

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARELERDE KARBON TETRAKLORÜR İLE KARACİĞER HASARI
OLUŞTURULMASI ÜZERİNE PROANTHOCYANİDİNİN KORUYUCU
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ecz. Bülent DERTLİ
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Dinç EŞSİZ

2012-KARS

**T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARELERDE KARBON TETRAKLORÜR İLE KARACİĞER
HASARI OLUŞTURULMASI ÜZERİNE PROANTHOCYANİDİNİN
KORUYUCU ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Ecz. Bülent DERTLİ
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Dinç EŞSİZ**

**Bu çalışma KAÜ Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Fonu tarafından
desteklenmiştir. Proje No: 2011-VF-15**

2012-KARS

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Bülent DERTLİ'nin Yüksek Lisans tezi olarak hazırladığı “**Farelerde Karbontetraklorür İle Karaciğer Hasarı Oluşturulması Üzerine Proanthocyanidin'in Koruyucu Etkisinin Araştırılması**” adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy...*birlikte*...ile kabul edilmiştir.

20.../09/2012

	Adı Soyadı
Başkan:	Doç. Dr. Dinç EŞSİZ
Üye :	Yard. Doç. Dr. Oktay ÖZKAN
Üye :	Yard. Doç. Dr. Metin ÖĞÜN

İmza

[Handwritten Signature]

[Handwritten Signature]

[Handwritten Signature]

Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun *02.10.*/2012 tarih ve *30* / *174* sayılı kararıyla onaylanmıştır.

[Handwritten Signature]
Prof. Dr. Mehtap CİTİL
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
İÇİNDEKİLER	I
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	III
ŞEKİLLER DİZİNİ	IV
RESİMLER DİZİNİ	V
TABLolar DİZİNİ	VI
TEŞEKKÜR	VII
1. GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Genel Bilgiler	4
2. MATERYAL ve METOT	11
2.1. Materyal	11
2.1.1. Deney Hayvanları	11
2.1.2. Kullanılan Kitler	11
2.1.3. Kullanılan Alet ve Gereçler	11
2.1.4. Kullanılan Tampon Çözeltiler	12
2.2. Metot	13
2.2.1. Deney planı	13
2.2.2. Histopatolojik İncelemeler	14

2.2.3. Biyokimyasal İncelemeler	15
2.2.3.1. Total Antioksidan Kapasitelerinin (TAK) Belirlenmesi	15
2.2.3.2. Total Oksidan Kapasitelerinin (TOK) Belirlenmesi	16
2.2.3.3. Total Bilurubin Miktarının Belirlenmesi	17
2.2.3.4. AST Aktivitesinin Belirlenmesi	19
2.2.3.5. ALT Aktivitesinin Belirlenmesi	20
2.2.4. İstatistiksel Analizler	20
3. BULGULAR	21
3.1. Histopatolojik Bulgular	21
3.2. Biyokimyasal Bulgular	23
4. TARTIŞMA	32
5. SONUÇ	38
6. ÖZET	39
7. SUMMARY	41
8. KAYNAKLAR	43
9. ÖZGEÇMİŞ	53

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

- CCl₄** : Karbon Tetraklorür
ALT : Alanin Aminotransferaz
AST : Aspartat Aminotransferaz
EPA : Birleşik Devletler Çevre Koruma Dairesi
H₂O₂ : Hidrojen Peroksit
GPx : Glutasyon Peroksidaz
PKC : Protein Kinaz-C
ACE : Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
C_{max} : Maksimum Yoğunluk
CO₂ : Karbondioksit
GSPE : Grape Seed Proanthocyanidin Extract
LD₅₀ : Letal Doz 50
DNA : Deoksiribo Nükleik Asit
SOR : Serbest Oksijen Radikali
GSH : Glutasyon
GSSG : İndirgenmiş Glutasyon
HE : Hematoksilen-Eosin
TAK : Total Antioksidan Kapasite
TOK : Total Oksidan Kapasite
ROT : Reaktif Oksijen Türleri
HF : Hepatik Fibrozis
MET : Metforminin
MDA : Malondialdehit
SOD : Süperoksit Dismutaz
CAT : Katalaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.1: Karbon tetraklorür'ün genel yapısı	4
Şekil 1.2: Proanthocyanidin'in genel yapısı	9
Şekil 3.1: Deney gruplarında yapılan Total Bilurubin (mg/dl) analiz sonuçları ve gruplar arasındaki istatistiksel farklar	25
Şekil 3.2: Deney gruplarında yapılan AST (U/L) analiz sonuçları ve gruplar arasındaki istatistiksel farklar	26
Şekil 3.3: Deney gruplarında yapılan ALT (U/L) analiz sonuçları ve gruplar arasındaki istatistiksel farklar	27
Şekil 3.4: Deney gruplarında yapılan plazma TAK (mmol/L Trolox equivalent/L) analiz sonuçları	28
Şekil 3.5: Deney gruplarında yapılan plazma TOK ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equivalent/L) analiz sonuçları ve gruplar arasındaki istatistiksel farklar	29
Şekil 3.6: Deney gruplarında yapılan karaciğer dokusu TAK ($\mu\text{mol Trolox equivalent/g doku}$) analiz sonuçları ve gruplar arasındaki istatistiksel farklar	30
Şekil 3.7: Deney gruplarında yapılan karaciğer dokusu TOK ($\text{nmol H}_2\text{O}_2$ equivalent/g doku) analiz sonuçları	31

RESİMLER DİZİNİ**Sayfa No**

Resim 1. a: Normal karaciğer (Kontrol grubu) ve vena sentralisler (oklar); **b:** CCl₄ uygulaması (Grup II) sonucu vena sentralisler (oklar) etrafında şekillenen hepatosellüler nekroz; **c:** Grup V'da vena sentralis (ok) etrafındaki hepatositlerde nekrotik değişiklikler bulunmamasına rağmen hepatositlerde belirgin hidropik ve vakuoler dejenerasyon görülmekte (H.E. x20)

TABLOLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1: Çalışmada oluşturulan deney grupları ve bu gruplara yapılan uygulamalar	13
Tablo 2.2: Total Antioksidan Kapasite (TAK) aktivite analizi	16
Tablo 2.3: Total Oksidan Kapasite (TOK) aktivite analizi	17
Tablo 2.4: Total Bilurubin Ölçüm Analizi	18
Tablo 3.1: CCl ₄ ve proantocyanidin uygulanan farelerde meydana gelen hepatosellüler nekrozun yaygınlığı (Mean±SE)	22
Tablo 3.2: Serum total bilirubin, AST, ALT, TAK ve TOK seviyeleri ile karaciğer dokusu TAK ve TOK seviyeleri analiz sonuçları ve gruplar arasındaki istatistiksel Farklar	24

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmam boyunca bana her tŸrlŸ desteğini esirgemeyen danışman hocam sayın Doç. Dr.Din EŞSİZ'e, sayın Prof. Dr. Abdullah DOęAN'a, sayın Doç. Dr. Asım KART'a, sayın Yrd. Doç. Dr. Oktay ÖZKAN'a, sayın Yrd. Doç. Dr. Murat BAYEZİT'e, sayın Yrd. Doç. Dr. Ayőe KANICI'ya, sayın Dr. Dinçer ERDAę'a, sayın Arő. Gör. Dr. Pınar AKSU'ya, sayın Doç. Dr. Onur ATAKİŐİ'ye ve sayın Doç. Dr. Mahmut SŐZMEN'e teőekkŸr ederim.

Ayrıca tez çalıőmam sŸresince yanımda olarak her tŸrlŸ desteği sağlayan eőim Emine GŸmŸőbaő DERTLİ'ye ve aileme teőekkŸr ederim.

1. GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Son yıllarda sağlık, tarım, sanayi gibi alanlarda toksik yapıda olan kimyasal maddelerin bilinçsiz ve yanlış kullanılması sonucu gerek halk sağlığı, gerekse diğer canlıların yaşamı için büyük bir tehlike oluşturmaktadır. Canlıların bu kimyasal maddelere uzun süre maruz kalmaları durumunda içerdikleri toksik maddelerden dolayı canlı vücudunda olumsuz etkiler ortaya çıkmaktadır.

Canlı vücudunda hayati öneme sahip organlar arasında önemli bir yeri olan karaciğer, karın boşluğunda diyaframın altında yer almaktadır. Karaciğerin pek çok önemli fonksiyonu bulunmakla birlikte temel görevleri şöyle sıralanabilir; sekresyon, ekskresyon, depo, fagositoz, detoksifikasyon, konjugasyon, esterleştirme, metabolizma ve hemopoez'dir (1). Karaciğer tüm bu görevleri karaciğer parankimini oluşturan epitel hücreleri aracılığıyla gerçekleştirmektedir. Karaciğerdeki fonksiyon bozukluklarına; toksik maddeler (karbon tetraklorür, alkol, kloroform, arsenik, kömür katranı vb), enfeksiyonlar ve parazit larvalarının karaciğerde oluşturduğu dejenerasyon sonucunda aşırı düzeyde hemosiderin birikimi gibi faktörler neden olmaktadır (2,3,4,5). Bu etkenlerden dolayı karaciğerde oluşan hasar sürekli olur ve bunun sürekli tekrarlanması durumunda hücre yenilenmesinden daha fazla oranda bağ dokusu artışı meydana gelmektedir. Karaciğer parankiminin tahrip olması ve bunun yerine yağ dokunun gelişmesi, fonksiyonel karaciğer hücreleri yanında vasküler ve safra kanalları sistemini de bozmaktadır (6).

Deneysel olarak karaciğerin fonksiyonlarını bozmayı amaçlayan pek çok araştırmacı karbon tetraklorürü kullanmıştır (2,4,5,7,8,9). Karbon tetraklorür ile deneysel olarak oluşturulan intoksikasyondan başta karaciğer olmak üzere pek çok organ (dalak, pankreas, timus, lenf düğümleri, akciğerler, kalp) ve sistemin doğrudan veya dolaylı olarak etkilendiği rapor edilmiştir (1,5,7,8,9,10).

Oral olarak vücuda alınan CCl_4 ile meydana gelen zehirlenmelerde ortaya çıkan ilk belirtiler; baş ağrısı, baş dönmesi, halsizlik, görme bulanıklığı, uyuma hali ve bilinç kaybıdır. CCl_4 'ün emilimden birkaç gün sonra karaciğerde yağlanma ve bunu takiben karaciğer hasarı oluşur. Karaciğer hücrelerinde meydana gelen nekroz sonucu aspartat aminotransferaz (AST) ve aldolaz enzim düzeylerinde artış gözlenir. Protrombin oluşum süresi uzar (53).

Serbest radikaller, yüksek oranda reaktif bileşikler olup, sahip oldukları bu reaktivite ile hücre membranının yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asitleri, DNA'daki nükleotidler ve proteinlerin sülfidril grupları ile reaksiyona girerek doku hasarına neden olmaktadır. Serbest radikaller fizyolojik şartlarda endojen olarak oluşurken aynı zamanda hava kirliliği, pestisitler, UV, radyasyon, X-ışını gibi eksojen faktörlerin etkisi ile de yüksek oranda oluşmaktadır (14).

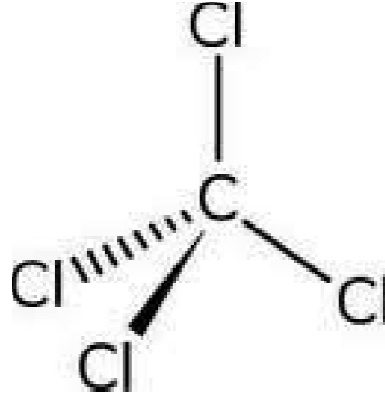
Çekirdeğinde proanthocyanidini içeren *Vitis vinifera* botanik tanımlamada yıllık odunsu üzüm asması olarak bilinmektedir ve Asya'ya özgüdür. Daha sonra ki yıllarda, Avrupa ve diğer ülkelerde de kültüre edilmiştir. Bu bitkinin farklı kısımlarının özellikle de meyvelerinin kullanılmasıyla yapılan ilaçlar, geleneksel tıpta yüzyıllardan beri kullanılmaktadır. Geleneksel tıpta özellikle de, siyah üzüm meyveleri; afrodisyak, diüretik, laksatif, purgatif ve serinletici olarak kullanılmasının yanında, bronşiyal astım, kan hastalıkları, göz hastalıkları, ateş, karaciğer hastalıkları ve boğaz ağrısı gibi hastalıkların tedavisinde ilaç olarak kullanıldığı belirtilmektedir. Proanthocyanidinler meyve, sebze, kuruyemiş ile bunların çekirdek, çiçek ve kabuklarında bulunan doğal bir antioksidandır ve serbest oksijen radikalleri ile oksidatif strese karşı biyolojik, farmakolojik ve terapötik etkileri bulunmaktadır. Proanthocyanidinler konsantrasyona bağlı olarak serbest oksijen radikallerini inhibe etmektedirler (11,14).

Yapılan literatür taramalarında proanthocyanidininin karaciğer üzerinde koruyucu etkisini inceleyen yeterli sayıda araştırmaya rastlanılmamıştır. Bundan dolayı bu çalışmada; karbon tetraklorür ile deneysel olarak oluşturulan karaciğer hasarı üzerine proanthocyanidininin koruyucu etkisinin araştırılması amaçlanmaktadır. Araştırma kapsamında karaciğerde total bilirubin, AST ve ALT enzim düzeyleri ile

yine karaciğer ve plazmada total oksidan ve total antioksidan kapasiteleri spektrofotometrik olarak ölçölüp, ayrıca karaciğerde meydana gelen dejenerasyonun histopatolojik olarak incelenmesiyle elde edilen bulguların literatüre katkı sağlayacağı kanısındayız.

1.2. Genel Bilgiler

Karbon tetraklorür (CCl_4) renksiz, berrak, uçucu bir sıvı bir madde olarak bilinmektedir. Önceleri kuru temizleme, yangın söndürme, tahıl dezenfeksiyonu ve böceklerle mücadelede yararlanılan bu kimyasal bileşik; günümüzde petrol ürünleri, çeşitli yağlar, vernik, cila, reçine çözücüsü ve organik bileşiklerin imalatında kullanılmaktadır. Çevreden insan vücuduna günlük ortalama $0.1 \mu\text{g}$ CCl_4 girişi olduğu bilinmektedir. Birleşik Devletler Çevre Koruma Dairesi (EPA) hayvan deneylerinden elde edilen sonuçlara dayanarak, CCl_4 'ü insan için olası kanserojen (grup B2) sınıfına dâhil etmiştir (15,16).



Şekil 1.1: Karbon tetraklorür'ün genel yapısı (82)

Karbon tetraklorür; solunan hava, su, gıda alımı ve deriden temas yoluyla vücuda girmektedir. Karaciğer, beyin, böbrek, kaslar, yağ dokusu ve kanda daha yüksek konsantrasyonlarda olmak üzere tüm vücuda dağılmaktadır (15). CCl_4 'ün sitokrom P_{450} enzimi aracılığıyla parçalanması sonucu oluşan serbest radikaller hücre hasarını başlatmaktadır (17,18). Vücuttan atılımı başta solunum yoluyla ve çok az miktarlarda dışkı ve idrar yoluyla olmaktadır (15).

Deneysel olarak yapılan çalışmalarda, CCl_4 uygulamasına bağlı olarak karaciğer dokusunda oksidatif hasar ve histopatolojik değişikliklerin meydana geldiği rapor edilmiştir (19,20). CCl_4 'ün toksik etkilerine karşı melatonin (21), klofibrat (22), kolşisin (23), putresin (24), losartan (25), ginkgo biloba özütü , nigella

sativa (26), siyah çay özütü ,somatostatin ve oktreotid (27) gibi ajanların etkileri araştırılmış ve bu araştırmalardan farklı sonuçlar elde edilmiştir.

Antihelmintik olarak veteriner hekimlikte kullanılan CCl_4 , akut veya gecikmiş tipte karaciğer toksikasyonlarına neden olmaktadır. Akut toksikasyonların histopatolojisinde karaciğerde hasar, yağlanma ve nekroz gözlenmektedir. CCl_4 , sitokrom P_{450} monooksijenaz sistemi tarafından triklorometil ve triklorometilperoksi radikallerine dönüştürülmektedir. Bu radikaller çok aktif olup, CCl_4 'ün karaciğerde özellikle sentrolobüler bölgede neden olduğu nekrozdan sorumludurlar. Triklorometil radikali, makromoleküllerle dayanıklı bileşikler oluşturduğu gibi, oksijenle de birleşerek daha aktif metaboliti olan triklorometilperoksi radikalini meydana getirmektedir. Bu radikal, lipit peroksidasyonun temel başlatıcısıdır. Lipit peroksidasyonu, lipoprotein sentezi için gerekli olan yapıları da hasara uğratarak hepatik lipidozise yardımcı olur. Karaciğerde aşırı lipit birikimi sonucu, fonksiyon bozukluğu ve siroza doğru ilerleyen değişimler ortaya çıkmaktadır (10,30-33).

Serbest radikaller bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküller olarak tanımlanmaktadır. Kadmiyum ve kurşun gibi bazı çevre kirleticilere uzun süre mesleki olarak maruz kalınması durumunda, oksidatif stres meydana gelmektedir. Oksidatif stres basit bir şekilde, vücudun antioksidan savunma sistemi ile hücrelerin lipit tabakasının peroksidasyonuna neden olan serbest radikal üretimi arasındaki dengesizlik olarak tanımlanabilir (40,41).

Serbest radikaller, hücrelerde endojen ve ekzojen kaynaklı etmenlere bağlı olarak oluşmaktadırlar. Ekzojen kaynaklı etmenler arasında parakuat, alloksan gibi kimyasallara maruz kalma, karbon tetraklorür, parasetamol gibi ilaç toksikasyonları, iyonize ve ultraviyole radyasyon, hava kirliliği yapan fitokimyasal maddeler, sigara dumanı, solventler gibi çevresel faktörler ile nitrofurantoin, bleomisin, doksorubisin ve adriamisin gibi antineoplastik ajanlar, alkol ve uyuşturucular gibi alışkanlık yapıcı maddeler bulunmaktadır(42-45).

Serbest radikaller bütün hücrel makromoleküllerle reaksiyona girebilme yeteneğine sahip oldukça aktif moleküllerdir. Hücrel hasar oluşumunda özellikle üç tip reaksiyon önemlidir; serbest oksijen radikalleri, plazma ve organel membranlarında lipit peroksidasyonuna neden olmaktadır. Hidroksil radikali membran lipitleri ile çift bağ yapmakta ve böylece lipit-radikal etkileşimi ile zincirleme reaksiyon sonucu pek çok lipit peroksidasyon ürünü (malondialdehit, dien konjugatları gibi) açığa çıkmaktadır. Eritrosit membranları ile lipozomal membranların (özellikle hücre ve mitokondri) okside olması sonucu bu yapıların fiziksel ve kimyasal özellikleri değişmektedir. Buna bağlı olarak, membranın iyon geçirgenliği bozulmakta ve eritrositlerde hemoliz ortaya çıkmaktadır. Böylece membran, organel ve hücre hasarı meydana gelmektedir (49).

Serbest radikaller hidroksil radikali, süperoksit anyon radikali, nitrik oksit ve lipit peroksit radikalleri gibi değişik kimyasal yapılara sahiptir (46). Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Oksijen, süperoksit grubuna (O_2^-) bazı demir-kükürt içeren yükseltgenme-indirgenme enzimleri ve flavoproteinlerin etkisiyle indirgenmektedir. Son derece etkin olan ve hücre hasarına yol açan süperoksit grubu, bakırlı bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) aracılığında hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene dönüşmektedir. Süperoksit grubundan daha zayıf etkili olan H_2O_2 , dokularda bulunan katalaz, peroksidaz ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimlerle su ve oksijen gibi daha zayıf etkili ürünlere dönüştürülerek etkisiz kılınmaktadır. Dietilditiyokarbamat gibi süperoksit dismutazın etkinliğini engelleyen maddeler, süperoksit gruplarının zararsız hale getirilmesini sınırlandırırken, lipit peroksidasyonu hızlandırır. Ayrıca, katalazın etkinliğini engelleyen maddeler (aminotriazol gibi herbisidler) de etkin oksijen gruplarına veya bu grupları oluşturan maddelere duyarlılığı artırır(47,48).

Serbest oksijen radikallerinin ciddi hasar yapma potansiyellerine karşı hücreler, bu toksik ürünleri hızla metabolize edecek savunmaları geliştirmişlerdir (47,48). Antioksidan savunma sistemleri; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi antioksidan enzimler ile glutatyon (GSH), vitamin A, C ve E gibi enzim olmayan maddelerden

oluşmaktadır. Dokular da antioksidan sistemlerce kaldırılamayacak kadar aşırı serbest radikal üretiminin olduğu durumlarda meydana gelen patolojiler çeşitli hücre sel hasarlara yol açmaktadır. Normal fizyolojik koşullarda oluşan fazla miktarda serbest radikallerin organizmadaki etkilerine oksidatif stres adı verilmektedir (47). Vücuda alınan zehirlerin bir kısmı reaktif oksijen türleri (ROT)'nin oluşmasına neden olmaktadır. Bu durum hücrenin oksidan/antioksidan dengesini bozmaktadır. Patolojik durumda dışarıdan alınan böyle maddeler çok daha şiddetli etkilere yol açmaktadır. Böyle durumlarda oksidanların düzeyleri ve etkileri daha şiddetli olur (54).

Antioksidanlar güçlü serbest radikal süpürücü maddelerdir. Çok sayıda sentetik ve doğal antioksidanın insan sağlığında ve hastalıkların önlenmesinde faydalı etkilerinin olduğu bilinmektedir ve bundan yola çıkılarak serbest radikallere bağlı olarak gelişen pek çok hastalığın tedavi edilmesinde proanthocyanidinlerin kullanılabileceği bildirilmektedir.(14,50,51)

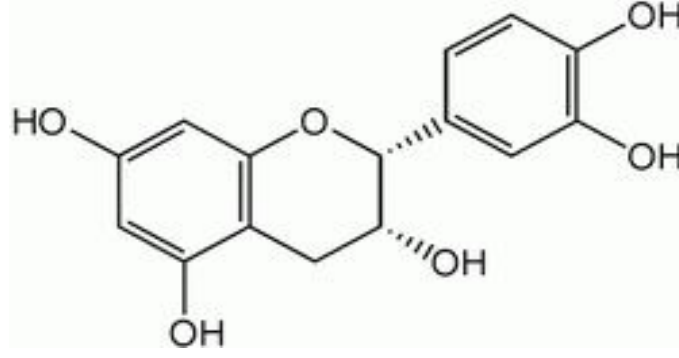
Proanthocyanidinler güçlü antioksidan özellikleri ile oksidatif hasara yol açan serbest radikallerin inhibisyonuna neden oldukları hem in-vivo hem in vitro çalışmalarda gösterilmiştir. Proanthocyanidinler indirgeyici ajanlardır ve bir elektron vererek serbest radikalleri (süperoksit ve hidroksil radikali) süpürmektedirler. Bu özellikleri nedeniyle GSPE (siyah üzüm çekirdeği proanthocyanidin özütü) içindeki proanthocyanidinler oksidatif stres ile hasara uğrayan dokuların korunmasında çok etkilidirler.(14,42,43)

Proanthocyanidinler aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan süperoksit anyon radikalini süpürür, lipid peroksidasyonunu engeller, endojen antioksidanlardan olan E ve C vitaminlerinin rejenerasyonunu sağlar, şelasyon yapıcı etkisiyle prooksidan etkili demir ve bakır gibi geçiş metallerini inaktive ederek oksidatif strese karşı direnci artırır (52). Proanthocyanidinlerin antioksidan aktivitelerinin ortaya çıkmasında bir diğer önemli yol ise antioksidan enzim aktivitelerini artırmaları ile oksidan moleküllerin açığa çıkmasında rol oynayan enzim aktivitelerini inhibe etmeleridir (42,43).

Çekirdeğinde proanthocyanidini içeren *Vitis vinifera* botanik tanımlamada yıllık odunsu üzüm asması olarak bilinmektedir ve Asya'ya özgüdür. Daha sonra ki yıllarda, Avrupa ve diğer ülkelerde de kültüre edilmiştir. Bu bitkinin farklı kısımlarının özellikle de meyvelerinin kullanılmasıyla yapılan ilaçlar, geleneksel tıpta yüzyıllardan beri kullanılmaktadır. Geleneksel tıpta özellikle de, siyah üzüm meyveleri; afrodisyak, diüretik, laksatif, purgatif ve serinletici olarak kullanılmasının yanında, bronşiyal astım, kan hastalıkları, göz hastalıkları, ateş, karaciğer hastalıkları ve boğaz ağrısı gibi hastalıkların tedavisinde ilaç olarak kullanıldığı belirtilmektedir. Proanthocyanidinler meyve, sebze, kuruyemiş ile bunların çekirdek, çiçek ve kabuklarında bulunan doğal bir antioksidandır ve serbest oksijen radikalleri ile oksidatif strese karşı biyolojik, farmakolojik ve terapötik etkileri bulunmaktadır. Proanthocyanidinler konsantrasyona bağlı olarak serbest oksijen radikallerini inhibe etmektedirler (11-14).

Vitis vinifera'nın farmakolojik etkileri İngiliz ve Amerikan farmakopelerinde belirtilmiştir. *Vitis vinifera* içerisinde bulunan proanthocyanidin vasküler bozuklukların tedavisinde etkili oldukları saptanmıştır. Üzüm çekirdeği içindeki biyoaktif antioksidan proanthocyanidinleri içeren özel farmasötik ürünler, başta Fransa olmak üzere, Avrupada, venöz-lenfatik yetmezlik ve periferik kapiller permeabilite artışı gibi mikrosirkülasyon bozukluklarının tedavisinde uzun yıllardan beri kullanılmaktadır (35,36).

Proanthocyanidinler, kondanse tanin olarak bilinen alt gruba dahildirler. Taninler karbonhidratlar ve proteinler ile çözünmez kompleksler oluşturarak özellikle bağ dokusu korunmasında önemli görevler üstlenmektedirler. Dimer, trimer ve tetramerik proanthocyanidinler düşük molekül ağırlıklı olup, su ve etanolde kolayca çözünmekte ve bağırsaklardan emilerek tüm vücuda dağılmaktadırlar (Şekil 1.2).



Şekil 1.2: Proanthocyanidin'in genel yapısı (38)

Proanthocyanidinler konsantrasyona bağlı olarak serbest oksijen radikallerinin inhibisyonunu sağlarlar. Proanthocyanidinlerin şimdiye kadar gösterilmiş çeşitli farmakolojik tıbbi ve terapötik etkileri arasında; vazodilatör, antikarsinojenik, anti-alerjik, antiinflamatuvar, antifungal, anti-artritik, antibakteriyel, kardiyoprotektif, immunostimülan, antiviral etkiler sayılabilir. Proanthocyanidinler inflamatuvar reaksiyonda rol oynayan fosfolipaz A2, siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimlerini inhibe ederler, bunun yanı sıra hücre içi sinyal iletişimde rol oynayan protein kinaz-C (PKC), hipertansiyon oluşumunda rol oynayan anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) ve bağ dokusu yıkımına yol açan hyaluronidaz ve kollajenaz enzim aktivitelerini düzenler. Aynı zamanda yapılan araştırmalarda proanthocyanidinlerin sitokrom P₄₅₀ aktivitesini hücre proliferasyonunda rol oynayan DNA topoizomerez II enzim aktivitelerini inhibe ettikleri gösterilmiştir. Proanthocyanidinler trombosit agregasyonu inhibisyonu yanında, kapiller permeabiliteyi de inhibe ederler. Bu inhibitor etki özellikle retinal mikropiller patolojilerin tedavisinde kullanılmaktadır. Proanthocyanidinler yüksek antioksidan aktiviteleri aracılığı ile serbest oksijen radikallerini süpürerek cilt yaşlanmasını ve ultraviyole radyasyonu ile ortaya çıkan lipid peroksidasyonunu önlerler ve zihinsel fonksiyonlar üzerine koruyucu etkisi vardır (11,35,36).

Polifenollerin farmakokinetiği ile ilgili çalışmalar azdır. Fenolik bileşikler çözünürlüğüne ve yapısına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Proanthocyanidinlerin midenin asidik ortamına dayanıllıdır. Polifenollerin içerisindeki dimer, monomer ve trimer yapılar kalın bağırsaklara ulaştıklarında hızla emilirler, fakat polimerler emilmezler ve kısmen hücre yüzeyine yapışırlar.

Prosiyanidin polimerler kolona ulaştıktan sonra kolondaki mikroflora tarafından parçalanırlar. Kolondaki mikroflora, proanthocyanidinleri düşük moleküler ağırlıklı aromatik bileşiklere çevirir. Bağırsak lümeninden emildikten sonra portal ven aracılığı ile karaciğere gelirler ve burada metabolize olurlar. Proanthocyanidinler karaciğerde metilasyon, oksidasyon, dehidroksilasyon, glukronik asitle veya sülfatla konjugasyon gibi biyotransformasyon tepkimeleri ile metabolitlerine ayrılırlar. Kanda maksimum yoğunluğa ulaşma süreleri 45 dakikadır ve hesaplanan yarılanma ömrü 5 saattir (14,37).

Flavonoid ve metabolitleri temel olarak idrar ve feçes ile az oranda CO₂ ile elimine edilirler. Grape Seed Proanthocyanidin Extract (GSPE) bileşikleri tek doz oral uygulama sonrasında hızlı şekilde plazmada görülürler. Tek doz 50mg/kg oral uygulamadan sonra; ilk 24 saat içinde uygulanan dozun %70'i idrar ve dışkı ile atılır. Temel idrar metabolitleri; etikkatekol, hippurik asit ve m-hidroksifenilpropionik asittir. Önemli feçes metaboliti; etikkatekol'dur. Temel safra metabolitleri ise vanilik asit ve m- hidroksifenilpropionik asittir. Proanthocyanidinlerin oral uygulanmasından sonra bir çok dokuya geçmektedir. Doku dağılımında temel hedefi bağ dokusudur (14).

GSPE ile yapılan akut ve subkronik oral toksisite çalışmalarında; 2 ve 4 g/kg akut oral doz çalışmasında mutajenite gözlenmemiştir. %0,002, 0,2 ve 2 g/kg dozlarda 90 gün boyunca ratlara uygulanan GSPE ekstresi ile toksisite belirtileri görülmemiştir. Subkronik toksisite çalışmalarında diyet içinde %2'lik GSPE (erkek; 1410 mg/kg/gün, dişide; 1501 mg/kg/gün karşılık gelen doz) uygulanması sonrası yan etkiler gözlenmemiştir. GSPE için LD₅₀ değeri erkek ve dişi ratlarda oluşturulan akut toksisite çalışmasında uygulanan 4 g/kg'dan daha yüksek bulunmuştur. Proanthocyanidinler nonmutajenik, nontoksik ve nonkarsinojenik olarak kabul edilmektedirler.(39)

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

Bu çalışmanın deneysel kısmı Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deneysel Hayvanları Ünitesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı, Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı ve Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirildi.

2.1.1. Deneysel Hayvanları

Araştırmada Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (Karar no: KAÜ-HADYEK/10.11.2010/43) onay alınmıştır. Çalışmada 28-32 gr ağırlığında 3 aylık, 42 adet Swiss albino erkek fare kullanıldı. Deneysel hayvanları standart fare kafeslerinde, hava sirkülasyonu sağlanmış deneysel hayvanları odasında 21 ± 2 °C sıcaklıkta barındırıldı. Deneysel süresince farelere su ve fare pelet yemi ad libitum verildi.

2.1.2. Kullanılan Kitler

Total Bilurubin Kiti (TML TR90171, 2012)

ALT Kiti (TML TR90125, 2012)

AST Kiti (TML TR90141, 2012)

Total Antioksidan Kapasite Kit (REL ASSAY, 2012)

Total Oksidan Seviye Kit (REL ASSAY, 2012)

2.1.3. Kullanılan Alet ve Gereçler

Distile su cihazı (NÜVE, NS 104)

Hassas terazi (SHIMADZU, AUX 220)

Vorteks (IKA, MS 3 basic)

Manyetik karıştırıcı ısıtmalı (JEIO TECH, TM-14S)
Otomatik pipetler (SOCOREX, 10-100 µl ve 100-1000 µl)
Santrifüj cihazı (Hettich, MIKRO 120)
Spektrofotometre (SHIMADZU, UV-1201).
Homojenizatör (BioSpec Tissue-Tearor 9853G-07)
Soğutmalı santrifüj (NÜVE, NF 800)
Işık mikroskopunda (Olympus, BX51)

2.1.4. Kullanılan Tampon Çözeltiler

0,1 M PBS Tamponu (pH 7,4)

250ml 10X konsantre solüsyon için;

18,93g NaCl

3,075g Na₂HPO₄.2H₂O

2,075g NaH₂PO₄.2H₂O

Kimyasallardan gösterilen oranlarda hassas terazide tartıldı ve bir beher içerisinde karıştırılıp, üzerine 200 ml distile su ilave edildi. Manyetik karıştırıcıda iyice çözüldürüldü. Çözünme işlemi takiben solüsyonun pH'sı 1M HCl veya 1M NaOH ile 7,4'e ayarlandı. pH'sı 7,4'e ayarlanan bu solüsyondan 250ml hazırlandı.

2.2. Metot

2.2.1. Deney planı

Fareler her grupta 7 hayvan olmak üzere 6 ayrı gruba ayrıldı. Farelere fare pelet yemi ve su *ad libitum* olarak verildi. İlk gruba kontrol grubu olarak herhangi bir uygulama yapılmadı. İkinci gruptaki hayvanlara ise sadece zeytin yağında çözdürülen (1/3 v/v) karbon tetraklorür diğer gruplarla aynı zamanda 7. gün tek doz 1 ml/kg intraperitoneal uygulandı. Üçüncü ve Dördüncü gruplara proanthocyanidin 10 mg/kg/gün ağız yolu ile 7 gün verildi. Beşinci ve Altıncı gruplara proanthocyanidin 100 mg/kg/gün ağız yolu ile 7 gün verildi. Dördüncü ve altıncı gruplara son proanthocyanidin uygulamasından 1 saat sonra zeytin yağında çözdürülen (1/3 v/v) karbon tetraklorür tek doz 1 ml/kg intraperitoneal uygulandı (Tablo 2.1).

Tablo 2.1: Çalışmada oluşturulan deney grupları ve bu gruplara yapılan uygulamalar.

Gruplar	Yapılan Uygulamalar
Grup I	Kontrol (Herhangi bir uygulama yapılmadı)
Grup II	CCl ₄ çalışmanın 7. gününde 1ml/kg c.a. tek doz CCl ₄ i.p. uygulandı.
Grup III	Proanthocyanidin ağız yoluyla 10 mg/kg günlük 7 gün uygulandı
Grup IV	Proanthocyanidin ağız yoluyla 10 mg/kg günlük 7 gün uygulandı ve son uygulamadan 1 saat sonra 1ml/kg c.a. tek doz CCl ₄ i.p. uygulandı.
Grup V	Proanthocyanidin ağız yoluyla 100 mg/kg günlük 7 gün uygulandı
Grup VI	Proanthocyanidin ağız yoluyla 100 mg/kg günlük 7 gün uygulandı ve son uygulamadan 1 saat sonra 1ml/kg c.a. tek doz CCl ₄ i.p. uygulandı.

Son uygulamadan 24 saat sonra farelere servikal dislokasyon yapıldıktan sonra heparinli tülere kan örnekleri alındı. Alınan kan örnekleri 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. Plazmalar biyokimyasal analizler yapılmaya kadar derin dondurucuda (-30 °C'de) saklandı.

Alınan plazma örneklerinde, Total Antioksidan Kapasite (TAK), Total Oksidan Seviye (TOS), Alanin Aminotransferaz (ALT) ve Aspartat Aminotransferaz (AST) aktiviteleri ile Total bilirubin düzeyleri spektrofotometrik yöntemle belirlendi.

Kan alındıktan sonra hayvanların sistemik nekropsileri yapılarak alınan karaciğer doku örneklerinin bir kısmı %10'luk formol solüsyonunda tespit edildi ve geri kalan kısımları TAK ve TOS ölçümü için PBS ile yıkandıktan sonra alüminyum folyoyla sarılarak analizler yapılmaya kadar derin dondurucuda (-30 °C'de) saklandı.

Histopatolojik inceleme için alınan doku örnekleri bilinen rutin işlemlerden geçirildikten sonra parafin blokları hazırlandı. Parafin bloklardan alınan kesitler Hematoksilen-Eosin (H.E.) ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi.

Biyokimyasal inceleme için alınan doku örnekleri PBS ile 5 kat sulandırılarak buz üzerinde 12.000 rpm'de 2 dakika süre ile homojenizatör (BioSpec Tissue-Tearor 9853G-07) kullanılarak homojenize edildi. Homojenizatlar 15000 rpm'de +4 C° 10 dk santrifüj edilerek oluşan süpernatantlar alındı. Bu süpernatantlardan doku TAK ve TOS düzeyleri spektrofotometrik yöntemle belirlendi.

2.2.2. Histopatolojik İncelemeler

Bütün deney farelerinden alınan karaciğer örnekleri %70'lik alkolde hazırlanan %10'luk formaldehid solüsyonunda tespit edildi. Rutin işlemlerin ardından hazırlanan parafin bloklardan 5 µm kalınlığında doku kesitleri alındı ve H.E. ile boyanarak ışık mikroskopunda (Olympus BX51; Olympus Optical Co., Osaka, Japonya) değerlendirildi. Gerekli görülen olgulardan mikroskopik resimler çekildi.

Araştırmada, Houghton ve ark. (1978)'nin standart skalası kullanılarak hasar derecesi tespit edildi. Karaciğer hasarının derecesi, yangı infiltrasyonu, hidropik ve vakuoler dejenerasyon ile yağ dejenerasyonunun şiddeti ve yaygınlığına göre semi-

kantitatif olarak değerlendirildi. Karaciğer dejenerasyonunun derecelendirmesi 0: normal karaciğer; 1: minimal karaciğer hasarı; 2: hafif karaciğer hasarı; 3: orta şiddette karaciğer hasarı; 4: belirgin karaciğer hasarı; 5: şiddetli karaciğer hasarı, şeklinde yapıldı. Ayrıca, karaciğer yüzey alanındaki hepatosellüler nekrozun yaygınlığı da semi-kantitatif olarak değerlendirildi ve sonuçları % olarak ifade edildi.

2.2.3. Biyokimyasal İncelemeler

Plazma ve karaciğer dokusundaki antioksidan ve oksidan miktarı Total Antioksidant Status (TAS) ve Assay Kit ve Total Oksidant Status (TOS) Assay Kit (Rel Assay Diagnostics, Clinical Chemistry Solutions) kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü (34). Plazma örneklerinde Total bilirubin, AST ve ALT düzeyleri Total Bilurubin Assay Kit (TML TR90171), AST Assay Kit (TML TR90141) ve ALT Assay Kit (TML TR90125) kullanılarak ve bildirdikleri metoda göre spektrofotometrik olarak ölçüldü.

2.2.3.1. Total Antioksidan Kapasitelerinin (TAK) Belirlenmesi

Erel (2004) tarafından geliştirilmiş kolorimetrik yöntem kullanıldı (79).

Kullanılan Reaktif ve Standartlar

Reaktif	1:	Test tamponu (50 ml)
Reaktif	2:	Renklendirilmiş ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)] radikal solüsyonu (10 ml)
Standart	1:	0.0 mmol Trolox Equiv./L) solüsyonu
Standart	2:	1.0 mmol Trolox Equiv./L) solüsyonu (10 ml).

Tablo 2.2: Total Antioksidan Kapasite (TAK) aktivite analizi

	Absorbans 1 (660 nm)	Absorbans 2 (660 nm)
Std1	500 µl reaktif 1 + 30 µl standart 1 Standart 1'in ilk absorbansı ölçüldü	Std1 + 75 µl reaktif 2 Oda ısısında 10 dakika ya da 37 °C'de 5 dakika inkübasyon, 2. Absorbans ölçüldü
Std 2	500 µl reaktif 1 + 30 µl standart 2 Standart 2'nin ilk absorbansı ölçüldü	Std 2 + 75 µl reaktif 2 Oda ısısında 10 dakika ya da 37 °C'de 5 dakika inkübasyon, 2. Absorbans ölçüldü
Örn 1	500 µl reaktif 1 + 30 µl örnek Örneğin ilk absorbansı ölçüldü	Ör 1 + 75 µl reaktif 2 Oda ısısında 10 dakika ya da 37 °C'de 5 dakika inkübasyon, 2. Absorbans ölçüldü

Sonuçların Hesaplanması;

$$\text{Sonuç} = \frac{[(\Delta\text{Abs Std1}) - (\Delta\text{Abs Örnekte})]}{[(\Delta\text{Abs Std1}) - (\Delta\text{Abs Std2})]}$$

Δ Standart 1'in absorbansı = (Std 1'in ikinci absorbansı - Std 1'in ilk absorbansı)

Δ Standart 2'nin absorbansı = (Std 2'in ikinci absorbansı - Std 2'in ilk absorbansı)

Δ Örneğin absorbansı = (Örneğin ikinci absorbansı - Örneğin ilk absorbansı)

2.2.3.2. Total Oksidan Seviye (TOS) Belirlenmesi

Erel (2005) tarafından geliştirilmiş kolorimetrik yöntem kullanılmıştır (80).

Kullanılan Reaktif ve Standartlar

- | | | |
|----------|----|---|
| Reaktif | 1: | Test tamponu (50 ml x1 ml) |
| Reaktif | 2: | Prokromojen solüsyonu (10 ml x 1 ml) |
| Standart | 1: | Kör solüsyonu (deiyonize su) |
| Standart | 2: | Stabilize edilmiş standart stok solüsyonu (SSSS) (800 mM H ₂ O ₂ Equiv./L, 10 ml x1 ml) |

Stok solüsyondan 50 µl alındı ve 10 ml deiyonize su ile vortexte karıştırıldı. Bu solüsyondan da 50 µl alındı ve 10 ml deiyonize su ile vortexte karıştırıldı. Bu şekilde standart iki stok solüsyonu 40 000 kat sulandırılmış oldu ve elde edilen çalışma solüsyonunun yoğunluğu 20 mikromolar H₂O₂ Equiv./L olarak elde edildi. Bu çalışma solüsyonu günlük olarak hazırlandı.

Tablo 2.3: Total Oksidan Seviye (TOS) aktivite analizi

	Absorbans 1 (530 nm)	Absorbans 2 (530 nm)
Std 2	500 µl reaktif 1 + 75 µl standart 2 Standart 2'nin ilk absorbansı ölçüldü	Std 2 + 25 µl reaktif 2 Oda ısısında 10 dakika ya da 37 °C'de 5 dakika inkübasyon, 2. Absorbans ölçüldü
Örn 1	500 µl reaktif 1 + 75 µl örnek Örneğin ilk absorbansı ölçüldü	Ör 1 + 25 µl reaktif 2 Oda ısısında 10 dakika ya da 37 °C'de 5 dakika inkübasyon, 2. Absorbans ölçüldü

Sonuçların Hesaplanması;

$$T = [(\Delta\text{Abs Örnek}) / (\Delta\text{Abs Std2})] \times 20 \text{ (Std 2 değeri)}$$

$$\Delta\text{Abs Örnek} = \text{Örneğin ikinci absorbansı} - \text{örneğin ilk absorbansı}$$

$$\Delta\text{Abs Std2} = \text{Standart 2'nin ikinci absorbansı} - \text{standart 2'nin ilk absorbansı}$$

$$\text{Std 2 değeri} = 20 \text{ µmol H}_2\text{O}_2\text{Equiv./L}$$

2.2.3.3. Total Bilurubin Miktarının Belirlenmesi

Total bilurubin miktarının ölçümü TML marka Total Bilurubin TR90171 kiti kullanılarak kitin bildirdiği metoda göre spektrofotometre ile yapıldı.

Kullanılan Reaktif ve Standartlar

Reaktif 1:

Sulfanilik asit	28,9 mmol/L
Hidroklorik asit	165 mmol/L
Dimetilsülfoksit	7 mol/L

Reaktif 2:

Sodyum nitrit	43 mmol/L
---------------	-----------

Standart: BIEN-4050

Total Bilurubin ölçüm prosedürü

Mikroplate içerisine aşağıdaki oranlarda maddeler konuldu ve 555 nm dalga boyunda Optik Dansiteleri (OD) spektrofotometrede ölçüldü.

Tablo 2.4: Total Bilurubin Ölçüm Analizi

	Örnek Körü	Örnek	Kalibratör Körü	Kalibratör
Rekatif 1	160 µl	160 µl	160 µl	160 µl
Örnek	20 µl	20 µl	-	-
Kalibratör	-	-	20 µl	20 µl
Karıştırıldıktan sonra 5 dk inkubasyon yapıldı ve birinci optik dansiteleri (OD1) ölçüldü.				
Kalibratör 2	-	40 µl	-	40 µl
Karıştırıldıktan sonra 5 dk inkubasyon yapıldı ve ikinci optik dansiteleri (OD2) ölçüldü.				

Sonuçların Hesaplanması;

$$\text{Total Bilurubin (mg/dl)} = \frac{[(\text{OD2 Örnek}) - (\text{OD1 Örnek Körü})]}{[(\text{OD2 Kalibratör}) - (\text{OD1 Kalibratör Körü})]} \times n$$

n: Kalibratör konsantrasyonu

2.2.3.4. AST Aktivitesinin Belirlenmesi

IFCC'nin önerdiği yönteme göre AST'nin kinetik olarak tespiti spektrofotometre ile yapıldı (81).

Kullanılan Reaktifler

Reaktif 1:

Tris buffer, pH 7,8	88 mmol/L
L-Aspartate	260 mmol/L
LDH	≥ 1500 U/L
MDH	≥ 900 U/L

Reaktif 2:

A-Ketoglutarate	12 mmol/L
NADH	0,24 mmol/L

AST ölçüm prosedürü

Dört hacim reaktif 1, bir hacim reaktif 2 ile karıştırıldı. Okuma işlemine geçilmeden önce distile su ile spektrofotometre sıfırlandı. Reaktif 1'den 1000 μ l küvete kondu ve üzerine 100 μ l örnek plazma eklendi ve karıştırıldı, 1 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra numuneler spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda 3 dk. boyunca dakika başına değişen optik dansiteleri ölçüldü (Δ OD/dak.).

Sonuçların Hesaplanması;

AST aktivitesi (U/L) = (Δ OD/dak.) x 1746

2.2.3.5. ALT Aktivitesinin Belirlenmesi

IFCC'nin önerdiği yönteme göre AST'nin kinetik olarak tespiti spektrofotometre ile yapıldı (81).

Kullanılan Reaktifler

Reaktif 1:

Tris buffer, pH 7,8	110 mmol/L
L-Alanine	600 mmol/L
LDH	≥1500 U/L

Reaktif 2:

A-Ketoglutarate	16 mmol/L
NADH	0,24 mmol/L

ALT ölçüm prosedürü

Reaktif 1'den 1000 µl küvete kondu üzerine 100 µl örnek plazma eklendi son olarak Reaktif 2'den 100 µl eklendi ve karıştırıldı, 1 dk inkübasyona bırakıldı. Okuma işlemine geçilmeden önce distile su ile spektrofotometre sıfırlandı. İnkübasyondan sonra numunelerin spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda 3 dk boyunca dakika başına değişen optik dansiteleri ölçüldü (Δ OD/dak.).

Sonuçların Hesaplanması;

$$\text{ALT aktivitesi (U/L)} = (\Delta\text{OD/dak.}) \times 1746$$

2.2.4. İstatistiksel Analizler

Bu çalışmadan elde edilen veriler, ortalama değer \pm ortalama değer in standart hatası "Mean \pm SE" şeklinde gösterildi. Verilerin istatistiksel analizleri için SPSS istatistiksel analiz programı kullanıldı (Windows versiyon 10.0). Verilere tek yönlü varyans analiz yapıldı ve gruplar arasındaki istatistiksel fark Duncan testi ile belirlendi. Yapılan istatistiksel analizler sonucu elde edilen *P* değerlerinin <0.05 olması durumunda farkın önemli olduğu kaydedildi.

3. BULGULAR

3.1. Histopatolojik Bulgular

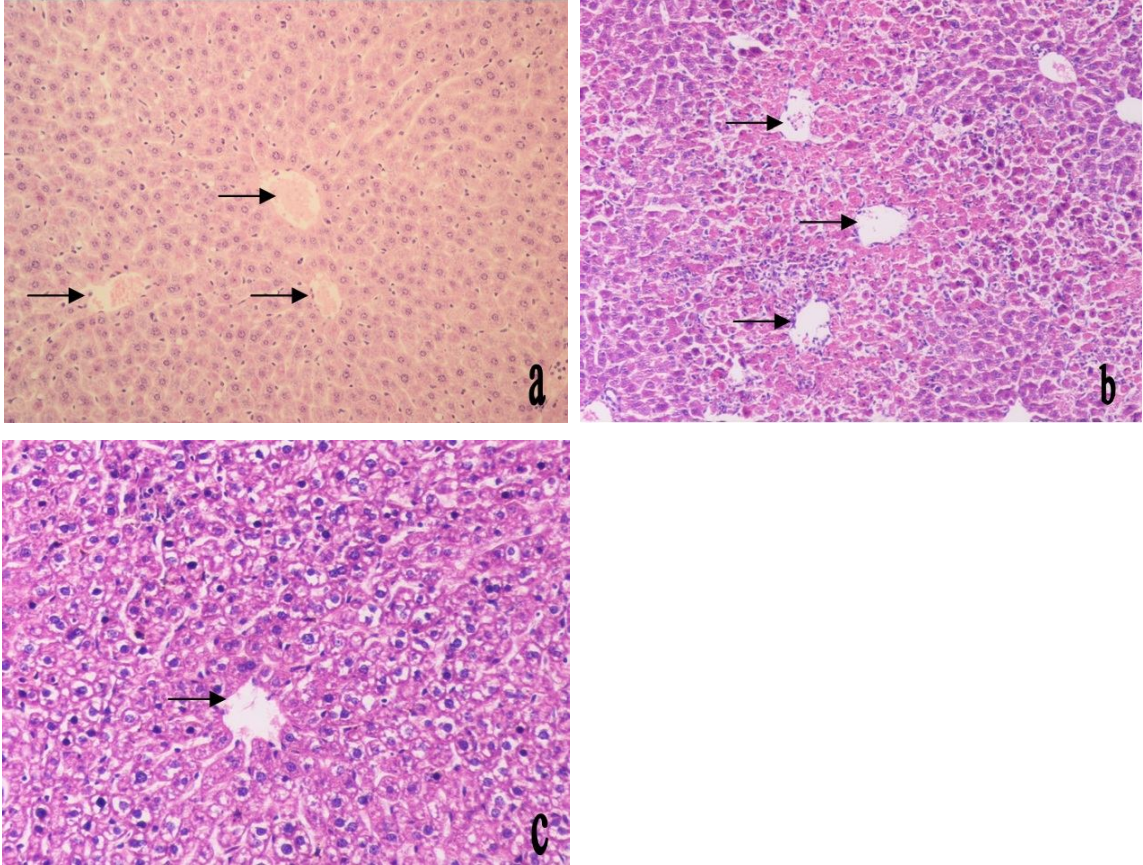
Bütün gruplardaki farelerden alınan karaciğer örneklerindeki karaciğer nekrozları semi-kantitatif olarak değerlendirildi. Materyal ve metotta bildirilen kriterlere göre karaciğer hasarı derecelendirildi (Tablo 3.1).

Kontrol gruplarındaki (1. Grup) bütün fare karaciğerlerinin normal olduğu tespit edildi (Resim 1a). Diğer yandan, Grup II'deki farelerin karaciğerlerinde şiddetli ve yaygın karaciğer nekrozu görüldü (Resim 1b). Bu nekrozların yaygın koagülatif tipte ve genelde periasiner yerleşimli oldukları dikkati çekti. Nekrotik bölgelerin dışında kalan hepatositlerde ise oldukça sınırlı ve hafif vakuoler ve hidropik dejenerasyonun bulunduğu tespit edildi. Nekrotik bölgelerde heterofil lökosit ve bazen de bunlara monosit infiltrasyonunun eşlik ettiği görüldü. Bazı bölgelerde nekroz odaklarının genişleyerek diğer nekroz odakları ile birleştiği dikkati çekti. Karaciğer parankiminde, nadiren periasiner bölgelerde, hafif bir safra kanalı hiperplazisi görüldü. Diğer yandan, Grup V ve Grup III'te karaciğer nekrozunun Grup I'deki fare karaciğerlerinde olduğu gibi bulunmadığı ya da çok hafif olduğu görüldü (Resim 1c). Yine, Grup IV ile Grup VI'da karaciğer nekrozunun yaygınlığının proanthosiyanidin etkisi ile Grup II'deki fare karaciğerlerine göre daha az olduğu fakat bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($P<0.05$) dikkati çekti.

Tablo 3.1: CCl₄ ve proantocyanidin uygulanan farelerde meydana gelen hepatosellüler nekrozun yaygınlığı.

Gruplar	Karaciğer	Hidropik ve Vakuoler
(n=7)	Nekrozu**	Dejenerasyon**
1. Grup I	0	6,14
2. Grup II	4,44*	0,99
3. Grup III	0,14	4,85
4. Grup IV	3,63*	4
5. Grup V	0	4,4
6. Grup VI	3,66*	2,33

*Kontrol grubuna göre önemli ($P < 0.05$); ** 0: normal karaciğer; 1: minimal; 2: hafif; 3: orta; 4: belirgin; 5: şiddetli karaciğer nekrozu ve/ ya da hidropik ve vakuolar dejenerasyon.



Resim 1. a: Normal karaciğer (Kontrol grubu) ve vena sentralisler (oklar); **b:** CCl₄ uygulaması (Grup II) sonucu vena sentralisler (oklar) etrafında şekillenen hepatosellüler nekroz; **c:** Grup V'da vena sentralis (ok) etrafındaki hepatositlerde nekrotik değişiklikler bulunmamasına rağmen hepatositlerde belirgin hidropik ve vakuoler dejenerasyon görülmekte (H.E. x20).

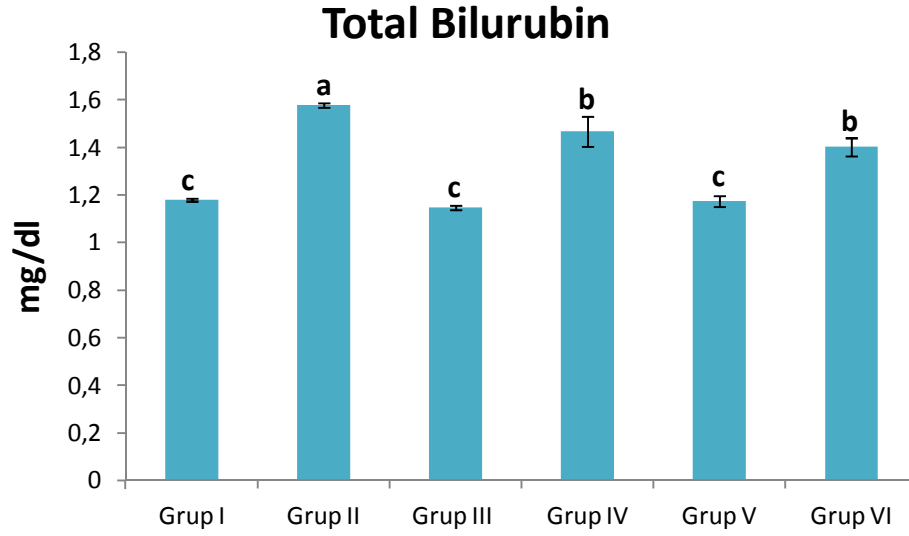
3.2. Biyokimyasal Bulgular

Biyokimyasal parametreler deney gruplarından alınan kan ve karaciğer dokusunda çalışıldı. Alınan kan numuneleri santrifüj edilerek serum ve plazmaya ayrıldı. Plazmada total bilirubin, AST, ALT, total antioksidan kapasite ve total oksidan kapasite değerleri spektrofotometrik olarak ölçüldü. Yine deney gruplarından alınan karaciğer örneklerinde de total antioksidan kapasite ve total oksidan kapasite değerleri spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Tablo 3.2: Plazma total bilirubin, AST, ALT, TAK ve TOS seviyeleri ile karaciğer dokusu TAK ve TOS seviyeleri analiz sonuçları ve gruplar arasındaki istatistiksel farklar.

Grup	I	II	III	IV	V	VI
Total Bilurubin (mg/dL)	1,180±0,006 ^c	1,577±0,009 ^a	1,147±0,009 ^c	1,467±0,063 ^b	1,173±0,023 ^c	1,402±0,038 ^b
AST (U/L)	122,71±19,89 ^b	4733,4±129,61 ^a	130,71±22,02 ^b	4701,4±144,4 ^a	133,17±5,99 ^b	4677,00±111,2 ^a
ALT (U/L)	26,14±2,14 ^d	4605,28±124,5 ^a	40,71±14,60 ^d	4089,4±314,8 ^b	24,00±2,59 ^d	3175,8±153,8 ^c
Plasma TAK (mmol Trolox eq/L)	0,895±0,068	0,680±0,044	0,757±0,043	0,700±0,043	0,814±0,076	0,719±0,062
Plasma TOS (μmol H₂O₂ eq /L)	6,443±0,471 ^b	13,676±2,805 ^a	6,857±0,666 ^b	9,080±1,205 ^b	6,594±0,558 ^b	9,036±0,834 ^b
Tissue TAK (μmol Trolox eq/g)	0,465±0,055 ^b	0,205±0,011 ^c	0,740±0,111 ^a	0,230±0,024 ^c	0,567±0,058 ^{ab}	0,235±0,035 ^c
Tissue TOS (nmol H₂O₂ eq/g)	6,274±0,246	9,159±1,366	7,322±0,686	8,425±1,014	6,513±0,450	7,467±0,669

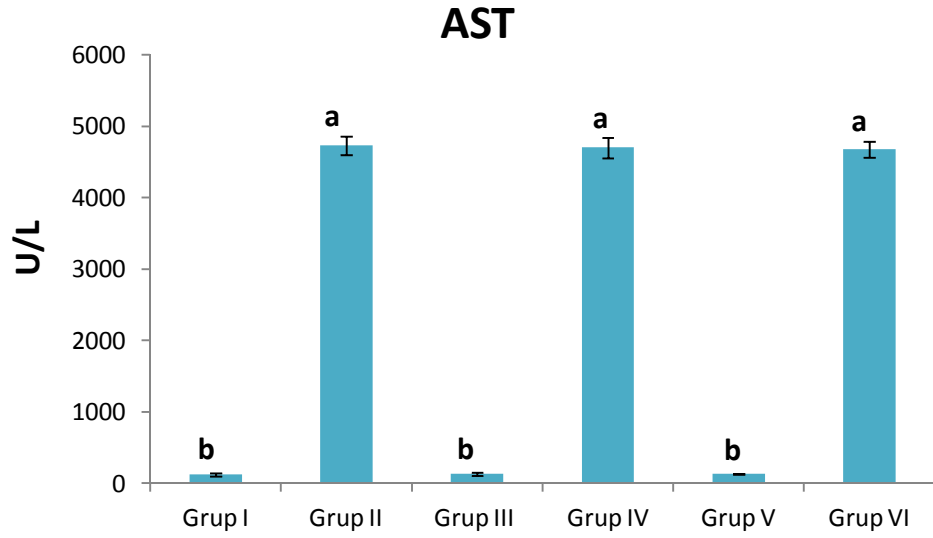
Veriler ortalama±standart hata olarak verildi. ^{a,b,c} ve ^d harfleri gruplar arasında fark olduğunu göstermektedir ($P<0,05$).



Veriler ortalama±standart hata olarak verildi. ^{a,b,c} harfleri gruplar arasında fark olduğunu göstermektedir ($P < 0,05$).

Şekil 3.1: Deney gruplarında yapılan Total Bilurubin (mg/dl) analiz sonuçları ve gruplar arasındaki istatistiksel farklar.

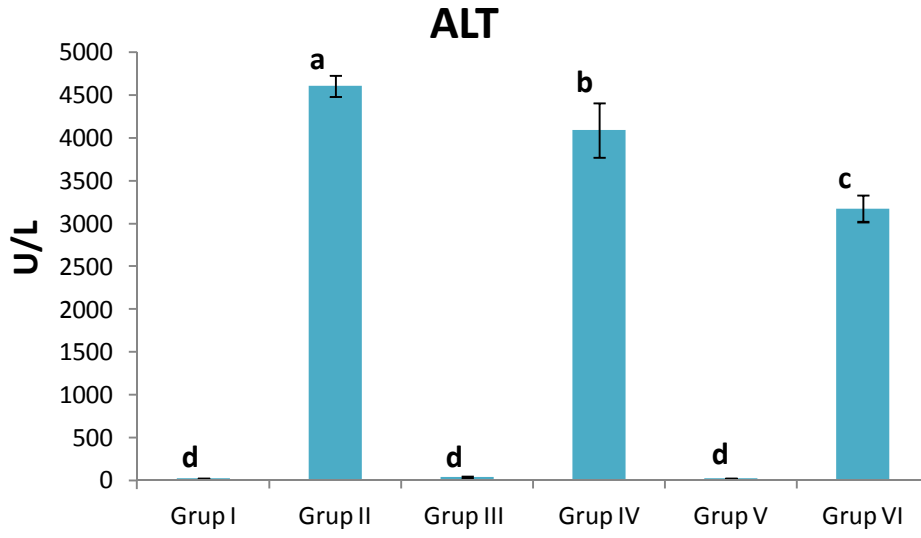
Total bilirubin düzeyi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, CCl_4 verilen grupta istatistiksel olarak önemli ölçüde bir artışın olduğu görülmektedir ($p < 0,05$). Yine kontrol grubu ile Pro10 ve Pro100 uygulanan gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir farkın olmadığı tespit edildi. Ayrıca, Pro10+ CCl_4 ve Pro100+ CCl_4 uygulanan grupların kendi aralarında istatistiksel olarak önemli bir farkın olmadığı, ancak bu gruplar yalnızca CCl_4 uygulanan grup ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bir farkın olduğu tespit edildi ($p < 0,05$) (Tablo 3.2, Şekil 3.1).



Veriler ortalama±standart hata olarak verildi. ^{a,b} harfleri gruplar arasında fark olduğunu göstermektedir ($P < 0,05$).

Şekil 3.2: Deney gruplarında yapılan AST (U/L) analiz sonuçları ve gruplar arasındaki istatistiksel farklar.

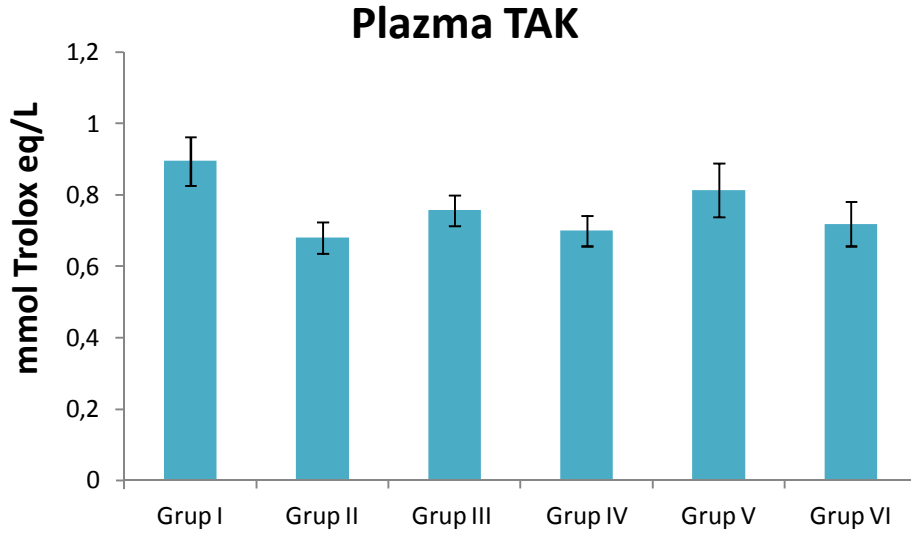
Karaciğer AST seviyesinde kontrol grubuna göre CCl_4 , Pro10+ CCl_4 ve Pro100+ CCl_4 uygulanan gruplarda istatistiksel açıdan önemli bir artışın meydana geldiği görülmüştür ($p < 0,05$). CCl_4 , Pro10+ CCl_4 ve Pro100+ CCl_4 uygulanan grupların kendi aralarında istatistiksel olarak bir fark tespit edilmemiştir. Yine kontrol grubu ile Pro10 ve Pro100 uygulanan gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark görülmemiştir ($p < 0,05$) (Tablo 3.2, Şekil 3.2).



Veriler ortalama±standart hata olarak verildi. ^{a,b,c,d} harfleri gruplar arasında fark olduğunu göstermektedir ($P < 0,05$).

Şekil 3.3: Deney gruplarında yapılan ALT (U/L) analiz sonuçları ve gruplar arasındaki istatistiksel farklar.

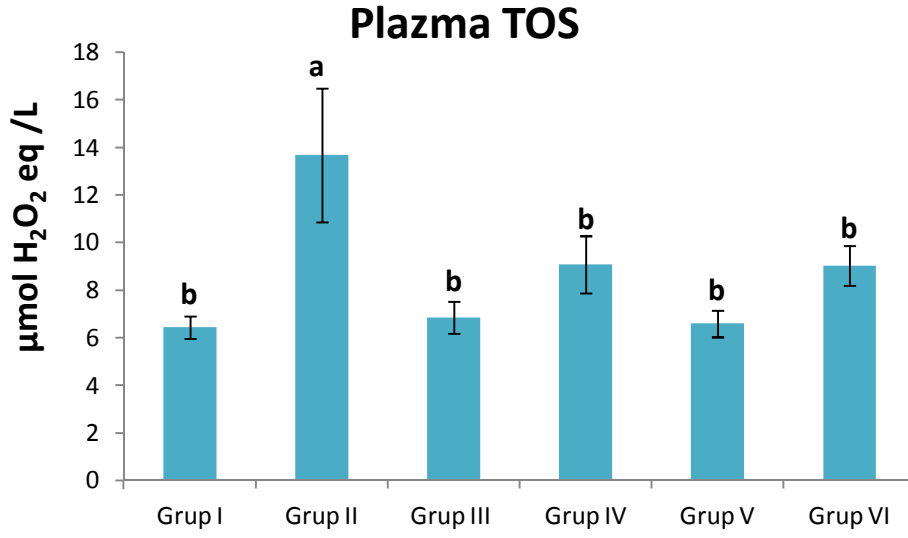
Karaciğer ALT seviyesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, CCl_4 , Pro10+ CCl_4 ve Pro100+ CCl_4 uygulanan gruplarda istatistiksel olarak önemli ölçüde artış göstermiştir. Ayrıca, CCl_4 , Pro10+ CCl_4 ve Pro100+ CCl_4 uygulanan gruplar kendi aralarında kıyaslandığında, Pro10+ CCl_4 ve Pro100+ CCl_4 uygulanan grupların yalnızca CCl_4 uygulanan gruba göre karaciğer ALT düzeyinde istatistiksel olarak önemli bir azalmanın olduğu tespit edilmiştir. Yine Pro10+ CCl_4 ve Pro100+ CCl_4 uygulanan gruplar arasında, Pro100+ CCl_4 uygulanan grupta Pro10+ CCl_4 grubuna göre karaciğer ALT düzeyinde istatistiksel açıdan önemli bir azalmanın olduğu görülmüştür ($p < 0,05$). Kontrol gurubu ile Pro10 ve Pro100 uygulanan gruplar arasında ise istatistiksel açıdan önemli bir farkın olmadığı tespit edilmiştir ($p < 0,05$) (Tablo 3.2, Şekil 3.3).



Veriler ortalama±standart hata olarak verildi.

Şekil 3.4: Deney gruplarında yapılan plazma TAK (mmol/L Trolox equivalent/L) analiz sonuçları.

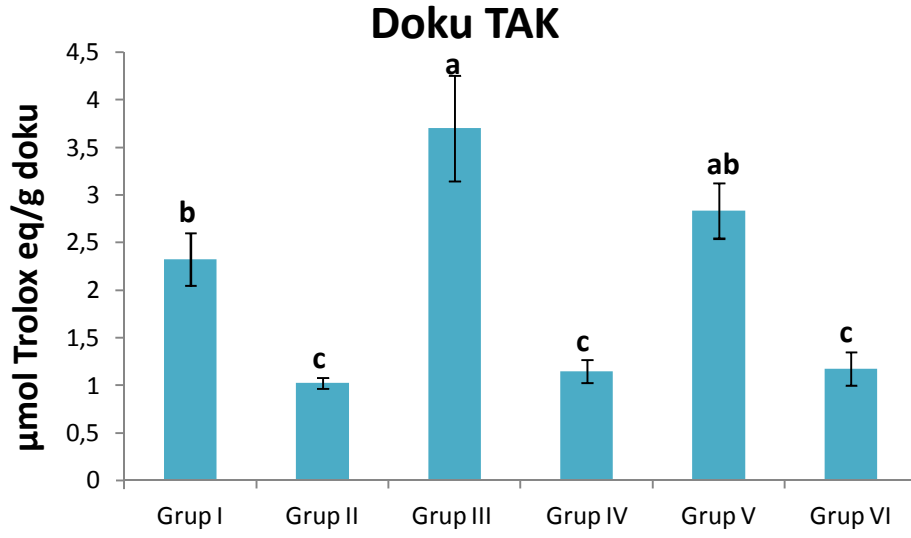
Plazma total antioksidan kapasitelerinde (TAK) gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark tespit edilmemiştir. Ancak, proanthocyanidin uygulamasının CCl_4 uygulamasına bağlı olarak meydana gelen total antioksidan kapasitelerindeki (TAK) azalmayı nispeten önlediği gözlenmiştir ($p<0.05$) (Tablo 3.2, Şekil 3.4).



Veriler ortalama±standart hata olarak verildi. ^{a,b} harfleri gruplar arasında fark olduğunu göstermektedir ($P < 0,05$).

Şekil 3.5: Deney gruplarında yapılan plazma TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equivalent/L) analiz sonuçları ve gruplar arasındaki istatistiksel farklar.

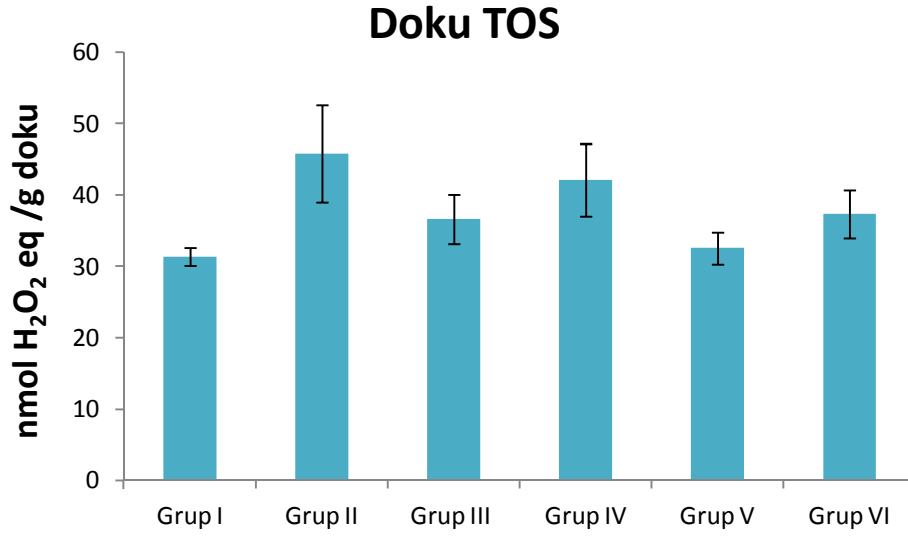
Plazma total oksidan seviyelerinde (TOS) gruplar arasında kıyaslama yapıldığında, yalnızca CCl_4 uygulanan grupta diğer gruplara göre istatistiksel olarak önemli ölçüde bir artışın olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Diğer gruplar kendi aralarında kıyaslandığında istatistiksel olarak önemli bir fark gözlenmemiştir. Ancak, CCl_4 uygulamasına bağlı olarak ortaya çıkan oksidasyon olayında proanthocyanidin (Pro10+ CCl_4 ve Pro100+ CCl_4) uygulamasının bu oksidasyonu nispeten azalttığı görülmüştür (Tablo 3.2, Şekil 3.5).



Veriler ortalama±standart hata olarak verildi. ^{a,b,c} harfleri gruplar arasında fark olduğunu göstermektedir ($P < 0,05$).

Şekil 3.6: Deney gruplarında yapılan karaciğer dokusu TAK (µmol Trolox equivalent/g doku) analiz sonuçları ve gruplar arasındaki istatistiksel farklar.

Doku total antioksidan kapasitelerinde (TAK) gruplar arasında kıyaslama yapıldığında, kontrol grubuna göre CCl_4 , Pro10+ CCl_4 ve Pro100+ CCl_4 uygulanan gruplarda TAK seviyesinde istatistiksel olarak önemli ölçüde bir azalmanın olduğu tespit edilmiştir. Yine Pro10 uygulamasının kontrol grubu ile CCl_4 uygulanan gruplara (CCl_4 , Pro10+ CCl_4 ve Pro100+ CCl_4) göre dokuda total antioksidan kapasitede istatistiksel olarak önemli bir ölçüde artışa yol açtığı görülmüştür. Ayrıca, yalnız başına Pro100 uygulanan grupta TAK seviyesinde CCl_4 uygulanan gruplara (CCl_4 , Pro10+ CCl_4 ve Pro100+ CCl_4) göre istatistiksel olarak önemli bir artışın olduğu görülmektedir ($p < 0,05$) (Tablo 3.2, Şekil 3.6).



Veriler ortalama±standart hata olarak verildi.

Şekil 3.7: Deney gruplarında yapılan karaciğer dokusu TOS (nmol H₂O₂ equivalent/g doku) analiz sonuçları.

Doku total oksidan seviyelerinde (TOS), gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark tespit edilmemiştir. Ancak, CCl₄ uygulamasına bağlı olarak oluşan oksidasyona karşı proanthocyanidin kullanımının bu oksidasyon olayını nispeten azalttığı görülmüştür (Tablo 3.2, Şekil 3.7).

4. TARTIŞMA

Karaciğer hasarında, oksidatif stres ve bunu takiben oluşan toksik serbest radikaller işe karışmaktadır (56,63). Bu oluşan serbest radikal türleri, lipit peroksidasyonuna ve diğer yollarla karaciğerde hepatositlerin hücre membranlarını bozarak etki göstermektedirler (55).

Karaciğer hasarı için sık kullanılan maddelerden biri olan CCl₄'ün hepatotoksik etkisi, reaktif ara ürünlerinin metabolik aktivasyonuna ve lipit peroksidasyonundaki artışa bağlı olup; parçalanma ürünleri de hücrelerde birikerek hasarın daha fazla ağırlaşmasına yol açmaktadır (56). CCl₄; karaciğer, timus, lenf düğümleri, dalak, böbrek, pankreas gibi birçok doku üzerinde tahribat yapmaktadır (57,58). Çalışmamızda da CCl₄ verilen farelerin karaciğerinde şiddetli ve yaygın karaciğer nekrozu olduğu gözlemlendi (Resim 1b). Bu nekrozların ve dejenerasyonların yaygın koagülatif tipte ve genelde periasiner yerleşimli olduğu tespit edildi. Nekrotik bölgelerde heterofil lökosit ve bazen de bunlara monosit infiltrasyonunun eşlik ettiği saptandı. Bazı bölgelerde nekroz odaklarının genişleyerek diğer nekroz odakları ile birleştiği dikkat çekti. Ayrıca, nekrotik alanların dışında kalan hepatositlerde ise oldukça sınırlı ve hafif vakuoler ve hidropik dejenerasyonun meydana geldiği görüldü.

Arosio ve ark.; yaptıkları çalışmada 3 mg/kg CCl₄ uygulandıktan 24 saat sonra sitoplazmik vakuolizasyon, yağlı karaciğer ve sentrilobüler alanda orta derecede hepatosit nekroz meydana geldiğini saptamışlardır (60). Şahin ve ark.; sadece CCl₄ kullanarak karaciğerde meydana gelen histolojik değişiklikler üzerine araştırma yapmışlardır. Onbeş gün süreyle sıçanlara 1.5 ml/kg dozda CCl₄ uygulamışlar ve çalışma sonunda karaciğer lobçuklarında periasiner ve portal bölgelerde hidropik dejenerasyon, koagülasyon nekrozu ve fibrozis ile çoğunluğu mononükleer daha az nötrofil lökositlerden oluşan hücresel eksudasyonun oluştuğunu tespit etmişlerdir (59). Yine Sotelo-Felix ve ark.; CCl₄'ün karaciğerde ödem, sitoplazmik şişme ve nükleer piknozis ile karakterize hepatosit bozulmasına

yol açtığını bir başka çalışmada tespit etmişlerdir (61). Çalışmamızda karbon tetraklorürün tek doz halinde ve 1 ml/kg intraperitoneal yolla uygulanması sonucu karaciğer parankiminde hiperplazisi, nadiren periasiner bölgelerde, hafif bir safra kanalı hiperplazisi tespit edildi. Hiperplazinin periasiner bölgede ve safra kanalında hafif seyretmesinin sebebi dozun daha düşük olması ve tek doz halinde uygulanması sonucu oluştuğu düşünülmektedir.

Parmaksız; sıçanlarda CCl₄'ün neden olduğu karaciğer hasarı üzerinde *Hypericum perforatum* L. (Binbirdelik otu), *Urtica dioica* L. (Isırgan otu), *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze (Yeşil çay), bitkilerinden elde edilen özütlerin koruyucu etkileri üzerine bir araştırma yapmıştır. Karbon tetraklorür toksisitesinin biyokimyasal parametrelerden ALT, AST, ALP ve Kreatinin üzerine etkisi ile malondialdehit (MDA) ve glutasyon aktivitelerini incelemiştir. Diğer taraftan bu bitkilerin karaciğer üzerinde ki histolojik değişimlerine bakmıştır. Sonuç olarak, *Hypericum perforatum* L.(Binbirdelik otu) ile *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze (Yeşil çay) anlamlı bir şekilde ALT, AST ve ALP konsantrasyonları düşürürken, *Urtica dioica* L. (Isırgan otu)'nın etkisinin olmadığını saptamıştır. Ayrıca, bu bitki türlerinden elde edilen özütlerin MDA konsantrasyonu düşürürken, GSH konsantrasyonunu yükselttiği belirlenmiştir (62).

Kaya ve ark.; karbon tetraklorür verilen ratlarda oluşturulan deneysel hepatik fibrozis (HF) modelinde metforminin (MET) HF gelişimini etkileyip etkilemediğini araştırmışlardır. Deneme gruplarında ALT ve MDA seviyesi CCl₄ uygulanan grupta oldukça yüksek bulunmuştur. SOD aktivitesi tedavi grubunda, CCl₄ grubundan düşük ancak kontrol grubundan yüksek bulunmuştur. CCl₄ grubunda CAT aktivitesi diğer gruplardan düşük, tedavi grubunda kontrol grubundan yüksek olarak tespit edilmiştir. HYP düzeyleri CCl₄ grubunda diğer gruplardan yüksek bulunurken tedavi ve kontrol grupları arasında herhangi bir fark saptanmamıştır. Isaak skorlaması sonucunda CCl₄ grubundaki nekroinflamatuvar aktivite diğer gruplardan yüksek bulunmuştur, tedavi ve kontrol grupları arasında anlamlı fark tespit edilmemiştir. Model grupta ise fibrozis skorunun oldukça yüksek olduğunu görmüşlerdir. Tedavi grubunda kontrol grubuna göre bir miktar daha az oluştuğu görülse de, hepatik

fibrozisin engellenemediğini tespit etmişlerdir. Bununla birlikte MET'in antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleri nedeniyle karaciğerde fibrozisin nedeni olan inflamasyonu baskıladığı saptanmıştır(64).

Eralp ve ark.; karbon tetraklorüre bağlı oluşan akut karaciğer hasarında mast hücre sayısındaki değişikliği ve antioksidan olarak E vitamininin bu değişikliğe etkisini araştırmışlardır. Deney sonunda sıçanlardan alınan karaciğer dokusunda, biyokimyasal olarak MDA değerlerini Biuret metodu ile saptamışlardır. Karaciğerin histolojik incelemesi olarak; mast hücrelerinin sayılması yanında Brunt skorlama sistemi ile morfolojik incelemeler yapmışlardır. Kontrol grubunda histolojik görünüm, mast hücre sayısı ve MDA değerlerini normal olarak bulmuşlardır. CCl₄ grubunda, III. zonda yoğun steatosiz ve hepatositlerde irileşme izlenirken, mononükleer hücre infiltrasyonu ve safra duktus proliferasyonu gözlemlenmiş ve mast hücre sayısı ile MDA değerlerini oldukça yüksek tespit etmişlerdir. CCl₄ ve E vitamininin eş zamanlı verildiği ve önce E vitamini uygulamasından sonra CCl₄ uygulanan gruplarda histomorfolojik yapı korunmuş, CCl₄ grubuna göre mast hücre sayıları düşmüş ve MDA değerleri azalmış olarak saptanmıştır (p<0, 05). Sonuç olarak, deneysel akut karaciğer hasarında portal alanlarda belirgin olarak mast hücre sayısı artmıştır. E vitamininin antioksidan etkisini, MDA değerlerini düşürmesinin yanında, karaciğer morfolojisini koruyarak ve mast hücre sayısındaki artışı engelleyerek etki gösterdiğini tespit etmişlerdir(65).

Göker ve Özmen; kuru ısırgan otu yaprağının, sıçanlarda karbon tetraklorür ile oluşturulan lipid peroksidasyonu üzerine inhibe edici etkisini araştırmışlardır. Uygulamadan sonra deney hayvanlarından alınan kan örneklerinde plazma ALT ve AST enzim düzeyleri ile plazma lipid peroksit düzeyleri ve karaciğerlerinde lipid peroksit düzeyleri ile glutatyon düzeylerini incelenmişlerdir. Kontrol + karbon tetraklorür verilen sıçanlarının plazma ALT ve AST enzim düzeyleri, ısırgan otu + karbon tetraklorür verilen sıçanlar ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu iki grubun plazma lipid peroksit düzeyleri arasında ise istatistiksel anlamda bir fark bulunmadığı gözlenmiştir. Diğer taraftan; yine bu iki grupta ölçülen karaciğer glutatyon ve karaciğer lipid peroksit düzeyleri kıyaslandığında, ısırgan otu

+ karbon tetraklorür grubu sıçanlarında bulunan değerlerin kontrol + karbon tetraklorür grubundaki sıçanlara göre anlamlı bir şekilde azalma olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak, ısırgan otu yaprağının lipit peroksidasyonunu inhibe edici etkisinin olduğu ve bununla antioksidan özelliği ile ilişkili olduğu kanısına varılmıştır(66).

Bizim çalışmamızda da CCl_4 uygulamasına bağlı olarak gelişen karaciğer hasarına karşı proanthocyanidin 10 mg/kg/gün ve 100 mg/kg/gün koruyucu olarak kullanıldı. CCl_4 + Pro10 ve CCl_4 + Pro100 uygulanan deney hayvanlarının karaciğer nekrozunun yaygınlığının proanthocyanidin etkisi ile yalnızca CCl_4 uygulanan deney hayvanlarına göre daha az olduğu tespit edildi.

Yine çalışmamızda, CCl_4 'e bağlı olarak plazma total bilirubin düzeyinde önemli ölçüde bir artışın meydana geldiği görülmüştür. Karbon tetraklorür ile birlikte koruyucu olarak uygulanan proanthocyanidin ise plazma total bilirubin düzeyini anlamlı bir şekilde düşürdüğü tespit edilmiştir. Ayrıca, karaciğer AST ve ALT düzeyleri CCl_4 uygulamasına bağlı olarak artış göstermiştir. CCl_4 uygulamasına bağlı olarak karaciğer AST düzeyinde ki artış proanthocyanidin uygulamasıyla nispeten azalmıştır. Karaciğer ALT düzeyi CCl_4 ve CCl_4 ile birlikte koruyucu olarak kullanılan proanthocyanidin gruplarında önemli ölçüde artış göstermiştir. Ancak, CCl_4 + Pro10 ve CCl_4 + Pro100 uygulanan deney hayvanlarının karaciğer ALT düzeyleri yalnız başına CCl_4 uygulanan deney hayvanlarına göre oldukça düşük göstermiştir. ALT düzeyinde ki bu azalma proanthocyanidin uygulanan dozuna bağlı olarak paralellik göstermiştir.

Aneja ve ark.; yaptıkları bir çalışmada, fitoöstrojenlerden genistein ve daidzein uygulaması sonucunda CCl_4 'e bağlı olarak gelişen karaciğer hasarının, hepatik glutatyon-S transferaz ve hepatik glutatyon tarafından engellendiğini ve lipit peroksidasyonunun önemli ölçüde önlendiğini saptamışlardır (77).

CCl_4 'ün ortaya çıkardığı karaciğer harabiyetini önlemede izoflavonların antioksidan olarak önemli bir rolünün olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (68,69,70). Üstündağ ve ark.; yaptıkları bir çalışmada; soy izoflavonların deneysel

olarak oluşturulan CCl₄ hasarına bağlı gelişen karaciğer hasarını önlemede etkili olduğunu, artmış olan lipit peroksidasyonu ürünlerinin azaldığını ve soy izoflavonların antioksidan özelliğe sahip paraoksonaz enzimini stimule edici etkisinin olduğunu tespit etmiştir (70).

İzoflavonlar dışında başka antioksidan moleküllerinde CCl₄ kullanımına bağlı oluşan karaciğer toksisitesini engellediği bildirilmektedir (71,72,73). Yapılan çalışmalarda ratlarda CCl₄ uygulanmasıyla oluşturulan karaciğer hasarı üzerine profilaktik olarak E vitamini verilmesinin bu hasarı önleyebileceği belirtilmektedir (71,72). Erdoğan ve ark.; yaptıkları bir çalışmada ratlarda CCl₄ ile oluşturulan akut karaciğer hasarı modelinde C ve E vitaminlerinin karaciğer hasarını önleyici etkilerinin olduğunu biyokimyasal ve histopatolojik olarak tespit etmişlerdir (73)

Devay; CCl₄ ile deneysel olarak siroz oluşturulan rat karaciğer dokularında oksidatif stres ve lipit peroksidasyonunu incelemek için malondialdehid (MDA) seviyeleri ve radikal metabolizmasında koruyucu role sahip antioksidan enzimlerden süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (CAT) enzim aktivitelerini çalışarak, oluşturulmaya çalışılan fibrozis üzerine güçlü bir antioksidan olan Stobadin'in etkisini incelemiştir. Siroz oluşumu CCl₄ 'ün 8 hafta boyunca artan dozlarda intraperitoneal olarak uygulayarak; Stobadin tedavisini ise 8 hafta boyunca oral olarak 24.7mg/kg/gün stobadin uygulayarak yapmıştır. Tüm parametreleri spektrofotometrik olarak çalışmıştır. Stobadin + CCl₄ uygulanan grupta katalaz enzim aktivitesindeki artışa rağmen ciddi lipit peroksidasyonu ve histopatolojik değişikliklerin gözlenmesi hidrojen peroksitin katalizinde GSH-Px'in daha önemli olduğu sonucuna ulaşmıştır (67).

Yapılan çalışmalarda CCl₄ uygulamasına bağlı olarak gelişen karaciğer hasarının oluşumu esnasında reaktif oksijen türlerinin üretiminde meydana gelen aşırı artış ve buna bağlı olarak antioksidan enzimlerden SOD ve GSH-Px düzeylerinde anlamlı bir şekilde azalmanın meydana geldiği belirtilmektedir. Dolayısı ile antioksidan enzimler ile karaciğer hasarı, fibrozis ve lipit peroksidasyon düzeyleri arasında ters bir korelasyonun olduğu görülmektedir (28,29,78). Yılmaz ve

ark.; CCl₄ ile siroz oluşturulmuş ratlarda GSH-Px ve G6PDH enzim düzeylerindeki düşmeye bağlı olarak süperoksit radikallerinin aşırı düzeyde arttığını ve serbest radikallerin siroz gibi karaciğer hastalıklarının patogenezinde rol oynayabileceğini bildirmişlerdir (29).

Oksidatif stres sonucu açığa çıkan serbest oksijen radikallerine bağlı olarak gelişen hücresel hasarın; kanser, aterosklerotik kalp hastalıkları, karaciğer hastalıkları ve toksik hücre hasarları gibi patogeneze sorumlu olduğu rapor edilmiştir(74,75). Wang ve ark.; melatonin uygulaması ile CCl₄ uygulanmış ratlarda, karaciğerde fibrozisin gerilediğini ve antioksidan enzimlerden olan süperoksit dismutaz (SOD) ile glutatyon peroksidaz (GSH-Px) düzeylerinde artış meydana geldiğini tespit etmişlerdir (76).

Yaptığımız çalışmada, CCl₄ farelerin plazma ve karaciğer dokusunda TOS artışa yol açmıştır ve buna bağlı olarak oksidatif stresi arttırdığı tespit edilmiştir. Bu artışın dokularda oluşan serbest radikal miktarlarında ki artışa bağlı olduğu düşünülmektedir. Karbon tetraklorür uygulamasına bağlı olarak gelişen oksidasyon olayında proanthocyanidin kullanımının bu oksidasyonu nispeten azalttığı gözlemlenmiştir. Yine CCl₄ uygulaması farelerin plazma ve karaciğer dokusunda TAK seviyesinde azalmaya neden olmuştur. Proanthocyanidin uygulaması CCl₄'e bağlı olarak meydana gelen plazma TAK seviyesindeki ki azalmayı nispeten önlemiştir. Ayrıca, farelerin karaciğer dokusunda CCl₄'e bağlı olarak oluşan TAK seviyelerindeki azalma proanthocyanidin uygulaması ile nispeten artış göstermiştir. Bu durum serbest radikallerin neden olduğu oksidatif etkiye karşı proanthocyanidin antioksidatif bir etki gösterdiği anlamına gelmektedir.

5. SONUÇ

Sonuç olarak, CCl₄'ün karaciğer hasarı oluşturduğu hem biyokimyasal hemde histopatolojik veriler ışığında tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışmada proanthosiyanidinin doza bağlı olarak bu hasarı önemli ölçüde azalttığı tespit edildi. Biyokimyasal verilerden plazma Total bilirubin, AST, ALT, TAK ve TOS ile karaciğer dokusu TAK ve TOS değerlerindeki değişimlerin proanthosiyanidinin dozu ile doğru orantılı olarak kontrol grubuna yaklaştığı tespit edildi. Özellikle 100mg/kg dozda proanthosiyanidinin ağız yolu ile kullanımının karaciğer üzerinde koruyucu etkisinin daha fazla olduğu sonucuna varıldı. Bu verilere dayanarak özellikle karaciğer üzerine toksik tesirleri olan çevre kirleticilere karşı korunmada proanthosiyanidin kullanılmasının yarar sağlayacağını düşünmekteyiz. Ayrıca çalışmamızın, proanthosiyanidinin diğer toksik ajanlara karşı koruyucu etkisinin bulunup bulunmadığı konusunda yeni çalışmalar içinde temel oluşturacağını düşünmekteyiz.

6. ÖZET

Bu çalışmada karbontetraklorür ile karaciğer hasarı oluşturulan farelerde, karaciğerin histopatolojisi ve alınan plazma örneklerinde, Total antioksidan kapasite (TAK), total oksidan seviye (TOS), ALT, AST aktiviteleri ile Total bilirubin düzeyleri ve karaciğer dokusu TAK ve TOS düzeyleri belirlenerek, güçlü bir antioksidan olan proanthosiyaninin koruyucu etkisi incelendi.

Çalışmada 3 aylık, 42 adet Swiss albino fare kullanıldı. Fareler her grupta 7 hayvan olmak üzere 6 ayrı gruba ayrıldı. İlk gruba kontrol grubu olarak herhangi bir uygulama yapılmadı. İkinci gruptaki hayvanlara ise sadece karbontetraklorür diğer gruplarla aynı zamanda uygulandı. Üçüncü ve Beşinci gruplara proanthocyanidin 10 mg/kg/gün ağız yolu ile 7 gün verildi. Dördüncü ve Altıncı gruplara proanthocyanidin 100 mg/kg/gün ağız yolu ile 7 gün verilmiştir. Dördüncü ve Altıncı gruplara son proantosiyanidin uygulamasından 1 saat sonra zeytin yağında çözdürülen (1/3 v/v) karbontetraklorür tek doz 1 ml/kg intraperitoneal uygulandı. Son uygulamadan 24 saat sonra farelere servikal dislokasyon yapılarak kan alındı ve ardından sistemik nekropsileri yapıldı. histopatolojik inceleme için alınan doku örnekleri kesitler HE ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi. Alınan plazma örneklerinde, TAK, TOS, ALT, AST aktiviteleri, Total bilirubin düzeyleri ile karaciğer dokusu TAK ve TOS seviyeleri spektrofotometrik olarak belirlendi.

Çalışmada CCl₄ ile toksikasyon yapılan grupla kontrol grubu karşılaştırıldığında; plazma Total Bilirubin seviyesi, TOS, AST ve ALT aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış ($P<0.05$); karaciğer doku TAK ise anlamlı derecede azalmıştır ($P<0.05$). aynı zamanda histopatolojik olarak CCl₄ grubunda nekrotik değişiklikler gözlenmiştir. total bilirubin düzeyi ve ALT enzim aktivitesinde Pro10+ CCl₄ ve Pro100+ CCl₄ uygulanan grupların CCl₄ uygulanan grup ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli ölçüde azaldığı tespit edildi ($p<0.05$). Plazma TOS düzeyi Pro10+ CCl₄ ve Pro100+ CCl₄ uygulanan grupların

CCl₄ uygulanan grup ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli ölçüde azaldığı (p<0.05) ve kontrol grubuna yaklaştığı tespit edildi.

Sonuç olarak, yapılan bu çalışmada proanthosiyanidin doza bağlı olarak karaciğer hasarı önemli ölçüde azalttığı tespit edildi. Özellikle 100mg/kg dozda proanthosiyanidin ağız yolu ile kullanımının karaciğer üzerinde koruyucu etkisinin daha fazla olduğu sonucuna varıldı.

7. SUMMARY

In this study, the liver histopathology and plasma samples total antioxidant capacity (TAC), total oxidant status (TOS), ALT, AST, total bilirubin levels and liver tissue TAC and TOS levels are determined, the preventive effect of a powerful antioxidant Proanthocyanidine was investigated on mice experimentally liver damage induces with CCl₄.

Forty-two, 3 months, male Swiss albino mice were used in this study. The mice were divided into six separate to 7 animals in each group. Group I control, Group II received CCl₄ (1 ml/kg i.p., single dose), Groups III and IV received proanthocyanidin 10 mg/kg/day to 7 days by oral gavage, Groups V and VI received proanthocyanidin 10 mg/kg/day to 7 days by oral gavage. one hour after the last applications of proanthocyanidin Group IV and VI received single dose CCl₄ (1 ml/kg i.p., single dose).

24 hours after the last application Cervical dislocation were performed to mice, then blood sample were taken. Tissue samples were taken after histopathological examination. Tissue sample were examined under a light microscope. Plasma samples TAC, TOS, ALT and AST activities, Total bilirubin levels and liver tissue TAC and TOS levels were determined spectrophotometrically.

In the study groups (Groups III-VI) and control group (Group I) were compared to CCl₄ intoxication Group (Group I) with the plasma levels of total bilirubin, TOS, AST and ALT activities, a statistically significantly increase ($P < 0.05$) in liver tissue TAC was significantly decreased ($P < 0.05$). Histopathological examination showed necrotic changes in CCl₄ group at the same time. Pro100+CCl₄ and Pro10 + CCl₄ treated group compared with the CCl₄ groups the level of total bilirubin and ALT enzyme activity was statistically decrease ($p < 0.05$). Plasma levels of TOS Pro100+CCl₄ and Pro10 + CCl₄ treated group compared with the CCl₄

groups was statistically significantly decreased ($p < 0.05$) and these values were approached the control group.

In conclusion, in this study proanthocyanidin significantly reduce hepatic damage in a dose-dependent manner. In particular, a dose of 100mg/kg orally of proanthocyanidin concluded that the use of more protective effect on the liver.

8. KAYNAKLAR

1. Guyton, A.C.: Textbook of Medical Physiology. Eighth Edit. W.B. Saunders Company. Philadelphia. 1991.
2. Doi, K., Kurabe, S., Shimazu, N. and Inagak, M.: Systemic histopathology of rats with CCl₄-induced hepatic cirrhosis. *Laboratory Animals*. 25: 21-25. 1991.
3. Ariosto, F., Riggio, O., Cantafora, A., Colucci, S., Gaudoi, E., Mechelli, C., Merli, S., Seri, S. and Capocacia, L.: Carbon tetrachloride - induced experimental cirrhosis in the rat: A reappraisal of the model. *Eur. Surg. Res*. 21: 280-286. 1989.
4. Fischer, A., Poulsen, H.E., Hansen, B.A., Hage, E., and Keiding, S.: CCl₄ cirrhosis in rats: irreversible histological changes and differentiated functional impairment. *Journal of Hepatology*. 12: 110-117. 1991.
5. Masaki, N., Yamada, S., Orgata, I., Ohta, Y., and Fujiwara, K.: Enhancement of Carbon Tetracholired-Induced Liver Injury by Glucagon and Insulin Treatment. *Res. Exp. Med*. 188: 27-33. 1988.
6. Junqueira, L.C., Carneiro, J. and Kelley, R.O.: Basic Histology. Seventh Edit. Prentice Hill International Inc. New Jersey. 1992.
7. Kakehashi, R., Watanabe, S., Ikoma, J.,and Suzuki, S.: Blood Chemistry, Hematology of Patients with Liver Cirrhosis. *Nippon Rinsho (Japan)*. 52(1): 45-49. 1994.
8. Fujiwara, K., Oka, Y., Ogata, I., Ohta, Y., Sato, Y., Masaki, N., Takatsuki, K., and Oka, H.: Exchange Blood Transfussion for Acute Hepatic Failure: Its Limited Availability Depending on the Type of Injury in Rats. *International Society for Artificial Organs*. 12(3): 227-233. 1988.

9. Ozeki, T., Funakoshi, K. and Iwaki, K.: Rapid Induction of Chirrosis by administration of Carbon-Tetrachloride Plus Phospholipase D., *British Journal of Experimental Pathology*. 66: 385-390. 1985.
10. Vural, N.: Toksikoloji. Ankara Üniv. Eczacılık Fak. Yay. No: 56. Ankara. 1984.
11. Masquelier, J.: Perfumes, Cosmetiques, Aromes. Oct.-Nov. 89-97. 1997.
12. Facino, R.,M., Carini, M., Aldini, G., Bombardelli, E., Morazzoni, P., and Morelli, R.: *Drug Res*. 44-592-601. 1994.
13. Nutall ,S. L., Kendall, M. J., Bombardelli, E.,and Morazzoni ,P. J.: *Clin.Pharm Ther*. 23. 385-389. 1998.
14. Özel Y.: Ratlarda Karaciğer İskemi/Reperfuzyon Hasarında Grape Seed Proanthocyanidin'in Koruyucu Etkilerinin İncelenmesi. Uzmanlık Tezi. 5. Genel Cerrahi Kliniği. Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi. 2006.
15. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR): Toxicological Profile for Carbon Tetrachloride. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. 2005.
16. Thrall, K.D., Vucelick, M.E., Gies, R.A., Zangar, R.C., Weitz, K.K., Poet, T.S., Springer, D.,L, Grant, D.,M, and Benson, J.,M.: Comparative metabolism of carbon tetrachloride in rats, mice, and hamsters using gas uptake and PBPK modeling. *J Toxicol Environ Health A*. 60: 531-548. 2000.
17. Weber, L.W., Boll, M., and Stampfl, A.: Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol*. 33: 105-136. 2003.

18. Rao, P.S., Mangipudy, R.S., Mehendale, H.M.: Tissue injury and repair as parallel and opposing responses to CCl₄ hepatotoxicity: a novel dose-response. *Toxicology*. 118: 181-193. 1997.
19. Abraham, P., Wilfred, G., Cathrine, S.P.: Oxidative damage to the lipids and proteins of the lungs, testis and kidney of rats during carbon tetrachloride intoxication. *Clin Chim Acta*. 289: 177-179. 1999.
20. Manautou, J.E., Silva, V.M., Hennig, G.E., and Whiteley, H.E.: Repeated dosing with the peroxisome proliferator clofibrate decreases the toxicity of model hepatotoxic agents in male mice. *Toxicology*; 127: 1-10. 1998.
21. Das, D., Pemberton, P.W., Burrows, P.C., Gordon, C., Smith, A., McMahon, R.F., and Warnes, T.W.: Antioxidant properties of colchicine in acute carbon tetrachloride induced rat liver injury and its role in the resolution of established cirrhosis. *Biochim Biophys Acta*; 1502: 351-362. 2000.
22. Mbonifor, J.N., Chigbo, F.E., and Mehendale, H.M.: Polyamine protection against chemically induced hepatotoxicity. *Int J Toxicol*; 19: 391-400. 2000.
23. Croquet, V., Moal, F., Veal, N., Wang, J., Oberti, F., Roux, J., Vuillemin, E., Gallois, Y., Douay, O., Chappard, D., and Calès, P.: Hemodynamic and antifibrotic effects of losartan in rats with liver fibrosis and/or portal hypertension. *Hepatology*; 37: 773-780. 2002.
24. Ozenirler, S., Dinçer, S., Akyol, G., Ozoğul, C., ve Oz, E.: Protective effect of ginkgo biloba extract on CCl₄-induced liver damage. *Hepatology Res*; 15: 215-224. 1999.
25. Fadhel, Z.A.: Amran S. Effects of black tea extract on carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation in liver, kidneys, and testes of rats. *Phytother Res*; 16: 28-32. 2002.

26. İlhan, N., ve Seçkin, D.: Protective effect of *Nigella sativa* seeds on CCl₄-induced hepatotoxicity. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*; 19: 175-179. 2005.
27. Chao ,T.C., Chao ,H.H., Lin, J.D., and Chen, M.F.: Somatostatin and octreotide modulate the function of Kupffer cells in liver cirrhosis. *Regul Pept*; 79: 117-124. 1999.
28. Polavarapu, R., Spitz, D.R., Sim, J.E., Follansbee, M.H., Oberley, L.W., Rahemtulla, A.,and Nanji, A.A. : Increased lipid peroxidation and impaired antioxidant enzyme function is associated with pathologicall liver injury in experimental alcoholic liver disease in rats fed diets high in corn oil and fish oil, *Hepatology*, 27 (5): 1317-1323, 1998.
29. Yılmaz, S., ve Bahçecioğlu, I.H.: Karbon tetraklorür ile Siroz Oluşturulmuş Ratlarda Lipid Peroksidasyonu, Antioksidan Enzim ve Piruvat Kinaz Aktiviteleri, *Türk. J. Vet. Anim. Sci.* 24: 25–28, 2000.
30. Güven, A., Erginsoy, S., ve Kaya, N.: Kazlarda karbon tetraklorür zehirlenmesinin biyokimyasal ve patolojik parametrelere etkisi. *Kafkas Ü. Vet. Fak. Derg.*, 9: 131-136.2003.
31. McCay, P.B., Lai, E.K., Payer, J.L., Dubose, C.M., and Janzen, E.G.: Oxygen and carbon centered radical formation during carbon tetrachloride metabolism. *J. Biol. Chem.*, 259: 2135-2143. 1984.
- 32.Pohl, L.R. and Mico, B.A.: Electrophilic halogens as potentially toxic metabolites of halogenated compounds. *Trends Pharmacol. Sci.* 5: 61-64. 1984.
33. Stombeck, D.R., and Guilford, W.G. : *Small Animal Gastroenterology*. 2nd edit. Stongate publishing Co., California.1990.

34. Erel, O.: A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin. Biochem.* 37: 277-285. 2004.
35. Corder, R., Mullen, W., Khan, N. Q., Marks, S. C., Wood, E. G., Carrier, M. J., and Crozier, A.: "Oenology: Red wine procyanidins and vascular health". *Nature* 444 (7119): 566. 2006.
36. Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods – 2007. November 2007.
37. Rösch, Daniel, Mügge, Clemens, Fogliano, Vincenzo, Kroh, and Lothar W.: Antioxidant Oligomeric Proanthocyanidins from Sea Buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) Pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (22): 6712–8. 2004.
38. <http://en.wikipedia.org/wiki/Proanthocyanidin>. 2012.
39. Morazzoni, P., and Bombardelli, E.: *Fitoterapia* LXV, 203-208 1994.
40. Abdollahi, M., Bahreini, Moghadam, A., Emmami, B., Fooladian, F., and Zafariet, K., : Increasing intracellular cAMP and cGMP inhibits cadmium-induced oxidative stress in rat submandibular saliva. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 135: 331-336. 2003.
41. Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S., and Rezaie, A., : Pesticides and oxidative stress : a review. *Med. Sci. Monit.*, 10: 141-147. 2004.
42. Janssen, Y.M.W., Houten, B.V., Borm, P.J.A., and Mossman, B.T.: Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab. Invest.*, 69: 261-274. 1993.

43. Özdem, S.S., ve Sadan, G., : Serbest oksijen radikallerinin oluşumu ve klinik açıdan önemi. Akdeniz Ü. Tıp Fak. Derg., 11: 63-71.1994.
44. Sinclair, A.J., Barnett, A.H., and Junec, J., : Free radicals and antioxidant systems in health and disease. British J. Hosp. Med., 43: 334-344.1990.
45. Yagi, K. : Lipid peroxidase and related radicals in clinical medicine. (in) Free Radicals in Diagnostic Medicine. D Armstrong (Editor), pp. 17-27, Plenum Press, New York.1994.
46. Cochran, C.G. : Cellular injury by oxidants. Am. J. Med., 92: 235-305.1991.
47. Kaya, S., Piriñçi, ve Bilgili, A.: Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji. Medisan Yayın Serisi: 35, Ankara, s. 222, 232, 273, 276, 355.1998.
48. Matés, J.M. : Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. Toxicology, 153: 83-104.2000.
49. Slater, T.F.: Free radical mechanisms in tissue injury. Biochemistry 1984; 22: 1-5.
50. Facino, R.M., Carini, M., Aldini, G., Bombardelli, E., Morazzoni, P., and Morelli, R.: Drug Res., 44-592-601 1994.
51. Nutall, S. L., Kendall, M. J., Bombardelli, E., and Morazzoni, P. J.: Clin.Pharm Ther., 23. 385-389 1998.
52. Shi, J., Yu, J., Pohorly, J.E., and Kakuda, Y.: Polyphenolics in Grape SeedsBiochemistry and Functionality. Journal of Medicinal Food 6 (4): 291–9.2003.
53. Mayer, B., and Hemmens, B.: Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. TIBS. 22:477-481, 1997.

54. Kılınç, K.: Oksijen radikalleri: üretilmeleri, fonksiyonları ve toksik etkileri. *Biyokimya Dergisi*. X: 60-89. 1985.
55. Halliwell, B., and Gutteridge, J.: Oxygen Toxicity, Oxygen Radicals, Transitions Metals and Disease. *Biochem J*. 219: 1-14. 1984.
56. Brattin, W.J., Glende, E.A., and Recknagel, R.: Pathological Mechanisms in Carbon Tetrachloride Hepatotoxicity. *Free Radic Biol Med*. 1: 27-28. 1985.
57. Masaıkı, N., Yamada, S., Orgata, I., Ohta, Y., and Fujiwara, K.: Enhancement of Carbon Tetrachloride-Induced Liver Injury by Glucagon and Insulin Treatment. *Res Exp.Med*. 188: 27-33.1988.
58. Özekı, T., Funakoshi, K., and Lwakı, K.: Rapid Induction of Chirrosis by administration of Carbon-Tetrachloride Plus Phospholipase D. *British Journal of Experimental Pathology*. 66: 385-390. 1985.
59. Şahin, A., Yener, Z., Dağoğlu, G., ve ark.: Karbontetraklorid (CCl4) İle Deneysel Olarak Karacığer Nekrozu Oluşturulan Ratlarda Vitamin E + Selenyum ve Nigella sativa (Çörekotu)'nın Karacığer Yıkımını Engelleyici Etkileri. *Türk J Vet. Anim. Sci*. 27: 141-152. 2003.
60. Arosio, B., Gagliano, N., Fusaro, L.M., Parmeggiani, L., Tagliabue, J., Galetti, P., De Castri, D., Moscheni, C., and Annoni, G.: Aloe-Emodin Quinone Pretreatment Reduces Acute Liver Injury Induced by Carbon Tetrachloride. *Pharmacol & Toxicol*. 87: 229-233. 2000.
61. Sotelo-Felix, J.I., Martinez-Fong, D., Muriel, P., De La Torre, P.: Evaluation of the Effectiveness of Rosmarinus officinalis (Lamiaceae) in the Alleviation of Carbon Tetrachloride- Induced Acute Hepatotoxicity in the Rat. *J. Ethnopharm*. 81: 145- 54. 2002.

62. Parmaksız, M.: Türkiye’ de Yetişen Bazı Bitkilerden Elde Edilen Ekstrelerin Sıçanlarda Oluşturulmuş Karaciğer Hasarına Karşı Etkileri. Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.Yüksek Lisans Tezi. Biyoloji Anabilim Dalı. 58-61. 2007.
63. Comporti, M.: Lipid Peroxidation and Cellular Damage in Toxic Liver Injury. Lab Invest. 53: 599- 623. 1985.
64. Kaya, A., Türkay, C., Uz, B., Eraslan, E., Bozdayı, M., Kandemir, O., Koca, C. ve Özyurt, H.: Metformin’in Deneysel Hayvan Modelinde Hepatik Fibrozis Gelişimine Etkilerinin Araştırılması. 24. Ulusal Gastroenteroloji Haftası. Gastroenterology Official Journal of The Turkish Society of Gastroenterology. Cilt 18 (1): 12. 2007.
65. Eralp, A., Yumuşak, N., Yüncü1, M., Koruk, M., Çataloluk, O., İnalöz, S. ve Sarı, İ.: Deneysel Karaciğer Hasarında Mast Hücre Değişikliği ve E Vitamininin Etkisi. 24. Ulusal Gastroenteroloji Haftası. Gastroenterology Official Journal of The Turkish Society of Gastroenterology. 18 (1): 12. 2007.
66. Göker, B. ve Özmen, R.: Beslenmenin Akut Karbon Tetraklorür Uygulamasına Bağlı Gelişen Karaciğer Hasarı Üzerine Koruyucu Etkisi. F.Ü. Sağ. Bil. Tıp Derg. 23 (2): 77 – 80. 2009.
67. Devay, S.: Karbon Tetraklorür’le Deneysel Siroz Oluşturulan Ratlarda Serbest Radikal Metabolizması; Stobadin’in Antioksidan Etkisi. Uzmanlık Tezi. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi. Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı. 2008.
68. Ozenirler, S., Dinçer, S., Akyol, G., Ozoğul, C., Oz, E.: The Protective effect of Ginkgo Biloba extract on CCl4- induced liver damage. Hepatology Research. 15: 215-224. 1999.

69. Jeon, T.I., Hwang, S.G., Park, N.G., Jung, Y.R., Shin, S.I., Choi, S.D., and Park, D.K.: Antioxidative effect of Chitosan on chronic con tetrachloride induced heaptik injury in rats. *Toxicology*. 187: 67-73. 2003.
70. Üstündağ, B., Bahçecioğlu, İ.H., Şahin, K., Gülcü, F., Düzgün, S., Özercan, İ.H. Ve Gürsu, M.F.: Soy İzoflavonların Karbon Tetraklorüre (CCL4) Bağlı Karaciğer Hasarı ve Plazma Paraoksonaz ile Arilesteraz Aktivite Düzeylerine Olan Etkileri. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi (Tıp)*. 19: 263-271. 2005.
71. Yardım-Akaydın, S., Sepici, A., Özkan, Y., Simsek, B., and Sepici, V.: Evaluation of Allontoin levels as a new marker of oxidative stress in Behcet's disease. *Scandinavian Journal of Rheumatology*. 35 (1): 61-64. 2006.
72. Uzun, K., Vural, K., Öztürk, T., Özer, F., and İmecik, İ.: Diagnostic value of lipid peroxidation in lung cancer. *Eastern Journal of Medicine*. 5(2): 48-51. 2000.
73. Erdoğan, E., Kaya, A., Rağbetli, M.C., Özbek, H. Ve Cengiz, N.: Anason (*Pimpinella anisum*) Ekstresinin Deneysel Akut Karaciğer Hasarında Karaciğer Koruyucu Etkisi Var Mı?. *Van Tıp Dergisi*. 11 (3): 69-74. 2004.
74. Muriel, P., and Escobar, Y.: Kupffer cells are responsible for liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride. *Journal of Applied Toxicology*. 23 (2): 103-108. 2003.
75. Lukacova, N., Chavko, M., Halat, G.: Effect of stobadine on lipid peroxidation and phospholipids in rabbit spinal cord after ischaemia. *Neuropharmacology*. 32 (3): 235-241. 1993.
76. Wang, H., Wei, W., Wang, N.P., Gui, S.Y., Wu, L., Sun, W.Y., and Xu, S.Y.: Melatonin ameliorates carbontetrachloride-induced hepatic fibrogenesis in rats via inhibition of oxidative stres. *Life Sci*. 77: 1902-1915. 2005.

77. Aneja, R., and Upadhyaya, G.: Ameliorating effect of Phthoestrogens on CCl₄-induced oxidative stress in the livers of male wistar rats. *Artificial Cells. Blood substitutes and Biotechnology*. 201-213. 2005.
78. Castilla-Cortazar, I., Garcia, M., Muguera, B., Quiroga, J., Perez, R., Santidrian, S., and Prieto, J.: Hepatoprotective effects of insulin like growth factor I in rats with carbon tetrachloride induced cirrhosis. *Gastroenterology*. 113 (5): 1682-1691. 1997.
79. Erel, O.: A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical reaction. *Clin. Biochem*. 37: 277-85. 2004.
80. Erel, O.: A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin. Biochem*. 38: 1103-11. 2005.
81. Expert Panel on enzyme of the IFCC. *Clin. Chim. Acta*. 70. F19. 1976.
82. http://en.wikipedia.org/wiki/Carbon_tetrachloride. 2012.

9. ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı : Bülent
Soyadı : DERTLİ
Doğum yeri ve tarihi : Adıyaman, 1985
Medeni durumu : Evli
Askerlik durumu : Yaptı
İletişim adresi ve tlf. : Karakoçan Devlet Hastanesi / Elazığ
Tel: 0506 602 74 77

II. Eğitimi

Lisans : Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (2002-2007)
Orta öğretim : Çelikhan Lisesi (1999-2002)
İlk okul : Barbaros İlköğretim Okulu (1991-1999)
Yabancı dil : İngilizce

III. Ünvanlar

Eczacı/ Sağlık bakanlığı : 2007-

IV. Mesleki Deneyimi

Sağlık Bakanlığı : Kars Doğum ve Çocuk Hastalıkları Hastanesi(Temmuz
2007-Şubat 2009)
Kars Devlet Hastanesi (Şubat 2009-Mart 2011)
Karakoçan Devlet Hastanesi/ Elazığ (Nisan 2012-)