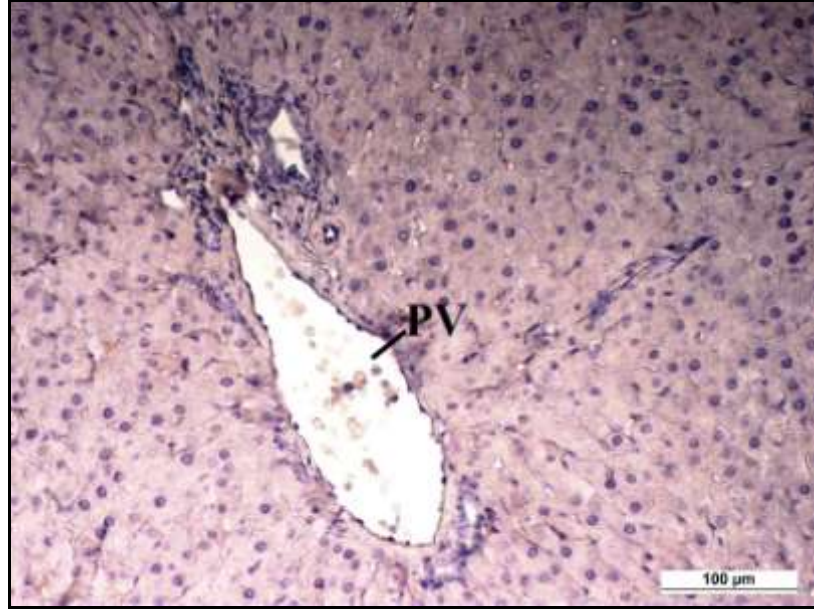


Şekil 4.52 CCl₄ grubunda portal alan ve sinüzoidlerin (S) çevresinde sitoplazması MMP-9 pozitif reaksiyon gösteren hepatositlerin görüntüsü (ok). Portal ven (PV). MMP-9 Bar:100µm

10 hafta melatonin uygulanmış CCl₄ grubunda (Grup 4), bazı kesitlerde yer yer seyrek MMP-9 pozitif hücreler tespit edilmiştir (Şekil 4.53). 12 hafta uygulanmış melatonin grubunda (Grup 5) ise, kontrol gruplarına benzer şekilde pozitif MMP-9 reaksiyonu gösteren hücelere rastlanmamıştır (Şekil 4.54).

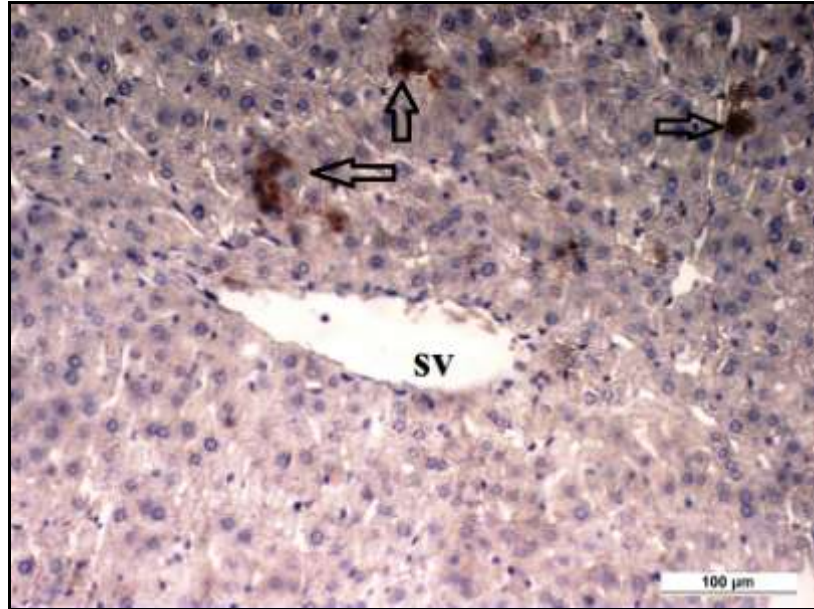


Şekil 4.53 CCl₄+MEL (10 hafta) grubunda portal alan çevresinde zayıf MMP-9 immünreaktivite (ok). Portal ven (PV). MMP-9 Bar:100µm

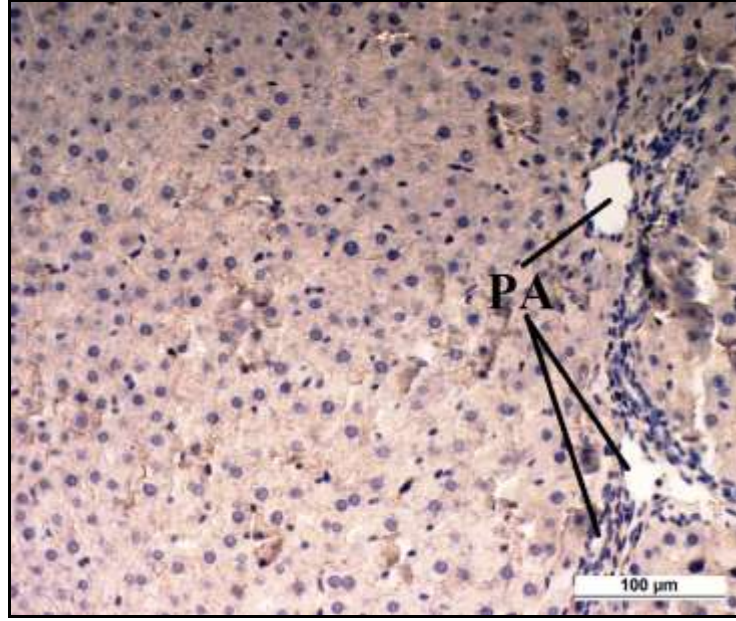


Şekil 4.54 12 hafta melatonin uygulanmış CCl_4 grubunda MMP-9 negatif reaksiyon. Portal ven (PV). MMP-9 Bar:100 μ m

10 hafta D Vitamini uygulanmış CCl_4 grubunda (Grup 6), bazı kesitlerde yer yer MMP-9 pozitif hücelere rastlanmıştır (Şekil 4.55). 12 hafta uygulanmış melatonin grubunda (Grup 7) ise, MMP-9 hücelere rastlanmamıştır (Şekil 4.56).



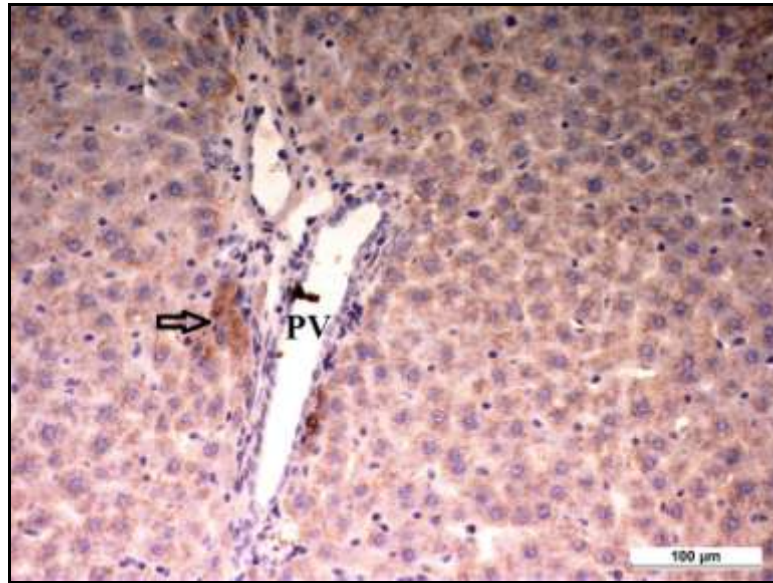
Şekil 4.55 10 hafta D Vitamini uygulanmış CCl_4 grubunda yer yer MMP-9 (+) reaksiyon gösteren hüceler. Sentral ven (SV). MMP-9 Bar:100 μ m



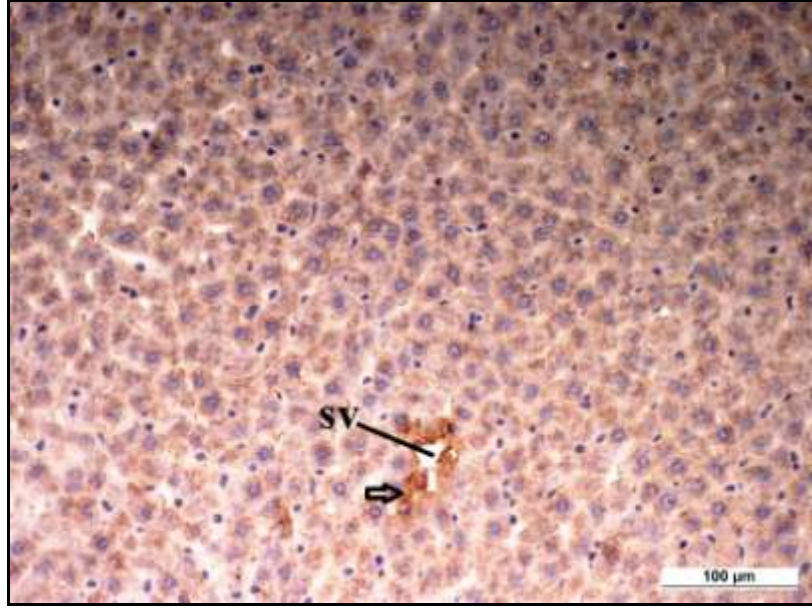
Şekil 4.56 CCl₄+D Vit (12 hafta) grubu karaciğer dokusunun genel görüntüsü. Portal alan (PA). MMP-9 Bar:100μm

4.6.2 Dezmin

Kontrol gruplarının (Grup 1,2) karaciğer dokularında seyrek olarak dezmin pozitif reaksiyon gösteren hücreler saptanmıştır (Şekil 4.57-4.58).

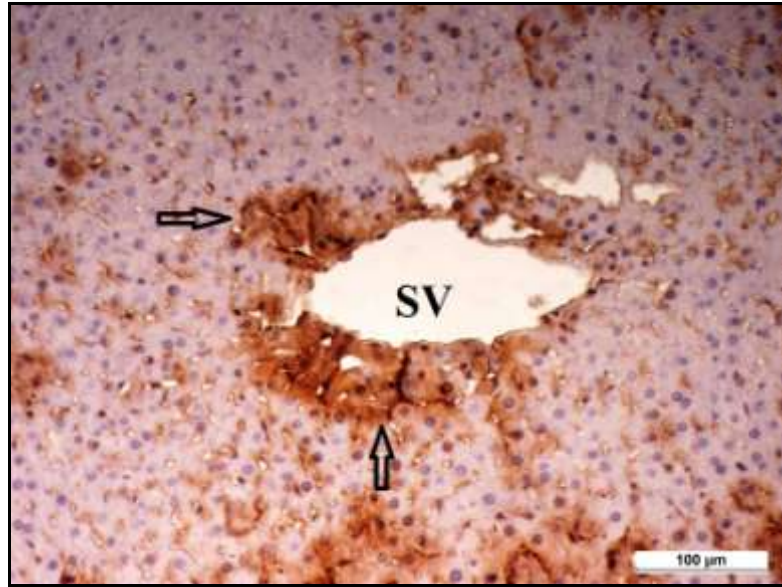


Şekil 4.57 Kontrol (mısır yağı) grubunda zayıf immünreaktivite gösteren dezmin (+) hücreler (ok). Portal ven (PV). Dezmin Bar:100μm.

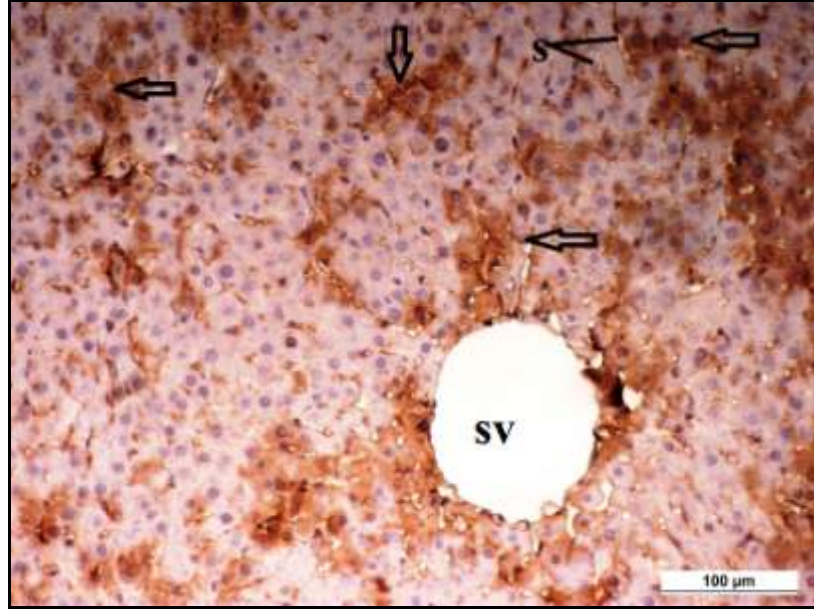


Şekil 4.58 Kontrol (PBS+etanol) grubu sıçanlarda sentral ven (SV) etrafında ve hepatositlerde dezmin (+) immünreaktivite (ok). Dezmin Bar:100µm

CCl₄ grubunun kesitleri incelendiğinde genel olarak dokunun kuvvetli dezmin pozitif reaksiyon verdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.59-4.61).



Şekil 4.59 CCl₄ uygulanmış grupta sentral ven (SV) çevresinde kuvvetli dezmin (+) reaksiyon gösteren hücreler (ok). Dezmin Bar:100µm



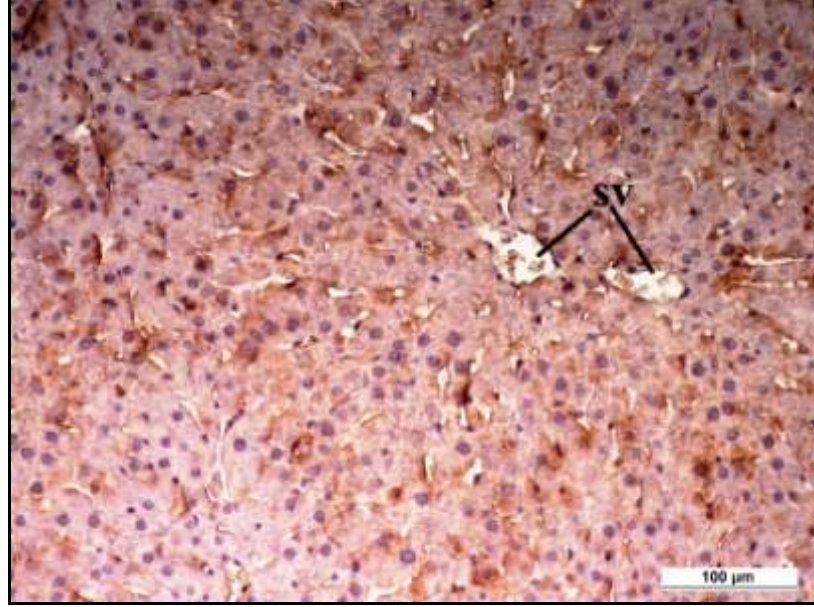
Şekil 4.60 CCl₄ grubunda sentral ven (SV) çevresinde ve sinüzoidlerin duvarında kuvvetli dezmin (+) immünreaktivite gösteren hücreler (ok) izlenmekte. Dezmin Bar:100μm



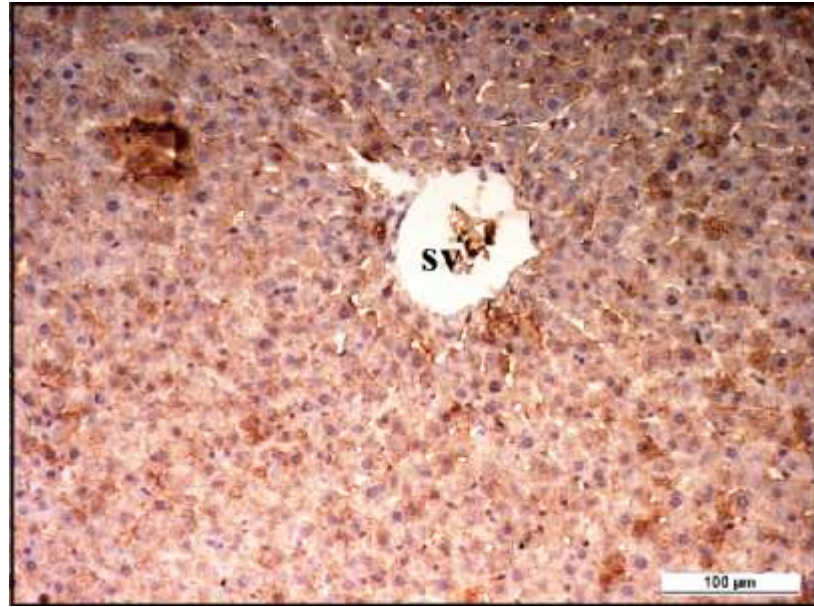
Şekil 4.61 CCl₄ grubu sıçanların karaciğer dokusunda portal ven çevresinde ve parankimada dezmin (+) immünreaktivite (ok). Portal ven (PV). Dezmin Bar:100μm

10 hafta melatonin uygulanmış CCl₄ grubunda (Grup 4), orta derecede dezmin pozitif reaksiyon vermiş hücreler saptanmıştır (Şekil 4.62). 12 hafta melatonin uygulanmış

CCl₄ grubunda (Grup 5) ise, sadece CCl₄ uygulanmış gruba göre hücrelerde daha zayıf dezmin pozitif immünreaktivite gözlenmiştir (Şekil 4.63).

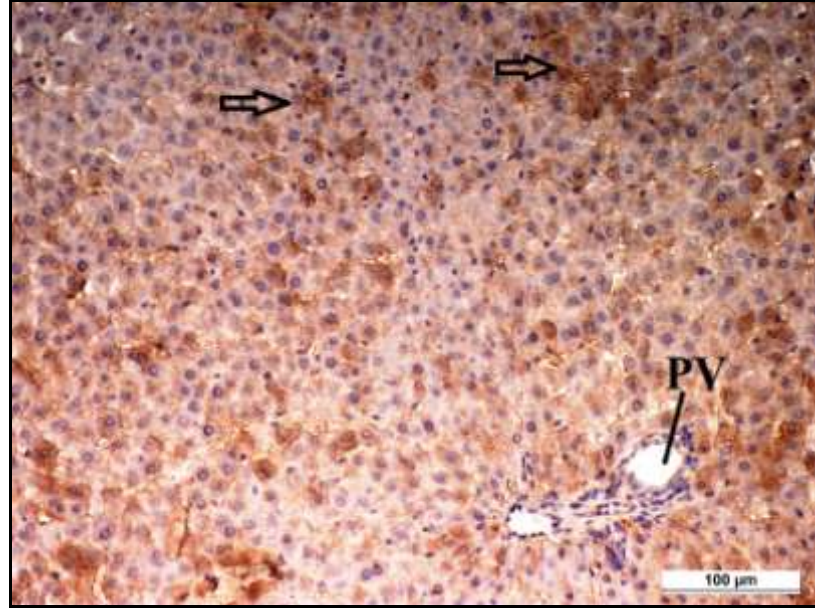


Şekil 4.62 CCl₄+MEL (10 hafta) grubunda parankimatik dokuda dezmin (+) immünreaktivite. Sentral ven (SV). Dezmin Bar:100µm

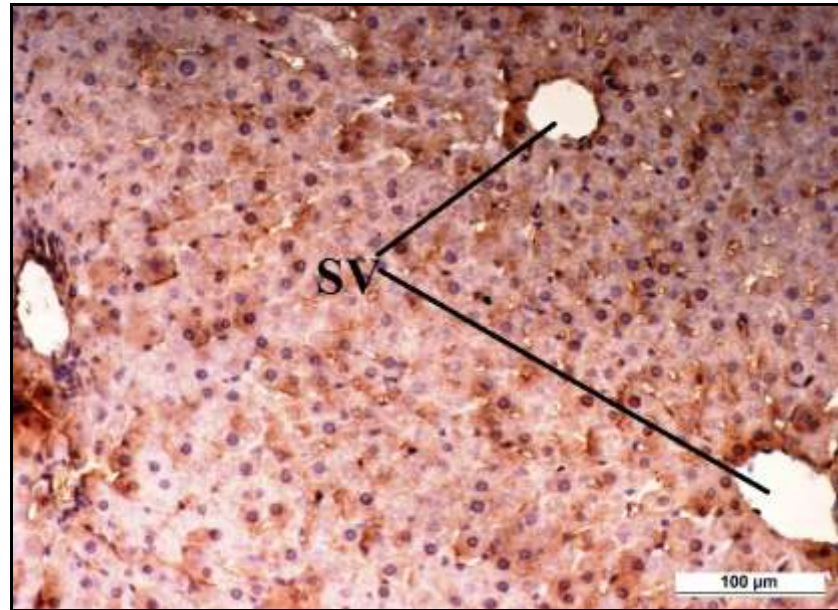


Şekil 4.63 CCl₄+MEL (12 hafta) grubunda dezmin pozitif immünreaktivite gösteren hücrelerin dağılımı. Sentral ven (SV). Dezmin Bar:100µm

10 hafta D Vitamini uygulanmış CCl₄ grubunda (Grup 6), orta şiddette dezmin pozitif hücelere rastlanmıştır (Şekil 4.64). 12 hafta D Vitamini uygulanmış CCl₄ grubunda (Grup 7) ise, kontrol gruplarına yakın zayıf dezmin pozitif reaksiyon gösteren hüceler tespit edilmiştir (Şekil 4.65).



Şekil 4.64 CCl₄+D Vit (10 hafta) grubunda dezmin (+) immünreaktivite. Portal ven (PV). Dezmin Bar:100µm

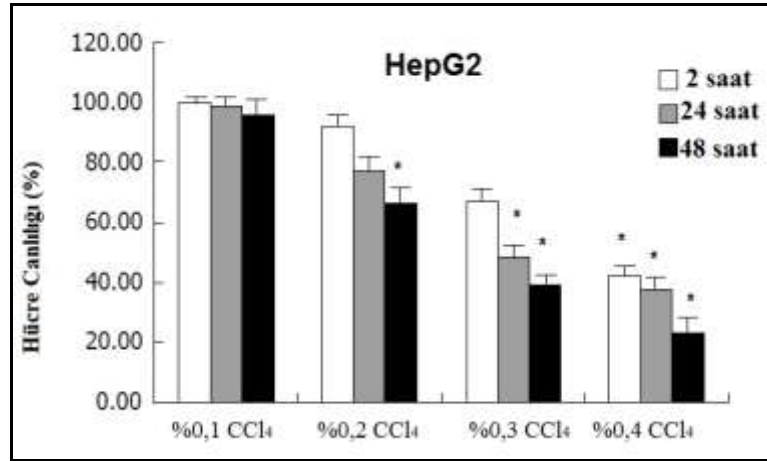


Şekil 4.65 CCl₄+D Vit (12 hafta) grubunda karaciğer lobülünde dezmin (+) hüceler izlenmekte. Sentral ven (SV) Dezmin Bar:100µm

4.7 In vitro Sonuçlar

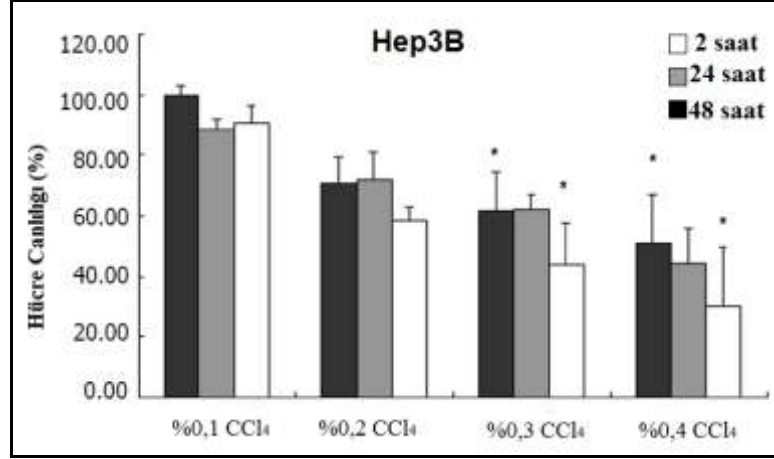
4.7.1 CCl₄ sitotoksitesi

HepG2 ve Hep3B insan hepatoma hücre hatlarında CCl₄'n sitotoksik etkisini bulmak amacıyla öncelikle konsantrasyon denemeleri yapılmıştır. Bunun için hücrelere %0,1, 0,2, 0,3 ve 0,4 oranlarında CCl₄ uygulaması yapılmıştır. %0,1'lik CCl₄ dozu, HepG2 hücrelerinde oldukça az sitotoksik etki (<%4) göstermiştir. MTT sonucuna göre, %0,4 oranında CCl₄'e maruz bırakma, 2. saatte HepG2 hücre canlılığını çok az etkilemiştir. 24. ve 48. saatte bu etki dereceli bir şekilde artmış ve 48. saatin sonunda canlı hücre yüzdesi oldukça az bulunmuştur (p=0,018, p<0,05) (şekil 4.66).



şekil 4.66 Farklı dozlarda CCl₄'e maruz bırakılan HepG2 hücrelerinin canlılık yüzdesi (* p<0,05)

HepG2 hücreleri gibi Hep3B hücre canlılığı da, inkübasyon sürelerine ve doza bağlı olarak CCl₄'ten etkilenmiştir (p=0,020, p<0,05) (şekil 4.67). HepG2'ye nazaran Hep3B hücreleri, CCl₄'ten daha yavaş oranda etkilenmiştir.



Şekil 4.67 Farklı dozlarda CCl₄'e maruz bırakılan Hep3B hücrelerinin canlılık yüzdesi (*p<0,05)

Her iki hücre hattında da CCl₄ sitotoksitesine karşı melatonin ve 1,25(OH)₂D₃'ün hücre canlılığına etkisini görmek için, en yüksek toksik etkiye yol açan %0,4 CCl₄ dozu seçilmiştir.

4.8.2 Hücre canlılığı bulguları

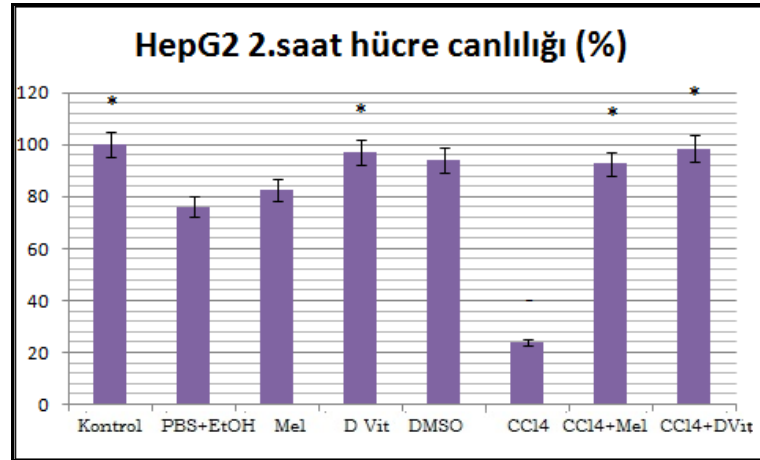
4.8.2.1 HepG2

Çalışmada kullanılan CCl₄'ün 2. 24. ve 48. saatlerdeki sitotoksite değerlendirmeleri ile elde edilen HepG2 hücre canlılık değerleri çizelge 4.5'de, hücrelerin canlılık yüzdeleri şekil 4.61-4.63'de verilmiştir. Çalışmada ayrıca Melatonin ve D Vitamininin CCl₄ sitotoksitesini üzerine etkileri de incelenmiştir.

Çizelge 4.5 HepG2 hücre hattının gruptaki hücre sayısı ortalamaları ve standart sapma gösterilmiştir

HepG2 Hücre Sayısı Ortalamaları	2 saat	24 saat	48 saat
1.Kontrol	0,884±0,192	0,865±0,230	1,140±0,350
2.PBS+E tanol	1,004±0,400	0,995±0,307	1,017±0,300
3.Melatonin	1,031±0,300	0,872±0,300	0,954±0,250
4.D Vitamini	1,018±0,250	1,539±0,230	1,139±0,260
5.DMSO	0,501±0,145	1,050±0,210	0,926±0,260
6.CCl ₄	0,616±0,135	0,450±0,103	0,337±0,103
7.CCl ₄ +Melatonin	1,015±0,281	0,874±0,270	0,167±0,190
8.CCl ₄ +D Vitamini	0,899±0,166	1,148±0,240	0,821±0,335

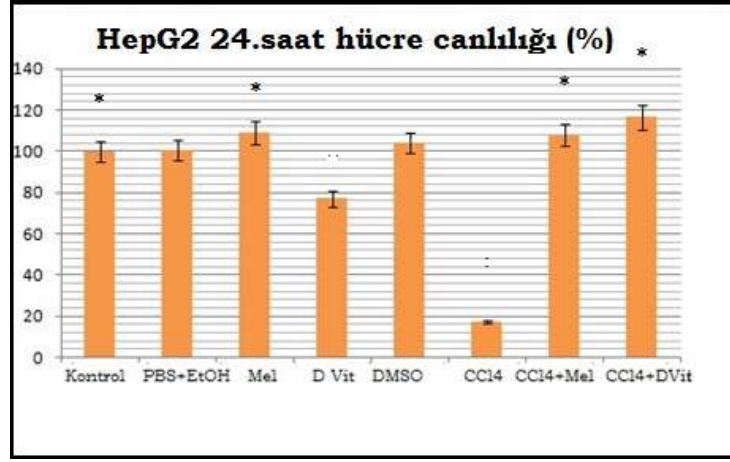
HepG2 hücre hattında 2. saatin sonunda hücre sayıları bakımından gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,000$, $p<0,05$). Farklılığı yaratan grupların bulunması amacıyla çoklu karşılaştırma testlerinden yararlanılmış ve olası tüm ikili kombinasyonlar arasında farklılık aranmıştır. Buna göre, Kontrol-CCl₄ ($p=0,000$), CCl₄- CCl₄+MEL ($p=0,000$), CCl₄- CCl₄+D Vit ($p=0,000$) ve CCl₄-D Vit ($p=0,000$) grupları birbirinden farklı bulunmuştur (Şekil 4.68).



Şekil 4.68 HepG2 2. saatin sonunda hücre canlılığı yüzdesi gösterilmektedir (* $p<0,05$). (* $p<0,05$, CCl₄ grubu ile diğer gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir).

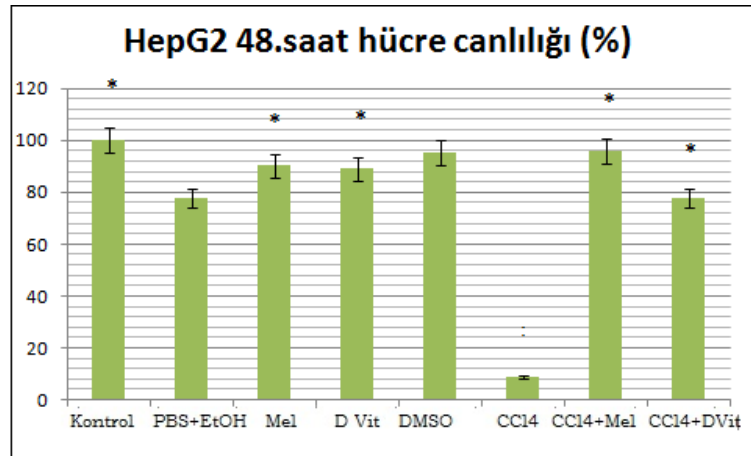
HepG2 hücre hattında 24. saatin sonunda hücre sayıları bakımından gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,000$, $p<0,05$). Farklılığı yaratan grupların bulunması amacıyla çoklu karşılaştırma testlerinden yararlanılmış ve olası tüm ikili kombinasyonlar arasında farklılık aranmıştır. Buna göre, Kontrol-CCl₄ ($p=0,032$),

CCl₄- CCl₄+MEL (p=0,000), CCl₄- CCl₄+D Vit (p=0,000), CCl₄-MEL (p=0,001) ve D Vit - CCl₄+D Vit (p=0,001) grupları birbirinden farklı bulunmuştur (Şekil 4.69).



Şekil 4.69 HepG2 24.saatin sonunda hücre canlılığı yüzdesi gösterilmektedir (* p<0,05). (* p<0,05, CCl₄ grubu ile diğer gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir)

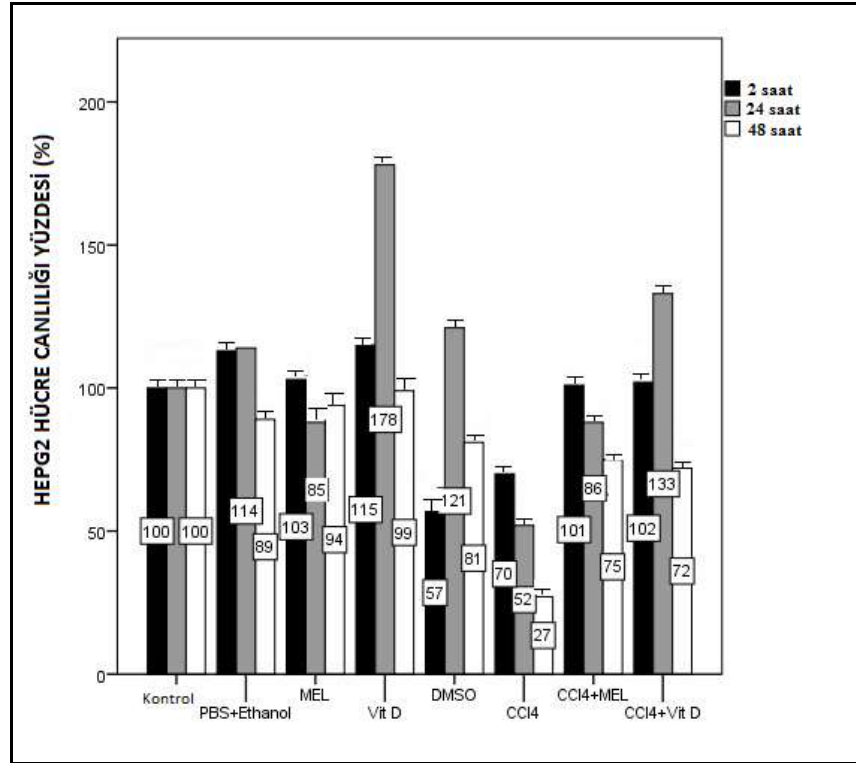
HepG2 hücre hattında 48. saatin sonunda hücre sayıları bakımından gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,000, p<0,05). Farklılığı yaratan grupların bulunması amacıyla çoklu karşılaştırma testlerinden yararlanılmış ve olası tüm ikili kombinasyonlar arasında farklılık aranmıştır. Buna göre, Kontrol-CCl₄ (p=0,000), CCl₄- CCl₄+MEL (p=0,000) ,CCl₄- CCl₄+D Vit (p=0,000), CCl₄-MEL (p=0,020) ve CCl₄-D Vit (p=0,015) grupları birbirinden farklı bulunmuştur (Şekil 4.70).



Şekil 4.70 HepG2 48.saatin sonunda hücre canlılığı yüzdesi gösterilmektedir (* p<0,05). (* p<0,05). (* p<0,05, CCl₄ grubu ile diğer gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir)

MTT sonuçları şu şekilde özetlenebilir (Şekil 4.71);

- CCl_4 'e maruz bırakılan HepG2 hücrelerinde hücre sayısında kontrol grubuna kıyasla, 2. saatten itibaren belirgin bir şekilde azalma gözlenmiştir. Özellikle 48. saatte hücre canlılığı oranı %27'ye düşmüştür. Bundan dolayı CCl_4 'ün HepG2 hücre canlılığını oldukça etkilediği söylenebilir.
- Melatonin verilen CCl_4 grubunda melatoninin, 48. saatte bile hücre canlılığını yaklaşık %75 oranında koruduğu saptanmıştır.
- D Vitamini verilen CCl_4 grubunda ise, aynı şekilde hücre canlılığının 2. 24. ve 48. saatlerde kontrol grubuna yakın olduğu belirlenmiştir. Sadece D Vitamini verilen grup ve CCl_4 ile beraber verilen grupta, özellikle 24. saatte bu oranın, kontrol grubundan daha fazla olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak D Vitamininin hücre canlılığını en çok 24. saatte koruduğu söylenebilir.



Şekil 4.71 HepG2 hücrelerinin bütün grupların 2. 24. ve 48. saatlerdeki canlılık yüzdeleri

Sonuç olarak, melatonin veya D Vitamini verilen CCl₄ uygulanmış gruplarda olduğu kadar, yalnızca melatonin veya D Vitamini verilen gruplarda da 2. 24. ve 48. saatlerin sonunda hücre proliferasyonu ve yaşamı üzerine alınan ortalama yüzde yanıtları arasındaki fark tüm veriler için istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05). CCl₄ uygulanmış hücrelerde melatonin ve D Vitamininin hücre canlılığını koruduğunu ve HepG2 hücrelerinde, D Vitamininin melatonine göre daha etkili olduğu söylenebilir.

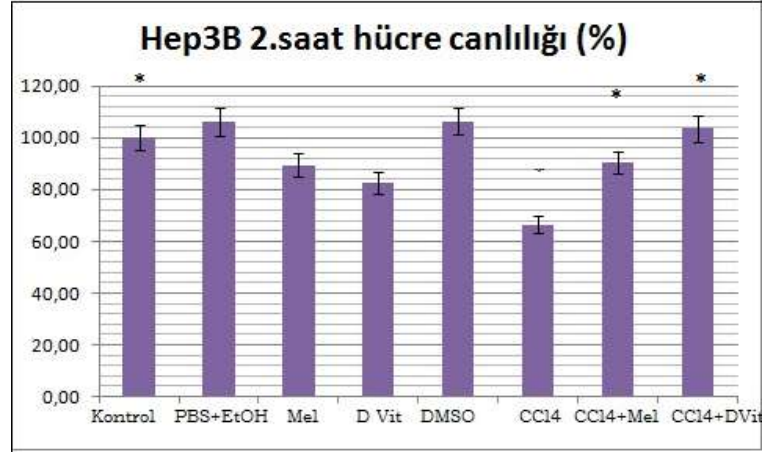
4.8.2.2 HEP3B

Çalışmada kullanılan CCl₄'ün 2. 24. ve 48. saatlerdeki sitotoksosite değerlendirmeleri ile elde edilen Hep3B hücre canlılık değerleri çizelge 4.6'da, hücrelerin canlılık yüzdeleri şekil 4.72-4.74'de verilmiştir. Çalışmada ayrıca Melatonin ve D Vitamininin CCl₄ sitotoksitesisi üzerine etkileri de incelenmiştir.

Çizelge 4.6 Hep3B hücre hattının gruplardaki hücre sayısı ortalamaları ve standart sapma gösterilmiştir

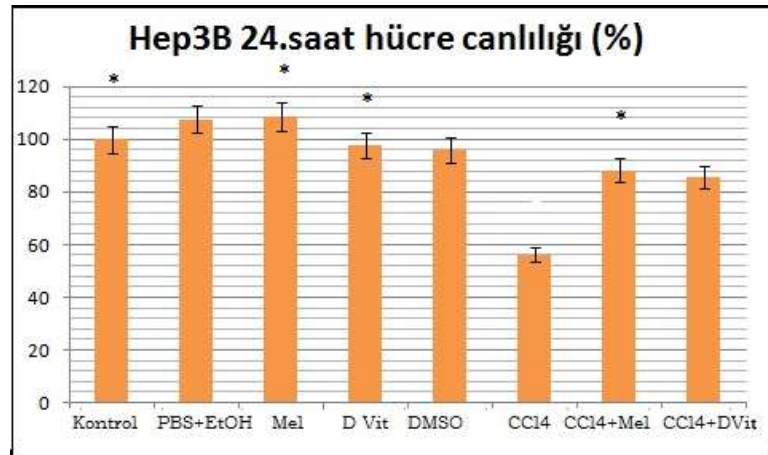
Hep3B Hücre Sayısı Ortalamaları	2 saat	24 saat	48 saat
1.Kontrol	0,246±0,038	0,969±0,093	1,057±0,137
2.PBS+Etanol	0,261±0,033	1,044±0,109	1,030±0,097
3.Melatonin	0,224±0,045	1,052±0,141	0,963±0,232
4.D Vitamini	0,203±0,024	0,950±0,107	0,964±0,103
5.DMSO	0,262±0,028	0,932±0,120	0,992±0,198
6.CCl ₄	0,163±0,015	0,544±0,150	0,272±0,060
7.CCl ₄ +Melatonin	0,222±0,026	0,856±0,101	0,769±0,096
8.CCl ₄ +D Vitamini	0,254±0,027	0,830±0,093	0,829±0,092

Hep3B hücre hattında 2. saatin sonunda hücre sayıları bakımından gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,000, p<0,05). Farklılığı yaratan grupların bulunması amacıyla çoklu karşılaştırma testlerinden yararlanılmış ve olası tüm ikili kombinasyonlar arasında farklılık aranmıştır. Buna göre, Kontrol-CCl₄ (p=0,000), CCl₄- CCl₄+MEL (p=0,012) ve CCl₄- CCl₄+D Vit (p=0,000) grupları birbirinden farklı bulunmuştur.



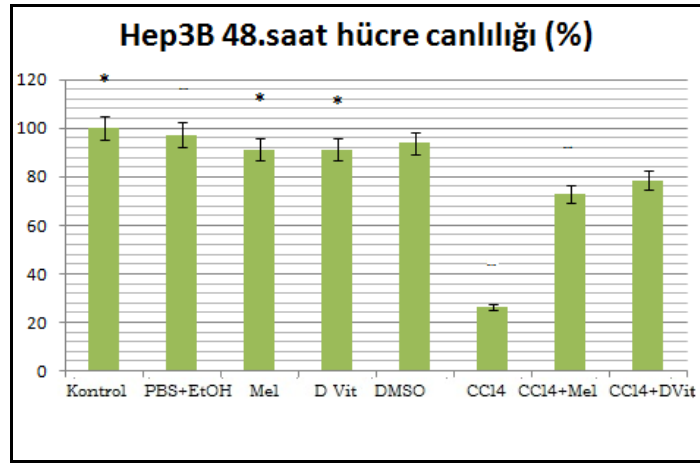
Şekil 4.72 Hep3B 2.saatın sonunda hücre canlılığı yüzdesi gösterilmektedir (* $p < 0,05$). (* $p < 0,05$). (* $p < 0,05$, CCl₄ grubu ile diğer gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir)

Hep3B hücre hattında 24. saatin sonunda hücre sayıları bakımından gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p = 0,000$, $p < 0,05$). Farklılığı yaratan grupların bulunması amacıyla çoklu karşılaştırma testlerinden yararlanılmış ve olası tüm ikili kombinasyonlar arasında farklılık aranmıştır. Buna göre, Kontrol-CCl₄ ($p = 0,000$), CCl₄- CCl₄+MEL ($p = 0,027$), CCl₄- MEL ($p = 0,000$) ve CCl₄- D Vit ($p = 0,002$) grupları birbirinden farklı bulunmuştur.



Şekil 4.73 Hep3B 24.saatın sonunda hücre canlılığı yüzdesi gösterilmektedir (* $p < 0,05$). (* $p < 0,05$, CCl₄ grubu ile diğer gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir)

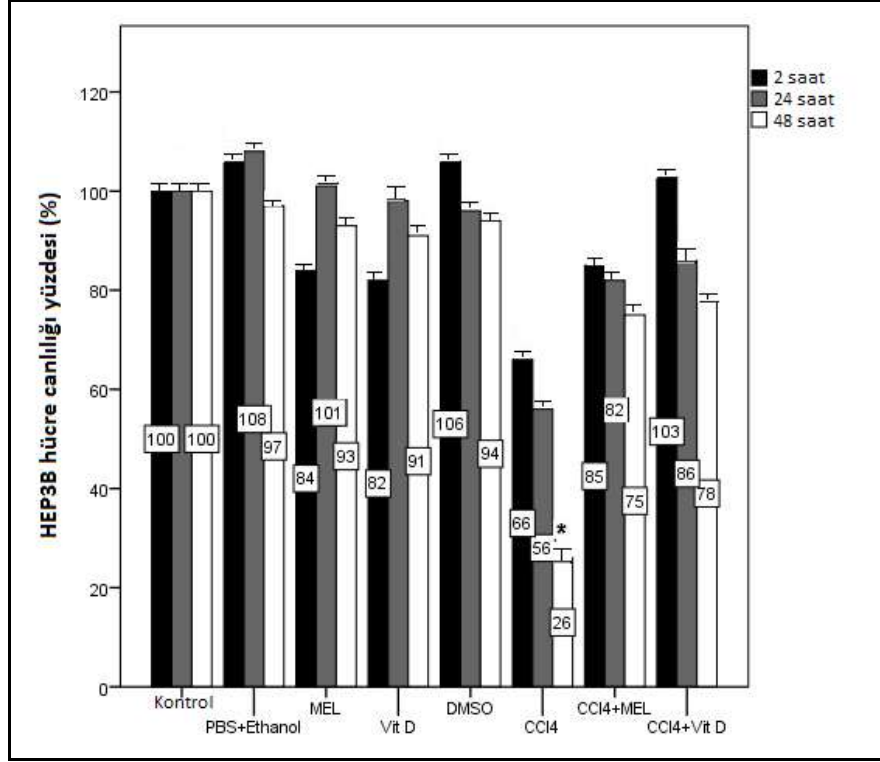
Hep3B hücre hattında 48. saatin sonunda hücre sayıları bakımından gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,000$, $p<0,05$). Farklılığı yaratan grupların bulunması amacıyla çoklu karşılaştırma testlerinden yararlanılmış ve olası tüm ikili kombinasyonlar arasında farklılık aranmıştır. Buna göre, Kontrol- CCl_4 ($p=0,000$), CCl_4 - CCl_4 +D Vit ($p=0,006$), CCl_4 - MEL ($p=0,001$), CCl_4 - D Vit ($p=0,000$), Kontrol- CCl_4 +MEL ($p=0,018$) ve PBS+Etanol- CCl_4 +MEL ($p=0,048$) grupları birbirinden farklı bulunmuştur.



Şekil 4.74 Hep3B 48.saat sonunda hücre canlılığı yüzdesi gösterilmektedir (* $p<0,05$). (* $p<0,05$). (* $p<0,05$, CCl_4 grubu ile diğer gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir)

MTT sonuçları şu şekilde özetlenebilir (Şekil 4.75);

- Hep3B hücre hattında da CCl_4 'ün 2 saatlik uygulaması hücre yaşamını çok az etkilerken, 24. ve 48. saatteki uygulamalarda bu etki oldukça belirginleşmiştir.
- Melatonin ve D Vitamininin CCl_4 verilen gruplarda hücre yaşamı üzerine etkilerinin olup olmadığı incelenmiştir. Sonuç olarak, melatonin veya D Vitamini verilen CCl_4 uygulanmış gruplarda olduğu kadar, yalnızca melatonin veya D Vitamini verilen gruplarda da 2. 24. ve 48. saatlerin sonunda hücre proliferasyonu ve yaşamı üzerine alınan ortalama yüzde yanıtları arasındaki fark tüm veriler için istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$).



Şekil 4.75 HEP3B hücrelerinin bütün grupların 2. 24. ve 48. saatlerdeki canlılık yüzdeleri

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Karaciğer fibrozisi ESM proteinlerinin aşırı birikimi sonucunda oluşur. Kronik karaciğer hastalıklarının birçoğunda meydana gelir (Bataller ve Brenner 2005). Son yıllarda yapılmış çalışmalarda karaciğer fibrozisinin hücresel ve moleküler mekanizmaları detaylı bir şekilde gösterilmiştir (Mormone vd. 2011, Iwaisako vd. 2012, Mallat ve Lotersztajn 2013).

Karaciğer fibrozisinde fibroz skar oluşumunu miyofibroblastlar sağlar. Hepatik miyofibroblastlar çeşitli fibrojenik uyarılara cevap olarak oluşur. Deneysel karaciğer fibrozisinde bu hücrelerin esas kaynağı ise hepatik stellat hücreler (HSH) ve portal fibroblastlardır (Iwaisako vd. 2012). Hepatik miyofibroblastlar özellikle kollajen olmak üzere ekstraselüler matriks bileşenlerinin artışıyla sağlayarak dokuda fibrozis oluşumuna sebep olur (Bataller ve Brenner 2005, Parola vd. 2008).

Oksidan ve antioksidanların arasındaki dengenin oksidanların lehine kayması sonucu oksidatif stres oluşur (Sies 1997). Oksidatif stres sonucu oluşan ROS oldukça reaktiftir. Lipitlerin, proteinlerin ve DNA'nın oksidasyonuna yol açarak hücrelerde hasar oluşturur (Medina ve Moreno-Otero 2005, Sánchez-Valle vd. 2012). Oksidatif stresin de, hepatik fibrozisin ilerlemesine neden olduğu ileri sürülmüştür (Poli 2000, Medina ve Moreno-Otero 2005, Sánchez-Valle vd. 2012).

CCl₄, serbest radikal oluşumuna yol açan toksik bir maddedir (Lee vd. 2003, Ding vd. 2005, Starkel ve Leclercq 2011, Huang vd. 2014). CCl₄ hepatoksisitesi, karaciğerde sitokrom P450 aktivasyonu ile hepatik mikrozomal enzim (CYP2E1) tarafından oluşturulan serbest radikallere, triklorometil (CCl₃·) ve triklorometil peroksile (CCl₃O₂-) bağlıdır (Basu 2003, Manibusan vd. 2007, Nada vd. 2010, Ingawale vd. 2014). Stabil olmayan bu radikaller hücre membranı proteinlerine ve lipitlerine bağlanarak lipid peroksidasyonunu tetikler ve karaciğer hasarı oluşturur (Debnath vd. 2013, Ingawale vd. 2014).

İnsan ve sıçan karaciğerinin temel yapısı birbirine benzerdir (Kogure vd. 1999). Bu nedenle, CCl₄'e bağlı karaciğer hasarının gösterilmesinde deneysel model olarak sıçanlar kullanılmaktadır (Gasso vd. 1996, Kanter vd. 2005, Kepekçi vd. 2013). Bu çalışmada da hepatoksisite oluşturmak amacıyla sıçanlar tercih edilmiştir.

In vivo ve *in vitro* lipit peroksidasyonunu belirlemek amacıyla MDA ölçümü yapılmaktadır (Basu 2003). Botsoglou vd. (2010), sıçanlara %50 yağlı parafin içerisinde çözülmüş 1 ml/kg oranında CCl₄'ü *i.p* yoldan tek doz verdiklerinde serumda, karaciğer, böbrek ve kalp dokularında MDA düzeylerinin anlamlı bir şekilde artış gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Kazlarda yapılan bir çalışmada, 12 hafta boyunca haftada üç kez 1ml/kg ve 1,5 ml/kg dozlarındaki CCl₄ oral olarak verilmiş, karaciğer ve böbrek dokularında MDA düzeyinin yükseldiği belirtilmiştir. 1,5 ml/kg CCl₄ uygulanan grupta MDA seviyesinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Güven ve Yılmaz 2005). Bir diğer çalışmada, Wistar albino sıçanlara 10ml/kg CCl₄ *i.p* olarak 7 gün verilmiştir. Alınan karaciğer, böbrek ve kalp dokularında MDA düzeyinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak arttığı ifade edilmiştir (Karadeniz vd. 2009). Yu vd. (2014), farelerle yaptıkları çalışmada, 7 gün boyunca 10ml/kg CCl₄'ü *i.p* yoldan verdiklerinde, karaciğer MDA düzeylerinin yüksek olduğunu bulmuşlardır. Kepekçi vd. (2013) ise, Wistar albino sıçanlara 1ml/kg CCl₄'ü *i.p* yoldan verdikten 24 saat sonra aldıkları karaciğer örneklerinde bile yüksek MDA seviyesinin olduğunu göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda sıçanlara haftada iki kez olmak üzere 10 hafta boyunca *s.c* yoldan 1,5ml/kg CCl₄ verilmiştir. CCl₄ grubu karaciğer MDA düzeylerinde araştırmacıların bulgularına uygun olarak anlamlı artış olduğu tespit edilmiştir (p<0,05).

Glutatyon (GSH), hemen hemen tüm hücreler içerisinde bulunan bir tripeptittir. Reaktif oksijen metabolitlerinin ve serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı hücreleri korur (Meister 1983). Aynı zamanda, GSH ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunu da sağlar (Lushchak 2012). Farklı doz, farklı uygulama süresi ve yöntemleriyle eksojen olarak CCl₄ verilen çeşitli çalışmalarda, karaciğer dokularında lipit peroksidasyonunun arttığı, ancak GSH seviyesinin anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır (Yang vd. 2008, Anand vd. 2011, Sun vd. 2013, Chen vd. 2014). Bu çalışmalara benzer olarak, bizim

çalışmamızda CCl₄ grubunda GSH seviyesinde kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmüştür (p<0,05).

CCl₄ ile karaciğer hasarı oluşturulmuş deneysel araştırmalarda, karaciğerde MDA artışıyla beraber SOD seviyesinin azaldığını da gösteren çalışmalar mevcuttur (Cui vd. 2013, Cao vd. 2014). Szymonik-Lesiuk vd. (2003), CCl₄ toksikasyonu oluşturulan Wistar albino erkek sıçanların karaciğer, beyin, kalp ve böbrek dokularında SOD aktivitelerini incelemişlerdir. Kalpte, beyinde ve böbrekte SOD aktivitesi önemli oranda azalırken; karaciğerde anlamlı bir değişiklik olmadığını ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar CCl₄ toksikasyonu ile oluşan oksidatif stresin, SOD gibi antioksidan enzimlerde hasara neden olabileceğini veya CCl₄'ün biyoaktivasyonu sırasında oluşan reaktif ara ürünlerin bu enzimlere bağlanarak onların inaktivasyonuna yol açabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde, CCl₄ verilen grubun karaciğer dokularının SOD aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (p>0,05).

Karaciğer ile ilgili biyokimyasal analizler, karaciğer hasarını, karaciğerin fonksiyonel durumunu ve karaciğer hastalığının etiolojisini saptamada önemlidir (Giannini vd. 2005). Lin vd. (2012), Wistar erkek sıçanlara, 12 hafta boyunca 2ml/kg CCl₄ vermişlerdir. Serum ALT, ALP ve GGT seviyelerini ölçmüşler ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu saptamışlardır. Motawi vd. (2011) ise, erkek Wistar albino sıçanlara 6 hafta boyunca 0,5mg/kg CCl₄ uyguladıklarında, ölçülen serum örneklerinde kontrol grubuna göre yüksek ALT, ALP, GGT ve TBIL seviyelerinin olduğunu belirlemişlerdir. Arai vd. (2010), 24 hafta boyunca 2g/kg CCl₄ ile siroz oluşturduklarında, serum ALT, ALP, TBIL ve CHOL seviyeleri artarken, ALB oranının aynı kaldığını gözlemişlerdir. Yeni Zelanda türü erkek tavşanlarla yapılan bir çalışmada ise, 4 hafta boyunca 0,2 ml/kg CCl₄ verilerek fibrozis oluşturulmuştur. Serum değerlerine bakıldığında, GGT oranı yüksek bulunurken; ALP ve ALB seviyeleri düşük bulunmuştur (Yin vd. 2012). Bizim çalışmamızda da, bu çalışmalara benzer olarak, CCl₄ ile hepatik fibrozis oluşturulan gruba, kontrol grubu karşılaştırıldığında, serum ALP, ALT, GGT ve CHOL oranı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artarken; ALB

seviyesi azalmıştır. Bu çalışmalardan farklı olarak, bizim çalışmamızda BA ve TBIL seviyeleri ise, kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur.

CCl₄ ile oluşturulan hepatik fibrozisin kollajen birikimi ile karakterize olduğu gösterilmiştir (Ding vd. 2005, Gui vd. 2006, Liu vd. 2006, Chen vd. 2010). Yapılan çalışmalarda 7. haftadan itibaren köprüleşme gösteren fibroze rastlanmıştır (Lee vd. 2003, Huang vd. 2014). Bu çalışmalara paralel olarak, bizim çalışmamızda 10 hafta boyunca CCl₄ verilmesi sonucu, portal alanların ve sentral venlerin çevresinde kollajen artışına rastlanmıştır. Ayrıca, bazı kesitlerde portal alanlar arasında köprüleşme gösteren fibrozis de saptanmıştır.

Yang vd. (2008), yaptığı histolojik çalışma da CCl₄ uygulanan erkek Sprague-Dawley sıçanlarda, sentral ven çevresinde hepatoselüler dejenerasyon ve nekroz, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, konjesyon ve sinüzoidal dilatasyon oluştuğunu belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda da, erkek Wistar albino sıçanlarda CCl₄ uygulamalı grupta, dejeneratif hepatositleri içeren fokal nekrotik alanlar, sinüzoidal dilatasyon ve hiperemi saptanmıştır.

Karaciğer hasarında, karaciğer glikojen içeriğiyle ilgili farklı bulgular bulunmaktadır. Matté vd. (2009), kronik hiperhomosisteinemi oluşturulan Wistar albino sıçanlardan aldıkları karaciğer doku kesitlerini PAS ile boyamışlardır. Sonuç olarak, karaciğer glikojen içeriğinin azaldığını göstermişlerdir. Savransky vd. (2007) ise, aralıklı ve kronik hipoksi oluşturdukları farelerin karaciğer dokularında glikojen birikimi olduğunu hem ışık hem de elektron mikroskobik düzeyde göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda da ışık mikroskobu bulgularında CCl₄ uygulanan gruplarda glikojen içeriklerinin azaldığı tespit edilmiştir.

Karaciğer hasarında retiküler fibril birikimlerinin olduğu da çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Ramm vd. 2000, Wiland vd. 2012, Arana vd. 2014, Enbom vd. 2014). Georges vd. (2007), Sprague-Dawley sıçanlarda CCl₄ ile oluşturdukları fibrozis sonucu, 3. 14. ve 70. gün sonrasında alınan karaciğer dokularında retiküler fibrilleri incelemişlerdir. Retiküler liflerin portal alanlarda zamanla arttığını, ancak parankimada

azaldığını saptamışlardır. Bu değişikliğin fibrozis sonucu ESM bileşenlerinin bazılarının azalması, bazılarının ise artması nedeniyle olabileceğini ifade etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da hasarlı karaciğer dokularında sentral ven, portal alan ve sinüzoidlerin etrafında retiküler fibril artışı gözlenmiştir.

Bağ dokunun bozulması ile karakterize edilen patolojik durumlarda MMP üyelerinin ekspresyonunda artış gözlenir (Matrisian 1994). MMP-9 (gelatinaz B), Kupffer hücreleri (Knittel vd. 1999), hepatositler (Giannelli vd. 2006) ve HSH'ler tarafından üretilmektedir (Hemmann vd. 2007). MMP-9, proteolitik olarak latent TGF- β 'nın aktifleşmesini sağlar (Yu ve Stamenkovic 2000). TGF- β , HSH'lerin miyofibroblastlara dönüşümüne yol açarak, kollajen sentezini artırır (Gressner vd. 2002).

Akut veya kronik karaciğer hasarı oluşturulmuş hayvan modellerinde MMP-9 ekspresyonu ile ilgili farklı sonuçlar bulunmuştur. Deneysel karaciğer fibrozisinde, 8 hafta CCl₄ uygulaması boyunca MMP-9 aktivasyonunun değişmediği gözlenmiştir (Zhou vd. 2004). Knittel vd. (2000) normal ve hasarlı karaciğerde immünohistokimyasal olarak yaptıkları çalışmada hücrelerin MMP-9 reaksiyonunu incelemişlerdir. Buna göre normal karaciğerde çok az miktarda MMP-9 (+) hücre bulunurken, hem akut hem de kronik olarak hasarlı karaciğerde MMP-9 (+) reaksiyon gösteren hücrelerin daha fazla olduğunu saptamışlardır. Zhang vd. (2010b), çalışmalarında deneysel olarak hepatik fibrozis oluşturmuşlardır. İmmünohistokimyasal olarak MMP-9 aktivitesine baktıklarında, kontrol grubu sıçanların karaciğer dokularında MMP-9 reaksiyonuna rastlanmadığı görmüşlerdir. 8 hafta CCl₄ uygulanan grupta yoğun MMP-9 aktivasyonu tespit etmişlerdir. MMP-9'un hepatositlerin sitoplazmalarında, vasküler endotel hücrelerde ve sinüzoidlerin endotel hücrelerinde lokalize olduğunu ortaya koymuşlardır. Bizim çalışmamızda da kontrol gruplarında MMP-9 aktivitesine rastlanmazken, CCl₄'lü grupta özellikle sentral ven duvarında ve etrafında, ayrıca sinüzoidler ve portal alanların çevresinde kuvvetli MMP-9 aktivitesine rastlanmıştır. İlave olarak, MMP-9'un hepatositlerin sitoplazmasında lokalize olduğu gözlenmiştir.

Yapılan çalışmalarda dezminin HSH'lerde ve miyofibroblastlarda eksprese olduğu gösterilmiştir (Neubauer vd. 1996, Knezevic vd. 2009, Fujii vd. 2010). Burt vd. (1986) yaptıkları çalışmada CCl₄ ile akut hasar oluşturulan sıçan karaciğerinde dezmin içeren stellat hücreleri immunohistokimyasal olarak incelemişlerdir. CCl₄ verilen gruplarda özellikle nekrotik alanlarda dezmin-pozitif hücrelerde artış olduğunu saptamışlardır. Fujii vd. (2010), CCl₄ ile uyarılmış fare karaciğer fibrozisinde, histopatolojik olarak HSH'lerdeki dezmin ekspresyonuna bakmışlardır. Dezmin ekspresyonunun arttığını gözlemişlerdir. Bir diğer çalışmada BALB/c farelerine 6 hafta boyunca CCl₄ uygulaması yapılmış ve karaciğer doku kesitleri immunohistokimyasal olarak dezminle boyanmıştır. Sonuç olarak, dezmin (+) hücrelerin fibröz septaların kenarlarında yer aldığı gösterilmiştir (Fan vd. 2013). Knezevic vd. (2009), fibrozisli köpek karaciğerinde α -sma, dezmin ve vimentin ekspresyonuyla ilgili yaptıkları çalışmalarında, kontrol grubu karaciğer doku örneklerinin dezmin antikoruna karşı farklı reaksiyon gösterdiğini ortaya koymuşlardır. HSH'lerin zayıf pozitif reaksiyon gösterdiğini saptamışlardır. Portal alanda arterlerin tunica media bölgesindeki düz kas hücreleri ve perivenüler düz kas hücrelerinin orta derece ile şiddetli derece arasında pozitif reaksiyon verdiğini göstermişlerdir. Portal triad stromasında bulunan iğ şeklindeki hücrelerin az bir kısmının dezmin antikoruna pozitif cevap verdiğini bulmuşlardır. Fibrozisli karaciğer dokularında, dezmine immünoreaktivitenin bazı perisinüzoidal HSH'lerde görüldüğünü tespit etmişlerdir. Buna ilave olarak, sinüzoidlerdeki yuvarlak hücrelerin dezmine immünopozitif reaksiyon gösterdiğini gözlemişlerdir. Şiddetli fibrozisi olan karaciğerde ise, vasküler düz kas hücreleri, bağ dokudaki hücreler ve karaciğer kapsülünün dezmine kuvvetli pozitif reaksiyon gösterdiğini ifade etmişlerdir. En yoğun pozitif reaksiyonun ise şiddetli fibrozisli ve sirozlu köpeklerin karaciğerindeki portal triad bölgesindeki iğ hücreleri ile fibrotik bantlarda olduğunu gözlemişlerdir. Bu çalışmalara benzer şekilde bizim çalışmamızda da, kontrol gruplarında zayıf reaksiyon gösteren dezmin pozitif hücreler saptanmıştır. CCl₄ grubu sıçanların karaciğer doku kesitlerinde ise, sentral ven ve portal alanların çevresinde, ayrıca sinüzoidlerin duvarlarında kuvvetli reaksiyon gösteren dezmin pozitif hücreler gözlenmiştir.

Çalışmamızda, melatonin ve D Vitamininin hem koruyucu, hem de tedavi edici rolünün anlaşılması amacıyla 4 ayrı grup oluşturulmuştur. CCl₄+MEL (10 hafta) ve CCl₄+ D Vit (10 hafta) gruplarında CCl₄ enjeksiyonunun başlangıcından itibaren melatonin ve D Vitamini verilmiştir. CCl₄+MEL (12 hafta) ve CCl₄+ D Vit (12 hafta) gruplarında ise, yine 10 hafta boyunca melatonin ve D Vitamini CCl₄ ile beraber verilmiştir. Ancak farklı olarak 10. haftanın sonunda CCl₄ uygulaması bitirilmiş, 2 hafta daha melatonin ve D Vitamini enjeksiyonuna devam edilmiştir.

Melatonin *in vivo* ve *in vitro* araştırmalarda kullanılan güçlü bir antioksidandır (Wang vd. 2005, Hong vd. 2009, Tahan vd. 2010, Sezgin vd. 2012, Gómez-Florit vd. 2013, Ozerkan vd. 2014). Hepatik hasar ile oluşan lipit peroksidasyonuna karşı karaciğeri antioksidan özelliği sayesinde koruduğu gösterilmiştir (Sewerynek vd. 1995a,b, Wang vd. 2005, Hong vd. 2009). Ayrıca CCl₄ tarafından oluşturulan hasara karşı da karaciğeri, böbreği ve akciğeri koruduğu belirtilmiştir (Ohta vd. 2000, Kus vd. 2005, Ogeturk vd. 2005, 2008, Taslidere vd. 2014). Melatoninin, glutatyon peroksidaz (GPx), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon redüktaz gibi antioksidanların seviyelerini arttırarak, dolaylı olarak da antioksidan etkisini gösterdiği saptanmıştır (Liu ve Ng 2000, Nishida 2005).

Wang vd. (2005), Sprague-Dawley sıçanlara 6 hafta boyunca 1 ml/kg CCl₄ enjeksiyonunun başlangıcından itibaren 5, 10 ve 20 mg/kg dozlarında melatonin vermişlerdir. Alınan karaciğer doku örneklerinde melatonin uygulanan CCl₄ gruplarında sadece CCl₄ uygulanan gruba göre MDA seviyesi azalırken, SOD seviyesinin yükseldiğini gözlemişlerdir. Histolojik olarak da, CCl₄ grubunda steatozis, inflamasyon, balonlaşmış hepatositler ve nekroz tespit etmişlerdir. Sonuç olarak, melatonin uygulamasının karaciğer fibrozisi ve inflamasyonu önemli ölçüde azalttığını bildirmişlerdir. Hong vd. (2009) yaptıkları çalışmalarında, Sprague-Dawley sıçanlar kullanmışlardır. 12 hafta boyunca 3ml/kg CCl₄ enjeksiyonuyla beraber, farklı gruplara sırasıyla 2,5, 5 ve 10 mg/kg melatonin vermişlerdir. Deney sonunda karaciğer dokularında melatonin verilen gruplarda MDA seviyesinin düştüğü ve GSH seviyesinin arttığını belirlemişlerdir. CCl₄ grubunda ALT ve AST seviyelerinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu bulunurken, melatonin verilen CCl₄ grubunda bu oranın azaldığını

gözlemişlerdir. Ayrıca CCl₄ grubunda nekroz, inflamasyon, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve kollajen birikimi gözlemlendiğini, özellikle 10mg/kg melatonin dozunun bu patolojik bulguları azalttığını belirtmişlerdir.

Tahan vd. (2010), Wistar albino sıçanlarda safra yolu ligasyonu (BDL) ile indüklenmiş karaciğer fibrozis modeli oluşturmuşlardır. Fibrozisli grupta MDA seviyesinin arttığını, GSH seviyesinin azaldığını gözlemişlerdir. Melatonin verilmesi ile MDA seviyesinin azaldığını, GSH seviyesinin ise arttığını ortaya koymuşlardır. Ayrıca, BDL'li gruplarda ALT, ALP, GGT ve bilirubin seviyelerinin melatonin verilen gruplara göre yüksek bulunduğunu saptamışlardır.

Kus vd. (2005), CCl₄ hasarı sonucunda serum ALT, ALP ve TBIL seviyelerinin yükseldiğini tespit etmişlerdir. Melatonin uygulanan grupta ise bu seviyelerin azaldığını belirlemişlerdir. Ayrıca CCl₄ grubu karaciğer dokusunda fibrozis, nekroz, mononükleer hücre infiltrasyonu, hemoraji, yağlı dejenerasyon ve hepatositlerde hidropik dejenerasyona rastlamışlardır. Melatonin verilmesiyle, hepatositlerdeki orta hidropik dejenerasyon hariç, normal lobüler görünüme sahip karaciğer yapısını gözleyebilmişlerdir.

Çalışmamızda araştırmacıların bulgularına uygun şekilde, CCl₄ grubunda MDA seviyesindeki artış, melatonin uygulaması ile azalmıştır. CCl₄ uygulaması ile azalan GSH değerlerinin aksine, özellikle 12 hafta melatonin verilen CCl₄ grubunda, bu değerlerin kontrol gruplarına yakın olduğu gösterilmiştir. Ayrıca 12 hafta melatonin uygulaması CCl₄ grubunda artmış olan serum ALP, ALT, GGT ve CHOL seviyelerini 10 hafta melatonin uygulamasına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaltırken düşük ALB seviyesini ise yükselmiştir. BA seviyesinde ise 10 hafta ve 12 hafta melatonin uygulandığında kontrol gruplarına yakın değerler saptanmıştır. Karaciğer dokusunda antioksidan sistemin melatonin tarafından korunduğu, yaptığımız çalışmadaki histolojik sonuçlarla da desteklenmektedir. 10 hafta melatonin uygulaması, CCl₄ hasarı sonucu oluşan sinüzoidal dilatasyonu, balonlaşmış hepatosit hücre kitlelerini, fibrozisi, retiküler lif kalınlaşması ve artışını azaltırken; 12 hafta melatonin uygulaması bu bulguları minimum düzeye indirmiş ve kontrole yakın bir doku

görünümü izlenmiştir. Ayrıca, Hong vd. (2009) ve Tahan vd. (2010) yaptıkları çalışmalara benzer şekilde bu çalışmada da melatoninin anti-fibrotik etkisi gözlemlenmiştir.

Melatoninin aynı zamanda MMP-9 aktivasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (Ganguly vd. 2005, Zhou vd. 2007, Mishra vd. 2011, Rudra vd. 2013). Bizim çalışmamızda da melatonin uygulaması ile MMP-9 aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda CCl₄ uygulaması üzerinde melatonin etkisine bakılmış ancak, MMP-9 aktivitesi incelenmemiştir. Bizim çalışmamızda farklı olarak melatonin uygulanmış CCl₄ grubunda MMP-9 aktivitesine de bakılmıştır.

Karaciğer D Vitamini metabolizmasında önemli bir role sahiptir. Ayrıca sirozlu hastalarda D Vitamini eksikliğinin yaygın olduğu saptanmıştır (Arteh vd. 2010). Yapılan çalışmalarda D Vitamini eksikliğinin fibrozisin ilerlemesine sebep olduğu gösterilmiştir (Arteh vd. 2010, Petta vd. 2010, Lange vd. 2011, Terrier vd. 2011, Baur vd. 2012). Yapılan literatür araştırmalarına göre CCl₄ ile uyarılmış karaciğer hasarına karşı D Vitamininin etkisi ile ilgili yeterli kaynağa rastlanmamıştır. Sadece Mangood vd. (2012) Vitamin D3 Analogu olan 1 α Hidroksivitamin D3'ü çalışmışlardır. Biyokimyasal olarak, CCl₄ uygulamasının serum ALT, ALP ve AST değerlerini arttırdığını saptamışlardır. D Vitamini analogu uygulanmasının ise bu enzim seviyelerini CCl₄ grubundan daha fazla arttırdığını ifade etmişlerdir. ALB ve TBIL seviyelerinde ise kontrol grubuna göre anlamlı bir değişikliğin olmadığını belirtmişlerdir. Histokimyasal olarak CCl₄ uygulanmış grupta, şişmiş ve vakuollerle dolu hepatositlerin ve lökositik hücre infiltrasyonunun bulunduğu fokal hepatik nekrozun olduğunu saptamışlardır. D Vitamini analogu uygulanmış CCl₄ grubunda da aynı şekilde lökositik hücre infiltrasyonunu ve hepatositlerde vakuolizasyona rastlamışlardır. Bizim çalışmamızda bu araştırıcı grubundan farklı olarak D Vitamininin aktif formu olan 1,25(OH)₂D₃ kullanılmıştır. CCl₄ grubunda yüksek bulunan serum ALP, ALT, GGT ve CHOL seviyeleri 10 ve 12 hafta D Vitamini verilen gruplarda doğru orantılı bir şekilde azalırken; düşük BA ve ALB seviyeleri yükselmiştir. Ayrıca, sinüzoidal dilatasyon, hiperemi, hepatosit dejenerasyonu, retiküler lif kalınlaşması gibi

patolojik bulgulara karşı da, özellikle 12 hafta D Vitamini uygulaması etkili olmuştur ve normale yakın bir doku görünümü izlenmiştir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, D Vitamininin karaciğer üzerinde anti-fibrotik etkilerinin olabileceği moleküler düzeyde gösterilmiştir. Abramovitch vd. (2011), sıçanlarda TAA ile karaciğer fibrozisi oluşturmuşlardır. 1,25(OH)₂D₃'nin fibrozisi önlediğini *in vivo* ve *in vitro* düzeyde göstermişlerdir. Ding vd. (2013), kalsemik D Vitamini analogu olan Kalsipotriol'ün farelerde CCl₄ uygulaması ile oluşturulan karaciğer fibrozisini azalttığını hem moleküler hem de histolojik incelemelerle ortaya koymuşlardır. Bu çalışmalara benzer şekilde bizim çalışmamızda da CCl₄ ile fibrozis oluşturulmuş karaciğer üzerinde 1,25(OH)₂D₃'ün anti-fibrotik etkisi gösterilmiştir. D Vitamini, CCl₄ hasarı sonucu portal alan ve sentral ven çevresindeki kollajen artışı, ayrıca portal venler arasında oluşan köprüleşme fibrozisini de azaltmıştır.

D Vitamininin, MMP ekspresyonunu düzenlediği de gösterilmiştir (Dean vd. 1996). Timms vd. (2002), D Vitamini eksikliğinin dolaşımda bulunan MMP-9'un anormal artışıyla ilişkili olabileceğini ifade etmişlerdir. Anand ve Selvaraj (2009) ise, pulmoner tüberkülozlu hastalara 1,25(OH)₂D₃ verdiklerinde, MMP-7 ve MMP-9 üretiminin baskılandığını, TIMP-1 üretiminin ise arttığını göstermişlerdir. Yapılan bu çalışmalarda D Vitamininin MMP-9 aktivitesi üzerine etkisi moleküler düzeyde incelenmiştir. Bizim çalışmamızda bu çalışmalardan farklı olarak MMP-9 aktivitesine immunohistokimyasal olarak bakılmıştır. D Vitamini uygulaması yapılan CCl₄ gruplarında MMP-9 immünreaktivitesinin azaldığı gözlenmiştir.

Bunlara ilave olarak, CCl₄ le indüklenmiş karaciğer hasarında dezmin ekspresyonu gösterilmiştir (Burt vd. 1986, Fujii vd. 2010, Fan vd. 2013). Ancak hem melatonin hem D Vitamini uygulanmış gruplarda bakılmamıştır. Bizim çalışmamızda melatonin ve D Vitamini uygulanmış gruplarda dezmin immünreaktivitesi de incelenmiştir.

D Vitamininin antioksidan özelliği ile ilgili yapılan çalışmalar arasında farklı sonuçlar bulunmaktadır (Lee ve Youn 1998, Banakar vd. 2004, Hamden vd. 2009, Ekici vd. 2009, Sezgin vd. 2013). Sıçanlarda D Vitamininin oksidatif stresi azaltabileceği ve

SOD aktivitesini arttırabileceği gösterilmiştir (George vd. 2012). Hamden vd. (2009), Wistar sıçanlarda alloksan ile diyabet oluşturarak, 1,25(OH)₂D₃'ün karaciğer ve böbrek üzerindeki etkilerini incelemiştir. Karaciğer ve böbrek dokusunun her ikisinde de diyabet sonucu artan MDA, 1,25(OH)₂D₃ uygulamasıyla azalırken, düşen SOD aktivitesi ise artmıştır. Ayrıca diyabet ile artan serum ALT, AST ve TBIL seviyelerinin de, D Vitamini uygulaması ile azaldığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda CCl₄ grubunda artan MDA düzeyi, 10 ve 12 hafta D Vitamini verilmesi sonucu azalmıştır. Karaciğer hasarı ile azalan GSH aktivitesi ise, özellikle 12 hafta D Vitamini verilen CCl₄ grubunda kontrol gruplarına yakın derecede artış göstermiştir. SOD aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe rastlanmamıştır.

Çalışmamızda melatonin ve 1,25(OH)₂D₃'ün hücre koruyucu etkilerini çalışmak amacıyla HepG2 ve Hep3B hücre hatları kullanılmıştır. D Vitamini çalışmalarında HepG2 ve Hep3B hücre hatları, uygun olan *in vitro* modellerdir (Tam vd. 1988). Hepatik hücre hatlarının primer hepatositlerle karşılaştırıldığında birçok avantajı bulunmaktadır. Sürekli büyüme özellikleri mevcuttur. Sınırsız ömürleri vardır. Oldukça kararlı bir fenotipe sahiptirler. Hücre hatları kolay elde edilebilir ve kültür koşulları daha basittir. Buna ilaveten, bazı hepatomalar kısmen farklılaşmış yetişkin fenotipe sahiptirler. Bütün bu özellikler hepatic hücre hatlarını potansiyel olarak kullanıma uygun hale getirmektedir. İnsan hepatoma hücre hatları hepatoselüler fonksiyonları ve toksisite çalışmalarını araştırmak için *in vitro* model olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Donato vd. 2008).

Çalışmamızda CCl₄'ün en yüksek sitotoksik etkisini bulabilmek için hücrelere farklı dozlarda CCl₄ ilave edilmiştir. Sonuç olarak, %0,4 oranında CCl₄ verilen hücrelerin canlılıkları oldukça fazla etkilenmiştir. Deney planı bu doza göre yapılmıştır. Bizim çalışmamıza benzer şekilde yapılan çalışmalarda da, CCl₄'e maruz bırakmanın hücre canlılığını azalttığı gösterilmiştir (Harries vd. 2001, Krithika vd. 2012).

Melatoninin zamana ve doza bağlı olarak hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Cos vd. 2001, Martín vd. 2006, Carbajo-Pescador vd. 2009, Fan vd. 2010, Proietti vd. 2011). Fan vd. (2010), 10⁻⁸-10⁻⁵ mol/L melatonin verdikleri HepG2

hücrelerinin 48 saat sonrasında, doza bağımlı olarak proliferasyonlarını azalttıklarını göstermişlerdir. Carbajo-Pescador vd. (2009) ise, HepG2 hücrelerinin yaklaşık 5 gün boyunca 2500 µM melatonin ile inkübasyonu sonrasında, hücre canlılığının %50 oranında azaldığını belirtmişlerdir. Cid vd. (2012), HepG2 hücrelerine 5 gün boyunca 0,01 nM melatonin uygulandığında, hücre sayısının istatistiksel olarak önemli oranda arttığını, daha yüksek melatonin dozlarında ise (0,4 nM, 10 nM and 1 µM) hücre sayısının önemli oranda azaldığını saptamışlardır. Bizim çalışmamızda da sadece melatonin uygulanan gruplarda ve melatonin uygulanmış CCl₄ gruplarında HepG2 ve Hep3B hücre canlılığının korunduğu gözlenmiştir.

D Vitamini normal ve malignan hücrelerin proliferasyonunda, farklılaşmasında ve apoptozunda önemli rol oynamaktadır (Abramovitch vd. 2011). Lütow-Holm vd. (1993), fare derisine D Vitamini uyguladıklarında, hücre proliferasyonunun tetiklendiğini göstermişlerdir. Bollag vd. (1995), keratinosit hücre kültürüne fizyolojik (pikomolar) konsantrasyonlarda 1,25(OH)₂D₃ ilavesinin hücrelerin proliferasyonuna yol açtığını belirtmişlerdir. Uberti vd. (2014) umbilikal (göbek) ven endotel hücrelerine (HUVEC) H₂O₂ uygulayarak oksidatif stres oluşturduklarında hücre canlılığının azaldığını belirlemişlerdir. Hücreler 1 nM D Vitamini ile inkübe edildiğinde ise, hücre canlılığının önemli derecede arttığını saptamışlardır. D Vitamininin fizyolojik koşullarda hücre canlılığını arttırabileceğini ifade etmişlerdir. Bizim çalışmamızda sadece D Vitamini uygulanan grupta özellikle 24. saatte kontrol grubuna göre hücre proliferasyonunun arttığı dikkati çekmiştir. Ayrıca, hem D Vitamini hem de CCl₄ uygulanan grupta hücre canlılığının korunduğu saptanmıştır.

Sonuç olarak; bizim çalışmamızda *in vitro* olarak, CCl₄ sitotoksik etki yaratmıştır. Melatonin ve D Vitamininin, HepG2 ve Hep3B hücre hatlarında proliferasyonu normal düzeyde tutarak, canlılık oranını nispeten koruduğu gözlenmiştir. D Vitamininin melatonine göre daha etkili olduğu belirlenmiştir. Ancak, yapılan çalışmalarda kanser hücrelerinde uzun süreli inkübasyonda, melatonin ve D Vitamininin anti-proliferatif etki gösterdiği saptanmıştır (Eisman vd. 1989, Marelli vd. 2000, Cos vd. 2001, Akhter vd. 2001, Cabrera vd. 2010). Bu yüzden *in vitro* düzeyde daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

In vivo açıdan ise, CCl₄ ile karaciğerde kronik hasar oluşturulmuştur. Biyokimyasal, histokimyasal ve immunohistokimyasal olarak melatonin ve D Vitamininin birbirine paralel şekilde dokuyu kısmen koruduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda melatonin ve D Vitamininin antioksidan aktivite göstererek lipit peroksidasyonunu azalttığı ve anti-fibrotik etki gösterdiği de belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, melatonin ve D Vitamininin deneysel olarak oluşturulmuş karaciğer hasarını geriye dönüştürebilmesinin daha ileri düzeyde yapılacak klinik çalışmalar için basamak oluşturabilir.

KAYNAKLAR

- Abramovitch, S., Dahan-Bachar, L., Sharvit, E., Weisman, Y., Tov, A. B., Brazowski, E. and Reif, S. 2011. Vitamin D inhibits proliferation and profibrotic marker expression in hepatic stellate cells and decreases thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. *Gut*, 60(12); 1728-1737.
- Adams, J. S. and Hewison, M. 2010. Update in vitamin D. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 95(2); 471-478.
- Akhter, J., Lu, Y., Finlay, I., Pourgholami, M. H. and Morris, D. L. 2001. $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ And Its Analogues, EB1089 and CB1093, Profoundly Inhibit The In Vitro Proliferation of The Human Hepatoblastoma Cell Line HepG2. *ANZ Journal of Surgery*, 71(7), 414-417.
- Akyıldızlar E. 2014. Anneler ve Kızlarının Güneşten Yararlanma Durumları ve Beslenme Alışkanlıklarının D Vitamini ve Diğer Biyokimyasal Parametreler Üzerine Etkisi. İstanbul Üniversitesi, Doktora Tezi. 104.
- Albertini, M. C., Radogna, F., Accorsi, A., Ugucioni, F., Paternoster, L., Cerella, C., De Nicola, M., D'Alessio, M., Bergamaschi, A., Magrini, A. and Ghibelli, L. 2006. Intracellular Pro-oxidant Activity of Melatonin Deprives U937 Cells of Reduced Glutathione without Affecting Glutathione Peroxidase Activity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1091(1); 10-16.
- Anand, K. V., Anandhi, R., Pakkiyaraj, M. and Geraldine, P. 2011. Protective effect of chrysin on carbon tetrachloride (CCl_4)-induced tissue injury in male Wistar rats. *Toxicology and Industrial Health*, 27(10); 923-933.
- Anand, S. P. and Selvaraj, P. 2009. Effect of $1, 25$ dihydroxyvitamin D(3) on matrix metalloproteinases MMP-7, MMP-9 and the inhibitor TIMP-1 in pulmonary tuberculosis. *Clinical Immunology*, 133(1); 126-131.
- Aprioku, J. S. 2013. Pharmacology of free radicals and the impact of reactive oxygen species on the testis. *Journal of Reproduction and Infertility*, 14(4); 158-172.
- Arai, H., Awane, N., Mizuno, A., Fukaya, M., Sakuma, M., Harada, N., Yamamoto, H., Okumura, H., Taketani, Y., Doi, T. and Takeda, E. 2010. Increasing early insulin secretion compensate adequately for hepatic insulin resistance in CCl_4 -induced cirrhosis rats. *The Journal of Medical Investigation*, 57(1-2); 54-61.
- Arana, S., Alves, V. A. F., Sabino, M., Tabata, Y. A., Nonogaki, S., Zaidan-Dagli, M. L. and Hernandez-Blazquez, F. J. 2014. Immunohistochemical Evidence for Myofibroblast-like Cells Associated with Liver Injury Induced by Aflatoxin B1 in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Comparative Pathology*, 150(2); 258-265.

- Arteh, J., Narra, S. and Nair, S. 2010. Prevalence of vitamin D deficiency in chronic liver disease. *Digestive Diseases And Sciences*, 55(9); 2624-2628.
- Arthur, M. J. 2000. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 279(2); 245-249.
- Anonymous. 2014a. http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HB-8065.aspx?geo_country=tr#generalinformation, Erişim tarihi: 06.07.2014.
- Anonymous. 2014b. Web sitesi: <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HB-8064.aspx>. Erişim tarihi: 06.07.2014.
- Aykaç, G., Uysal, M., Süha Yalçın, A., Koçak-Toker, N., Sivas, A. and Öz, H. 1985. The effect of chronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats. *Toxicology*, 36(1); 71-76.
- Banakar, M. C., Paramasivan, S. K., Chattopadhyay, M. B., Datta, S., Chakraborty, P., Chatterjee, M., Kannan, K. and Thygarajan, E. 2004. 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 prevents DNA damage and restores antioxidant enzymes in rat hepatocarcinogenesis induced by diethylnitrosamine and promoted by phenobarbital. *World Journal of Gastroenterology*, 10(9); 1268-1275.
- Basu, S. 2003. Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients. *Toxicology*, 189; 113–127.
- Bataller, R., and Brenner, D. A. 2005. Liver fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(2); 209-218.
- LBaur, K., Mertens, J. C., Schmitt, J., Iwata, R., Stieger, B., Eloranta, J. J., Frei, P., Stickel, F., Dill, M. T., Seifert, B., Ferrari, H. A., von Eckardstein, A., Bochud, P. Y., Müllhaupt, B. and Geier, A. 2012. Combined effect of 25-OH Vitamin D plasma levels and genetic Vitamin D Receptor (NR 1H1) variants on fibrosis progression rate in HCV patients. *Liver International*, 32(4); 635-643.
- Bettahi, I., Pozo, D., Osuna, C., Reiter, R. J., Acuña-Castroviejo, D. And Guerrero, J. M. 1996. Melatonin reduces nitric oxide synthase activity in rat hypothalamus. *Journal of Pineal Research*, 20(4); 205-210.
- Bollag, W. B., Ducote, J. and Harmon, C. S. 1995. Biphasic effect of 1, 25 dihydroxyvitamin D3 on primary mouse epidermal keratinocyte proliferation. *Journal of Cellular Physiology*, 163(2); 248-256.
- Botsoglou, N., Taitzoglou, I., Zervos, I., Botsoglou, E., Tsantarliotou, M. and Chatzopoulou, P. S. 2010. Potential of long-term dietary administration of rosemary in improving the antioxidant status of rat tissues following carbon tetrachloride intoxication. *Food and Chemical Toxicology*, 48(3); 944-950.

- Bucala, R., Spiegel, L., Chesney, J., Hogan, M. and Cerami, A. 1994. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Molecular Medicine*, 1(1); 71.
- Burt, A. D., Robertson, J. L., Heir, J. and Macsween, R. N. 1986. Desmin containing stellate cells in rat liver; distribution in normal animals and response to experimental acute liver injury. *The Journal of Pathology*, 150(1); 29-35.
- Büyükavcı, M., Özdemir, Ö., Buck, S., Stout, M., Ravindranath, Y. and Savaşan, S. 2006. Melatonin cytotoxicity in human leukemia cells: relation with its pro-oxidant effect. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 20(1); 73-79.
- Cabrera, J., Negrín, G., Estévez, F., Loro, J., Reiter, R. J. and Quintana, J. 2010. Melatonin decreases cell proliferation and induces melanogenesis in human melanoma SKMEL1 cells. *Journal of Pineal Research*, 49(1); 45-54.
- Cao, G., Li, Q., Chen, X., Cai, H. and Tu, S. 2014. Hepatoprotective Effect of Superfine Particles of Herbal Medicine against CCl₄-induced Acute Liver Damage in Rats. *BioMed Research International*, 2014:934732. doi: 10.1155/2014/934732.
- Carbajo-Pescador, S., Martín-Renedo, J., García-Palomo, A., Tuñón, M. J., Mauriz, J. L. and González-Gallego, J. 2009. Changes in the expression of melatonin receptors induced by melatonin treatment in hepatocarcinoma HepG2 cells. *Journal of Pineal Research*, 47(4); 330-338.
- Carillon, J., Rouanet, J. M., Cristol, J. P. and Brion, R. 2013. Superoxide dismutase administration, a potential therapy against oxidative stress related diseases: several routes of supplementation and proposal of an original mechanism of action. *Pharmaceutical Research*, 30(11); 2718-2728.
- Casini, A. F., Ferrali, M., Pompella, A., Maellaro, E. and Comporti, M. 1986. Lipid peroxidation and cellular damage in extrahepatic tissues of bromobenzene-intoxicated mice. *The American Journal of Pathology*, 123(3); 520-531.
- Cassiman, D., Libbrecht, L., Desmet, V., Deneef, C. and Roskams, T. 2002. Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers. *Journal of Hepatology*, 36(2); 200-209.
- Castilla, C.I., Garcia, M., Muguerza, B., Quiroga, J., Perez, R., Satidrian, S. and Prieto, J. 1997. Hepatoprotective effects of insulin like growth factor I in rats with carbon tetrachloride induced cirrhosis. *Gastroenterology*, 113 (5); 1682-1691.
- Catalá, A. 2009. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chemistry and Physics of Lipids*, 157(1); 1-11.
- Chen, M., Huang, W., Wang, C., Nie, H., Li, G., Sun, T., Yang, F., Zhang, Y., Shu, K., Wang, C. and Gong, Q. 2014. High-mobility group box 1 exacerbates CCl₄-induced acute liver injury in mice. *Clinical Immunology*, 153; 56-63.

- Chen, P., Han, Z., Yang, P., Zhu, L., Hua, Z. and Zhang, J. 2010. Loss of clock gene *mPer2* promotes liver fibrosis induced by carbon tetrachloride. *Hepatology Research*, 40(11); 1117-1127.
- Cid, M. A., Úbeda, A., Hernández-Bule, M. L., Martínez, M. A. and Trillo, M. A. 2012. Antagonistic effects of a 50 Hz magnetic field and melatonin in the proliferation and differentiation of hepatocarcinoma cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 30(6); 1502-1516.
- Claustrat, B., Brun, J. and Chazot, G. 2005. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Medicine Reviews*, 9(1); 11-24.
- Cos, S., Garcia-Bolado, A. and Sanchez-Barcelo, E. J. 2001. Direct antiproliferative effects of melatonin on two metastatic cell sublines of mouse melanoma (B16BL6 and PG19). *Melanoma Research*, 11(2); 197-201.
- Costa, E. J., Lopes, R. H. and Lamy-Freund, M. T. 1995. Permeability of pure lipid bilayers to melatonin. *Journal of Pineal Research*, 19(3); 123-126.
- Cui, Y., Han, Y., Yang, X., Sun, Y. and 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. .
- De Zwart, L. L., Meerman, J. H., Commandeur, J. N. and Vermeulen, N. P. 1999. Biomarkers of free radical damage: applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(1); 202-226.
- Dean, D. D., Schwartz, Z., Schmitz, J., Muniz, O. E., Lu, Y., Calderon, F., Howell, D. S. and Boyan, B. D. 1996. Vitamin D Regulation of Metalloproteinase Activity in Matrix Vesicles. *Connective Tissue Research*, 35(1-4); 331-336.
- Debnath, S., Ghosh, S. and 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.
- Dehn, P. F., White, C. M., Connors, D. E., Shipkey, G. and Cumbo, T. A. 2004. Characterization of the human hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line as an *in vitro* model for cadmium toxicity studies. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Animal*, 40(5-6); 172-182.
- Desmouliere, A., Chaponnier, C. and Gabbiani, G. 2005. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair and Regeneration*, 13(1); 7-12.
- Dijk, D. J. and Cajochen, C. 1997. Melatonin and the circadian regulation of sleep initiation, consolidation, structure, and the sleep EEG. *Journal of Biological Rhythms*, 12(6); 627-635.
- Ding, J., Yu, J., Wang, C., Hu, W., Li, D., Luo, Y., Luo, H. and Yu, H. 2005. *Ginkgo biloba* extract alleviates liver fibrosis induced by CCl₄ in rats. *Liver International*, 25(6); 1224-1232.

- Ding, N., Yu, R. T., Subramaniam, N., Sherman, M. H., Wilson, C., Rao, R., Leblanc, M., Coulter, S, He, M., Scott, C., Lau, S. L., Atkins, A. R., Barish, G. D., Gunton, J. E., Liddle, C., Downes, M. and Evans, R. M. 2013. A Vitamin D receptor/SMAD genomic circuit gates hepatic fibrotic response. *Cell*, 153(3); 601-613.
- Donato, M. T., Lahoz, A., Castell, J.V. and Gómez-Lechón, M. J. 2008. Cell lines: a tool for in vitro drug metabolism studies. *Current Drug Metabolism*. 9(1);1-11.
- Dooley, S., Hamzavi, J., Ciucan, L., Godoy, P., Ilkavets, I., Ehnert, S., Ueberham, E., Gebhardt, R., Kanzler, S., Geier, A., Breikopf, K., Weng, H. and Mertens, P. R. 2008. Hepatocyte-specific Smad7 expression attenuates TGF-beta-mediated fibrogenesis and protects against liver damage. *Gastroenterology*, 135; 642-659.
- Dziegiel, P., Podhorska-Okolow, M. and Zabel, M. 2008. Melatonin: adjuvant therapy of malignant tumors. *Medical Science Monitor*, 14(5); 64-70.
- Egeblad, M. and Werb, Z. 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews Cancer*, 2(3); 161-174.
- Eisman, J. A., Koga, M., Sutherland, R. L., Barkla, D. H. and Tutton, P. J. M. 1989. 1, 25-dihydroxyvitamin D3 and the regulation of human cancer cell replication. *Experimental Biology and Medicine*, 191(3); 221-226.
- Ekici, F., Ozyurt, B. and Erdogan, H. 2009. The combination of vitamin D3 and dehydroascorbic acid administration attenuates brain damage in focal ischemia. *Neurological Sciences*, 30(3); 207-212.
- Enbom, E. T., Le, M. D., Oesterich, L., Rutgers, J. and French, S. W. 2014. Mechanism of hepatotoxicity due to black cohosh (*Cimicifuga racemosa*): Histological, immunohistochemical and electron microscopy analysis of two liver biopsies with clinical correlation. *Experimental and Molecular Pathology*, 96(3); 279-283.
- Esteban, M., Cuesta, A., Chaves-Pozo, E. and Meseguer, J. 2013. Influence of Melatonin on the Immune System of Fish: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(4); 7979-7999.
- Eyden, B. 2008. The myofibroblast: phenotypic characterization as a prerequisite to understanding its functions in translational medicine. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12(1); 22-37.
- Fan, L. L., Sun, G. P., Wei, W., Wang, Z. G., Ge, L., Fu, W. Z. and Wang, H. 2010. Melatonin and doxorubicin synergistically induce cell apoptosis in human hepatoma cell lines. *World Journal of Gastroenterology*, 16(12); 1473-1481.
- Fan, X., Zhang, Q., Li, S., Lv, Y., Su, H., Jiang, H. and Hao, Z. 2013. Attenuation of CCl₄-Induced Hepatic Fibrosis in Mice by Vaccinating against TGF-β1. *PLoS one*, 8(12); e82190.

- Faroon, O., Taylor, J., Roney, N., Fransen, M. E., Bogaczyk, S. and Diamon, G. 2005. Toxicological profile for carbon tetrachloride. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service; 309. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp30.pdf>.
- Francis, P. L., Leone, A. M., Young, I. M., Stovell, P. and Silman, R. E. 1987. Gas chromatographic-mass spectrometric assay for 6-hydroxymelatonin sulfate and 6-hydroxymelatonin glucuronide in urine. *Clinical Chemistry*, 33(4); 453-457.
- Friedman, S. L. 2000. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *Journal of Biological Chemistry*, 275(4); 2247-2250.
- Friedman, S. L. 2003. Liver fibrosis—from bench to bedside. *Journal of Hepatology*, 38; 38-53.
- Friedman S. L. 2008a. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*, 134; 1655- 1669.
- Friedman, S. L. 2008b. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiological Reviews*, 88(1); 125-172.
- Fujii, T., Fuchs, B. C., Yamada, S., Lauwers, G. Y., Kulu, Y., Goodwin, J. M., Lanuti, M. and Tanabe, K. K. 2010. Mouse model of carbon tetrachloride induced liver fibrosis: Histopathological changes and expression of CD133 and epidermal growth factor. *BMC Gastroenterology*, 10(1); 79.
- Galano, A., Tan, D. X. and Reiter, R. J. 2011. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. *Journal of Pineal Research*, 51(1); 1-16.
- Ganguly, K., Maity, P., Reiter, R. J. and Swarnakar, S. 2005. Effect of melatonin on secreted and induced matrix metalloproteinase-9 and -2 activity during prevention of indomethacin-induced gastric ulcer. *Journal of Pineal Research*, 39(3); 307-315.
- García, J. J., López-Pingarrón, L., Almeida-Souza, P., Tres, A., Escudero, P., García-Gil, F. A., Tan, D. X., Reiter, R. J., Ramírez, J. M. and Bernal-Pérez, M. 2014. Protective effects of melatonin in reducing oxidative stress and in preserving the fluidity of biological membranes: a review. *Journal of Pineal Research*, 56(3); 225-237.
- Gasso, M., Rubio, M., Varela, G., Cabré, M., Caballería, J., Alonso, E., Deulofem, R., Camps, J., Giménez, A., Pajares, M., Parés, A., Mato, J. M. and Rodés, J. 1996. Effects of S-adenosylmethionine on lipid peroxidation and liver fibrogenesis in carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Journal of Hepatology*, 25(2); 200-205.
- Geerts, A. 2001. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. In *Seminars in Liver Disease*, 21; 311–335.

- George, N., Peeyush Kumar, T., Antony, S., Jayanarayanan, S. and Paulose, C. S. 2012. Effect of vitamin D3 in reducing metabolic and oxidative stress in the liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *British Journal of Nutrition*, 108(8); 1410-1418.
- Georges, P. C., Hui, J. J., Gombos, Z., McCormick, M. E., Wang, A. Y., Uemura, M., Mick, R., Janmey, P.A., Furth, E. E. and Wells, R. G. 2007. Increased stiffness of the rat liver precedes matrix deposition: implications for fibrosis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 293(6); 1147-1154.
- Giannelli, G., Bergamini, C., Marinosci, F., Fransvea, E., Napoli, N., Maurel, P., Dentico, P. and Antonaci, S. 2006. Antifibrogenic effect of IFN-alpha2b on hepatic stellate cell activation by human hepatocytes. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 26; 301-308.
- Giannini, E. G., Testa, R. and Savarino, V. 2005. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *Canadian Medical Association Journal*, 172(3); 367-379.
- Gill, S. E. and Parks, W. C. 2008. Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 40(6); 1334-1347.
- Giovannucci, E., Liu, Y., Hollis, B. W. and Rimm, E. B. 2008. 25-hydroxyvitamin D and risk of myocardial infarction in men: a prospective study. *Archives of Internal Medicine*, 168(11); 1174-1180.
- Goldberg, D.M. 1980. Structural, functional, and clinical aspects of γ -glutamyltransferase. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 12(1); 1-58.
- Gómez-Florit, M., Ramis, J.M. and Monjo, M. 2013. Anti-fibrotic and anti-inflammatory properties of melatonin on human gingival fibroblasts in vitro. *Biochemical Pharmacology*, 86(12); 1784-1790.
- Gressner, A. M. 1996. Transdifferentiation of hepatic stellate cells (Ito cells) to myofibroblasts: a key event in hepatic fibrogenesis. *Kidney International*, 54; 39-45.
- Gressner, A. M., Weiskirchen, R., Breitkopf, K. and Dooley, S. 2002. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Frontiers in Bioscience*, 7(1); 793-807.
- Guerrero, J. M. and Reiter, R. J. 2002. Melatonin-immune system relationships. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2(2); 167-179.
- Gui, S. Y., Wei, W., Wang, H., Wu, L., Sun, W. Y., Chen, W. B. and Wu, C. Y. 2006. Effects and mechanisms of crude astragalosides fraction on liver fibrosis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 103(2); 154-159.

- Guyot, C., Lepreux, S., Combe, C., Doudnikoff, E., Bioulac-Sage, P., Balabaud, C. and Desmoulière, A. 2006. Hepatic fibrosis and cirrhosis: the (myo) fibroblastic cell subpopulations involved. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 38(2); 135-151.
- Güven, A. and Yilmaz, S. 2005. The effect of carbon tetrachloride (CCl₄) and ethanol (C₂H₅OH) on the determination of levels glutathione peroxidase, catalase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and lipid peroxidation liver and kidney in the goose. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 11(2); 113-117.
- Hamden, K., Carreau, S., Jamoussi, K., Miladi, S., Lajmi, S., Aloulou, D., Ayadi, F. and Elfeki, A. 2009. 1 alpha 25 Dihydroxyvitamin D₃: Therapeutic and Preventive Effects against Oxidative Stress, Hepatic, Pancreatic and Renal Injury in Alloxan-Induced Diabetes in Rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 55(3); 215-222.
- Hardeland, R. and Poeggeler, B. 2003. Non-vertebrate melatonin. *Journal of Pineal Research*, 34(4); 233-241.
- Hardeland, R., Cardinali, D. P., Srinivasan, V., Spence, D. W., Brown, G. M. and Pandi-Perumal, S. R. 2011. Melatonin—A pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Progress in Neurobiology*, 93(3); 350-384.
- Harries, H. M., Fletcher, S. T., Duggan, C. M. and Baker, V. A. 2001. The use of genomics technology to investigate gene expression changes in cultured human liver cells. *Toxicology in vitro*, 15(4); 399-405.
- Hashimoto, N., Jin, H., Liu, T., Chensue, S. W. and Phan, S. H. 2004. Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*, 113(2); 243-252.
- Hemann, S., Graf, J., Roderfeld, M. and Roeb, E. 2007. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis—a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. *Journal of Hepatology*, 46(5); 955-975.
- Henderson, N. and Iredale, J. 2007. Liver fibrosis: cellular mechanisms of progression and resolution. *Clinical Science*, 112; 265-280.
- Hernandez-Gea, V. and Friedman, S. L. 2011. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 6; 425-456.
- Hinz, B. 2007. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(3); 526-537.
- Hinz, B., Phan, S. H., Thannickal, V. J., Galli, A., Bochaton-Piallat, M. L. and Gabbiani, G. 2007. The myofibroblast: one function, multiple origins. *The American Journal of Pathology*, 170(6); 1807-1816.
- Holick, M. F. 2007. Vitamin D deficiency. *New England Journal of Medicine*, 357(3); 266-281.

- Hong, R. T., Xu, J. M. and Mei, Q. 2009. Melatonin ameliorates experimental hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *World Journal of Gastroenterology*, 15(12); 1452-1458.
- Huang, X., Wang, X., Lv, Y., Xu, L., Lin, J. and Diao, Y. 2014. Protection Effect of Kallistatin on Carbon Tetrachloride-Induced Liver Fibrosis in Rats via Antioxidative Stress. *PloS one*, 9(2); e88498.
- Ingawale, D. K., Mandlik, S. K. and 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.
- Iredale, J. P. 1997. Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver fibrosis. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 29(1); 43-54.
- Iredale, J. P. 2007. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *Journal of Clinical Investigation*, 117(3); 539-548.
- Iriti, M., Varoni, E. M. and Vitalini, S. 2010. Melatonin in traditional Mediterranean diets. *Journal of Pineal Research*, 49(2); 101-105.
- Iwaisako, K., Brenner, D. A. and Kisseleva, T. 2012. What's new in liver fibrosis? The origin of myofibroblasts in liver fibrosis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 27(2); 65-68.
- Iwaisako, K., Hatano, E., Taura, K., Nakajima, A., Tada, M., Seo, S., Tamaki, N., Sato, F., Ikai, I., Uemoto, S. and Kinoshita, M. 2008. Loss of Sept4 exacerbates liver fibrosis through the dysregulation of hepatic stellate cells. *Journal of Hepatology*, 49(5); 768-778.
- Jahnke, G., Marr, M., Myers, C., Wilson, R., Travlos, G. and Price, C. 1999. Maternal and developmental toxicity evaluation of melatonin administered orally to pregnant Sprague-Dawley rats. *Toxicological Sciences*, 50(2); 271-279.
- Jenab, M., Bueno-de-Mesquita, H. B., Ferrari, P., van Duijnhoven, F. J., Norat, T., Pischon, T., Jansen, E. H., Slimani, N., Byrnes, G., Rinaldi, S., Tjønneland, A., Olsen, A., Overvad, K., Boutron-Ruault, M. C., Clavel-Chapelon, F., Morois, S., Kaaks, R., Linseisen, J., Boeing, H., Bergmann, M. M., Trichopoulou, A., Misirli, G., Trichopoulos, D., Berrino, F., Vineis, P., Panico, S., Palli, D., Tumino, R., Ros, M. M., van Gils, C. H., Peeters, P. H., Brustad, M., Lund, E., Tormo, M.J., Ardanaz, E., Rodríguez, L., Sánchez, M. J., Dorransoro, M., Gonzalez, C. A., Hallmans, G., Palmqvist, R., Roddam, A., Key, T. J., Khaw, K. T., Autier, P., Hainaut, P. and Riboli, E. (2010). Association between pre-diagnostic circulating Vitamin D concentration and risk of colorectal cancer in European populations: a nested case-control study. *British Medical Journal*, 340; b5500.

- Jomova, K. and Valko, M. 2011. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283(2); 65-87.
- Kallis, Y. N. and Forbes, S. J. 2009. The bone marrow and liver fibrosis: friend or foe? *Gastroenterology*, 137(4); 1218-1221.
- Kandimalla, K. K., Babu, R. J. and Singh, M. 2010. Biphasic flux profiles of melatonin: The Yin–Yang of transdermal permeation enhancement mediated by fatty alcohol enhancers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99(1); 209-218.
- Kanter, M., Coskun, O. and Budancamanak, M. 2005. Hepatoprotective effects of *Nigella sativa* L and *Urtica dioica* L on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and liver enzymes in carbon tetrachloride-treated rats. *World Journal of Gastroenterology*, 11(42); 6684-6688.
- Kanter, M., Meral, I., Dede, S., Cemek, M., Ozbek, H., Uygan, I. and Gunduz, H. 2003. Effects of *Nigella sativa* L. and *Urtica dioica* L. on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and some liver enzymes in CCl₄-treated rats. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 50(5), 264-268.
- Karadeniz, A., Yıldırım, A., Karakoç, A., Kalkan, Y. and Çelebi, F. 2009. Protective effect of *Panax ginseng* on carbon tetrachloride induced liver, heart and kidney injury in rats. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 160; 237-243.
- Karbownik, M. and Reiter, R. J. 2000. Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 225(1); 9-22.
- Kepekçi, R. A., Polat, S., Çelik, A., Bayat, N. and Saygideger, S. D. 2013. Protective effect of *Spirulina platensis* enriched in phenolic compounds against hepatotoxicity induced by CCl₄. *Food Chemistry*. 141(3); 1972-1979.
- Kisseleva, T. and Brenner, D. A. 2008. Mechanisms of fibrogenesis. *Experimental Biology and Medicine*, 233(2); 109-122.
- Kitson, M. T. and Roberts, S. K. 2012. D-livering the message: The importance of Vitamin D status in chronic liver disease. *Journal of Hepatology*, 57(4); 897-909.
- Knezevic, M., Gledić, D., Kukulj, V., Knežević, Đ., Jovanović, M., Božić, T. and Aleksić-Kovačević, S. 2009. Expression of α -SMA, desmin and vimentin in canine liver with fibrosis. *Acta Veterinaria*, 59(4); 361-370.
- Knittel, T., Mehde, M., Grundmann, A., Saile, B., Scharf, J. G. and Ramadori, G. 2000. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during hepatic tissue repair in the rat. *Histochemistry and Cell Biology*, 113(6); 443-453.
- Knittel, T., Mehde, M., Kobold, D., Saile, B., Dinter, C. and Ramadori, G. 1999. Expression patterns of matrix metalloproteinases and their inhibitors in parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver: regulation by TNF-alpha and TGF-beta1. *Journal of Hepatology*, 30(1); 48-60.

- Knowles, B. B., Howe, C. C. and Aden, D. P. 1980. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science*, 209; 497-499.
- Kogure, K., Ishizaki, M., Nemoto, M., Kuwano, H. and Makuuchi, M. 1999. A comparative study of the anatomy of rat and human livers. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*, 6(2); 171-175.
- Krithika, R., Verma, R. J. and Shrivastav, P. S. 2013. Antioxidative and cytoprotective effects of andrographolide against CCl₄-induced hepatotoxicity in HepG2 cells. *Human and Experimental Toxicology*, 32(5); 530-543.
- Krizhanovsky, V., Yon, M., Dickins, R. A., Hearn, S., Simon, J., Miething, C., Yee, H., Zender, L. and Lowe, S. W. 2008. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell*, 134(4); 657-667.
- Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., Mitchell R. 2011. *Basic Pathology*, 8th Edition, 960, USA.
- Kus, I., Ogeturk, M., Oner, H., Sahin, S., Yekeler, H. and Sarsilmaz, M. 2005. Protective effects of melatonin against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats: a light microscopic and biochemical study. *Cell Biochemistry and Function*, 23(3); 169-174.
- Lama, V. N. and Phan, S. H. 2006. The extrapulmonary origin of fibroblasts: stem/progenitor cells and beyond. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 3(4); 373-376.
- Lange, C. M., Bojunga, J., Ramos-Lopez, E., von Wagner, M., Hassler, A., Vermehren, J., Herrmann, E., Badenhop, K., Zeuzem, S. and Sarrazin, C. 2011. Vitamin D deficiency and a CYP27B1-1260 promoter polymorphism are associated with chronic hepatitis C and poor response to interferon-alfa based therapy. *Journal of Hepatology*, 54(5); 887-893.
- Lee, J. H. and Youn, J. I. 1998. The photoprotective effect of 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ on ultraviolet light B-induced damage in keratinocyte and its mechanism of action. *Journal of Dermatological Science*, 18(1); 11-18.
- Lee, T. Y., Wang, G. J., Chiu, J. H. and Lin, H. C. 2003. Long-term administration of *Salvia miltiorrhiza* ameliorates carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 55(11); 1561-1568.
- Lin, X., Zhang, S., Huang, Q., Wei, L., Zheng, L., Chen, Z., Jiao, Y., Huang, J., Fu, S. and 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.

- Liu, F. and Ng, T. B. 2000. Effect of pineal indoles on activities of the antioxidant defense enzymes superoxide dismutase, catalase, and glutathione reductase, and levels of reduced and oxidized glutathione in rat tissues. *Biochemistry and Cell Biology*, 78(4); 447-453.
- Liu, J. Y., Chen, C. C., Wang, W. H., Hsu, J. D., Yang, M. Y. and Wang, C. J. 2006. The protective effects of *Hibiscus sabdariffa* extract on CCl₄ induced liver fibrosis in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 44(3); 336-343.
- Lushchak, V. I. 2012. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *Journal of Amino Acids*, 2012:736837. doi: 10.1155/2012/736837.
- Lützw-Holm, C., Angelis, P., Grosvik, H. and Clausen, O. P. F. 1993. 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ and the vitamin D analogue KH1060 induce hyperproliferation in normal mouse epidermis. *Experimental Dermatology*, 2(3); 113-120.
- Macchi, M. M. and Bruce, J. N. 2004. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 25(3); 177-195.
- Mahal, H. S., Sharma, H. S. and Mukherjee, T. 1999. Antioxidant properties of melatonin: a pulse radiolysis study. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(5); 557-565.
- Maldonado, M. D., Reiter, R. J., Perez-San-Gregorio, M. A. 2009. Melatonin as a potential therapeutic agent in psychiatric illness. *Human Psychopharmacology*, 24; 391-400.
- Mallat, A. and Lotersztajn, S. 2013. Cellular Mechanisms of Tissue Fibrosis. 5. Novel insights into liver fibrosis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 305(8); 789-799.
- Manchester, L. C., Poeggeler, B., Alvares, F. L., Ogden, G. B. and Reiter, R. J. 1994. Melatonin immunoreactivity in the photosynthetic prokaryote *Rhodospirillum rubrum*: implications for an ancient antioxidant system. *Cellular & molecular biology research*, 41(5); 391-395.
- Mangood, S. A., Mohamed, M. I. and Taha, M. S. 2012. The Vitamin D₃ analogue (1 α hydroxyvitamin D₃) aggravates carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in albino rats. *Isotope and Radiation Research*, 44(4); 805-816.
- Manibusan, M. K., Odin, M. and Eastmond, D. A. 2007. Postulated carbon tetrachloride mode of action: a review. *Journal of Environmental Science and Health Part C*, 25(3); 185-209.
- Marelli, M. M., Limonta, P., Maggi, R., Motta, M. and Moretti, R. M. 2000. Growth-inhibitory activity of melatonin on human androgen-independent DU 145 prostate cancer cells. *Prostate*, 45(3); 238-244.

- Martín, V., Herrera, F., Carrera-Gonzalez, P., García-Santos, G., Antolín, I., Rodríguez-Blanco, J. and Rodríguez, C. 2006. Intracellular signaling pathways involved in the cell growth inhibition of glioma cells by melatonin. *Cancer Research*, 66(2); 1081-1088.
- Matrisian, L. M. 1994. Matrix metalloproteinase gene expression. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 732; 42–50.
- Matté, C., Stefanello, F. M., Mackedanz, V., Pederzoli, C. D., Lamers, M. L., Dutra-Filho, C. S., Dos Santos, M. F. Wyse, A. T. 2009. Homocysteine induces oxidative stress, inflammatory infiltration, fibrosis and reduces glycogen/glycoprotein content in liver of rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 27(4); 337-344.
- McCrudden, R. and Iredale, J. P. 2000. Liver fibrosis, the hepatic stellate cell and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Histology and Histopathology*, 15(4); 1159-1168.
- Mederacke, I. 2013. Liver Fibrosis–Mouse Models and Relevance in Human Liver Diseases. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 51(01); 55-62.
- Medina, J. and Moreno-Otero, R. 2005. Pathophysiological basis for antioxidant therapy in chronic liver disease. *Drugs*, 65(17); 2445-2461.
- Meister, A. 1983. Selective modification of glutathione metabolism. *Science*, 220 (4596); 472-477.
- Meister, A. 1994. Glutathione, ascorbate, and cellular protection. *Cancer Research*, 54(7); 1969-1975.
- Menendez-Pelaez, A. and Reiter, R. J. 1993. Distribution of melatonin in mammalian tissues: the relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *Journal of Pineal Research*, 15(2); 59-69.
- Mishra, A., Paul, S. and Swarnakar, S. 2011. Downregulation of matrix metalloproteinase-9 by melatonin during prevention of alcohol-induced liver injury in mice. *Biochimie*, 93(5); 854-866.
- Moreira, R. K. 2007. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 131(11); 1728-1734.
- Mormone, E., George, J. and Nieto, N. 2011. Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches. *Chemico-Biological Interactions*, 193(3); 225-231.
- Motawi, T. K., Hamed, M. A., Shabana, M. H., Hashem, R. M. and AboulNaser, A. F. 2011. *Zingiber officinale* acts as a nutraceutical agent against liver fibrosis. *Nutrition and Metabolism (Lond)*, 8; 40.

- Munger, K. L., Levin, L. I., Hollis, B. W., Howard, N. S. and Ascherio, A. 2006. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *Jama*, 296(23); 2832-2838.
- Murch, S. J., Hall, B. A., Le, C. H. and Saxena, P. K. 2010. Changes in the levels of indoleamine phytochemicals during veraison and ripening of wine grapes. *Journal of Pineal Research*, 49(1); 95-100.
- Murphy, F. R., Issa, R., Zhou, X., Ratnarajah, S., Nagase, H., Arthur, M. J., Benyon, C. and Iredale, J. P. 2002. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition implications for reversibility of liver fibrosis. *Journal of Biological Chemistry*, 277(13); 11069-11076.
- Nada, S. A., Omara, E. A., Abdel-Salam, O. M. and Zahran, H. G. 2010. Mushroom insoluble polysaccharides prevent carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rat. *Food and Chemical Toxicology*, 48(11); 3184-3188.
- Nakamura, E., Kozaki, K.I., Tsuda, H., Suzuki, E., Pimkhaokham, A., Yamamoto, G., Irie, T., Tachikawa, T., Amagasa, T., Inazawa, J. and Imoto, I. 2008. Frequent silencing of a putative tumor suppressor gene melatonin receptor 1 A (MTNR1A) in oral squamous-cell carcinoma. *Cancer Science*, 99; 1390–1400.
- Neubauer, K., Knittel, T., Aurisch, S., Fellmer, P., Ramadori, G. 1996. Glial fibrillary acidic protein--a cell type specific marker for Ito cells *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Hepatology*, 24(6); 719-730.
- Neubauer, K., Saile, B. and Ramadori, G. 2001. Liver fibrosis and altered matrix synthesis. *Canadian Journal of Gastroenterology*, 15(3); 187-193.
- Newell, P., Villanueva, A., Friedman, S. L., Koike, K. and Llovet, J. M. 2008. Experimental Models of Hepatocellular Carcinoma. *Journal of hepatology*, 48(5); 858-879.
- Nishida, S. 2005. Metabolic effects of melatonin on oxidative stress and diabetes mellitus. *Endocrine*, 27(2); 131-135.
- Novo, E., Valfrè di Bonzo, L., Cannito, S., Colombatto, S. and Parola, M. 2009. Hepatic myofibroblasts: a heterogeneous population of multifunctional cells in liver fibrogenesis. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 41(11); 2089-2093.
- Noyan, A. 2004. Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji. 15. Baskı, Meteksan, 1157, Ankara.
- Ogeturk, M., Kus, I., Kavakli, A., Oner, J., Kukner, A. and Sarsilmaz, M. 2005. Reduction of carbon tetrachloride-induced nephropathy by melatonin administration. *Cell Biochemistry and Function*, 23(2); 85-92.
- Ogeturk, M., Kus, I., Pekmez, H., Yekeler, H., Sahin, S. and Sarsilmaz, M. 2008. Inhibition of carbon tetrachloride-mediated apoptosis and oxidative stress by

- melatonin in experimental liver fibrosis. *Toxicology and Industrial Health*, 24(4), 201-208.
- Ohta, Y., Kongo, M., Sasaki, E., Nishida, K. and Ishiguro, I. 2000. Therapeutic effect of melatonin on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. *Journal of Pineal Research*, 28(2); 119-126.
- Osseni, R. A., Rat, P., Bogdan, A., Warnet, J. M. and Touitou, Y. 2000. Evidence of prooxidant and antioxidant action of melatonin on human liver cell line HepG2. *Life Sciences*, 68(4); 387-399.
- Ozerkan D., Ozsoy, N. and Yilmaz, E. 2014 Vitamin D and Melatonin Protect the Cell's Viability and Ameliorate the CCl₄ Induced Cytotoxicity in HepG2 and Hep3B Hepatoma Cell Lines. *Cytotech*. DOI: 10.1007/s10616-014-9738-8.
- Özdemir, S. 2009. Rutin Karaciğer Testleri. *Nobel Medicus*, 5(2); 5-9.
- Palacios, R. S., Roderfeld, M., Hemmann, S., Rath, T., Atanasova, S., Tschuschner, A., Gressner, O. A., Weiskirchen, R., Graf, J. and Roeb, E. 2008. Activation of hepatic stellate cells is associated with cytokine expression in thioacetamide-induced hepatic fibrosis in mice. *Laboratory Investigation*, 88(11); 1192-1203.
- Pandi-Perumal, S.R., Srinivasan, V., Maestroni, G. J. M., Cardinali, D. P., Poeggeler, B. and Hardeland, R. 2006. Melatonin nature's most versatile biological signal? *The FEBS Journal*, 273; 2813–2838.
- Paredes, S. D., Korkmaz, A., Manchester, L. C., Tan, D. X. and Reiter, R. J. 2009. Phytomelatonin: a review. *Journal of Experimental Botany*, 60(1); 57-69.
- Parola, M. and Robino, G. 2001. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *Journal of Hepatology*, 35(2); 297-306.
- Parola, M., Marra, F. and Pinzani, M. 2008. Myofibroblast-like cells and liver fibrogenesis: emerging concepts in a rapidly moving scenario. *Molecular Aspects of Medicine*, 29(1); 58-66.
- Parry, B. L. 2002. Jet lag: minimizing its effects with critically timed bright light and melatonin administration. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 4(5); 463-466.
- Petta, S., Cammà, C., Scazzone, C., Tripodo, C., Di Marco, V., Bono, A., Cabibi, D., Licata, G., Porcasi, R., Marchesini, G. and Craxí, A. 2010. Low Vitamin D serum level is related to severe fibrosis and low responsiveness to interferon-based therapy in genotype 1 chronic hepatitis C. *Hepatology*, 51(4); 1158-1167.
- Phan, S. H. 2002. The myofibroblast in pulmonary fibrosis. *CHEST Journal*, 122(6); 286-289.

- Poirier, L. A. 1975. Hepatocarcinogenesis by diethylnitrosamine in rats fed high dietary levels of lipotropes. *Journal of the National Cancer Institute*, 54(1); 137-140.
- Poli, G. 2000. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Molecular aspects of medicine*, 21(3); 49-98.
- Povero, D., Busletta, C., Novo, E., di Bonzo, L. V., Cannito, S., Paternostro, C. and Parola, M. 2010. Liver fibrosis: a dynamic and potentially reversible process. *Histology and Histopathology*, 25(8); 1075-1091.
- Proietti, S., Cucina, A., D'Anselmi, F., Dinicola, S., Pasqualato, A., Lisi, E. and Bizzarri, M. 2011. Melatonin and Vitamin D3 synergistically down-regulate Akt and MDM2 leading to TGF β -1 dependent growth inhibition of breast cancer cells. *Journal of Pineal Research*, 50(2); 150-158.
- Prosser, C. C., Yen, R. D. and Wu, J. 2006. Molecular therapy for hepatic injury and fibrosis: Where are we? *World Journal of Gastroenterology*, 12(4); 509–515.
- Qi, W., Chen, X., Poronnik, P. and Pollock, C. A. 2006. The renal cortical fibroblast in renal tubulointerstitial fibrosis. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 38(1); 1-5.
- Quarles, L. D. 2008. Endocrine functions of bone in mineral metabolism regulation. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(12); 3820-3828.
- Rahman, Q., Abidi, P., Afaq, F., Schiffmann, D., Mossman, B. T., Kamp, D. W. and Athar, M. 1999. Glutathione redox system in oxidative lung injury. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 29(6); 543-568.
- Ramirez A.M., Wongtrakool C., Welch T., Steinmeyer, A., Zügel, U. and Roman, J. 2010. Vitamin D inhibition of pro-fibrotic effects of transformation growth factor b1 in lung fibroblasts and epithelial cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 118(3); 142-150.
- Ramm, G. A., Carr, S. C., Bridle, K. R., Li, L., Britton, R. S., Crawford, D. H., Vogler, C.A., Bacon, B.R. and Tracy, T. F. 2000. Morphology of liver repair following cholestatic liver injury: resolution of ductal hyperplasia, matrix deposition and regression of myofibroblasts. *Liver*, 20(5); 387-396.
- Reiter R. J., Sergio D., Paredes. L., Manchester C. and Tan X. D. 2009. Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered gene for melatonin, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 44(4); 175–200.
- Reiter, R. J. 1995. Functional pleiotropy of the neurohormone melatonin: antioxidant protection and neuroendocrine regulation. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 16(4); 383-415.
- Reiter, R. J., Melchiorri, D., Sewerynek, E., Poeggeler, B., Barlow-Walden, L., Chuang, J., Ortiz, G. G. and AcuñaCastroviejo, D. 1995. A review of the evidence

- supporting melatonin's role as an antioxidant. *Journal of pineal research*, 18(1); 1-11.
- Reiter, R. J. 2003. Melatonin: clinical relevance. *Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism*, 17(2); 273-285.
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Mayo, J. C., Sainz, R. M., Leon, J. and Czarnocki, Z. 2003. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochimica Polonica*, 50(4); 1129-1146.
- Remuzzi, G. and Bertani, T. 1998. Pathophysiology of progressive nephropathies. *New England Journal of Medicine*, 339(20); 1448-1456.
- Reppart, S. M., Weaver, D. R. and Godson, C. 1996. Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends in pharmacological sciences*, 17(3); 100-102.
- Rockey, D. C., Boyles, J. K., Gabbiani, G., and Friedman, S. L. 1992. Rat hepatic lipocytes express smooth muscle actin upon activation *in vivo* and in culture. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, 24(2); 193-203.
- Rodriguez, C., Mayo, J. C., Sainz, R. M., Antolin, I., Herrera, F., Martin, V. and Reiter, R. J. 2004. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *Journal of Pineal Research*, 36(1); 1-9.
- Rose, R. C. and Bode, A. M. 1993. Biology of free radical scavengers: an evaluation of ascorbate. *The FASEB journal*, 7(12); 1135-1142.
- Rudra, D. S., Pal, U., Maiti, N. C., Reiter, R. J. and Swarnakar, S. 2013. Melatonin inhibits matrix metalloproteinase-9 activity by binding to its active site. *Journal of Pineal Research*, 54(4); 398-405.
- Russo, F. P., Alison, M. R., Bigger, B. W., Amofah, E., Florou, A., Amin, F., Bou-Gharios, G., Jeffery, R., Iredale, J. P. and Forbes, S. J. 2006. The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis. *Gastroenterology*, 130(6); 1807-1821.
- Sahin, K., Onderci, M., Gursu, M. F., Kucuk, O. and Sahin, N. 2004. Effect of melatonin supplementation on biomarkers of oxidative stress and serum vitamin and mineral concentrations in heat-stressed Japanese quail. *The Journal of Applied Poultry Research*, 13(2); 342-348.
- Sánchez-Valle, V., C Chavez-Tapia, N., Uribe, M. and Méndez-Sánchez, N. 2012. Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review. *Current Medicinal Chemistry*, 19(28); 4850-4860.
- Sanzgiri, U. Y., Srivatsan, V., Muralidhara, S., Dallas, C. E. and Bruckner, J. V. 1997. Uptake, distribution, and elimination of carbon tetrachloride in rat tissues following inhalation and ingestion exposures. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 143(1); 120-129.

- Savransky, V., Nanayakkara, A., Vivero, A., Li, J., Bevans, S., Smith, P. L., Torbenson, M.S. and Polotsky, V. Y. 2007. Chronic intermittent hypoxia predisposes to liver injury. *Hepatology*, 45(4); 1007-1013.
- Schiffer, E., Housset, C., Cacheux, W., Wendum, D., Desbois-Mouthon, C., Rey, C., Clergue, F., Poupon, R., Barbu, V. and Rosmorduc, O. 2005. Gefitinib, an EGFR inhibitor, prevents hepatocellular carcinoma development in the rat liver with cirrhosis. *Hepatology*, 41(2); 307-314.
- Schuppan, D., Ruehl, M., Somasundaram, R. and Hahn E.G. 2001. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis, In *Seminars in Liver Disease*, 21; 351–372.
- Sewerynek, E., Melchiorri, D., Chen, L. and Reiter, R. J. 1995a. Melatonin reduces both basal and bacterial lipopolysaccharide-induced lipid peroxidation *in vitro*. *Free Radical Biology and Medicine*, 19(6); 903-909.
- Sewerynek, E., Melchiorri, D., Reiter, R. J., Ortiz, G. G. and Lewinski, A. 1995b. Lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity is inhibited by the antioxidant melatonin. *European Journal of Pharmacology*, 293(4); 327-334.
- Seyer, J. M., Hutcheson, E. T. and Kang, A. H. 1977. Collagen polymorphism in normal and cirrhotic human liver. *Journal of Clinical Investigation*, 59(2); 241-248.
- Sezgin, G., Öztürk, G., Güney, S., Sinanoglu, O. and Tunçdemir, M. 2013. Protective effect of melatonin and 1, 25-dihydroxyvitamin D3 on renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Renal Failure*, 35(3); 374-379.
- Shida, C. S., Castrucci, A. M. L. and Lamy-Freund, M. T. 1994. High melatonin solubility in aqueous medium. *Journal of pineal research*, 16(4); 198-201.
- Sies, H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82(2); 291-295.
- Solakoglu S. ve Aytekin Y, 2006. *Temel Histoloji*, 500, Ankara.
- Splettstoesser, W. D. and Schuff-Werner, P. 2002. Oxidative stress in phagocytes—“the enemy within”. *Microscopy Research and Technique*, 57(6); 441-455.
- Stamenkovic, I. 2000. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. In *Seminars in Cancer Biology*, 10; 415–433.
- Starkel, P. and Leclercq, I. A. 2011. Animal models for the study of hepatic fibrosis. *Best practice & research Clinical Gastroenterology*, 25(2); 319-333.
- Stehle, J. H., Saade, A., Rawashdeh, O., Ackermann, K., Jilg, A., Sebestény, T. and Maronde, E. 2011. A survey of molecular details in the human pineal gland in the light of phylogeny, structure, function and chronobiological diseases. *Journal of Pineal Research*, 51(1); 17-43.

- Sun, Y., Yang, X., Lu, X., Wang, D. and Zhao, Y. 2013. Protective effects of Keemun black tea polysaccharides on acute carbon tetrachloride-caused oxidative hepatotoxicity in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 58; 184-192.
- Swarnakar, S., Paul, S., Singh, L. P. and Reiter, R. J. 2011. Matrix metalloproteinases in health and disease: regulation by melatonin. *Journal of Pineal Research*, 50(1); 8-20.
- Szymonik-Lesiuk, S., Czechowska, G., Stryjecka-Zimmer, M., Słomka, M., Mądro, A., Celiński, K. and 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.
- Tahan, G., Akin, H., Aydogan, F., Ramadan, S. S., Yapicier, O., Tarcin, O., Uzun, H., Tahan, V. and Zengin, K. 2010. Melatonin ameliorates liver fibrosis induced by bile-duct ligation in rats. *Canadian Journal of Surgery*, 53(5); 313-318.
- Tahan, V., Ozaras, R., Canbakan, B., Uzun, H., Aydin, S., Yildirim, B., Aytakin, H., Ozbay, G., Mert, A. and Senturk, H. 2004. Melatonin reduces dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats. *Journal of Pineal Research*, 37(2); 78-84.
- Tam, S. P., Strugnell, S., Deeley, R. G. and Jones, G. 1988. 25-Hydroxylation of Vitamin D3 in the human hepatoma cell lines Hep G2 and Hep 3B. *Journal of Lipid Research*, 29(12); 1637-1642.
- Tamura, H., Takasaki, A., Taketani, T., Tanabe, M., Lee, L., Tamura, I., Maekawa, R., Aasada, H., Yamagata, Y. and Sugino, N. 2014. Melatonin and female reproduction. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 40(1); 1-11.
- Tan, D. X., Reiter, R. J., Manchester, L. C., Yan, M. T., El-Sawi, M., Sainz, R. M., Mayo, J. C., Kohen, R., Allegra, M. and Hardeland, R. 2002. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2(2); 181-197.
- Tan, D.-X., Manchester, L.C., Hardeland, R., Lopez-Burillo, S., Mayo, J.C., Sainz, R.M. and Reiter, R.J. 2003. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. *Journal of Pineal Research*. 34; 75-78.
- Tan, X., Li, Y. and Liu, Y. 2006. Paricalcitol attenuates renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17(12); 3382-3393.
- Taslidere, E., Esrefoglu, M., Elbe, H., Cetin, A. and 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.
- Terrier, B., Carrat, F., Geri, G., Pol, S., Piroth, L., Halfon, P., Poynard, T., Souberbielle, J. C. and Cacoub, P. 2011. Low 25-OH vitamin D serum levels

- correlate with severe fibrosis in HIV-HCV co-infected patients with chronic hepatitis. *Journal of Hepatology*, 55(4); 756-761.
- Timms, P. M., Mannan, N., Hitman, G. A., Noonan, K., Mills, P. G., Aganna, E., Price, C. P. and Boucher, B. J. 2002. Circulating MMP-9, Vitamin D and variation in the TIMP-1 response with VDR genotype: mechanisms for inflammatory damage in chronic disorders? *Qjm*, 95(12); 787-796.
- Török, N. J. 2008. Recent advances in the pathogenesis and diagnosis of liver fibrosis. *Journal of Gastroenterology*, 43(5); 315-321.
- Uberti, F., Lattuada, D., Morsanuto, V., Nava, U., Bolis, G., Vacca, G., Squarzanti, D. F., Cisari, C. and Molinari, C. 2014. Vitamin D protects Human Endothelial Cells from oxidative stress through the autophagic and survival pathways. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 99(4); 1367-1374.
- Üçok, K., Mollaoğlu, H., Genç, A., Akkaya, M. ve Şener, Ü. 2010. Safra sistemi fizyolojisi. *Journal of Surgical Arts/Cerrahi Sanatlar Dergisi*, 3(1), 1-8.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M. and Telser, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(1); 44-84.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. M. and Mazur, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1); 1-40.
- Vishwas, D. K., Mukherjee, A. and Haldar, C. 2013. Melatonin improves humoral and cell-mediated immune responses of male golden hamster following stress induced by dexamethasone. *Journal of Neuroimmunology*, 259(1); 17-25.
- Vu, T. H. and Werb, Z. 2000. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes and Development*, 14(17); 2123-2133.
- Wang, H., Wei, W., Wang, N. P., Gui, S. Y., Wu, L., Sun, W. Y. and Xu, S. Y. 2005. Melatonin ameliorates carbon tetrachloride-induced hepatic fibrogenesis in rats via inhibition of oxidative stress. *Life Sciences*, 77(15); 1902-1915.
- Wang, H., Zhang, Y., and Heuckeroth, R. O. 2007. PAI-1 deficiency reduces liver fibrosis after bile duct ligation in mice through activation of tPA. *FEBS Letters*, 581(16); 3098-3104.
- Wang, T. J., Pencina, M. J., Booth, S. L., Jacques, P. F., Ingelsson, E., Lanier, K., Benjamin, E. J., D'Agostino, R. B., Wolf, M. and Vasan, R. S. 2008. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation*, 117(4); 503-511.
- Weber, L. W., Boll, M. and Stampfl, A. 2003. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: Carbon tetrachloride as a toxicological model. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 33(2); 105-136.

- Wells, R.G., Kruglov, E. and Dranoff, J. A. 2004. Autocrine release of TGF-beta by portal fibroblasts regulates cell growth. *FEBS Letters*. 559; 107–110.
- Wiland, H. O., Pai, R. K. and Purysko, A. S. 2012. Hepatic angiosarcoma mimicking sinusoidal obstruction syndrome/venoocclusive disease: A pathologic-radiologic correlation. *Annals of Diagnostic Pathology*, 16(4); 275-279.
- Wynn, T. A. 2008. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *The Journal of Pathology*, 214(2); 199-210.
- Xia, J. L., Dai, C., Michalopoulos, G. K. and Liu, Y. 2006. Hepatocyte growth factor attenuates liver fibrosis induced by bile duct ligation. *The American Journal of Pathology*, 168(5); 1500-1512.
- Yamaguchi, K., Yang, L., McCall, S., Huang, J., Yu, X. X., Pandey, S. K., Bhanot, S., Monia, B. P., Li, Y.X. and Diehl, A. M. 2008. Diacylglycerol acyltransferase 1 anti-sense oligonucleotides reduce hepatic fibrosis in mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 47(2); 625-635.
- Yang, Y. S., Ahn, T. H., Lee, J. C., Moon, C. J., Kim, S. H., Jun, W., Park, S. C., Kim, H.C. and Kim, J. C. 2008. Protective effects of Pycnogenol on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in Sprague–Dawley rats. *Food and Chemical Toxicology*, 46(1); 380-387.
- Yi, X., Long, L., Yang, C., Lu, Y. and Cheng, M. 2014. Maotai Ameliorates Diethylnitrosamine-Initiated Hepatocellular Carcinoma Formation in Mice. *PLoS One*, 9(4); e93599.
- Yin, Y., Yan, M. and Zhu, T. 2012. Minimum Alveolar Concentration of Sevoflurane in Rabbits with Liver Fibrosis. *Anesthesia and Analgesia*, 114(3); 561-565.
- Yu, H., Zheng, L., Yin, L., Xu, L., Qi, Y., Han, X., Xu, Y., Liu, K. and Peng, J. 2014. Protective effects of the total saponins from *Dioscorea nipponica makino* against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice through suppression of apoptosis and inflammation. *International Immunopharmacology*, 19(2); 233-244.
- Yu, Q. and Stamenkovic, I. 2000. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- β and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes and Development*, 14(2); 163-176.
- Yuan, L. and Kaplowitz, N. 2009. Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(1); 29-41.
- Zannis, V. I., Breslow, J. L., SanGiacomo, T. R., Aden, D. P. and Knowles, B. B. 1981. Characterization of the major apolipoproteins secreted by two human hepatoma cell lines. *Biochemistry*, 20(25); 7089-7096.
- Zeisberg, M., Yang, C., Martino, M., Duncan, M. B., Rieder, F., Tanjore, H. and Kalluri, R. 2007. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via

- epithelial to mesenchymal transition. *Journal of Biological Chemistry*, 282(32); 23337-23347.
- Zhang, Y., Guo, J., Dong, H., Zhao, X., Zhou, L., Li, X., Liu, J. and Niu, Y. 2011. Hydroxysafflor yellow A protects against chronic carbon tetrachloride-induced liver fibrosis. *European Journal of Pharmacology*, 660(2); 438-444.
- Zhang, Y., Kong, J., Deb, D. K., Chang, A. and Li, Y. C. 2010a. Vitamin D receptor attenuates renal fibrosis by suppressing the renin-angiotensin system. *Journal of the American Society of Nephrology*, 21(6); 966-973.
- Zhang, Y., Liu, P., Gao, X., Qian, W. and Xu, K. 2010b. rAAV2-TGF- β 3 Decreases Collagen Synthesis and Deposition in the Liver of Experimental Hepatic Fibrosis Rat. *Digestive Diseases and Sciences*, 55(10); 2821-2830.
- Zhou, L., Qian, Z. X., Li, F. and Liu, R. Y. 2007. The effect of melatonin on the regulation of collagen accumulation and matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 mRNA and protein in a murine model of chronic asthma. *Zhongh Jie He He Hu Xi Za Zhi*, 30(7); 527-532.
- Zhou, X., Hovell, C. J., Pawley, S., Hutchings, M. I., Arthur, M. J., Iredale, J.P. and Benyon, R.C. 2004. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -14 persists during early resolution of experimental liver fibrosis and might contribute to fibrolysis. *Liver International*, 24; 492-501.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Dilşad ÖZERKAN
Doğum Yeri : ANKARA
Doğum Tarihi : 27/09/1984
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Ankara Atatürk Anadolu Lisesi (2002)
Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2007)
Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Zooloji
ABD (Eylül 2007 – Ocak 2010)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Kastamonu Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Araştırma Görevlisi
(Ocak 2010-halen)

Yayınlar (SCI) (Yayın yılları dikkate alınmalıdır)

1. **Ozerkan D.**, Ozsoy, N., Yılmaz, E. (2014) Vitamin D and Melatonin Protect the Cell's Viability and Ameliorate the CCl₄ Induced Cytotoxicity in HepG2 and Hep3B Hepatoma Cell Lines. *Cytotech.* DOI: 10.1007/s10616-014-9738-8. (SCI-E).
2. **Ozerkan D.**, Ozsoy, N., Cebesoy S. (2014) Response of thymus lymphocytes to streptozotocin-induced diabetes and exogenous vitamin C administration in rats. *Microscopy.* DOI: DFU029.

Uluslararası Kongre Sunum (Sunum tarihleri dikkate alınmalıdır)

1. **Okan D.** Ozsoy, N.,Cebesoy, S. “Role of vitamin C on mitotic activity of lymphocytes in thymus of streptozotocin-induced diabetic rats.”(2009) (FEBS Kongresi- PRAG)
2. Ozsoy, N., **Okan D.**, Cebesoy, S. “Protective effect of vitamin C treatment on diabetes-induced ultrastructural changes in the thymic capillaries of rats.” (2009) (FEBS Kongresi- PRAG)
3. **Okan D.**, Ozsoy, N.,Cebesoy, S.,Ozer, Ç. "Distribution Of Spleen Connective Tissue Fibers In Diabetic And Vitamin C Treated Diabetic Rats" (2011) (Turkish Feps-physiology Meeting).
4. **Okan D.**, Ozsoy, N.,Cebesoy, S., Akbulut, G., Öztürk, G. "Histochemical Properties Of Gastronecmius Muscle Fibers In The Young And Aged Rats"(2011) (Turkish Feps-physiology Meeting).
5. **Ozerkan D.**, Ozsoy, N. “Antifibrotic and Protective Effects of Vitamin D on Experimentally Induced Liver Fibrosis in Rats” (2014) (3rd International Molecular Biology and Biotechnology Congress) (02-06 June 2014) (Bosnia-Herzigova).

Ulusal Kongre Sunum (Sunum tarihleri dikkate alınmalıdır)

1. **Okan D.** Ozsoy, N.,cebesoy, S.,Ozer, Ç. "C Vitamini Uygulanmış Diyabetik Sıçan Timusundaki Mast Hücrelerinin İncelenmesi"(2011)(20.elektron Mikroskobu Kongresi).
2. **Okan D.** Ozsoy, N.,cebesoy, S. “Diyabetik ve vitamin C tedavili sıçanların timusunda kan-timus bariyerinin ince yapısı” (2011) (20.elektron Mikroskobu Kongresi).

3. **Dilşad ÖZERKAN**, Fevziye VURAL, Nesrin ÖZSOY, Suna CEBESoy, Safa Mohammed Elmustafa Osman ELMUBARAK “Deneysel Karbontetraklorür Toksisitesinde Soleus Kas Hasarı ve D Vitamininin Rolü”(2013) (1.Zooloji Kongresi).
4. Fevziye VURAL, **Dilşad ÖZERKAN**, Suna CEBESoy, Nesrin ÖZSOY, Safa Mohammed Elmustafa Osman ELMUBARAK “ Karbontetraklorür Uygulanmış Sıçan Soleus Kası Üzerine Melatoninin Etkisi” (2013) (1.Zooloji Kongresi).

Görev Aldığı Projeler

1. TÜBİTAK-Bursiyer: Normoksik ve hipoksik koşullarda akciğer alveoler makrofajlar ve akciğerde inflamatuvar sürece aracı moleküller (2009-2010).SBAGBMBF-4/108S262-300000TL
2. Ankara Üniversitesi BAP/Yardımcı Araştırmacı-Karbon tetraklorür (CCl₄) Toksisitesine Karşı Melatonin ve D Vitamininin Hücre Proliferasyonu ve Oksidatif Stres Üzerine Etkilerinin in vitro İncelenmesi (2012-2014).12B4240012, 19000TL
3. Ankara Üniversitesi BAP/Yardımcı Araştırmacı-Sıçan Karaciğerinde Karbon tetraklorür (CCl₄) Hasarına Karşı Melatonin ve D Vitamininin Oksidatif Stres ve MMP-9 Üzerine Etkisi (2013-devam ediyor).13L4240006-12000TL
4. Ankara Üniversitesi BAP/Yardımcı Araştırmacı-Akciğer Dokusunda Karbon Tetraklorür (CCl₄) ile oluşturulan Oksidatif Hasara Karşı Melatonin ve D Vitamininin Koruyucu Etkisi (2014-devam ediyor).BAP/13H4240005-9500TL