

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANATOMİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL FORMALDEHİT UYGULANAN SIÇANLARIN KARACİĞER
DOKUSUNDA APOPTOZİS ve CD68 İMMÜNREAKTİVİTESİ ÜZERİNE
OZON ve TİMOKİNONUN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Feyza AKSU

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ahmet KAVAKLI

ELAZIĞ
2021

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Metin Kaya GÜRGÖZE

DEKAN

Bu Tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Murat ÖGETÜRK
Anatomi Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafınızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet KAVAKLI _____ Danışman

Uzmanlık Sınavı Jüri Üyeleri

.....	_____
.....	_____
.....	_____
.....	_____
.....	_____
.....	_____

İTHAF SAYSASI

Tıpta uzmanlık tezimi, hayatım boyunca desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen aileme ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı'nda; uzmanlık eğitimimde, mesleki alanda yetişmemde, tezimin planlanması, olgunlaştırılması ve sonlandırılması aşamalarında hiçbir zaman desteğini ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Ahmet KAVAKLI'ya sonsuz saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim boyunca her zaman desteklerini gördüğüm, deneyimlerinden ve tavsiyelerinden faydalandığım Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Murat ÖGETÜRK'e, Prof. Dr. A. Oya SAĞIROĞLU'na, Dr. Öğr. Üyesi Ramazan Fazıl AKKOÇ'a, anatomi bölümü asistan arkadaşlarıma ve mesai arkadaşlarıma; tez çalışmamda yardımlarını esirgeyeyen Prof. Dr. Seval YILMAZ'a ve Doç. Dr. Tuncay KULOĞLU'na,

Hayatım boyunca her zaman beni destekleyen anneme, babama ve kardeşlerime;

Hayatımın her döneminde sevinç kaynağım olan oğlum Selim Alper'e ve kızım Şevval'e ve her zaman her anlamda yanımda olan eşim Ali'ye;

Teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Feyza AKSU

ÖZET

Formaldehit (FA), dokularda hasara neden olmakta, oksidatif stresi aktifleştirmekte ve antioksidan düzeylerini düşürmektedir. Timokinon (TQ) ve Ozon (O₃) ise oksidan maruziyetinin neden olduğu hasarı iyileştirmektedir. Bu çalışmada amacımız; FA maruziyetinin kan ve karaciğerde oluşturduğu hasarı biyokimyasal belirteçlerle ve histopatolojik olarak TUNEL metodu ve CD68 hücre yoğunluğu ölçümü ile ortaya koymak, ayrı ayrı antioksidan etkili moleküller olan TQ ve O₃'nun hem tek başına kullanıldıklarında hem de birlikte kullanıldıklarında FA maruziyeti ile oluşan hasarı ne derece değiştirdiklerini ortaya koymaktır.

Çalışmada ağırlıkları 270-300 gr arasında değişen 8-10 haftalık 56 adet Sprague-Dawley cinsi erkek sıçan kullanıldı. Serumda AST, ALT, total antioksidan (TAS) ve total oksidan (TOS) seviyeleri tayin edildi. Ayrıca total antioksidan (TAS) ve total oksidan (TOS) seviyeleri için karaciğer dokuları da incelendi. Karaciğer dokularında immünohistokimyasal yöntemlerle CD68 hücre yoğunluğu değişimleri ortaya koyulurken ayrıca apoptotik hücrelerin belirlenmesi için TUNEL yöntemi uygulandı.

FA maruziyeti, deney hayvanlarının serum AST ve ALT seviyelerinde artışa, serum ve karaciğerlerinde TAS seviyelerinde azalmaya, TOS seviyelerinde yükselmeye, TUNEL pozitifliğinde ve CD68 hücre yoğunluğunda artışa neden oldu. Antioksidan olarak verilen TQ ve O₃, serum ve karaciğerde meydana gelen biyokimyasal ve histopatolojik değişiklikleri ciddi anlamda düzeltti.

Sonuç olarak; TQ ve O₃, FA maruziyetinin neden olduğu oksidatif hasarı baskılamakta ve oluşan histopatolojik bozulmaları geri çevirmektedir.

Anahtar Kelimeler: Formaldehit, Karaciğer, Timokinon, Ozon, TUNEL, CD68.

ABSTRACT

EXAMINATION OF THE EFFECTS OF OZONE AND THYMOQUINONE ON APOPTOSIS AND CD68 IMMUNOREACTIVITY IN LIVER TISSUE OF EXPERIMENTAL FORMALDEHYDE ADMINISTERED RATS

Formaldehyde (FA) causes damage to tissues, activates oxidative stress, and reduces antioxidant levels. Thymoquinone (TQ) and Ozone (O₃) improve the damage caused by oxidant exposure. This study aims to reveal the damage caused by FA exposure to blood and liver by biochemical markers, TUNEL method histopathologically, and CD68 cell density measurement and to reveal to what extent TQ and O₃, which are individual antioxidant acting molecules, alter the damage caused by FA exposure both when used separately and when used together.

In the study, 56 Sprague-Dawley male rats aged 8-10 weeks and weighing between 270-300 g were used in the study. AST, ALT, total antioxidant (TAS), and total oxidant (TOS) levels were determined in serum. In addition, liver tissues were examined for total antioxidant (TAS), and total oxidant (TOS) levels. TUNEL method was applied to determine apoptotic cells while CD68 cell density changes were revealed in liver tissues by immunohistochemical methods.

FA exposure caused an increase in serum AST and ALT levels, a decrease in TAS levels, an increase in TOS levels in serum and liver of experimental animals, an increase in TUNEL positivity, and CD68 cell density. TQ and O₃ given as antioxidants significantly corrected biochemical and histopathological changes in serum and liver.

As a result; TQ and O₃ suppress the oxidative damage caused by FA exposure and reverse the histopathological deteriorations.

Keywords: Formaldehyde, Liver, Thymoquinone, Ozone, TUNEL, CD68.

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
İTHAF SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLO LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xi
KISALTMALAR LİSTESİ	xiii
1.GİRİŞ	1
1.1. Formaldehit (FA)	1
1.1.1. Formaldehitin Özellikleri	1
1.1.2. Formaldehitin Kullanım Alanları	2
1.1.3. Formaldehit Maruziyetinin Sınırları ve Bu Sınır Üzerinde Zararlı Etkileri	3
1.1.3.1. Formaldehitin Karaciğer Üzerine Zararlı Etkileri	3
1.1.3.2. Formaldehitin Diğer Sistemler Üzerine Zararlı Etkileri	4
1.2. Karaciğer	6
1.2.1. Karaciğer Embriyolojisi	6
1.2.2. Karaciğer Histolojisi	6
1.2.3. Karaciğer Anatomisi	6
1.2.3.1. Karaciğerin Damarları	9
1.2.3.2. Karaciğerin Lenfatikleri	10
1.2.3.3. Karaciğerin Sinirleri	10
1.2.3.4. Karaciğerin Fonksiyonları	10
1.3. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres	11
1.4. Antioksidanlar	12

1.5. CD68 (Cluster of Differentiation 68)	13
1.6. Timokinon (TQ)	14
1.6.1. Kimyasal Yapısı	14
1.6.2. Timokinonun Sistemler Üzerine Etkisi	15
1.7. Ozon (O ₃)	16
1.7.1. Tarihçesi	16
1.7.2. Genel Bilgiler	17
1.7.3. Medikal Amaçlı Elde Edilmesi	17
1.7.4. Etki Mekanizması	18
1.7.5. Ozon Uygulama Metodları	20
1.7.5.1. Sistemik Uygulama	20
1.7.5.2. Topikal Uygulama	21
1.7.6. Ozon Tedavisinin Endikasyonları	21
1.7.7. Ozon Tedavisinin Yan Etki ve Kontrendikasyonları	24
2. GEREÇ ve YÖNTEM	25
2.1. Deney Hayvanları	25
2.2. Deney Grupları	25
2.3. Deney Ortamının Hazırlanışı	26
2.4. Kan Örneklerinin Hazırlanması	28
2.4.1. MDA Tayini için	28
2.4.2. GSH Tayini için	28
2.4.3. CAT Tayini için	28
2.4.4. GPx Tayini için	28
2.4.5. AST ve ALT Tayini için	28
2.5. Doku Homojenatlarının Hazırlanması	28
2.5.1. MDA, GSH, CAT Tayini için Doku Örneklerinin Hazırlanması	28
2.5.2. GPx Tayini için Doku Örneklerinin Hazırlanması	29
2.6. Kullanılan Yöntemler	29
2.6.1. Plazma ve Dokuda MDA Düzeyinin Tayini	29
2.6.2. Eritrosit ve Dokuda GSH Düzeyinin Tayini	29
2.6.3. Kanda ve Dokuda CAT Aktivitesinin Tayini	29
2.6.4. Kanda ve Dokuda GPx Aktivitesinin Tayini	29

2.7. Total Oksidan ve Total Antioksidan Ölçümleri	30
2.7.1. Total Oksidan Seviyesinin (TOS) Ölçümü	30
2.7.2. Total Antioksidan Seviyesinin (TAS) Ölçümü	31
2.8. İmmünohistokimya	31
2.8.1. CD68 İmmün Boyama Metodu	31
2.8.2. TUNEL Metodu	32
2.9. İstatistiksel Analiz	34
3. BULGULAR	35
3.1. Formaldehit Ölçümleri	35
3.2. Klinik Bulgular	35
3.3. Biyokimyasal Bulgular	36
3.3.1. Kanda Biyokimyasal Bulgular	36
3.3.2. Karaciğer Dokusunda Biyokimyasal Bulgular	37
3.3.3. Kanda TOS ve TAS Ölçümleri	38
3.3.4. Karaciğerde TOS ve TAS Ölçümleri	39
3.4. İmmünohistokimyasal Bulgular	40
3.4.1. Karaciğer Dokusunda CD68 İmmünreaktivitesi	40
3.4.2. Karaciğer Dokusunda TUNEL Boyama	45
4. TARTIŞMA	51
5. KAYNAKLAR	60
6. ÖZGEÇMİŞ	72

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Formaldehitin kimyasal ve fiziksel özellikleri	1
Tablo 2. Medikal O ₃ 'nun endikasyonları ve etki mekanizması	23
Tablo 3. Solunan havadaki O ₃ gazı konsantrasyonu ve toksik etkileri	24
Tablo 4. Sıçan yemi içeriği	27
Tablo 5. TUNEL boyama prosedürü	33
Tablo 6. Sıçanların kanında AST ve ALT değerlerinin değişimi	36
Tablo 7. Sıçanların kanında MDA, GSH, CAT, GPx ve SOD değerlerinin değişimi	37
Tablo 8. Sıçanların karaciğer dokusunda MDA, GSH, CAT, GPx ve SOD değerlerinin değişimi	38
Tablo 9. Sıçanların kanında TAS ve TOS değerlerinin değişimi	39
Tablo 10. Sıçanların karaciğer dokusunda TAS ve TOS değerlerinin değişimi	40
Tablo 11. CD68 histoskoru	41
Tablo 12. Apoptotik indeks (%)	46

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. 720 °C’de Gümüş katalizörlüğünde metanolden FA elde edilmesi	2
Şekil 2. Karaciğerin diaframatik ve visceral yüzleri	7
Şekil 3. Antioksidan sınıflandırması	12
Şekil 4. Timokinonun kimyasal yapısı	14
Şekil 5. Medikal O ₃ ’nun terapötik etkileri	19
Şekil 6. Cam fanus, hava pompası, FA enjekte edilen pamuk topları	26
Şekil 7. Formaldehit ölçümü görseli	35
Şekil 8. Sıçan tüylerinde renk değişimi	36
Şekil 9. Kontrol grubu sıçanların karaciğer dokusunda CD68 immünreaktivitesi (→).	41
Şekil 10. TQ grubu sıçanların karaciğer dokusunda CD68 immünreaktivitesi (→).	42
Şekil 11. TQ+O ₃ grubu sıçanların karaciğer dokusunda CD68 immünreaktivitesi (→).	42
Şekil 12. O ₃ grubu sıçanların karaciğer dokusunda CD68 immünreaktivitesi (→).	43
Şekil 13. FA grubu sıçanların karaciğer dokusunda CD68 immünreaktivitesi (→).	43
Şekil 14. FA+O ₃ grubu sıçanların karaciğer dokusunda CD68 immünreaktivitesi (→).	44
Şekil 15. FA+TQ grubu sıçanların karaciğer dokusunda CD68 immünreaktivitesi (→).	44
Şekil 16. FA+O ₃ +TQ grubu sıçanların karaciğer dokusunda CD68 immünreaktivitesi (→).	45
Şekil 17. Kontrol grubu sıçanların karaciğer dokusunda TUNEL pozitifliği (→).	46
Şekil 18. O ₃ grubu sıçanların karaciğer dokusunda TUNEL pozitifliği (→).	47
Şekil 19. TQ grubu sıçanların karaciğer dokusunda TUNEL pozitifliği (→).	47

Şekil 20. TQ+O ₃ grubu sıçanların karaciğer dokusunda TUNEL pozitifliği (→).	48
Şekil 21. FA grubu sıçanların karaciğer dokusunda TUNEL pozitifliği (→).	48
Şekil 22. FA+O ₃ grubu sıçanların karaciğer dokusunda TUNEL pozitifliği (→).	49
Şekil 23. FA+TQ grubu sıçanların karaciğer dokusunda TUNEL pozitifliği (→).	49
Şekil 24. FA+O ₃ +TQ grubu sıçanların karaciğer dokusunda TUNEL pozitifliği (→).	50



KISALTMALAR LİSTESİ

ALT	: Alanin Aminotransferaz
AST	: Aspartat Aminotransferaz
CAT	: Katalaz
CD68	: Cluster of Differentiation 68
CO₂	: Karbondioksit
FA	: Formaldehit
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GSH	: Glutasyon Redüktaz
GSSG	: Glutasyon Disülfit
GST	: Glutasyon S Transferaz
I/R	: İskemi Reperfüzyon
KOAH	: Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
MDA	: Malondialdehit
N. sativa	: Nigella Sativa
O₂	: Oksijen
O₃	: Ozon
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TAS	: Total Antioksidan Seviyesi
TOS	: Total Oksidan Seviyesi
TQ	: Timokinon

1.GİRİŞ

1.1. Formaldehit (FA)

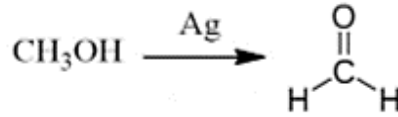
1.1.1. Formaldehitin Özellikleri

Formaldehit (FA) oldukça yaygın olarak kullanılan bir kimyasal ajan olup, organizmanın doğal yapısında da yer almaktadır. Keskin kokulu, renksiz ve suda çok iyi çözünen FA, aldehit ailesinin en basit üyesidir (1, 2). FA; formik aldehit, metil aldehit, metanal veya metil oksit olarak da bilinmektedir (3, 4). FA, fenol ve melamin reçinelerinin yapımında, sunta ve kontraplak imalatında, ev temizlik ürünlerinde, duvar kaplamalarında, mumyacılıkta, tekstil ürünlerinin işlenmesinde, boya ve plastik maddelerin yapımında, kozmetik sanayide, diş macunlarında, tıbbi laboratuvarlarda koruyucu sıvı ve mikroorganizmaları öldürmesi sebebiyle bazı ambalaj maddelerinin bileşiminde ve gıda kaplarının sterilizasyonunda yaygın bir biçimde kullanılmaktadır. Bundan dolayı da yaşamımızın önemli parçası haline gelmiş bir kimyasal maddedir (3, 5). FA'nın kimyasal formülü CH_2O 'dur. Erime noktası $-92\text{ }^{\circ}C$, kaynama noktası $-21\text{ }^{\circ}C$ 'dir. Molekül ağırlığı ise 30.03'tür (Tablo 1) (6).

Tablo 1. Formaldehitin kimyasal ve fiziksel özellikleri.

Tanımlayıcı Bilgiler	
CAS No	50-00-0
Sistemik IUPAC Adı	Metanol
Yaygın IUPAC Adı	Formaldehit
Diğer Adları	Formol
	Formalin
	Metilen Oksit
	Metil Aldehit
	Oksometan
EC (European Community) No	Oksimetilan
	200-001-8
Özellikleri	
Kimyasal Formülü	CH_2O
Molekül Kütlesi	30,03 g/mol
Yoğunluk	0,8153 g/cm ³ ($-20\text{ }^{\circ}C$)
Erime Noktası	$-92\text{ }^{\circ}C$ ($-134\text{ }^{\circ}F$; 181 K)
Kaynama Noktası	$-19\text{ }^{\circ}C$ ($-2\text{ }^{\circ}F$; 254 K)
Parlama Noktası	$60\text{ }^{\circ}C$
Dağılım Katsayısı	0,350
Sudaki Çözünürlüğü	400 g/dm ³
Buhar Basıncı	$>1\text{ atm}$ ($20\text{ }^{\circ}C$)
Reaktivite	Peroksit, azot dioksit ve performik asit ile patlayıcı reaksiyon
Havada Eşik Koku Limiti	0,5-1,0 ppm

FA'nın saf olmayan formu, 1867 yılında Alman kimyager August Wilhem von Hofmann tarafından bulunmuştur. Saf formu ise 1892 yılında bir başka Alman kimyager Friedrich August Kekulé von Stradonitz tarafından izole edilmiştir. FA; 400-650 °C'de bakır, gümüş veya molibden alaşımı gibi bir katalizör aracılığı ile metanolün oksidasyonundan elde edilir (Şekil 1) (7).



Şekil 1. 720 °C'de Gümüş katalizörlüğünde metanolden FA elde edilmesi.

FA'nın metanol oksidasyonundan elde edilen %37'lik sulu çözeltisine formalin adı verilir. Polimerize olmuş katı formuna paraformaldehit adı verilir ve bu formu ısıtılarak depolimerize edilebilir. Oldukça reaktif bir madde olduğundan dolayı her ortamda gaz haline geçebilir. FA'nın gaz hali ppm (parts per million; 1 ppm= 1.25 mg/m³), sıvı hali mililitre (ml) olarak belirtilir (8, 9).

FA hücrelerde değişik seviyelerde bulunan normal bir metabolittir, fakat vücutta depo edilmez. FA, ya karaciğer ve eritrositlerde formaldehit dehidrogenaz enzimi (FDH) katalizörlüğünde formik asite dönüşerek idrar ve feçes yoluyla, ya da karbondioksite okside olarak solunum yoluyla vücuttan atılır (10).

FA'nın vücuda alınması solunum ve sindirim yolu ile olmaktadır. Solunum yoluyla vücuda girişi sigara dumanı, ekzos gazı ve FA içerikli ürünlerden buharlaşan formalin ile olurken, sindirim yoluyla vücuda girişi bazı gıdalarda kullanılan katkı maddeleri, kahve, içme suyu, meyve ve sebzeler ile olur (9, 11).

1.1.2. Formaldehitin Kullanım Alanları

Alman kimyacı August Wilhelm von Hofmann'ın 1867 yılında metanolü okside ederek FA'yı sıvı halde elde etmesiyle birlikte birçok endüstriyel alanda yaygın olarak kullanılmaya başlandı. Dünya genelinde her yıl yaklaşık 20 milyon ton %37'lik formol üretilmektedir (3). FA ilk defa antimikrobiyal ajan olarak 1886 yılında Loew (4) tarafından kullanılmıştır. Endüstriyel alanda kullanımına ise bakalit yapımı için 1910 yılında Almanya'da başlanmıştır (3).

FA, günümüz şartlarında kimyasal özellikleri nedeni ile günlük yaşantıda sık karşılaşılan bir kimyasal maddedir. Bina ürünleri, zemin panelleri, sunta, yalıtım malzemeleri, mobilyalar, kumaşlar, ayakkabılar, kağıtlar, ilaçlar, ekstazi gibi uyuşturucuların üretiminde, boya ve plastik maddelerin yapımında, ev temizlik ürünlerinde ve duvar kaplamalarında kullanılmakla birlikte mumyacılıkta, fotoğrafçılıkta ve mikroorganizmaları öldürmesi sebebiyle bazı ambalaj maddelerinin bileşiminde yer almakta ve gıda kaplarının sterilizasyonunda dezenfektan olarak kullanılmaktadır (12-14). Tıp alanında, anatomiye kadavranın tespiti ve uzun süre saklanması; histoloji ve patoloji laboratuvarlarında incelenecek dokuların hazırlanması; hemodiyaliz solüsyonlarında ve bazı ilaçlarda koruyucu madde olarak FA'dan yararlanılmaktadır (11, 15).

1.1.3. Formaldehit Maruziyetinin Sınırları ve Bu Sınır Üzerinde Zararlı Etkileri

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından kanserojen olarak kabul edilen FA vücuda solunum ve sindirim yoluyla alınmakta, alınan FA'nın başta solunum sistemi olmak üzere, sinir sistemi, gastrointestinal sistem, bağışıklık sistemi ve üreme sistemi üzerinde olumsuz etkileri bulunmaktadır (12, 16-18).

Anatomistler, tahniçiler, histologlar, patologlar ve FA üretiminin yapıldığı meslek grupları gibi FA maruziyetinin fazla olduğu gruplar üzerinde yapılan çalışmalarda; lösemi, beyin, akciğer ve kolon kanserlerinden ölenlerin sayısının normal popülasyona göre daha fazla olduğu bildirilmiştir. Yapılan hayvan deneylerinde FA'nın; sinir sistemi, üreme sistemi, sindirim sistemi ve solunum sistemi üzerine olumsuz etkileri olduğu gösterilmiştir (12, 14, 17, 18).

1.1.3.1. Formaldehitin Karaciğer Üzerine Zararlı Etkileri

Canlılarda doğal yolla üretilen FA bir yana bırakılacak olursa, meyveler, sebzeler, içecekler ve bazı gıdalardaki katkı maddelerinde bulunan FA sindirim yolu ile insanlara geçmektedir (3). Sindirim yoluyla vücuda alınan FA, karaciğer ve eritrositlerdeki FA dehidrogenaz enzimi (FDH) aracılığıyla formik asite (metanoik asit) metabolize edilmektedir.

Yapılan çalışmalarda FA maruziyetinin karaciğerde küçülmeye, sentrilobüler vakuolizasyona ve lokal hücresel nekroza neden olduğu gösterilmiştir (13, 19, 20).

İngiltere’de endüstri alanında çalıştıkları için FA’ya maruz kalan bireylerde karaciğer kanserlerinde artış olduğu bildirilmiştir (21).

Deneyisel bir çalışmada FA’ya maruz kalmış karaciğer dokusunda malondialdehit (MDA) salınımda artış, oksijen tüketiminde azalış, karaciğerin mikroskopik incelenmesinde mitokondri membran rüptürü, krista kaybı ve dejenere hepatoselüler hasar olduğu gözlemlenmiştir (22). Yapılmış diğer bir deneyisel çalışmada FA birikmesinin karaciğerde hepatik glutatyonun tükenmesine, MDA seviyesinde artışa ve hepatotoksisite oluşumuna yol açtığı daha sonra ise hepatik hücre hasarına neden olduğu gözlemlenmiştir (23).

1.1.3.2. Formaldehitin Diğer Sistemler Üzerine Zararlı Etkileri

FA maruziyetinden ilk ve en çok etkilenen yapılar göz ve solunum sistemidir. FA maruziyetinin gözde oluşturduğu etkiler; sulanma, kızarıklık, yanma hissi, ağrı ve bulanık görmedir. FA’nın 0.24 ppm gibi düşük konsantrasyonları dahi gözde irritasyon oluşturabilir (24, 25). Düşük doz FA maruziyetinin solunum sisteminde oluşturduğu etkiler; solunum yollarında yanma hissi, öksürük ve hırıltılı solunumdur. Yüksek konsantrasyonlarda (5-30 ppm) ise nefes darlığı, inflamasyon, pulmoner ödem ve pnömoni gibi daha ağır belirtiler meydana gelebilir (26, 27). FA maruziyeti sonucu sıçan akciğerlerinde inflamasyon geliştiği ve mast hücrelerinin degranülasyona uğradığı gösterilmiştir (28, 29). Yapılan geniş kohort çalışmalarında FA maruziyeti ile akciğer kapasitesi arasında ki anlamlı ilişki araştırılmıştır. Astımlı hastalar 2 ppm’lik FA’ya maruz bırakılmış, sonrasında ılımlı derecede egzersiz yapanlarda hiperaktivite olmazken egzersiz yapmayanlarda hafif derecede hiperaktivite gözlenmiştir. Akciğerlerde 2-3 ppm’lik FA maruziyeti orta derecede irritasyona neden olmuştur (30, 31).

FA, gıda sterilizasyonunda ve ambalajlarında kullanıldığından dolayı oral yolla sıkça alınabilmekte ve bu da oral toksisiteye neden olmaktadır (32). Oral yolla alınan FA’nın letal dozu insan ve hayvanlarda benzer olup 523 mg/kg’dır (2, 32). FA’nın metabolize hali olan formik asit üst gastrointestinal sistemde ciddi lokal korozyf etki oluşturur, bunun yanı sıra bulantı, ishal, ülserasyon, nekroz ve kanamaya neden olur. Ayrıca başka bir çalışmada da gastrointestinal sistem mukozasında toksik etki yaparak ciddi hayati tehdit oluşturduğu bildirilmiştir (33).

Diğer sistemlerin koordinasyonu ve yönetiminde önemli olan sinir sistemi, mesleki anlamda FA'ya maruz kalan kişilerde solunum sistemi tahrişinden sonra en çok etkilenen diğer bir sistemdir (34). Kronik FA maruziyetinin sinir sisteminde fonksiyon bozukluklarına yol açtığı ve sonucunda baş ağrısı, baş dönmesi, hafıza kaybı, halsizlik ve uyku bozukluğu gibi semptomlara neden olduğu bildirilmiştir (18, 35).

Klinik ve deneysel olarak toksikolojik açıdan incelenen FA'nın, üriner sistem üzerinde oldukça toksik etkileri mevcuttur. İnsanların mesleki alanlarda uzun süre FA'ya maruz kalmasının böbrek kanserine yol açtığı bildirilmiştir (36). İntihar amacıyla 150 ml sıvı formalin içen bir hastada akut böbrek yetmezliğinin geliştiği rapor edilmiştir (37). Başka bir çalışmada ise alkol tüketen hastalarda, FA ve formik aside metabolize olan metanolün böbrek dokusunda nekroza, dolayısıyla da böbrek yetmezliğine neden olduğu rapor edilmiştir (38).

Doğum öncesi ve doğum sonrası dönemde FA içerikli kimyasallara maruz kalınması hem anneyi hem de bebeği olumsuz etkilemektedir. FA'ya maruz kalan kadınlarda doğurganlıkta azalma, abortus, kürtaj, düşük doğum ağırlığına sahip bebek doğurma, erken doğum, ölü doğum, yenidoğanda ise hasarlı nöron artışı ve yapısal malformasyonlar oluştuğu bildirilmiştir (13). Erkek farelerde yapılmış bir çalışmada ise FA kullanılmış ve sonucunda testis ağırlığında ve sperm kalitesinde önemli ölçüde azalma gözlemlenmiştir (39).

FA maruziyetinin oluşturduğu karsinojenik etkiyle ilgili pekçok çalışma bulunmaktadır. FA maruziyeti fazla olan meslekler incelendiğinde; tahnit teknisyenlerinde lösemi, beyin ve prostat kanserlerinden ölümlerin FA inhalasyonu ile ilişkili olduğu bulunmuştur (40), anatomist ve patoloğlarda beyin tümörü, nöroglial hücre tümörü ve lösemiden dolayı ölümlerin fazla olduğu tesbit edilmiştir (41, 42). Ayrıca sıçanlarda yapılan çalışmalarda gastrointestinal leiomyosarkom, testislerde intertisyel adenoma ve trakeal tümör oranında artış gözlemlenmiştir (43).

1.2. Karaciğer

1.2.1. Karaciğer Embriyolojisi

Embriyolojik olarak karaciğer 4. hafta başında gelişmeye başlar. Gelişmesinde kalbin salgıladığı fibroblast growt faktör uyarıcı olmaktadır. İnsan embriyosunda karaciğer, ventral bir çıkıntı olarak ön bağırsağın kaudalinden hepatik divertikül olarak gelişir. Hepatik divertikül, ventral mezogastriyumu meydana getiren septum transversum'a doğru gelişir. Hızla gelişen hepatik divertikül iki parçaya ayrılır. Karaciğerin taslağını oluşturan kraniyal parça daha büyük, safra kesesini oluşturan kaudal parça ise daha küçüktür. Karaciğer içi hücre kordonları ve safra kanallarının karaciğer dokusu içindeki kısmı çoğalan endoderm hücreleri tarafından oluşturulur (44). Karaciğerin visseral peritonu mezogastriumdan oluşmaktadır. Umblikal ven umblikal korddan çıktıktan sonra karaciğere doğru ilerler ve lig. falciforme boyunca devam eder. Karaciğerin kendi rengini almasını sağlayan hematopoez 6. hafta başlar. Safra üretimi ise 12. hafta başlar (44, 45).

1.2.2. Karaciğer Histolojisi

Karaciğer, Glisson kapsülü olarak isimlendirilen fibröz bağ doku özelliği gösteren bir kapsül ile sarılmıştır ve bu kapsülden ayrılan bağ doku uzantıları karaciğeri lob ve lobüllere ayırır. Bunlar; klasik karaciğer lobülü, portal lobül ve karaciğer asinüsüdür (46). Karaciğerin %80'ini oluşturan hepatositler, karaciğer parankimal hücreleridir ve santral venden periferine doğru ışınal tarzda dizilmiştir (45, 46). Glisson üçgeni (Kiernan aralığı ya da Porta mesafesi) adı verilen bağ dokusu alanları, karaciğer lobüllerinin birbiri ile temas ettiği bölgelerde bulunur. Glisson üçgeni içinde portal triad adı verilen a. interlobularis, v. porta'nın ince dalı olan v. interlobularis ve ductus interlobularis yapı topluluğu seyrediler (47, 48).

1.2.3. Karaciğer Anatomisi

Karaciğer, karın boşluğunda bulunan en büyük organ ve vücutta bulunan en büyük bez olma özelliğine sahiptir. Erişkinlerde vücut ağırlığının yaklaşık %2'sini, çocuklarda ise %5'ini meydana getirir. Fetüste ise karaciğerin vücut ağırlığına oranı erişkininkinden çok daha fazladır. Karaciğerin ortalama ağırlığı erişkin erkeklerde 1400-1800 gr, erişkin kadınlarda ise 1200-1400 gr civarındadır. Karaciğer karın boşluğunun sağ üst kısmının tamamına yakın bölümünü doldurur, topografik olarak

ise regio hypochondriaca dextra'nın tümünü, regio epigastrica'nın büyük kısmını doldurur (49, 50).

Karaciğerin facies diaphragmatica ve facies visceralis olmak üzere iki yüzü, margo inferior ve margo posterior olmak üzere iki kenarı vardır (Şekil 2).



Şekil 2. Karaciğerin diafragmatik ve visceral yüzleri (51)

Facies diaphragmatica: Karaciğerin büyük yüzüdür. Diaphragmanın alt yüzü ile komşuluk yapar, düzgün, kubbe şeklindedir. Facies diaphragmatica pars superior, pars anterior, pars posterior ve pars dextra olmak üzere dört bölümde incelenir (49, 50).

Pars superior; facies diaphragmaticanın üst kısmıdır. Diafragma aracılığı ile sağda pleura ve akciğerle, solda pericardium ve kalp ile komşudur. Kalbin oturduğu yer impressio cardiaca olarak isimlendirilir. Arka kısmına yakın bir alan hariç büyük bölümü peritonla kaplıdır. **Pars anterior;** facies diaphragmaticanın ön kısmıdır. Bu bölüm sağda 6.-10. kaburga ve kıkırdakları ile solda 7.-8. kıkırdak kaburgalarla komşudur. Ortada proc. xiphoideus ve aşağısında karın ön duvarı ile komşudur. Lig. falciforme hepatis'in bulunduğu yer hariç tamamen peritonla kaplıdır. **Pars posterior;** karaciğerin diaphragma ile temas halinde olan kısmıdır. Sağ tarafı geniş ve künt, sol tarafı dar, ortası ise konkavdır. Büyük bölümü peritonsuzdur. Area nuda, lig. coronarium'un içinde kalan peritonsuz sahadır. **Pars dextra;** facies diaphragmaticanın peritonlu sağ kısmıdır ve diafragma aracılığıyla kaburgalarla komşudur (49, 50).

Fascies visceralis: Karaciğerin karın organlarıyla komşu olan alt yüzüdür. Fascies visceralis'in orta bölümünde bazı yapılar H harfine benzeyen bir geçit oluşturur. Bu geçitin ortasını porta hepatis, sağ tarafını sulcus sagittalis dexter, ince yarık tarzındaki sol kolunu ise fissura sagittalis sinistra yapar (49, 50). Porta hepatis'e

giren çıkan yapılar v. porta hepatis ile etrafında ki sinir ağı, a. hepatica propria'nın dalları, safra kanalları ile lenf damarlarıdır (49).

Sulcus sagittalis dexter'in ön kısmında yer alan fossa vesicae biliaris (felleae) isimli alana vesica biliaris (fellea), arka kısmında yer alan sulcus venae cavae isimli alana ise v. cava inferior oturur (49, 50).

Fissura sagittalis sinistra'nın ön kısmında yer alan fissura ligamenti teretis isimli alana lig. teres hepatis, arka kısmında yer alan fissura ligamenti venosi isimli alana ise lig. venosum oturur (49, 50).

Porta hepatis, sulcus venae cavae, fossa vesicae biliaris, fissura ligamenti teretis ve fissura ligamenti venosi yapıları fascies viseralis'in ortasında yer alan peritonsuz bölgedir. Fascies visceralis bu alan dışında peritonla örtülüdür (49, 50).

Karaciğer dört lobdan oluşmaktadır. Sulcus sagittalis dexter'in sağında kalan bölüme lobus hepatis dexter, fissura sagittalis sinistra'nın solunda kalan bölüme lobus hepatis sinister adı verilir. Bu iki oluk arasında, porta hepatis'in önünde kalan kısma lobus quadratus adı verilirken, arkasında yer alan bölüme ise lobus caudatus denilir. Fascies diaphragmatica'da lobus hepatis dexter ve lobus hepatis sinister'in sınırı lig. falciforme hepatis'dir (49, 50). Lobus hepatis dexter, lobus hepatis sinister'in 6 katı kadardır. Regio hypochondriaca dextra'da yer alan lobus hepatis dexter, tüm karaciğerin 5/6'sını oluşturur. Lobus hepatis dexter'den daha küçük ve yassı olan lobus hepatis sinister ise tüm karaciğerin 1/6'sını oluşturur ve topografik olarak regio epigastrica'da ve az da olsa kısmen regio hypochondriaca sinistra'da yer alır. Lobus hepatis sinister'in bazen dalağa kadar uzanan sol ucunda bulunan bağ dokuya appendix fibrosa hepatis denilir (49, 50).

Lobus quadratus'u önden karaciğerin margo inferior'u, arkadan porta hepatis, sağ taraftan fossa vesica biliaris ve sol taraftan fissura ligamenti teretis sınırlar (49, 50).

Lobus caudatus'u önden porta hepatis, sağ taraftan sulcus vena cavae, sol taraftan fissura ligamenti venosi sınırlar. Bu lobun ön tarafında iki uzantı vardır. Sol tarafta yer alan proc. papillaris daha kalındır ve porta hepatis'in arka kenarının sol yarısını oluşturur. Sağ tarafta yer alan proc. caudatus ise arka kenarının sağ yarısını oluşturur ve lobus hepatis dexter ile birleşir. Proc. caudatus'u örten periton for. bursa omentalis'in (foremen epiploicum) ön-üst kısmını sınırlar (49, 50).

Facies visceralis’de komşu organların oluşturduğu izler vardır. Lobus hepatis dexter’in visceral yüzünde önden arkaya doğru impressio colica (flexura coli dextra oturur), impressio renalis (sağ böbrek oturur) ve impressio suprarenalis’in (sağ böbrek üstü bezi oturur) bir bölümü yer alır. Impressio renalis’in solunda impressio duodenalis (pars descendens duodeni oturur) adı verilen iz görülür. Lobus hepatis sinister’in visceral yüzünde sadece impressio gastrica (mide fundusunun izi) bulunur (49, 50).

Karaciğeri diafragmanın alt yüzüne ve karın ön duvarına tutunduran altı bağ vardır. Bu bağlardan biri embriyolojik kalıntı olup v. umbilicalis’in kapanması ile oluşan lig. teres hepatis’tir. Diğer bağları ise peritoneum oluşturur. Bunlar; lig. falciforme hepatis, lig. coronarium, lig. hepatorenale, lig. triangulare dextrum ve lig. triangulare sinistrum’dur (49, 50).

1.2.3.1. Karaciğerin Damarları

Karaciğerin kanlanması farklı özelliği iki ayrı sistem ile desteklenmesidir. Bunlardan biri v. porta hepatis (portal ven) diğeri ise a. hepatica propria’dır (49, 52, 53).

A. hepatica propria oksijenden zengin olan arteriyel kanı taşır. Karaciğere ulaşan kanın %20’si a. hepatica propria tarafından karşılanır. A. hepatica communis truncus coeliacus’tan ayrılan bir arterdir. Sonrasında a. gastroduodenalis ve a. gastrica dextra dallarını verir ve artık a. hepatica propria ismi ile devam eder. V. portae hepatis sindirilmiş besinlerden zengin venöz kanı taşır. Karaciğere ulaşan kanın %80’i ise v. portae hepatis tarafından karşılanır. Hem v. porta hem de a. hepatica propria karaciğere porta hepatis’den (karaciğer kapısı, hilum) girer. V. portae hepatis ile a. hepatica propria’nın dalları karaciğer içerisinde dallara ayrılırlar ve karaciğer sinüzoidlerine açılarak v. centralis’e dökülürler. V. centralis’ler birleşerek v. hepatica’ları yaparlar. V. hepatica’lar vasıtası ile karaciğerin venöz kanı v. cava inferior’a dökülür (49, 50, 54).

1.2.3.2. Karaciğerin Lenfatikleri

Karaciğerin yüzeyel lenf damarlarının büyük kısmı porta hepatis giden derin lenf damarları ile birleşir, sonrasında sırasıyla nodi hepatici'ye ve nodi coeliaci'ye açılır (49).

Area nuda'dan gelen lenf damarları nodi phrenici superiores, nodi mediastinales anteriores ve nodi mediastinales posteriores'e, sonrasında ise truncus lymphaticus dexter ve ductus thoracicus'a açılır (49).

Lig. coronarium ve lig. triangulare'nin lenf damarları ise lenf nodüllerine uğramadan ductus thoracicus'a açılır (49).

Karaciğerin derin lenf damarlarının çoğu porta hepatisdeki nodi hepatici'ye açılır. Nodi hepatici'den çıkan lenf damarları nodi coeliaci'den geçip ductus thoracicus'a açılır. Bir kısmı ise v. hepatica'ları takip ederek diafragmadaki for. vena cavae'ye gelir (49).

1.2.3.3. Karaciğerin Sinirleri

Karaciğerin sempatik innervasyonundan sorumlu sinir lifleri n. splanchnicus'lardan, parasempatik innervasyonundan sorumlu sinir lifleri ise sağ ve sol n. vagus'tan gelir. Hem sempatik hem de parasempatik sinir lifleri önce plexus coeliacus'u meydana getirirler. Sonrasında plexus hepaticus içerisinde ilerlerler. İlerleyen lifler a. hepatica propria ile v. porta hepatis çevresinden geçtikten sonra karaciğer içerisinde dağılırlar (50, 54).

Sensitif lifler, 8-11 torakal medulla spinalis segmentlerine gider. Karaciğeri örten peritonda sağ n. phrenicus'un dalları dağılır, bu nedenle peritonla ilgili ağrılar sağ omuzda hissedilir (49).

1.2.3.4. Karaciğerin Fonksiyonları

Karaciğer, yaşamın devamı için önem arzeden temel organlarımızdan biridir. Karaciğer, hem iç salgı hem de dış salgı fonksiyonu olan bir organdır. Karaciğerin damarları arasında adı geçen v. porta hepatis, barsak kanalından emilen birçok maddeyle birlikte, dalaktan dışarı atılması gereken maddeleri de buraya getirir. Böylelikle bu maddelerin hem işlenmesinde hem de depo edilmesinde görev alır. Ayrıca zorlu çalışmalarda genel dolaşıma sevk edilmesi için, kan depo görevi yapmaktadır. Karaciğer kendi iç salgıları aracılığıyla, kanın pıhtılaşma

mekanizmasında görev almaktadır (49). Bunların dışında karaciğerin önemli dış salgı özelliği olup safra salınımı ile yağların sindirimi ve sonrasında duodenumun ikinci kısmına boşaltılmasında görev almaktadır. Karaciğer protein, karbonhidrat ve lipid metabolizmasında da rol almaktadır. Karaciğerde, sadece birkaçından bahsedebildiğimiz, 500'ün üzerinde kimyasal reaksiyon gerçekleşmektedir (52, 53).

1.3. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Serbest radikaller son derece reaktif ve stabil olmayan atom veya moleküllerdir. Bu atom veya moleküller en dış yörüngesinde bir veya daha fazla sayıda eşleşmemiş elektron içerir. İnsan ve hayvanlarda oksijen kullanılarak mitokondride enerji dönüşümü esnasında, elektron transport zincirinde meydana gelen elektron kaçakları sonucu oluşur (55). Başka moleküller ile rahatlıkla elektron alışverişi yapan bu moleküllere "oksidan moleküller" ya da "reaktif oksijen türleri (ROS)" adı verilir (56, 57).

Oksidasyona sebep olan serbest radikallere; süperoksit anyonlar (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali (OH), hipoklorik asit, kloroaminler, azot dioksit ve lipid peroksitler örnek gösterilebilir (56, 57). Serbest radikallerin normal fizyolojik süreçte aldıkları görev, sinyal iletimi ve bakterilere karşı organizmayı korumaktır (58). Ancak iskemi, hemoraji, intoksikasyonlar, travma, kirli hava, sigara dumanı, ultraviyole ışınlar, alkol, nitrojen dioksit, kükürt dioksit, benzen ve FA gibi birçok kimyasal molekül, serbest radikallerin fizyolojik sınırların üstüne çıkmasına aracılık eder. Sonrasında da yaşlanma, artrit, ateroskleroz, diyabet ve kanser gibi birçok hastalığın ortaya çıkmasına sebep olmaktadır (55, 69).

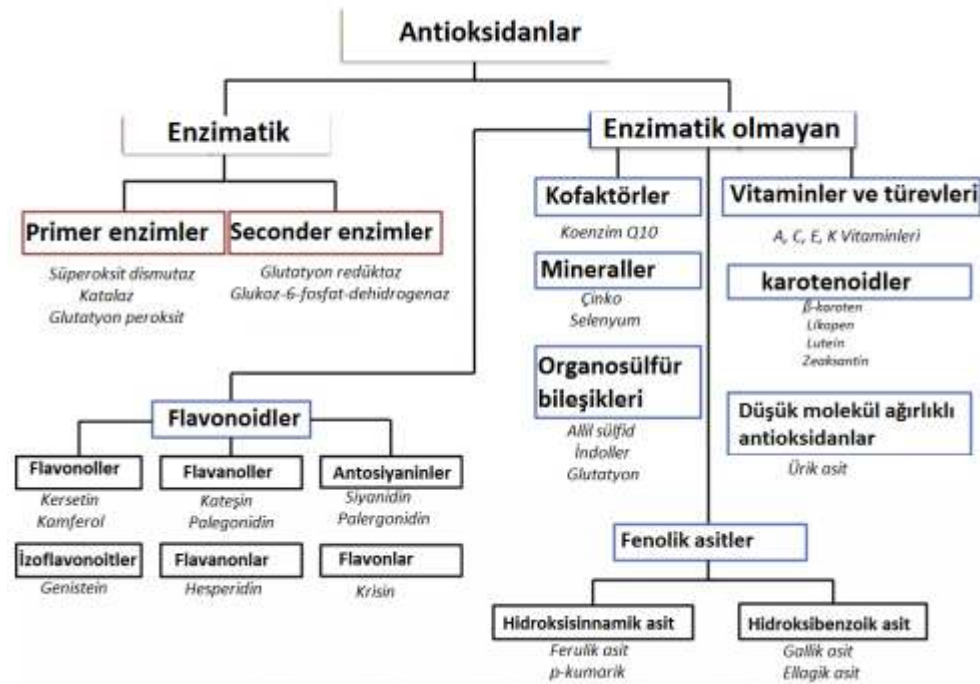
Oksidatif denge, organizmada serbest radikallerin oluşma hızı ile kaldırılma hızı arasındaki dengedir. Oksidatif denge bozulmazsa organizma, serbest radikallerden zarar görmez. Fakat serbest radikallerin oluşma hızında yükselme veya ortadan kaldırılma hızında bir düşme olursa oksidatif denge bozulur ve hücrede serbest radikaller artar. Serbest radikallerin hücrede artışı ve hücrenin işlevleri üzerinde yaptıkları olumsuz etkiye oksidatif stres (oksidatif hasar) adı verilir (56, 57). ROS ve diğer serbest radikallerin ömürleri kısadır, bu yüzden tespit etmek oldukça zordur. Ortaya çıkan oksidatif hasar genel olarak amino asitler, nükleik asitler ve lipid peroksidasyon ürünlerinin ölçülmesiyle analiz edilmektedir (60).

FA kullanılarak deney hayvanlarında pek çok çalışma yapılmıştır. FA'nın oksidatif hasar oluşturduğu, buna karşı uygulanan bazı antioksidanların ise bu hasarı azalttığı bildirilmiştir (61, 62).

1.4. Antioksidanlar

“Antioksidan savunma sistemleri” ya da "antioksidanlar" adı verilen mekanizmalar, ROS oluşumu ve bunların sebep olduğu hasarı engelleyen savunma mekanizmalarıdır. Antioksidanlar etkilerini; toplayıcı, baskılayıcı, zincir kırıcı ve onarıcı etki ile dört farklı şekilde gösterir (63, 64).

Antioksidan sistemi, enzimatik antioksidan maddeler ve enzimatik olmayan antioksidan maddeler olmak üzere iki alt başlığa ayrılır (Şekil 3) (65). Enzimatik antioksidanlara süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon S transferaz (GST) ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimleri örnek verilebilir. Oksidatif stres durumunda bu enzimlerin aktivitelerinde artış görüldüğü için özellikle SOD, CAT ve GPx enzimleri oksidatif stres ve antioksidan özellik araştırmalarında yaygın olarak incelenen parametrelerdir (60, 66). Enzimatik olmayan antioksidanlar ise endojen veya eksojen kaynaklı olabilir ve glutatyon, ürik asit, miyogloblin, hemogloblin, metiyonin, laktoferrin, bilirubin, çinko, E,C ve K vitamini gibi moleküller örnek verilebilir (63, 64).



Şekil 3. Endojen Antioksidan sınıflandırması (65).

1.5. CD68 (Cluster of Differentiation 68)

CD68 bir glikozile membran proteindir ve 110 kDa ağırlığındadır. Doku makrofajları ve monositler tarafından yüksek oranda eksprese edilir. CD68, lizozomal bağlantılı müsin benzeri membran protein ailesiyle bağlantılıdır (67, 68). CD68'in yerleşimi esas olarak lizozom ve endozom membranıdır. Fakat bunun yanında az da olsa hücre yüzeyinde bulunacak şekilde yerleşimi de vardır (69). CD68 proteini çöpçü reseptör ailesinin de üyesi olup, makrofajların ilgili bölgeye ulaştırılıp o bölgede aktivasyonunda, fagositozun arttırılmasında ve hücrel artıkların temizlenmesinde görev almaktadır (69).

Sun ve ark. (70) yaptıkları çalışmada; metabolik sendrom sonucu oluşan inflamasyonun osteoartrit üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Çalışmada sıçanlara yüksek karbonhidrat ve yağ diyeti uygulanarak metabolik sendrom oluşturulmuştur. Böylelikle metabolik sendromlu sıçanların diz eklemlerindeki sinovyumda bulunan çok sayıda hücrenin CD68 için immün reaktif olduğunu saptamışlardır.

Başka bir çalışmada Skyba ve ark. (71) kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) tanısı konulmuş hastaları incelemişlerdir. Bu çalışmaya göre ideal kiloya sahip kişilere nazaran obez kişilerde CD68 ve TNF- α gen düzeyleri ciddi oranda yüksek bulunmuştur. Ayrıca adipoz dokuda var olan bu genlerin adiposit hücre yoğunluğu ve vücut kütle indeksi ile doğru orantılı, insülin hassasiyeti ile ters orantılı ilişkisi rapor edilmiştir. Bu bilgiler dışında adipoz dokuda yer alan CD68, TNF- α ve IL-6 gen düzeyleri birbirleriyle ilişkili bulunmuş ve KOAH hastalarının adipoz dokularında yer alan makrofajların, hastalık sürecinde gelişen inflamasyona ivme kazandırdığı rapor edilmiştir (72).

Thenappan ve ark. (73) yaptıkları çalışmada pulmoner dokuda CD68 pozitif makrofajların biriktiğini bildirmişlerdir. Biriken CD68 pozitif makrofajlar, akciğerde inflamasyonu ve anormal anjiyogenezi başlatan önemli faktörlerdir. Akciğerdeki anormal inflamasyon ve anjiyogenezin neden olduğu hepatopulmoner sendromun kontrol altına alınabilmesi için de biriken makrofajların yok edilmesi gerektiğini rapor etmişlerdir.

1.6. Timokinon (TQ)

Çörek otu olarak bilinen *Nigella sativa* (*N. sativa*) Asya'nın güneybatısı, Avrupa'nın güneyi ve Afrika'nın kuzeyine özgü Ranunculaceae (Düğün çiçeğigiller) ailesinden olan mucizevi bir bitkidir (74). Yaprakları ince ve boyu 40 cm'e kadar uzayabilen otsu bir bitkidir (Resim 1).

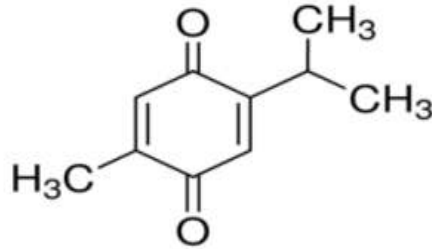


Resim 1. *N. sativa* L. (Anonim, 2018)

Çörek otunun tohumları; proteinler (%16-19,9), sabit yağlar (%32-40), uçucu yağlar (%0,4-2,5), amino asitler (arjinin, glutamik asit, metionin, lösin, lisin, trosin, prolin ve treonin), alkaloidler, tanenler, saponinler, lifler (%5,5), askorbik asit (C), karbonhidratlar (%33,9), mineraller (%1,79-3,44), tiamin (B1), niasin (PP), pridoksin (B6), folik asit (B9) ve su (%6) içermektedir. Uçucu yağında ise; nigellon, trans anetol, karvakrol, p-cymene, d-limonen, α ve β -pinen de bulunmaktadır (75, 76). TQ, ditimokinon, timohidrokinon ve timol ise uçucu yağın içinde yer alan farmakolojik aktif bileşenlerdir (77).

1.6.1. Kimyasal Yapısı

TQ'nun kimyasal formülü $C_{10}H_{12}O_2$ 'dir (Şekil 4), 2- izopropil-5 metil- 1,4 benzokinon yapısındadır ve molekül ağırlığı 164.201 g/mol'dür (78).



Şekil 4. Timokinonun kimyasal yapısı

TQ, N.sativa'nın temel bileşenleri içinde hem en fazla oranda bulunan (%30-%48) hem de potansiyel olarak en fazla farmakolojik etkiye sahip aktif bileşenidir (79). TQ'nun uçucu yağda bulunma yüzdeleri bir çalışmada %27,8-%57,0 olarak rapor edilirken (80), yapılan başka çalışmalarda ise %18,4-%24 olarak bildirilmiştir (81, 82).

1.6.2. Timokinonun Sistemler Üzerine Etkisi

TQ birçok biyoaktiviteye sahip bir bileşendir. Buna karşın en çok antioksidan ve antikanserojenik etkileri araştırılmıştır (83-85). TQ'nun antioksidan özelliğini araştıran pek çok çalışma yapılmıştır (86, 87). Çalışmalarda TQ'nun antioksidan etkisiyle ilgili süperoksit radikali ve hidroksil radikallerini içeren birçok reaktif oksijen türlerinin temizleyicisi olduğu, 5-hidroksieikozatetraenoik asit ile 5-lipoksijenaz sentezini inhibe ettiği, serbest radikal oluşumunu engellediği, demire bağlı mikrozomal lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği, polimorfonükleer lökositleri uyardığı ve oksijenin zararlı etkilerine karşı koruyucu etkisi olduğu rapor edilmiştir (88, 89).

TQ'nun ilk ekstrakte edildiği 1960'lı yıllardan itibaren antioksidan, antiinflamatuvar ve antikanser aktiviteleri ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. TQ'nun antikanser etkilerini antiproliferatif, hücre döngüsü durdurucu, apoptozis arttırıcı, ROS üretici ve antimetaztas gibi farklı yollarla yaptığı düşünülmektedir (90). Araştırmalarda TQ'nun; ön mide karsinomunu (91), kolorektal kanser (83), neoplastik keratinositler (92), insan osteosarkomu (93), fibrosarkom, hepatoselüler karsinoma (85), akciğer karsinomu, prostat kanseri (84) vb. çoğu kanser türünde hücrelerin çoğalması üzerinde engelleyici ve tedavi edici etki gösterdiği bildirilmiştir.

Gastrointestinal sistem hastalıkları için N. Sativa ve TQ ekstratlarının yaygın bir şekilde kullanıldığı bildirilmiştir (94). Yapılan çalışmalarda N. Sativa yağının ve TQ'nun mide mukozasını koruma yoluyla gastrik lezyonlara karşı gastroprotektif etkili ve antiülser etkili olduğu rapor edilmiştir (95).

Hayvanlar üzerinde kimyasal ajanlarla karaciğer hasarı oluşturulan deneysel modellerde TQ'nun sitoprotektif etkili bir bileşen olduğunu gösteren birçok çalışma mevcuttur (87, 96). Bir çalışmada farelere karbon tetraklorür verilerek karaciğer hasarı oluşturulduktan sonra oral TQ uygulamasının karaciğer hasarını düzelttiği rapor edilmiştir (96). Farelere karbon tetraklorür enjeksiyonundan 1 saat önce TQ'nun profilaktik olarak uygulandığı çalışmalarda, toksisite sonucu artan serum enzim

seviyelerini düşürdüğü, hepatik GSH içeriğini arttırdığı ve böylelikle karbon tetraklorürün hepatotoksitesini düzelttiği bildirilmiştir (86, 97). Tekrar fareler üzerinde yapılan başka bir çalışmada TQ (1, 2 ve 4 mg/kg/gün, 5 gün) oral olarak verilmiş ve kuinon redüktaz ve glutatyon transferaz aktiviteleri üzerine etkisi araştırılmıştır. TQ'nun kuinon redüktaz ve glutatyon transferaz aktivitelerini belirgin olarak arttırdığı, bu nedenle de karaciğerde koruyucu bir bileşik olarak kimyasal karsinogenlere ve toksisiteye karşı etkili olabileceği rapor edilmiştir (98). Ratlarda yapılan bir çalışmada asetaminofen ile karaciğer toksisitesi oluşturulmuş, tedavi amaçlı uygulanan TQ'nun etkisi incelenmiş ve TQ'nun terapötik etkisini antioksidan sistemini artırma yoluyla yaptığı bildirilmiştir (99). Yapılan başka bir çalışmada ise etanol ile ratlarda hepatotoksite oluşturulmuş, oluşan hepatotoksiteye karşı TQ'nun (10 ve 20 mg/ kg vücut ağırlığı, 7 gün, oral) koruyucu olduğu ve alkol kaynaklı karaciğer hastalıklarının tedavisinde TQ'nun etkili bir ajan olduğu bildirilmiştir (100).

1.7. Ozon (O₃)

1.7.1. Tarihçesi

Ozonun (O₃) varlığını ilk kez Van Marum 1785 yılında ortaya çıkarmış, ancak Christian Friedrich Schönbein 1839 yılında O₃'nun üç atomlu oksijen gazı olduğunu keşfetmiştir (101). O₃ jeneratörü ilk olarak 1857 yılında Almanya'da Werner von Siemens tarafından yapılmıştır, ancak tedavi amacıyla ilk defa 1870 yılında C. Lender tarafından kanın saflaştırılması için kullanılmıştır (102, 103). O₃'nun tarihte tıbbi nedenli ilk kullanımı 1. Dünya Savaşı sırasında Dr. Albert Wolff'a uzanmaktadır. Ayrıca 1935 yılında Dr. Erwin Payr, 59. Alman Cerrahi Birliği toplantısında "Cerrahide Ozon Uygulamaları" konulu bir sunum yapmıştır (104, 105). O₃'nun hem laboratuvar ekipmanı için hem de dış hekimliğinde tedavi için kullanımı 1950 yılında E.A. Fisch tarafından gerçekleştirilmiştir. Sonrasında 1972 yılında "Tıbbi Ozon Derneği" kurulmuş, 1993 yılında ise adı "Hastalıkların Önlenmesi ve Tedavisinde Ozon Uygulamaları Tıp Derneği" olarak değiştirilmiştir. Birçok hekim O₃ tedavisini 80'li yıllara kadar kullanmış ancak tıbbi kullanımı için bilimsel çalışmalar ve araştırmalar 80'li yıllardan sonra ivme kazanmıştır (106). Türkiye'de ise 2014 yılında Resmi Gazete'de yayınlanan "Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Uygulamaları

Yönetmeliği”nde yer alan uygulama esasları, sağlık kuruluşlarının türleri ve çalışma esasları mevzuatına uygun şekilde medikal O₃ tedavisi uygulamaları başlamıştır (107).

1.7.2. Genel Bilgiler

O₃ gaz halinde bulunan bir moleküldür. Yapısında üç oksijen atomu yer alır. Yapısında iki oksijen yer alan moleküler oksijen (O₂) kararlı halde iken, üç oksijen içeren O₃ kararsız haldedir. Kararsız formda olan O₃’nun oksijene dönüşmesi yaklaşık 20 dakika içinde gerçekleşir. O₃’dan oksijen oluşumu sırasında ortamda serbest kalan atom var olan diğer moleküllere bağlanarak medikal yarar sağlayan yapıları meydana getirir (104).

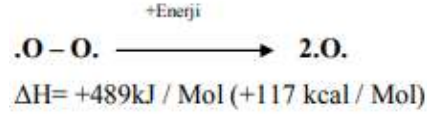
Stratosfer tabakası içinde 1–10 ppm konsantrasyonunda bulunan O₃ açık mavi renkte, keskin kokulu bir gazdır (108), görevi yeryüzünü ultraviyole (UV) ışınlarının zararlı etkilerinden korumaktır (109, 110). O₂ ve karbondioksitte (CO₂) olduğu gibi suda çözünme özelliği vardır. Suda çözünürlüğü O₂’ye göre 10 kat (100 mL suda 49 mL O₃, 0,02 M, 0°C’de) daha fazladır. Spontan olarak yıkıma uğrar. Yarı ömrü 20°C’de 40 dakika, 0°C’de yaklaşık 140 dakikadır ancak -111.9°C altında olarak depo edilebilir. Biyolojik sıvılarda çeşitli moleküllerle reaksiyona giren O₃ gazı serbest radikallerin oluşumuna neden olur (111). Bu nedenle ozon/oksijen karışımındaki O₃, antioksidan bileşiklerle, plazmada bulunan çoklu doymamış yağ asitleriyle ve sülfhidril (SH) grubu içeren tiyoller ile reaksiyona girer (104). Kimyasal yapısı gereği radikal özelliği yoktur, fakat oksidan bir ajandır. Oksidan özelliğinden dolayı bulunduğu ilk yıllarda dezenfeksiyon amacıyla kullanılırken, medikal kullanımı ise O₃ jeneratörlerinin keşfiyle artarak günümüze ulaşmıştır (112).

1.7.3. Medikal Amaçlı Elde Edilmesi

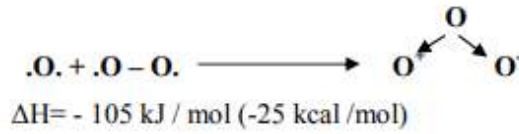
Medikal kullanıma uygun O₃ en sık Corona Discharge O₃ Jeneratörleri aracılığıyla elde edilir. Jeneratör aracılığıyla elektrik akımı 4000-14000 V gibi yüksek voltajlı verilir ve oksijen molekülünün (O₂) yapısında yer alan çift bağ bozulur ve bir oksijen atomu serbest kalır. Serbest kalan bu atom var olan bir O₂ molekülüyle birleşip O₃ gazını oluşturur. O₃, 3O₂ + 68,4 Kcal → 2O₃ tepkimesi ile oluşur. Diğer elde etme yöntemleri, soğuk plazma sistemi ve ultraviyole O₃ jeneratörleridir (113).

O₃ oluşumu aşağıdaki basamaklar sonunda gerçekleşir (106):

1. Oksijen molekülünün bir kısmı elektrikle muamele sonucunda ayrı ayrı oksijen atomlarına ayrışır:



2. Enerji yüklü atomlar bir başka oksijen molekülüyle reaksiyona girer, enerjilerini yitirir ve O₃ oluştururlar:



Medikal O₃'nun hazırlanması ve kullanımında dikkat edilmesi gereken önemli noktalar vardır. O₃ hiçbir zaman saf olarak kullanılmamalıdır. Her zaman O₂ ile belirli oranda karıştırılmalıdır. Bu karışımda O₂ oranı en az %95, O₃ oranı ise en fazla %5 olmalıdır. Eğer bu karışıma normal atmosfer havası girerse, reaktif özelliğinden dolayı O₃ tepkimeye girer ve sonucunda toksik bir gaz olan nitrojendioksit (N₂O₂) oluşabilir (114). O₃ sabit bir molekül olmadığı için medikal kullanımı sırasında her zaman taze olarak hazırlanmalı ve bekletilmeden anında uygulanmalıdır (106). O₃ gazı direk damar içine verildiği takdirde emboliye neden olabilir, bu nedenle dışarıda kan ile iyice karıştırıldıktan sonra infüzyon şeklinde uygulanmalıdır. Tedavi sırasında O₃ uygulaması için O₃'a dayanıklı üretilmiş malzeler (paslanmaz çelik, nötral cam ve teflon) kullanılmalıdır (104).

1.7.4. Etki Mekanizması

Henry kanunu'na göre O₃ gazı da her gaz gibi sıcaklık, basınç ve konsantrasyon parametrelerine bağlı olarak saf suda çözünme özelliğine sahiptir. Fakat O₃ diğer gazlardan farklı olarak serum fizyolojik, plazma, lenf, idrar gibi biyolojik sıvılarda oksijene göre çok daha hızlı olarak çözünür ve reaksiyona girer. Bu nedenle ozon/oksijen karışımındaki O₃ majör otohemoterapi uygulamasında; çoklu doymamış yağ asitleri, antioksidanlar (askorbik asit ve ürik asit gibi), sülfhidril gruplarına sahip tiyol bileşikler (sistein gibi), glutatyon ve albümin ile reaksiyona girer. Bu reaksiyon esnasında doza bağımlı olarak DNA, RNA, karbonhidratlar ve

enzimler de etkilenebilir. Tüm bu bileşikler O_3 karşısında oksidasyona uğrar ve reaktif oksijen türevleri (süperoksit, hidrojen peroksit ve hipoklorit) oluşur. Doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu reaksiyonlar içinde en önemlisidir (114). Bu reaksiyonda her hidrojen peroksitle birlikte iki de lipid oksidasyon ürünü oluşmaktadır (105, 115).

İkincil haberci gibi davranan hidrojen peroksitin O_3 'nun tedavi edici özelliğinde kısıtlı da olsa etkili olduğu kabul edilmektedir. Hidrojen peroksitin etkilerinden biri eritrositlerdeki 2,3-difosfoglisarat düzeyini arttırması, böylece oksijenin dokulara daha kolay bırakılmasına neden olmasıdır. Hidrojen peroksitin plazmada konsantrasyonu artar, kolayca hücrelerin içine diffüze olur, böylece lökosit ve endotelial hücrelerde çeşitli interlökin, interferon ve transforme edici büyüme faktörü yapımını arttırma yönünde etkileri olur. Lipid oksidasyon ürünlerinin yarı ömürleri saatlere ulaşabildiği için O_3 'nun geçmiş etkilerinden sorumlu tutulmaktadır. Bu ürünler uzun yarı ömürlerinden dolayı çeşitli biyolojik etkiler gösterirler (116). Medikal O_3 'a maruziyet trombosit fonksiyonlarının artışına neden olmaktadır ve bunu doz bağımlı yapmaktadır. Trombositler aktive olduktan sonra büyüme faktörü salınımı ile iskemi gelişen hastalarda ve ülserli hastalarda iyileşmeye olumlu etkilerinin olduğu gösterilmiştir (117). Deneysel oksidatif stres modellerinde medikal O_3 'nun etkileri araştırılmış, antioksidan enzim (SOD, CAT ve GPx gibi) düzeylerini arttırdığı, MDA düzeylerini azalttığı ve böylece dokuları iskemi-reperfüzyon hasarından koruduğu gösterilmiştir (118).

Medikal O_3 sonrası oluşan terapötik etkiler aşağıdaki gibidir (Şekil 5).



Şekil 5. Medikal O_3 'nun terapötik etkileri (119)

Serbest radikaller çeşitli patolojik süreçlerde bazen başlatıcı işlev yapar, bazen ara basamaklarda görev alır, bazen de sonda ortaya çıkabilen reaktif maddelerdir.

Birçok fonksiyonu olan serbest radikallerin varlığı O_3 'nun biyolojik etkilerinin ortaya çıkması için önemlidir (120).

1.7.5. Ozon Uygulama Metodları

1.7.5.1. Sistemik Uygulama

Major Otohemoterapi: Bu tedavi yönteminde O_3 ile zenginleştirilen hasta kanı belirli bir hızla hastaya tekrar geri transfüze edilir. Uygulamada kapalı ve basıncı alınmış bir sistem kullanılır. Hastadan yaklaşık 50-100 ml kan alınır, uygun dozlarda O_3 ile reaksiyona sokulur. Bu tedavide steril tek kullanımlık malzeme kullanılmalıdır. Bu tedavi yöntemi genellikle; arteriyel dolaşım bozuklukları, immün yetmezlikten kaynaklanan hastalıklar, enfeksiyonlar, kanser hastalarının ek tedavisi, romatizmal eklem hastalıkları gibi durumlarda tercih edilmektedir (105, 106, 121).

Minör Otohemoterapi: Bu yöntemde hastadan alınan 5 ml kan, aynı miktarda 80–100 μ l/ml'lik ozon/oksijen karışımı ile reaksiyona sokulur. Sonrasında oluşan karışım im (intramuskuler) yolla vücuda geri verilir. İşlem esnasında anesteziye gerek yoktur. Bu tedavi yöntemi; alerjik vakalar, akne ve fronkülozis gibi durumlarda tercih edilir (105, 109).

Rektal insüflasyon: Medikal O_3 tedavisinin en eski uygulama yöntemlerindendir. Bu yöntemde 150-300 ml ozon/oksijen karışımı kullanılır. Karışım katater ve katatere bağlı silikon torba veya enjektör aracılığı ile rektal yoldan uygulanır. Bu tedavi yöntemi toplamda 10-12 insüflasyonluk bir uygulama programıdır. Bu yöntemin tercih edildiği durumlar; sistemik olarak majör otohemoterapinin uygulanamaması, özellikle intravenöz reinfüzyona damarların uygun olmaması nedeniyle uygulanamadığı yaşlı hastalar; topikal olarak bağırsaklarda proktit ve kolit gibi patolojik durumlar ve bağışıklık sisteminin yetersiz kaldığı sistemik enfeksiyonlardır (109, 122).

Periton İçi Uygulama: Periton boşluğuna silikon kateter sabitlenir ve bu kateterle 10-20 μ g/ml arasındaki bir konsantrasyon ve 200-300 ml arasındaki bir hacimde O_3 'lanmış suyla periton yıkanır. Bu yöntem peritonitin tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca deneysel hayvan çalışmalarında en sık kullanılan yöntemdir (122).

1.7.5.2. Topikal Uygulama

Düşük Basınçlı O₃ Uygulaması: Daha önceki çalışmalarda, lokal sınırlı yaralarda O₃ gazının düşük atmosferik basınçta ve bir emme kabı altında sürekli akışının olumlu etkisi bildirilmiştir (106). Bu yöntem; dekübit ülserleri, radyasyon yaraları ve fistül tedavilerinde tercih edilmektedir (122, 123).

Transkutanöz O₃ İmersiyonu: Bu yöntem genellikle; varis ülserleri ve geniş alana yayılan enfekte olmuş yaralarda tercih edilmektedir (122, 123).

İntraartiküler O₃ Enjeksiyonu: Bu tedavi yöntemi genellikle; osteoartrit, romatoid artit ve gonartroz durumlarında tercih edilmektedir (106, 120).

O₃'lanmış Ürünlerin Uygulanması: O₃'lu su, O₃'lu kremler veya O₃'lu zeytinyağı şeklindeki uygulamalardır. Bu yöntem; diş ve diş eti yaraları, zona, enfekte cilt yaraları, mantar enfeksiyonları ve otitis eksterna gibi durumlarda kullanılabilmektedir (105, 121, 122).

1.7.6. Ozon Tedavisinin Endikasyonları

Medikal O₃ tedavisi esas olarak infeksiyöz hastalıklar, immün sistem hastalıkları, vasküler bozukluklar, ortopedik patolojiler ve dejeneratif hastalıklarda kullanılmaktadır (110).

Enfeksiyöz hastalıklar: O₃'lanmış distile su ve O₃'lu yağın dezenfektan etkisi ve immün sistemi aktive edici özelliği bilinmektedir. Bu etkilerinin dışında savaş yaraları, ülserler anaerobik enfeksiyonlar ve yanıklarda etkinliği vardır. O₃'lanmış solüsyonlar temizleyici etki ve güçlü dezenfektan özelliğinden dolayı mantar hastalıkları, gingivitis, anal fissür, yatak yarası, fistül, osteomyelit, sinüzit, stomatit, apse, vulvovajinit, antibiyotiklere dirençli iyileşmeyen yaralar veya anaerobik bakterileri öldürmek için kullanılmaktadır (106). Ayrıca yapılan çalışmalarda medikal O₃ tedavisinin hem maliyetinin düşük olduğu hem de kendisine gelişmiş bir direncin olmadığı rapor edilmiştir (110).

İmmün sistem hastalıkları: İmmün sistemin baskılandığı veya bozulduğu kanser hastalarında kemoterapi veya radyoterapi tedavisi sonrasında, kronik viral hastalıklarda ve romatolojik hastalıklarda medikal O₃ tedavileri uygulanmaktadır (124, 125).

Vasküler bozukluklar: Yapılan birkaç çalışmada medikal O₃ tedavisinin serebral ve kalp damar hastalıklarında, kronik alt ekstremitte iskemilerinde, Raynaud's Sendromunda etkili olduğu bildirilmiştir (126). O₃'nun bu tedavideki etki mekanizması şöyle açıklanmıştır; eritrositlerdeki 2,3-DPG miktarını arttırıp oksihemoglobin disosiasyon eğrisini sağa kaydırır ve periferde hipoksik dokulara O₂ dağıtımını sağlar. O₃'a maruz kalan endotelial hücrelerde NO salınımı ciddi düzeyde artar. Salınımı artan NO hem vazodilatasyonu sağlar hem de ekstremitte iskemisi olan hastalardaki spontan ağrıyı ortadan kaldırır. Kesin olmamakla birlikte iskemik alanlarda neoanjiogenez olduğu da iddia edilmektedir (127). Ayrıca O₃'lanmış heparinize kanda Platelet Derive Büyüme Faktörü (PDGF) ve Değiştirici Büyüme Faktörü (TGF β1) salınımı ve buna bağlı olarak da ülserleşmiş dokuların iyileştiği gözlenmiştir (126).

Ortopedik patolojiler: Disk hernileri veya akut-kronik eklem hastalıklarında hasarlı bölgeye düşük hacimle medikal O₃ tedavisi uygulanmaktadır (128, 129).

Dejeneratif hastalıklar: Yapılan çalışmalarda verilen ozon/oksijen karışımının antioksidan enzim seviyesini arttırdığı ve bu etkiyle senil demans, parkinson hastalığı, optik sinir disfonksiyonları ve makülopati gibi hastalıklarda faydalı olacağı bildirilmiştir (130, 131). Orta düzeyde ve tekrarlı medikal O₃ tedavilerinin SOD, CAT, GPx enzimlerini kesinlikle arttırdığı bilinmektedir. Kardiyak infarktüs, nörodejeneratif hastalıklar, HIV enfeksiyonu (124) ve makulopati gibi durumlarda da bu enzimlerde artış olduğu rapor edilmiştir (110).

Tablo 2'de medikal O₃'nun etki mekanizması ve bu doğrultuda endikasyonları gösterilmektedir (110).

Tablo 2. Medikal O₃'nun endikasyonları ve etki mekanizması

Endikasyonları	Etki mekanizması
Arteriyel dolaşım bozuklukları	Eritrosit metabolizması aktivasyonu O ₂ 'nin serbest kalma etkisi
Yüzeyel ülserler ve deri lezyonları	Dezenfeksiyon Yara iyileştirme özelliği
Enfeksiyonlar ve virüs kaynaklı hastalıklar	İmmünomodülasyon Dezenfeksiyon
Patolojik bağırsak sorunları	İmmünoaktivasyon Antienflamatuar etki
Karsinojenik patolojiler	İmmünoaktivasyon Antienflamatuar etki
Romatizmal hastalıklar	İmmünomodülasyon Antioksidatif kapasitenin aktivasyonu İmmünoaktivasyon
Geriatrik sorunlar	O ₂ 'nin serbest kalma etkisi Enzim aktivasyonu
Dış hekimliği	Dezenfeksiyon Yara iyileştirme özelliği

Terapötik O₃ uygulama doz aralığı, “Uluslararası Ozon Tedavisi Okulları”nın 2010 yılında yayınladığı “Madrid Ozon Deklorasyonu”nda belirlenmiştir. Bu bilgi dahilinde terapötik O₃ konsantrasyonunun 5-60 µg/ml arasında olduğu kabul edilmiş ve konsantrasyonlar düşük, orta ve yüksek konsantrasyon olarak üçe ayrılmıştır (132).

Düşük konsantrasyon (10-20 µg/ml): İmmün sistemin baskılandığı veya etkilendiği hastalıklarda tercih edilmektedir. Bu konsantrasyon aralığında immünmodülatör etki yapmaktadır.

Orta konsantrasyon (20-30 µg/ml): Hem immünmodülatör hem de antioksidan etki yapar. Alzheimer, Parkinson ve demans gibi nörodejeneratif hastalıklarda; amfizem, kronik obstruktif akciğer hastalığı ve akut respiratuar stres sendromu gibi akciğer hastalıklarında; retinitis pigmentosa, katarakt, glokom ve yaşa bağlı maküler dejenerasyon gibi oftalmolojik hastalıklarda; talasemi ve orak hücreli anemi gibi hematolojik hastalıklarda ve hipertansiyon, venöz yetmezlik, periferik arteriyel hastalık, kardiyak iskemi ve venöz staz gibi vasküler hastalıklarda kullanılmaktadır.

Yüksek konsantrasyon (30-60 µg/ml): Anti-enflamatuar etki göstermektedir. Enfeksiyöz (HIV, Herpes Simplex Virüs, Human Papilloma Virüs, Hepatit A, B, C, zona, giardiazis, candidiazis), dermatolojik, eklem (osteoartrit, gonartroz), alerjik ve sistemik enflamatuar hastalıkların (SLE, romatoid artrit, Crohn hastalığı) tedavisinde kullanılmaktadır.

1.7.7. Ozon Tedavisinin Yan Etki ve Kontrendikasyonları

Medikal O₃ tedavisinin mutlak kontrendike olduğu durum; glukoz 6 fosfat dehidrogenaz enzim eksikliği ile giden Favizm hastalığıdır. Tedavinin seyrini etkilediği için tedavi sürecinde C vitamini ve E vitamini içeren tüm antioksidan takviyelerinin bırakılması önerilmektedir. Göreceli kontrendike durumlar ise; hamilelik (özellikle ilk 3 ayda), nonkompanse diyabetes mellitus ve toksik hipertiroidizmdir (133, 134).

O₃ uygun terapötik aralıkta kullanıldığı takdirde yan etkileri oldukça az gözlemlenmektedir. Yan etkiler genellikle lokal komplikasyonlardan (iyatrojenik) veya O₃'nun yüksek konsantrasyonlarda inhale edilmesinden kaynaklanmaktadır. Nadiren de olsa en sık görülen yan etkiler; mide bulantısı, dudaklarda ve dilde karıncalanma hissi, ağızda metalik tat, yorgunluk, kaşıntı, eritematöz deri döküntüleri ve hafif hipotansiyondur (135).

Solunan havada artan O₃ konsantrasyonuna bağlı olarak organizmada ortaya çıkan toksik durumlar Tablo 3'te gösterilmiştir (136).

Tablo 3. Solunan havadaki O₃ gazı konsantrasyonu ve toksik etkileri

Havadaki O ₃ Konsantrasyonu (Ppm)	Toksik Etki
0.1	Üst hava yollarında irritasyon ve salgı artışı
1.0-2.0	Rinit, öksürük, baş ağrısı, bulantı
2.0-5.0 (10-20 dk)	İlerleyici dispne, bronşiyal spazm, retrosternal ağrı
5.0 (60 dk)	Akut pulmoner ödem, bazen respiratuar paralizi
10.0	4 saat içinde ölüm
50.0	Dakikalar içinde ölüm

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmaya Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı'nın 17.07.2019 tarih ve 2019/15 sayılı toplantısının 147 nolu karar onayı ile başlanmıştır. Çalışmada ağırlıkları 270-300 gr arasında değişen 8-10 haftalık 56 adet Sprague-Dawley cinsi erkek sıçan kullanıldı. Deney için 56 adet hayvan her grupta rastgele 7 adet hayvan olacak şekilde 8 eşit gruba ayrıldı ve her bir grup 4 haftalık deney süresine dahil edildi.

2.2. Deney Grupları

Kontrol grubu (Grup 1): Bu gruptaki sıçanlar deney süresi boyunca 100x50x20 cm ebatlarındaki cam fanus içerisinde normal atmosfer havasına maruz bırakıldı.

O₃ verilen grup (Grup 2): Deney süresi boyunca 100x50x20 cm ebatlarındaki cam fanus içerisinde normal atmosfer havasına maruz kalan sıçanlara haftada 5 gün 150 µg/kg/gün ip (intraperitoneal) yolla O₃ verildi.

TQ verilen grup (Grup 3): Deney süresi boyunca 100x50x20 cm ebatlarındaki cam fanus içerisinde normal atmosfer havasına maruz kalan sıçanlara haftada 5 gün 10 mg/kg/gün ip (intraperitoneal) yolla TQ verildi.

O₃ ve TQ verilen grup (Grup 4): Deney süresi boyunca 100x50x20 cm ebatlarındaki cam fanus içerisinde normal atmosfer havasına maruz kalan sıçanlara haftada 5 gün 150 µg/kg/gün ip O₃ ve 10 mg/kg/gün ip TQ aralarında 8 saat zaman dilimi bırakılacak şekilde verildi.

FA verilen grup (Grup 5): Bu gruptaki sıçanlar deney süresi boyunca 100x50x20 cm ebatlarındaki cam fanus içerisinde solunum yolu ile 10 ppm 8 saat/gün FA'ya maruz bırakıldı.

FA ve O₃ verilen grup (Grup 6): Deney süresi boyunca 100x50x20 cm ebatlarındaki cam fanus içerisinde solunum yolu ile 10 ppm 8 saat/gün FA'ya maruz kalan sıçanlara haftada 5 gün 150 µg/kg/gün ip O₃ verildi.

FA ve TQ verilen grup (Grup 7): Deney süresi boyunca 100x50x20 cm ebatlarındaki cam fanus içerisinde solunum yolu ile 10 ppm 8 saat/gün FA'ya maruz kalan sıçanlara haftada 5 gün 10 mg/kg/gün ip TQ verildi.

FA, O₃ ve TQ verilen grup (Grup 8): Deney süresi boyunca 100x50x20 cm ebatlarındaki cam fanus içerisinde solunum yolu ile 10 ppm 8 saat/gün FA'ya maruz kalan sıçanlara haftada 5 gün 150 µg/kg/gün ip O₃ ve 10 mg/kg/gün ip TQ aralarında 8 saat zaman dilimi bırakılacak şekilde verildi.

2.3. Deney Ortamının Hazırlanışı

Deney süresinde 100x50x20 cm ebatlarında sekiz adet cam fanus kullanıldı. Her fanusa bir deney grubu yerleştirildi. Deney gruplarından dördü (grup 1,2,3 ve 4) deney boyunca FÜDAM'da barındı ve normal atmosfer havası soludu. Diğer dört gruba (grup 5,6,7 ve 8) ise cumartesi ve pazar hariç diğer günlerde 08:00 ile 16:00 saatleri arasında zehirli gaz tahliye sistemi olan Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi laboratuvarlarında FA solutuldu. FA soluma süresinin sekiz saatle sınırlandırılmasının sebebi; anatomist, histolog ve patoloğlarda FA'nın mesleki maruziyetinin hafta içi beş gün ve gün içinde sekiz saat olmasıdır.

Deney hayvanlarının barınacağı ortam ve FA solutma prosedürü Aydın ve ark.'nın (137) uygulama şekliyle gerçekleştirildi. Fanuslara hava giriş çıkışını sağlamak için 5 mm çapında iki adet delik açıldı. 100 cm uzunluğundaki cam fanuslar tel elek ile iki bölmeye ayrıldı. 70 cm uzunluğundaki bölmeye hayvanlar bırakıldı. 30 cm uzunluğundaki bölme ise FA uygulaması için kullanıldı. Her iki bölmenin tavanına 10.5 cm çapında birer tane yuvarlak delik açıldı. Büyük bölmenin tavanında bulunan delik hayvan tahliyesi için kullanıldı. Küçük bölmenin tavanında bulunan delikten 1 cm çapında iki adet pamuk top sarkıtıldı (Şekil 6).



Şekil 6. Cam Fanus, Hava Pompası, FA Enjekte Edilen Pamuk Topları

Deney süresince hayvanlara saat 08:00 ile 16:00 arasında FA solutuldu. Bunun için fanusların küçük bölmesinin tavanında yer alan her pamuk topunun merkezine 1 cc FA enjekte edildi. FA havadan ağır olup dibe çöken bir gaz olduğu için, gün içinde %37'lik FA doldurulan 50 ml ependorf tüplerinden hava pompasına bağlı serum setlerindeki damla ayarlayıcı aygıt ile fanuslara FA takviyesi yapıldı. Bu pompa dakikada 0.01- 0.02 ppm FA pompalayacak şekilde ayarlandı. Böylelikle hem cam fanus içindeki FA oranı gün içinde 10 ppm seviyesinde tutuldu hem de FA'nın cam fanusun her yerinde eşit olarak dağılması sağlandı. Cam fanus içindeki FA konsantrasyonu, OSHA (Occupational Safety and Health Administration) tavsiyeli, kalibrasyonu yapılmış FA monitörü (Environmental Sensors Co. Boca Raton FL 33432 USA Katalog No: ZDL-300) ile tespit edildi. Sekiz saat süresince 10 ppm'de tutulmaya çalışılan FA seviyesinde azalma olduğu takdirde 1 cc %37'lik FA yeniden pamuk toplarının merkezine enjekte edildi ve böylece sekiz saat boyunca 10 ppm FA seviyesi sağlandı.

Normal atmosfer havası soluyan ve sekiz saat FA solutulan hayvanların hepsinde normal rat yemi ile *ad libitum* su ve beslenmeye devam edildi (Tablo 4).

Tablo 4. Sıçan Yemi İçeriği

Soya (%)	29.4
Arpa (%)	27
Buğday (%)	15
Mısır (%)	10
Kepek (%)	8
Balık Unu (%)	8
DCP (%)*	1.6
Tuz (%)	0.6
Kavimix VM 23-Z (%)**	0.2
Methionin (%)	0.2

* % 18 fosfor, % 25 kalsiyum, % 0,2 flor

**1 gramında: 4800 IU A, 960 IU D3, 12 mg E, 0,8 mg K3, 0,8 mg B1, 2,4 mg B2, 1,2 mg B6, 0,006 mg B12 vitaminleri, 16 mg Nikotin amid, D. Panth. 0,32 mg Folik asit, 0,02 mg D-Biotin, 50 mg kolin klorür, 20 mg çinko, Basitrasin, 32 mg Mn, 16 mg Fe, 24 mg Zn, 2 mg Cu, 0,8 mg I, 0,2 mg Co, 0,06 mg Se, 4 mg Antioksidan ve 200 mg Ca'dan oluşur.

Deney sonunda bütün gruplardaki sıçanlar anestezi altında sakrifiye edildi. Sıçanlardan alınan kanların bir kısmı EDTA'lı tüplere kalan kısmı düz biyokimya tüplerine alındı. Sıçanlardan alınan karaciğer dokularının bir kısmı histolojik çalışma için %10'luk FA içeren steril idrar kaplarına alınırken, kalan kısmı biyokimya çalışmaları için -80°C'de saklandı.

2.4. Kan Örneklerinin Hazırlanması

2.4.1. MDA Tayini için

MDA tayini için alınan EDTA'lı kan örnekleri santrifüj edilerek plazmaları alınmış ve plazmada MDA düzeylerine bakılmıştır.

2.4.2. GSH Tayini için

Tam kanın distile su ile 1:10 oranında distil su ile sulandırılması ile elde edilen hemolizatlarda GSH tayini yapılmıştır.

2.4.3. CAT Tayini için

Plazması ayrılan EDTA'lı kan örnekleri, serum fizyolojik ile 3 kez yıkandıktan sonra eritrositler 1:5 oranında distile su ile sulandırılarak hemoglobin (Hb) tayini yapılmıştır. Daha sonra dilüe edilmiş bu kan örnekleri 1:100 oranında fosfat tamponu (50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH:7.0) ile tekrar sulandırılmış ve hazırlanmış bu hemolizatlarda CAT aktivite tayini yapılmıştır.

2.4.4. GPx Tayini için

Alınan tam kanın 1:20 oranında distile su ile sulandırılması ile elde edilen hemolizatlarda GPx aktivite tayini yapılmıştır.

2.4.5. AST ve ALT Tayini için

Alınan kan örnekleri EDTA içeren tüplerde toplanıp 3000 rpm'de santrifüj 10 dk edilerek elde edilen plazma örneklerinde AST ve ALT aktivite tayini yapılmıştır.

2.5. Doku Homojenatlarının Hazırlanması

2.5.1. MDA, GSH, CAT Tayini için Doku Örneklerinin Hazırlanması

Doku örnekleri iki süzgeç kâğıdı arasında suyu alındıktan sonra tartılarak distile su ile 1:10 oranında (ağırlık/hacim) sulandırılıp, kırılmış buz içerisinde teflon-

cam homojenizatörle homojenize edilmiş, 3.500 rpm’de 15 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatantlarda MDA, GSH, CAT ve protein tayinleri yapılmıştır.

2.5.2. GPx Tayini için Doku Örneklerinin Hazırlanması

Doku örnekleri distile su içinde 1:10 oranında (ağırlık/hacim) sulandırılıp, kırılmış buz içerisinde homojenize edilmiş ve oluşan homojenatlar 1.5 ml’lik ependorflara konularak soğutmalı santrifüjde 14.000 rpm’de 55 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifügasyon işlemi sonucunda süpernatantlar alınmış ve alınan bu süpernatantlarda GPx aktiviteleri ve protein tayini yapılmıştır.

2.6. Kullanılan Yöntemler

2.6.1. Plazma ve Dokuda MDA Düzeyinin Tayini

Plazma örneklerinde MDA düzeylerinde meydana gelen değişiklikler spektrofotometrik olarak Placer ve ark.’dan (138) modifiye edilmiş olan yöntemle göre ölçülmüştür. Bu metotta lipid peroksidasyonunun aldehit ürünlerinden olan MDA ile tiyobarbitürik asit, pembe renkli bir kompleks oluşturmakta ve bu çözeltinin absorbansı 532 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülerek lipid peroksidasyonunun derecesi saptanmıştır.

2.6.2. Eritrosit ve Dokuda GSH Düzeyinin Tayini

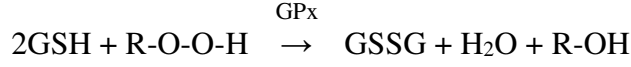
GSH tayini Ellman (139) tarafından bildirilen metotla yapılmıştır. Bu yöntem, 5,5’dithiobis-2-nitrobenzoik asit ilave edildiğinde sülfidril gruplarının meydana getirdiği sarı rengin spektrofotometrik olarak ölçülmesi temeline dayanan bir yöntemdir.

2.6.3. Kanda ve Dokuda CAT Aktivitesinin Tayini

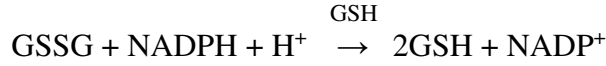
Eritrosit ve doku CAT aktivitesini ölçmek için Aebi (140) metodu kullanılmıştır. CAT H_2O_2 ’in yıkımını katalize eder. H_2O_2 ’in CAT tarafından yıkım hızı, H_2O_2 ’in 240 nm dalga boyunda ışığı absorbe etmesinden yararlanılarak spektrofotometrik olarak ölçülür.

2.6.4. Kanda ve Dokuda GPx Aktivitesinin Tayini

Eritrosit ve doku GPx aktivitesi ölçümü için Beutler’in (141) metodu kullanılmıştır. GPx, GSH’nin GSSG’ye oksidasyonunu H_2O_2 kullanarak katalizler.



GSSG'nin oluşum hızı GSH reaksiyonu vasıtasıyla ölçülür.



Reaksiyon ortamındaki t-butilhidroperoksidin (bu enzim ölçümlerinde en uygun peroksid substratıdır) her bir molekülünün redüksiyonu için 1 mol glutatyon disülfat (GSSG) oluşur. GSSG'nin GSH'ye redüksiyonunda GSSG'nin her bir molünün redüksiyonu için 1 mol NADPH okside olur. GPx aktivitesi de NADPH oksidasyonunu takiben spektrofotometrik olarak 340 nm'deki sistemin optik dansitesindeki düşüşten hesaplanır.

GPx'in spesifik aktivitesi; kanda U/mg Hb, dokuda U/g protein olarak hesaplanmıştır.

2.7. Total Oksidan ve Total Antioksidan Ölçümleri

2.7.1. Total Oksidan Seviyesinin (TOS) Ölçümü

Örneklerin (serum/plazma) TOS düzeyleri Sunred Biological Technology Co. Ltd. (Shanghai, CHINA) firmasından temin edilen Human TOS ELISA Kit kullanılarak ELISA yöntemiyle üretici firmanın kataloğunda (katalog no: 201-11-1669) belirtilen şekilde çalışma prosedürlerine uygun olarak çalışıldı. Örnekler çalışılırken plate yıkamalarında otomatik yıkayıcı Bio-Tek ELX50 (BioTek Instruments, USA) cihazı kullanıldı. Absorbans okumalarında ChroMate P4300 microplate reader (Awareness Technology Instruments, Palm City, FL, USA) cihazı kullanıldı. Test değerleri nmol/mL olarak verildi. Human HTN1 ELISA kitinin ölçüm aralığı 0.1-20 nmol/mL, sensivitesi ise 0.073 nmol/mL olarak belirtilmiştir.

2.7.2. Total Antioksidan Seviyesinin (TAS) Ölçümü

Örneklerin (serum/plazma) TAS düzeyleri Sunred Biological Technology Co. Ltd. (Shanghai, CHINA) firmasından temin edilen Human TOS ELISA Kit kullanılarak ELISA yöntemiyle üretici firmanın kataloğunda (katalog no: 201-11-2672) belirtilen şekilde çalışma prosedürlerine uygun olarak çalışıldı. Örnekler çalışılırken plate yıkamalarında otomatik yıkayıcı Bio-Tek ELX50 (BioTek Instruments, USA) cihazı kullanıldı. Absorbans okumalarında ChroMate P4300 microplate reader (Awareness Technology Instruments, Palm City, FL, USA) cihazı kullanıldı. Test değerleri U/mL olarak verildi. Human HTN1 ELISA kitinin ölçüm aralığı 0.2-60 U/mL, sensitivitesi ise 0.175 U/mL olarak belirtilmiştir.

2.8. İmmünohistokimya

2.8.1. CD68 İmmün Boyama Metodu

%10'luk nötral FA'da fikse edilen karaciğer dokuları, rutin histolojik takip serilerinden geçirilerek parafin bloklar hazırlandı. Hazırlanan parafin bloklardan 4-6 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Deparafinize edilen dokular dereceli alkol serilerinden geçirilip antigen retrieval için sitrat tampon solüsyonunda pH:6'da mikrodalga fırında (750W) 7+5 dakika kaynatıldı. Kaynatma sonrası oda ısısında yaklaşık 20 dakika soğutmak için bekletilen dokular PBS (Phosphate Buffered Saline, P4417, Sigma-Aldrich, USA) ile 3x5 dakika yıkandıktan sonra endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için hidrojen peroksid blok solüsyonu ile 5 dakika inkübe edildi (Hydrogen Peroxide Block, TA-125-HP, Lab Vision Corporation, USA). PBS ile 3x5 dakika yıkanan dokulara zemin boyasını engellemek için 5 dakika Ultra V Block (TA-125-UB, Lab Vision Corporation, USA) solüsyonu uygulandıktan sonra 1/200 oranında dilue edilen primer antikorlar (Rabbit CD68 Polyclonal Antibody, E-AB-40066, Elabscience, USA) ile 60 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildi. Dokular, primer antikor uygulanmasından sonra PBS ile 3x5 dakika yıkandıktan sonra sekonder antikor (Biotinylated Goat Anti-Polyvalent (anti-mouse / rabbit IgG), TP-125-BN, Lab Vision Corporation, USA) ile 30 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildi. Dokular, sekonder antikor uygulanmasından sonra PBS ile 3x5 dakika yıkayıp Streptavidin Peroxidase (TS-125-HR, Lab Vision Corporation, USA) ile 30 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildikten sonra PBS içerisine alındı.

Dokulara 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) Substrate + AEC Chromogen (AEC Substrate, TA-015 ve HAS, AEC Chromogen, TA-002-HAC, Lab Vision Corporation, USA) solüsyonu damlatılıp ışık mikroskopunda görüntü sinyali alındıktan sonra eş zamanlı olarak PBS ile yıkamaya alındı. Mayer'in hematoksilin ile zıt boyaması yapılan dokular PBS ve distile sudan geçirilerek uygun kapatma solüsyonu (Large Volume Vision Mount, TA-125-UG, Lab Vision Corporation, USA) ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Leica DM500 mikroskopunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı (Leica DFC295).

Boyamada immünreaktivitenin yaygınlığı (0.1: <%25, 0.4: %26-50, 0.6: %51-75, 0.9: %76-100) ve şiddeti (0: yok, +0.5: çok az, +1: az, +2: orta, +3: şiddetli) esas alınarak histoskor oluşturuldu. Histoskor=yaygınlık x şiddet.

2.8.2. TUNEL Metodu

Parafin bloklardan 5-6 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon, kat no: S7101, USA) kullanılarak apoptoza giden hücreler belirlendi. Xylene ile deparafinize edilen dokular, dereceli alkol serilerinden geçirilerek phosphate buffered saline (PBS) ile yıkandı. %0.05'lik proteinase K ile 10 dakika inkübe edilen dokular, endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için %3 hydrogen peroxide ile 5 dakika inkübe edildi. PBS ile dokular yıkandıktan sonra, 6 dakika Equilibration Buffer ile inkübe edilip, 37°C'de nemli ortamda çalışma solüsyonu (%70 µl Reaction Buffer + %30 TdT Enzyme) ile 60 dakika inkübe edildi. Stop/Wash Buffer'da 10 dakika bekletilen dokular, Anti-Digoxigenin-Perosidaz ile 30 dakika muamele edildi. Diaminobenzidine (DAB) substratı ile apoptotik hücreler görüntülendi. Harris hematoksilin ile zıt boyası yapılan kesitler uygun kapatma solüsyonu ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Leica DM500 mikroskopunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı (Leica DFC295). TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde Harris hematoksilin ile maviye boyanmış çekirdekler normal, kahverengi nükleer boyanma gösteren hücreler apoptotik olarak değerlendirildi. Kesitlerde 10'luk büyütmede rastgele seçilen alanlarda, normal ve apoptotik en az 500 hücre sayıldı. Apoptotik hücrelerin, toplam (normal + apoptotik) hücrelere oranlanması ile Apoptotik indeks (AI)'i hesaplanarak istatistiksel analizleri yapıldı. Boyama metodu aşağıdaki tabloda ayrıntılı olarak verilmiştir (Tablo 5).

Tablo 5. TUNEL Boyama Prosedürü.

	İşlem	Süre
1	60°C etüv	Bir gece
2	Xylol	3X15
3	%100, %96, %80, %70 etil alkol	3'er dakika
4	PBS	5 dakika
5	Kesitlerin çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizilir	
6	1:500 dilüsyondaki Protinaz K solüsyonu	20 dakika
7	PBS	3X5
8	Endojen peroksit blokajı (%3 H ₂ O ₂)	3 dakika
9	PBS	3X5
10	Equilibration tampon solüsyonu	10 dakika
11	Çalışma solüsyonu (%70 µl Reaction Buffer + %30 TdT Enzyme) 37°C'de	60 dakika
12	Stop/Wash Buffer (2ml) + Distile su (68ml) Oda sıcaklığında	10 dakika
13	Anti-Digoxigenin-Peroxidase	30 dakika
14	PBS	3X5
15	DAB Dilution Buffer + DAB Substrate	5-10
16	PBS	3X5
17	Distile su	5 dakika
18	Harris hematoksilen	1-5 dakika
19	Distile su	5 dakika
20	%80, %96 ve %100 etil alkol	1'er dakika
21	Xylol	2X5
22	Kapatma medyumu kullanılarak lamel ile kapatma.	

2.9. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için IBM SPSS Statistics 21 paket programı kullanıldı. Grup ortalamaları arasındaki farklar tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) kullanılarak hesaplandı. Post-hoc olarak Duncan testinden faydalanılarak, tüm değerler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası (ortalama $\pm$ SEM) şeklinde gösterildi.

$p < 0.05$ değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



3. BULGULAR

3.1. Formaldehit Ölçümleri

Gün içinde farklı saatlerde yapılan FA ölçümlerinde, FA'ya maruz kalma değeri 10.20 ± 0.16 ppm olarak tespit edildi (Şekil 7).



Şekil 7. Formaldehit Ölçümü Görseli

3.2. Klinik Bulgular

Dört hafta süren çalışma boyunca sıçanların gözle görülebilen klinik değişiklikleri takip edildi. Deney süresince FA'ya maruz kalmayan sıçanların tüyleri beyaz kalırken, FA'ya maruz kalan sıçanların tüylerinde sararma gözlemlendi (Şekil 8). Ayrıca FA solutulan sıçanların hareketlerinde yavaşlama, sık sık burun temizleme, aşırı göz kırpma ve yalanma hareketlerinde artış gözlemlendi. Bununla birlikte FA solutulan sıçanların çalışma başlangıcında ortalama ağırlığı 282 gr iken dört hafta sonrasında ortalama ağırlığı 263 gr olup vücut ağırlığında azalma tesbit edildi.



Şekil 8. Sıçan Tüylerinde Renk Değişimi

3.3. Biyokimyasal Bulgular

3.3.1. Kanda Biyokimyasal Bulgular

Serum AST ve ALT seviyelerinde oluşan değişiklikler açısından gruplar arası karşılaştırma yapıldı. Kontrol grubu, O₃ grubu, TQ grubu ve TQ+O₃ grubundaki sıçanlar arasında anlamlı bir farklılık izlenmedi. Fakat FA'ya maruz kalan sıçanlarda kontrol grubuna göre anlamlı bir yükselme ($p<0,05$) izlendi. Bunun yanında FA'ya maruz kalıp beraberinde sadece O₃, sadece TQ, ya da hem O₃ hem TQ tedavisi alan sıçanlarda FA nedeniyle yükselen değerlerin düştüğü gözlemlendi. Bu düşüş en çok FA+O₃ grubunda ortaya çıktı (Tablo 6).

Tablo 6. Sıçanların kanında AST ve ALT değerlerinin değişimi

Gruplar	AST (U/L)	ALT (U/L)
Kontrol	131,65±6,06 ^{ab}	65,50±2,46 ^a
O ₃	152,45±2,93 ^b	68,00±1,79 ^{ab}
TQ	154,15±1,85 ^b	67,50±0,22 ^{ab}
TQ+O ₃	135,15±2,93 ^{ab}	67,50±2,46 ^{ab}
FA	286,43±16,58 ^c	81,00±1,32 ^c
FA+O ₃	115,10±10,19 ^a	67,00±2,23 ^{ab}
FA+TQ	127,40±9,03 ^{ab}	73,50±4,25 ^b
FA+TQ+O ₃	140,05±10,98 ^{ab}	68,50±2,56 ^{ab}

Sıçanların serum MDA değerlerindeki değişime baktığımızda; kontrol, O₃, TQ ve TQ+O₃ grubu sıçanların MDA düzeyleri arasında anlamlı bir değişiklik saptanmadı. FA'ya maruz kalan sıçanların MDA değerinde anlamlı bir yükselme (p=0,001) gözlemlendi. FA'ya maruz kalıp beraberinde sadece O₃, sadece TQ, ya da hem O₃ hem TQ tedavisi alan sıçanlarda ise artan MDA seviyelerinde kontrol grubu değerleri ile uyumlu olan azalmalar izlendi. Bu değişim en çok FA+TQ grubunda meydana geldi (Tablo 7).

Sıçanlarda serum antioksidan parametrelerini incelediğimizde; kontrol, O₃, TQ ve TQ+O₃ grupları arasında anlamlı bir değişiklik saptanmadı. FA verilen sıçanlarda serum GSH ve CAT değerlerinde kontrol grubuna göre azalma olup p=0,05 çıkarken GPx ve SOD değerlerinde ise p=0,001 ile anlamlı düzeyde azalma saptandı. Buna karşın FA'ya maruz kalıp beraberinde sadece O₃, sadece TQ, ya da hem O₃ hem TQ tedavisi alan sıçanlarda ise azalan antioksidan parametrelerinin seviyelerinde anlamlı artışlar izlendi (Tablo 7).

Tablo 7. Sıçanların kanında MDA, GSH, CAT, GPx ve SOD değerlerinin değişimi

Gruplar	MDA (nmol/ml)	GSH (μmol/ml)	CAT (k/g Hb)	GPx (U/g Hb)	SOD (U/g Hb)
Kontrol	8,27±0,29 ^{ab}	159,31±5,88 ^a	30,61±1,85 ^{ab}	113,25±1,29 ^a	63,01±0,48 ^a
O₃	8,44±0,50 ^{ab}	148,74±8,02 ^a	27,40±1,69 ^b	114,73±2,62 ^a	63,03±0,51 ^a
TQ	8,08±0,32 ^a	149,59±6,04 ^a	34,97±1,76 ^a	114,61±6,15 ^a	62,43±0,61 ^{ab}
TQ+O₃	8,28±0,18 ^{ab}	149,04±5,76 ^a	26,84±2,00 ^b	122,01±7,62 ^a	62,89±0,61 ^a
FA	10,75±0,23 ^c	117,31±3,78 ^b	19,98±0,80 ^c	80,38±3,68 ^b	58,10±0,77 ^c
FA+O₃	9,28±0,17 ^b	142,82±9,99 ^a	27,19±2,27 ^b	112,71±11,67 ^a	60,77±0,99 ^b
FA+TQ	8,69±0,17 ^{ab}	143,88±5,39 ^a	26,79±0,96 ^b	107,40±3,95 ^a	62,44±0,63 ^{ab}
FA+TQ+O₃	9,24±0,23 ^b	143,46±7,47 ^a	29,08±2,20 ^{ab}	112,34±4,69 ^a	62,91±0,54 ^a

3.3.2. Karaciğer Dokusunda Biyokimyasal Bulgular

Sıçanların doku MDA değerlerindeki değişime baktığımızda; kontrol, O₃, TQ ve TQ+O₃ grubu sıçanların MDA düzeyleri arasında anlamlı bir değişiklik saptanmadı. FA'ya maruz kalan sıçanların MDA değerinde anlamlı bir yükselme (p=0,001) gözlemlendi. FA'ya maruz kalıp beraberinde sadece O₃, sadece TQ, ya da hem O₃ hem

TQ tedavisi alan sıçanlarda ise artan MDA seviyelerinde kontrol grubu ile uyumlu olan azalmalar izlendi. Bu azalma en çok FA+TQ+O₃ grubunda gözlemlendi (Tablo 8).

Sıçanlarda doku antioksidan parametrelerini incelediğimizde; kontrol, O₃, TQ ve TQ+O₃ grupları arasında anlamlı bir değişiklik saptanmadı. FA'ya maruz bırakılan sıçanların doku SOD ve GPx değerlerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir düşüş (p=0,001) olurken CAT seviyesinde anlamlı olmayan bir düşüş (p=0,05) saptandı. Buna karşın FA'ya maruz kalıp beraberinde sadece O₃, sadece TQ, ya da hem O₃ hem TQ tedavisi alan sıçanlarda ise azalan antioksidan parametrelerin seviyelerinde anlamlı artışlar meydana geldi (Tablo 8).

Tablo 8. Sıçanların karaciğer dokusunda MDA, GSH, CAT, GPx ve SOD değerlerinin değişimi

Gruplar	MDA (nmol/g doku)	GSH (μmol/ml)	CAT (k/mg prot.)	GPx (U/mg prot.)	SOD (U/mg prot.)
Kontrol	0,65±0,03 ^{abc}	14,67±0,49 ^a	34,22±2,51 ^{ab}	18,45±0,57 ^a	12,99±0,05 ^{ab}
O₃	0,54±0,06 ^a	17,54±0,18 ^a	33,65±2,87 ^{ab}	16,49±0,57 ^a	12,80±0,10 ^b
TQ	0,62±0,05 ^{abc}	16,64±0,30 ^a	40,05±1,94 ^a	18,18±0,53 ^a	13,25±0,19 ^{ab}
TQ+O₃	0,58±0,03 ^{ab}	17,13±0,21 ^a	37,22±1,72 ^{ab}	16,97±0,55 ^a	13,43±0,27 ^a
FA	0,96±0,06 ^d	14,93±0,35 ^b	25,57±1,76 ^c	14,30±0,58 ^b	11,91±0,14 ^c
FA+O₃	0,77±0,05 ^c	16,64±0,32 ^a	35,07±2,22 ^{ab}	18,39±1,02 ^a	12,93±0,10 ^{ab}
FA+TQ	0,78±0,05 ^c	17,17±0,25 ^a	34,02±2,47 ^{ab}	17,23±0,47 ^a	13,00±0,18 ^{ab}
FA+TQ+O₃	0,71±0,05 ^{bc}	16,73±0,23 ^a	35,07±2,22 ^b	17,58±0,41 ^a	12,92±0,12 ^{ab}

3.3.3. Kanda TOS ve TAS Ölçümleri

Serum TAS seviyelerindeki değişimi incelediğimizde; kontrol, O₃, TQ ve TQ+O₃ grupları arasında anlamlı farklılık izlenmedi. FA'ya maruz kalan sıçanların serum TAS değerlerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir düşüş (p=0,03) meydana geldi. FA'ya maruz kalıp beraberinde sadece O₃, sadece TQ, ya da hem O₃ hem TQ tedavisi alan sıçanlarda FA nedeniyle azalan serum TAS değerlerinde tekrar yükselme izlendi. Bu artış en çok FA+TQ+O₃ grubunda ortaya çıktı (Tablo 9).

Serum TOS seviyelerindeki değişimi incelediğimizde; kontrol, O₃, TQ ve TQ+O₃ grupları arasında anlamlı farklılık izlenmedi. FA'ya maruz kalan sıçanların

serum TOS değerlerinde kontrol grubuna göre anlamlı olmayan bir artış ($p=0,98$) izlendi. FA'ya maruz kalıp beraberinde sadece O₃, sadece TQ, ya da hem O₃ hem TQ tedavisi alan sıçanlarda FA nedeniyle artan serum TOS değerlerinde düşme saptandı. Bu düşüş en çok FA+TQ grubunda ortaya çıktı (Tablo 9).

Tablo 9. Sıçanların kanında TAS ve TOS değerlerinin değişimi

Gruplar	TAS	TOS
Kontrol	4.65±0.16 ^a	2.27±0.16 ^{ab}
O₃	4.65±0.35 ^a	2.31±0.07 ^{ab}
TQ	4.78±0.38 ^a	2.28±0.18 ^{ab}
TQ+O₃	4.67±0.24 ^a	2.34±0.20 ^{ab}
FA	4.20±0.25 ^b	2.36±0.22 ^a
FA+O₃	4.55±0.25 ^a	2.30±0.19 ^{ab}
FA+TQ	4.32±0.09 ^a	2.29±0.32 ^{ab}
FA+TQ+O₃	4.60±0.13 ^a	2.30±0.37 ^{ab}

3.3.4. Karaciğer Dokusunda TOS ve TAS Ölçümleri

Sıçanların karaciğer TAS seviyelerindeki değişimi incelediğimizde; kontrol, O₃, TQ ve TQ+O₃ grupları arasında anlamlı farklılık izlenmedi. FA'ya maruz kalan sıçanların değerlerinde kontrol grubu sıçanların değerlerine göre azalma olduğu saptandı. FA'ya maruz kalıp beraberinde sadece O₃, sadece TQ, ya da hem O₃ hem TQ tedavisi alan sıçanlarda FA nedeniyle azalan TAS değerlerinde tekrar yükselme izlendi. Bu yükselme en çok FA+TQ+O₃ grubunda meydana geldi (Tablo 10). Doku TAS seviyelerinde anlamlı değişiklikler saptanmadı ($p=0,205$).

Sıçanların karaciğer TOS seviyelerindeki değişimi incelediğimizde; kontrol, O₃, TQ ve TQ+O₃ grupları arasında anlamlı farklılık izlenmedi. FA'ya maruz kalan sıçanların doku TOS değerlerinde kontrol grubu sıçanların doku TOS değerlerine göre anlamlı olmayan bir artış ($p>0,05$) izlendi. FA'ya maruz kalıp beraberinde sadece O₃, y sadece TQ, ya da hem O₃ hem TQ tedavisi alan sıçanlarda FA nedeniyle artan doku TOS değerlerinde azalma saptandı. Bu azalma en çok FA+O₃ grubunda izlendi (Tablo 10). Doku TOS seviyelerinde oluşan değişiklikler anlamlı bulunmadı ($p=0,992$).

Tablo 10. Sıçanların karaciğer dokusunda TAS ve TOS değerlerinin değişimi

Gruplar	TAS	TOS
Kontrol	8.04±0.42 ^{ab}	2.76±0.19 ^{ab}
O ₃	8.16±0.84 ^{ab}	2.74±0.38 ^{ab}
TQ	8.19±0.33 ^{ab}	2.75±0.48 ^{ab}
TQ+O ₃	8.25±8.40 ^{ab}	2.75±0.45 ^{ab}
FA	7.63±0.37 ^a	2.92±0.66 ^a
FA+O ₃	7.83±0.41 ^b	2.81±0.46 ^{ab}
FA+TQ	7.93±0.34 ^b	2.82±0.32 ^{ab}
FA+TQ+O ₃	8.09±0.32 ^{ab}	2.85±0.12 ^{ab}

3.4. İmmünohistokimyasal Bulgular

3.4.1. Karaciğer Dokusunda CD68 İmmünreaktivitesi

CD68 immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskobu altında incelenmesi sonucu; CD68 immünreaktivitesi, karaciğer dokusunda sadece kupffer hücrelerinde (siyah ok) izlendi.

Kontrol grubuyla (Şekil 9) kıyaslandığında CD68 immünreaktivitesi TQ (Şekil 10) (p=0,097) ve TQ+O₃ (Şekil 11) (p=0,318) gruplarında benzer olarak izlenirken O₃ grubunda (Şekil 12) (p<0,001) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış olarak gözlemlendi. Bununla birlikte CD68 immünreaktivitesi FA grubunda (Şekil 13) (p=0,004) kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış olarak izlendi.

FA grubu ile karşılaştırıldığında ise CD68 immünreaktivitesi FA+O₃ (Şekil 14) (p<0,001), FA+TQ (Şekil 15) (p=0,004) ve FA+O₃+TQ (Şekil 16) (p=0,002) gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış olarak izlendi. Tedavi gruplarından FA+O₃ grubu ile karşılaştırıldığında FA+ TQ (p<0,001) ve FA+O₃+TQ (p<0,001) gruplarında CD68 immünreaktivitesi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış olarak gözlemlendi (Tablo 11).

Tablo 11. CD68 histoskoru

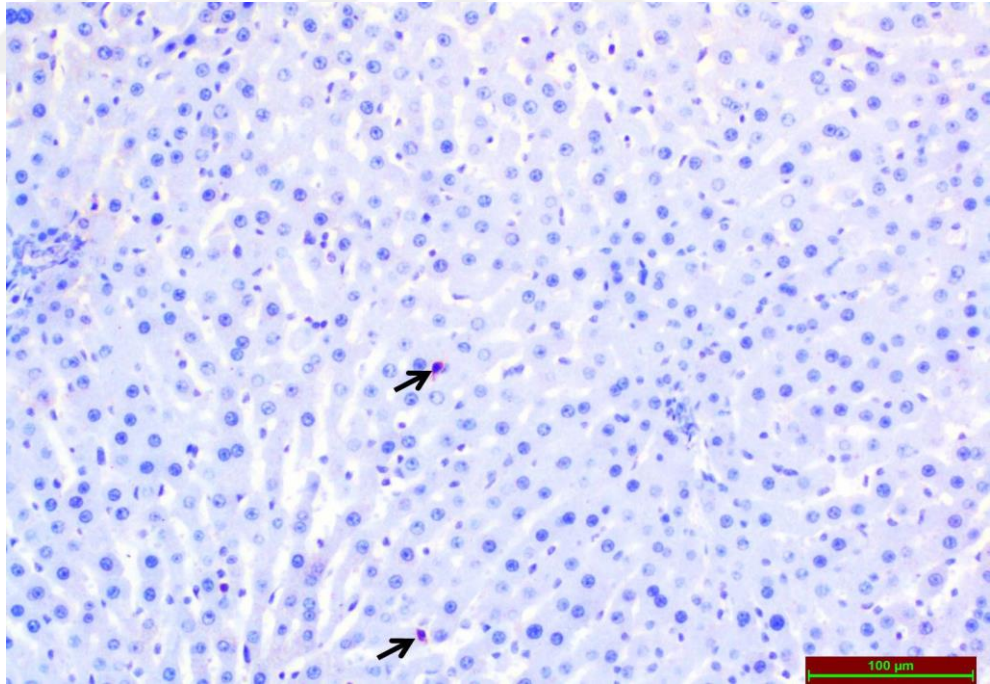
Gruplar	CD68 Histoskoru Median (min-maks)
Kontrol	3,00 (2,00-4,00)
O ₃	8,00 (5,00-9,00) ^a
TQ	2,00 (1,00-5,00)
TQ+O ₃	3,00 (2,00-4,00)
FA	1,00 (1,00-3,00) ^a
FA+O ₃	8,00 (6,00-9,00) ^{ab}
FA+TQ	3,00 (2,00-5,00) ^{bc}
FA+ O ₃ +TQ	3,00 (3,00-5,00) ^{bc}

Değerler median (min-maks) olarak verilmiştir.

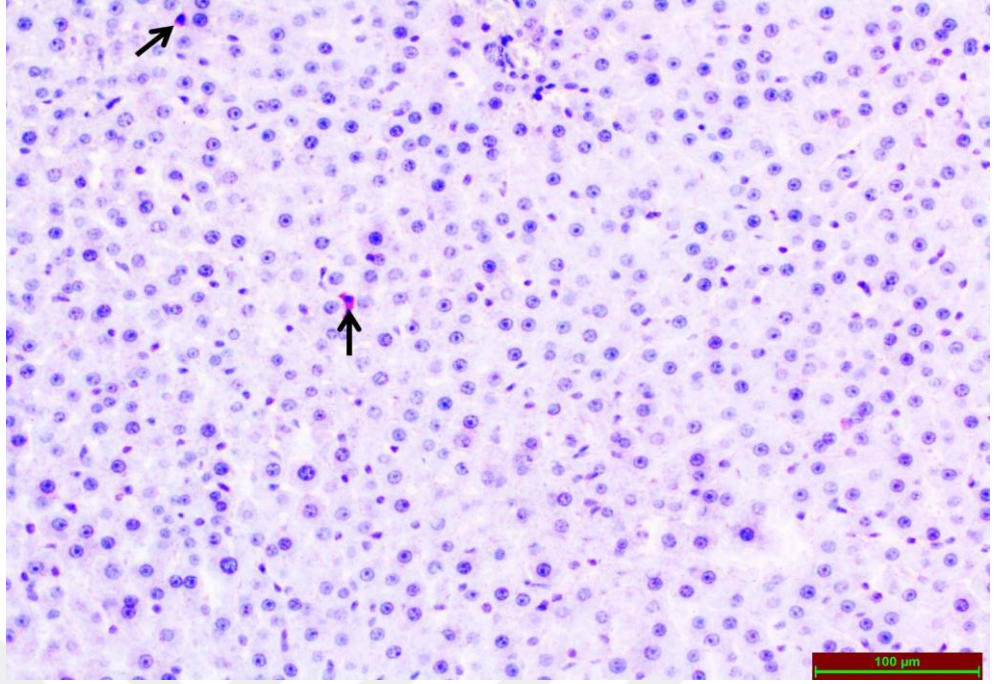
^aKontrol grubuna göre karşılaştırıldığında

^bFA grubu ile karşılaştırıldığında

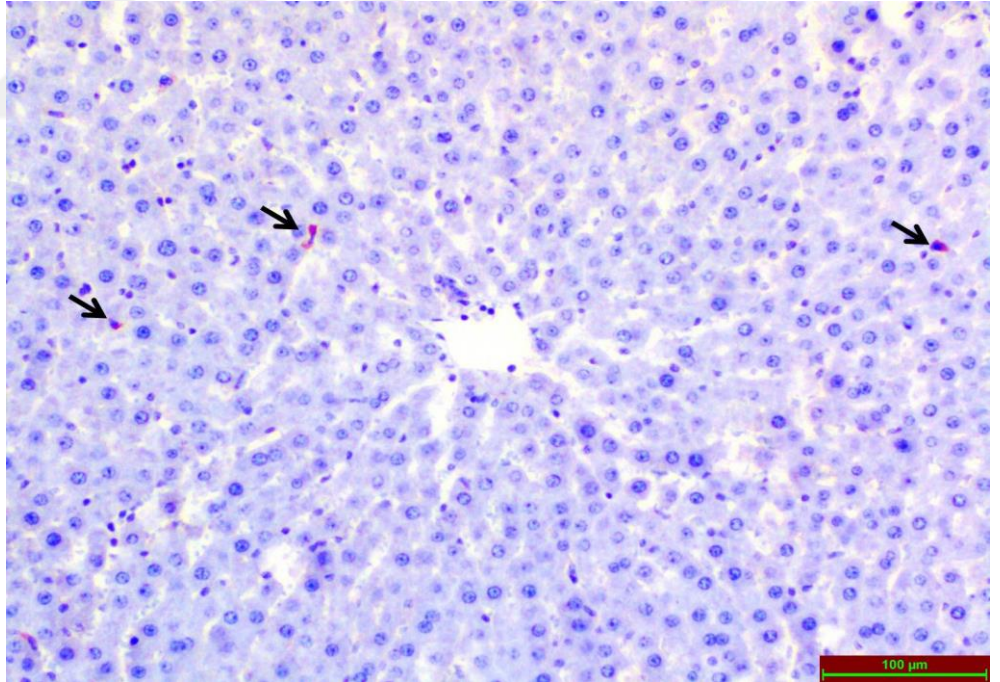
^cFA+O₃ grubu ile karşılaştırıldığında (p<0,005).



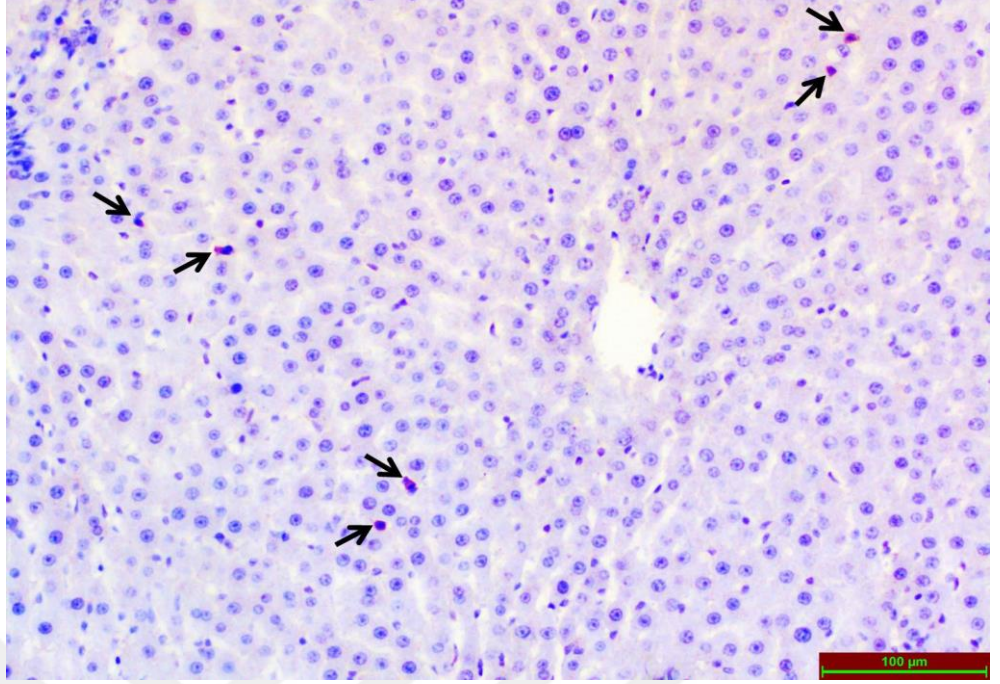
Şekil 9. Kontrol grubu sıçanların karaciğer dokusunda CD68 immünreaktivitesi (→).



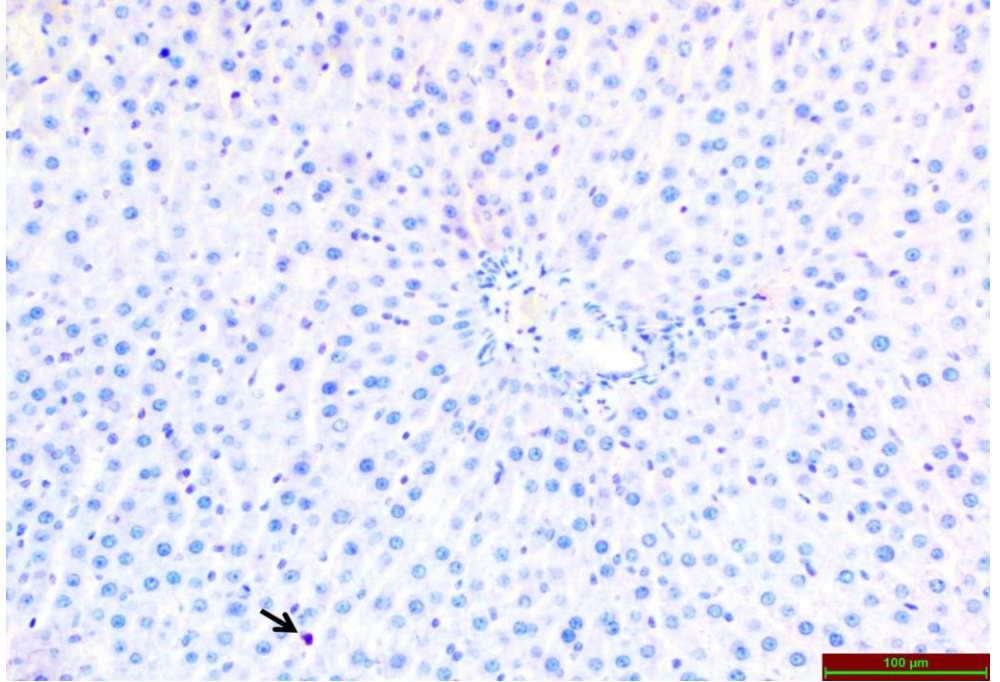
Şekil 10. TQ grubu sıçanların karaciğer dokusunda CD68 immünreaktivitesi (→).



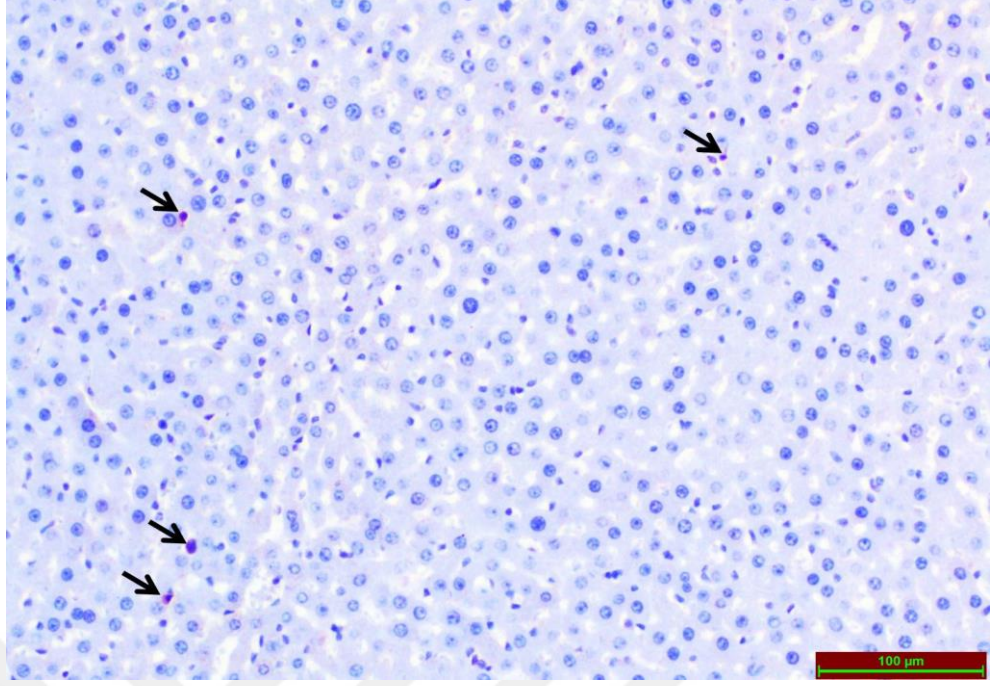
Şekil 11. TQ+O₃ grubu sıçanların karaciğer dokusunda CD68 immünreaktivitesi (→).



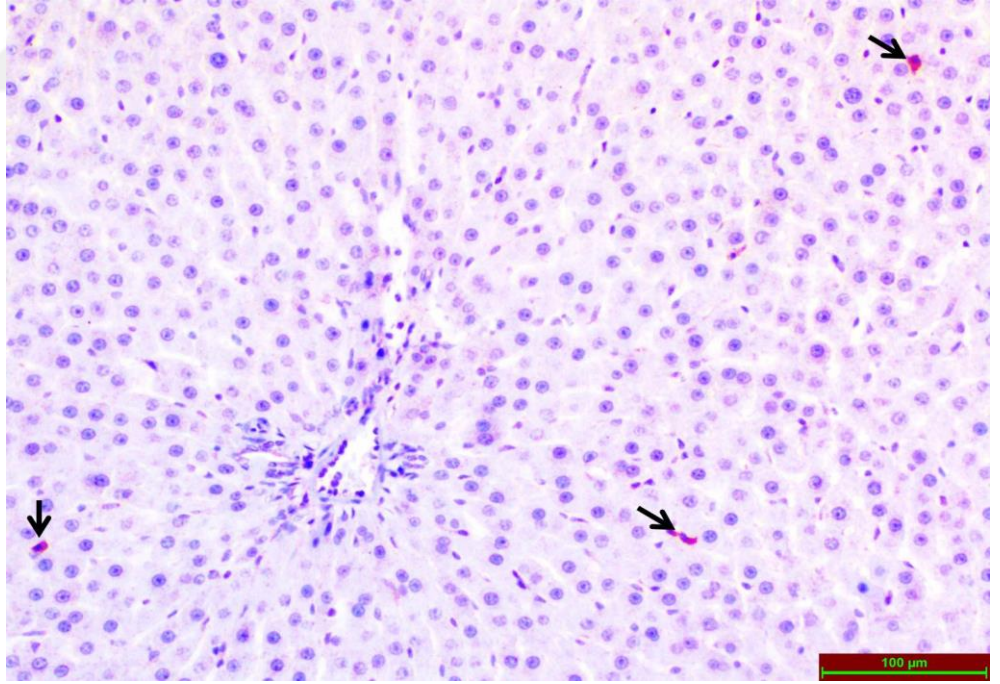
Şekil 12. O₃ grubu sıçanların karaciğer dokusunda CD68 immünreaktivitesi (→).



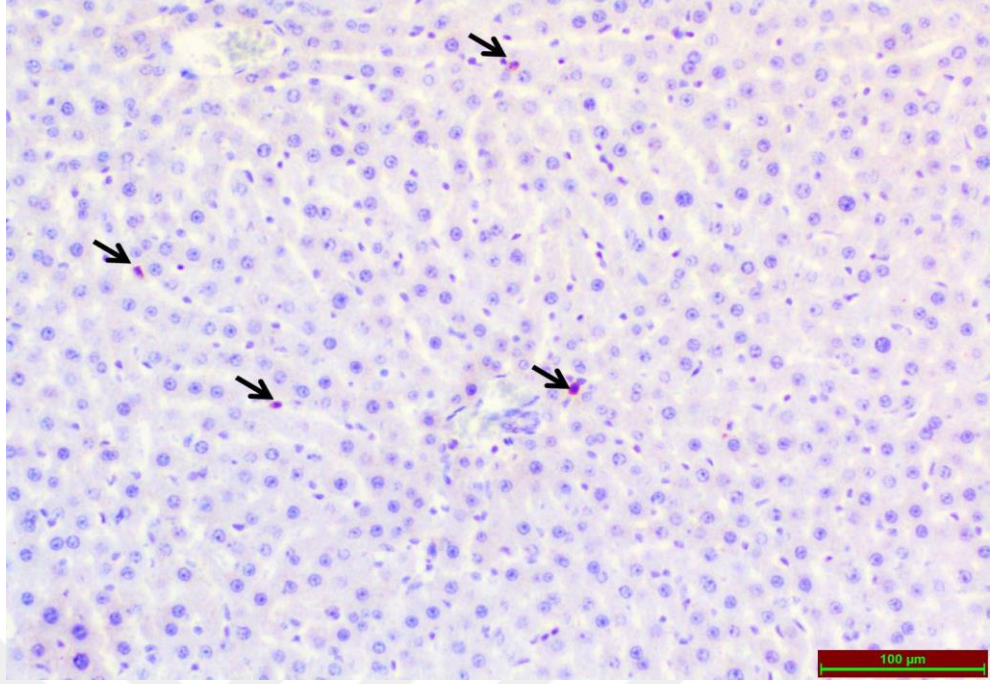
Şekil 13. FA grubu sıçanların karaciğer dokusunda CD68 immünreaktivitesi (→).



Şekil 14. FA+O₃ grubu sıçanların karaciğer dokusunda CD68 immünreaktivitesi (→).



Şekil 15. FA+TQ grubu sıçanların karaciğer dokusunda CD68 immünreaktivitesi (→).



Şekil 16. FA+O₃+TQ grubu sıçanların karaciğer dokusunda CD68 immünreaktivitesi (→).

3.4.2. Karaciğer Dokusunda TUNEL Boyama

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyama ışık mikroskobu altında incelendi.

Kontrol grubuyla (Şekil 17) kıyaslandığında TUNEL pozitifliği; O₃ (Şekil 18) ($p=0,209$), TQ (Şekil 19) ($p=0,805$) ve TQ+O₃ (Şekil 20) ($p=0,620$) gruplarında benzer olarak izlenirken FA grubunda (Şekil 21) ($p<0,001$) TUNEL pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış olarak izlendi.

FA grubu ile karşılaştırıldığında ise TUNEL pozitifliği; FA+O₃ (Şekil 22) ($p<0,001$), FA+TQ (Şekil 23) ($p<0,001$) ve FA+O₃+TQ (Şekil 24) ($p<0,001$) gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış olarak izlendi (Tablo 12).

Tablo 12. Apoptotik İndeks (%)

Gruplar	Apoptotik İndeks (%) Median (min-maks)
Kontrol	1,00 (1,00-3,00)
O ₃	1,00 (2,00-3,00)
TQ	1,00 (1,00-2,00)
TQ+O ₃	1,00 (1,00-3,00)
FA	5,00 (3,00-8,00) ^a
FA+O ₃	1,00 (1,00-2,00) ^b
FA+TQ	1,00 (1,00-2,00) ^b
FA+O ₃ +TQ	2,00 (1,00-3,00) ^b

Değerler median (min-maks) olarak verilmiştir.

^aKontrol grubuna göre karşılaştırıldığında

^bFA grubu ile karşılaştırıldığında, (p<0,005).



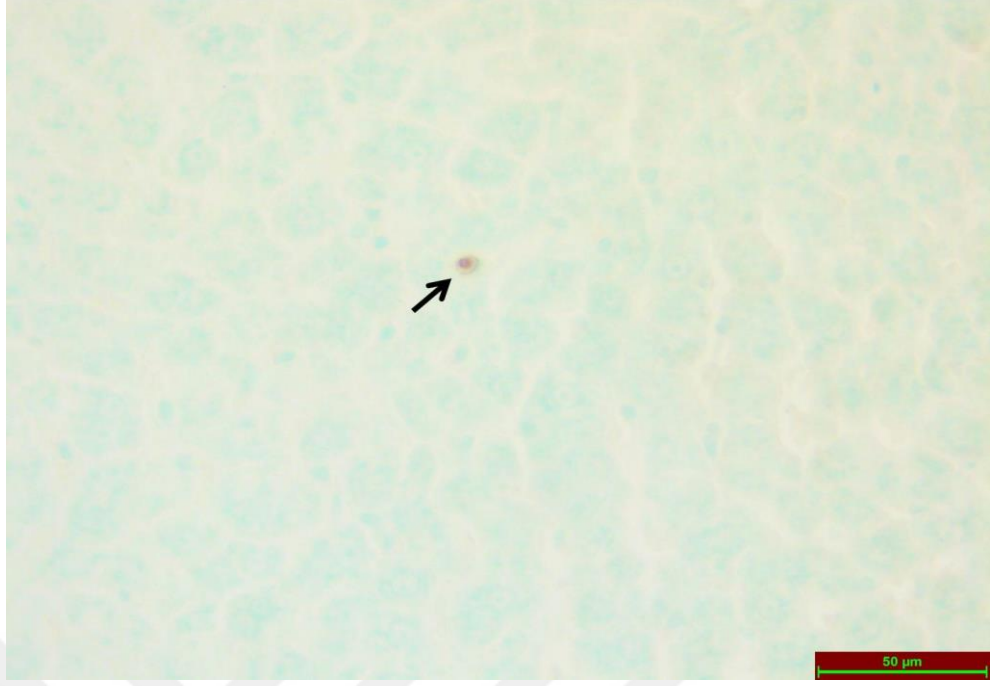
Şekil 17. Kontrol grubu sıçanların karaciğer dokusunda TUNEL pozitifliği (→).



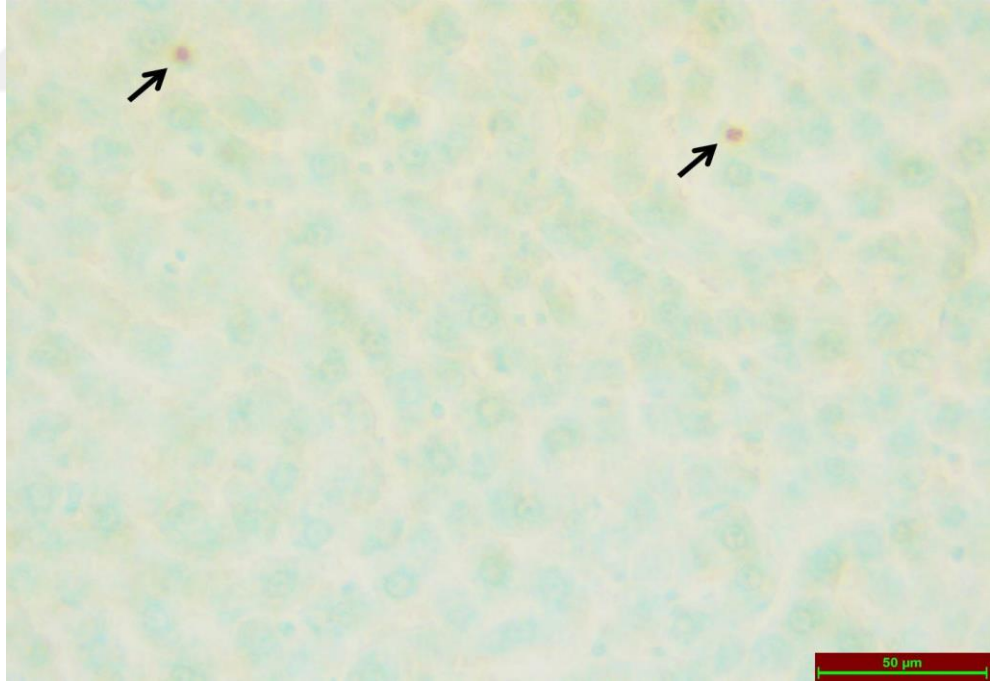
Şekil 18. O₃ grubu sıçanların karaciğer dokusunda TUNEL pozitifliği (→).



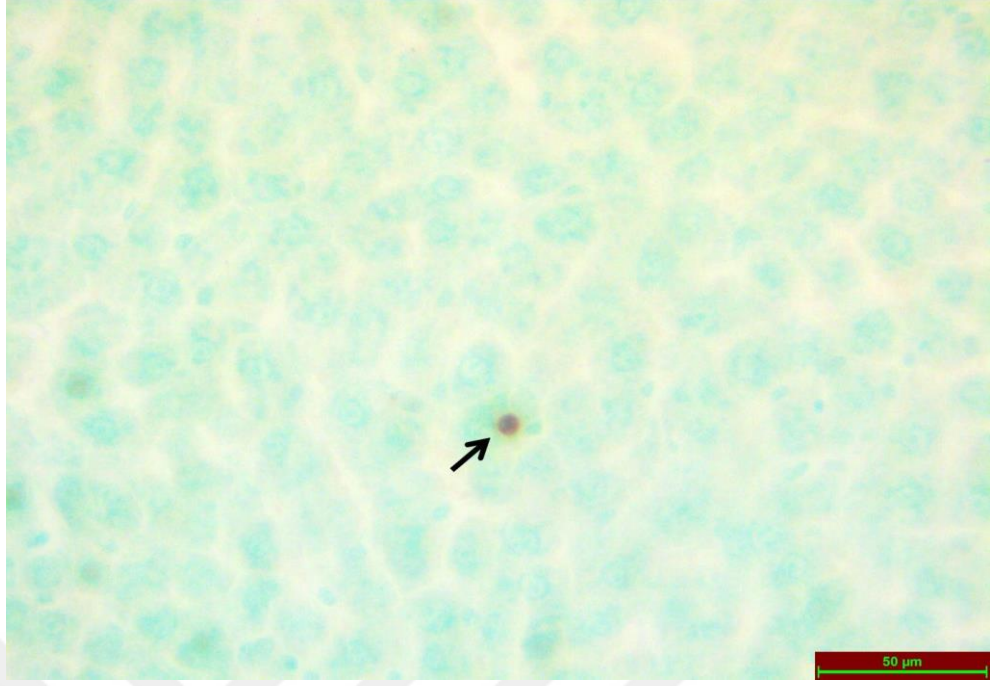
Şekil 19. TQ grubu sıçanların karaciğer dokusunda TUNEL pozitifliği (→).



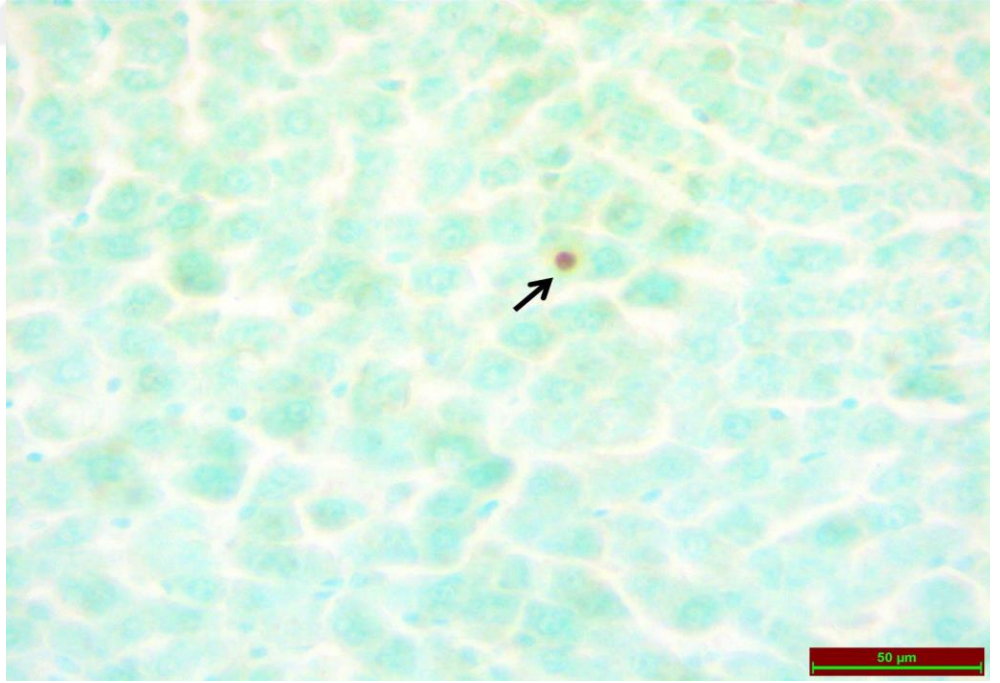
Şekil 20. TQ+O₃ grubu sıçanların karaciğer dokusunda TUNEL pozitifliği (→).



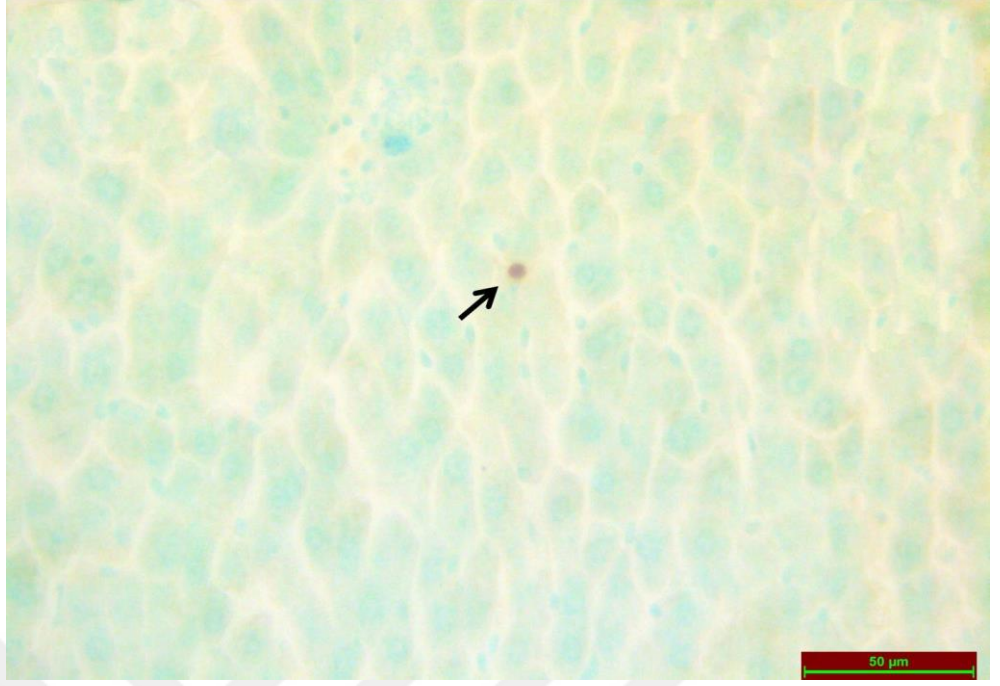
Şekil 21. FA grubu sıçanların karaciğer dokusunda TUNEL pozitifliği (→).



Şekil 22. FA+O₃ grubu sıçanların karaciğer dokusunda TUNEL pozitifliği (→).



Şekil 23. FA+TQ grubu sıçanların karaciğer dokusunda TUNEL pozitifliği (→).



Şekil 24. FA+O₃+TQ grubu sıçanların karaciğer dokusunda TUNEL pozitifliği (→).

4. TARTIŞMA

Formaldehit keskin kokulu, renksiz, suda çok iyi çözünen bir madde olup, aldehit ailesinin en basit üyesidir. FA hem organizmanın doğal yapısında yer alan hem de kimyasal amaçla oldukça yaygın kullanılan bir ajandır (1, 2).

FA ev temizlik ürünlerinde, duvar kaplamalarında, mumyacılıkta, tekstil ürünlerinin işlenmesinde, boya ve plastik maddelerin yapımında, kozmetik sanayide, diş macunlarında, tıbbi laboratuvarlarda koruyucu sıvı ve mikroorganizmaları öldürmesi sebebiyle bazı ambalaj maddelerinin bileşiminde ve gıda kaplarının sterilizasyonunda yaygın bir biçimde kullanılmaktadır. Bundan dolayı da yaşamımızın önemli parçası haline gelmiş bir kimyasal maddedir (3, 5). FA'nın geniş bir kullanım alanı olduğu için insan sağlığı üzerine etkilerinin incelenmesine yoğunlaşmıştır.

FA maruziyeti gözde sulanma, kızarıklık, yanma hissi, ağrı, bulanık görme ve 0.24 ppm gibi düşük konsantrasyonlarda dahi gözde iritasyon oluşturabilir (24, 25). FA maruziyetinin solunum sisteminde düşük dozda oluşturduğu etkiler; solunum yollarında yanma hissi, öksürük, hırıltılı solunumdur. Yüksek dozda (5-30 ppm) ise nefes darlığı, inflamasyon, pulmoner ödem ve pnömoni gibi daha ağır belirtiler oluşturur (26, 27). FA gastrointestinal sistemde ciddi lokal korozif etki, bulantı, ishal, ülserasyon, nekroz ve kanamaya, devamında ise dolaşım kollapsı, metabolik asidoz, hematüri, anüri, böbrek hasarı, kardiyak depresyon ve hayati tehlike oluşturan ciddi tablolara sebep olmaktadır (27, 33).

Çalışmamızda dört hafta boyunca FA'ya maruz bırakılan sıçanların kan ve karaciğer dokularında oluşturduğu bilinen harabiyete ve biyokimyasal bozulmalara karşı TQ ve O₃'ün etkilerinin hangi yönde olduğu, TQ ve O₃ verilmesinin antioksidan kapasite üzerindeki etkisinin nasıl olduğu, TQ ve O₃'ün antioksidan etkisinin birbirlerine üstünlüğünün olup olmadığı, bu etkiyle karaciğerde CD68 düzeylerinin nasıl etkilendiği ve ayrıca karaciğerdeki apoptotik durumlar araştırıldı.

Çalışmamızda kontrol grubu sıçanlarının tüyleri beyaz kaldı. FA'ya maruz kalan sıçanların tüylerinde ise sararma, bunun yanında sıçanların hareketlerinde yavaşlama, sık sık burun temizleme, aşırı göz kırpması ve yalanma hareketlerinde artış gözlemlendi. Oluşan bu klinik bulgular TQ ve O₃ alan gruplarda ortadan kalkmaktaydı.

Canlı organizmanın ya normal fizyolojik fonksiyonları esnasında ya da dışardan belli ajanlara maruziyeti ile serbest radikaller oluşur. Serbest radikallerin

etkilerine karşı koruyucu antioksidan savunma sistemi aktive olur. Serbest radikaller ile antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin serbest radikaller lehine değişmesi durumunda oksidatif stres ortaya çıkar. FA'nın neden olduğu toksik etkilerin oluşum mekanizmalardan biri de oksidatif stres olarak görülmektedir (142, 143). Sıçanlarla yapılan bir çalışmada FA'nın serum TAS değerlerini düşürdüğü ve serum MDA düzeylerini arttırdığı bildirilmiştir (144). Murta ve ark.'nın (142) yaptığı çalışmada farklı dozlarda FA uygulaması sonucu sıçanların akciğer dokularında artan FA konsantrasyonuna bağlı olarak MDA düzeylerinin arttığı görülmüştür. Yapılan çalışmalarda olduğu gibi bizim çalışmamızda da sıçanlara uygulanan FA, hem kan hem de karaciğer dokusunda MDA düzeylerinde artışa sebep oldu.

Oluşan doku hasarında oksijen türevi serbest radikallerin süpürülmesinin dokuların oksidan hasara karşı korunmasında önemli olduğu bildirilmiştir (144). SOD, CAT ve GPx, dokularda oluşan ROS'ların enzimatik olarak parçalanmasında ve zararsızlaştırılmasında rol alan enzimlerdir. Yapılan çalışmalarda FA'ya maruziyet sonrasında SOD, CAT ve GPx düzeylerinin düştüğü rapor edilmiştir (145, 146). Bizim çalışmamızda da FA'ya maruz kalan sıçanların hem kan hem de karaciğer dokularında SOD, CAT, ve GPx düzeylerinde azalma oldu.

GSH endojen olarak üretilen enzimatik olmayan antioksidan bir moleküldür. GSH'nin yaklaşık %40'ı karaciğerde yer almaktadır. GSH'nin en önemli görevi ROS'ları süpürmek, böylelikle biyomoleküllerin hasarına karşı koruyuculuk sağlamaktır. Artmış FA maruziyeti GSH depolarını tüketerek doku ve hücrelerde hasara yol açmaktadır (147, 148). Yonar ve ark. (149) yaptıkları çalışmada; FA'nın doku örneklerinde hem MDA konsantrasyonunu, hem de GPx ve GSH enzim aktivitelerini arttırdığını saptamışlar ve enzim düzeylerindeki artışı da oksidatif stresi ortadan kaldırmak için vücudun gösterdiği bir reaksiyon olarak yorumlamışlardır. Yapılan başka bir çalışmada FA maruziyeti ile kanda MDA artarken, SOD ve GPx seviyelerinde azalma olmuştur (145). Çalışmamızda FA, kanda GSH seviyelerinde azalmaya sebep olurken, karaciğer dokusunda GSH düzeyinde hafif artışa neden oldu.

Yapılan bir çalışmada iskemi reperfüzyon (I/R) ile oluşan hepatik hasar ile SOD ve CAT seviyelerindeki bozulmanın, O₃ tedavisi ile kontrol grubu düzeyine yakın olacak şekilde normaleştiği bildirilmiştir (150). Oksidatif stres oluşturularak O₃'nun etkilerinin araştırıldığı başka çalışmalarda da, verilen O₃ tedavisinin SOD,

CAT ve GPx gibi antioksidan enzim düzeylerini arttırdığı ve MDA düzeylerini azalttığı, sonuçta dokuları I/R hasarından koruduğu gösterilmiştir (136). I/R ile hepatik hasar oluşturulmuş başka bir çalışmada da I/R grubunda GSH tükenmesi olurken, O₃ tedavisi verilen grupta GSH tükenmesinin önlendiği bildirilmiştir (151). Bizim çalışmamızda da FA'ya maruz bırakılan sıçanlarda MDA seviyelerinde artma ve SOD, CAT ve GPx seviyelerinde azalma olurken, uygulanan O₃ tedavisi ile artan MDA seviyelerinde düşüş ve azalan SOD, CAT, GSH ve GPx seviyelerinde ise artış gözlemlendi.

Çelik ve ark.'nın (152) yaptığı bir çalışmada; deneysel olarak oluşturulan nöropatik ağrı modelinde artan MDA seviyelerinin TQ gruplarında azaldığı bildirilmiştir. Mehri ve ark.'nın (153) yaptıkları çalışmada; akrilamid ile sıçanlarda serebral kortekste artan MDA seviyesinin TQ tedavisi ile doza bağımlı olarak azaldığı görülmüştür. Yapılan başka bir çalışmada ise Gökce ve ark. (154), TQ uygulamasının I/R hasarı sonucunda artan MDA seviyelerini azalttığını, azalan SOD ve CAT değerlerini ise arttırdığını rapor etmişlerdir. Erdemli ve ark. (155) yaptıkları çalışmada; 30 gün süreyle 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin uygulaması ile sıçanlarda MDA seviyesinin artarken SOD ve CAT seviyelerinin azaldığını, antioksidan amaçlı uygulanan TQ ile artan MDA düzeylerinde azalma, azalan SOD ve CAT düzeylerinde ise düşme olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmamızda da FA'ya maruz bırakılan sıçanlarda MDA seviyelerinde artma ve SOD, CAT, GSH ve GPx seviyelerinde azalma olduğu ve uygulanan TQ tedavisi ile artan MDA seviyelerinde düşme ve azalan SOD, CAT, GSH ve GPx seviyelerinde ise yükselme olduğu gözlemlendi.

Çalışmamızda bir grup sıçana FA maruziyeti sonrasında hem TQ hem de O₃ tedavisi verildi. İkili tedavide iki farklı antioksidanın biyokimyasal olarak birbiriyle negatif etkileşimi görülmedi. Aksine hem TQ hem de O₃ tedavisinin birlikte verilmesi, değişen MDA, SOD, CAT, GSH ve GPx seviyelerini kontrol grubu seviyesine yaklaşacak şekilde etkiledi. FA ile birlikte TQ ve O₃ uygulamasının, artan MDA düzeylerinin düşmesini sağlayarak lipid peroksidasyonunu önemli ölçüde önlediği görüldü.

Buradan antioksidan olarak kullandığımız TQ ve O₃'nun, FA maruziyetinin neden olduğu oksidan hasara karşı koruyucu etkiye sahip olabileceği bilgisine varılmaktadır.

Hepatotoksisite durumunda karaciğer fonksiyonlarındaki değişimleri gösteren en önemli enzimler aminotranferazlardır. Aminotranferazların en önemlileri ALT ve AST enzimleridir. Akut veya kronik karaciğer hasarları bu enzimlerin kanda artışına yol açmaktadır (156, 157). Yapılan bir çalışmada Güleç ve ark. (174); kontrol grubu ile FA uygulanan grubu karşılaştırdıklarında, FA uygulanan grupta AST ve ALT düzeylerinde artış olduğunu ortaya koymuşlardır. Aynı şekilde Gerin ve ark. (146) da yaptıkları çalışmada; FA maruziyeti sonucunda hepatotoksisite geliştiğini ve buna bağlı olarak serum AST ve ALT seviyelerinin arttığını bildirmişlerdir. Yapılan çalışmalarda rapor edildiği gibi bizim çalışmamızda da FA'ya maruz bırakılan sıçanların AST ve ALT seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla artış görülmektedir. Bu da bize FA'nın karaciğer üzerinde ciddi bir toksik etki oluşturduğunu göstermektedir.

Sayed-Ahmed ve ark. (159) yaptıkları çalışmada; karaciğer dokusunda ALT seviyesini arttıran dietil-nitrozamine karşı, uygulanan TQ'nun artan ALT seviyelerini azalttığını rapor etmiştir. Erdemli ve ark. (155) yaptıkları çalışmada 30 gün süreyle 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin uygulaması ile AST ve ALT düzeylerinde anlamlı derecede artış olan sıçanlara antioksidan amaçlı uygulanan TQ ile AST ve ALT düzeylerinde azalma olduğunu rapor etmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada fipronil uygulanan hayvanların hepatik biyobelirteçleri (AST ve ALT) önemli ölçüde artarken, TQ ile tedavi sonrasında artan biyobelirteçlerin ciddi anlamda normal seviyeye yaklaştığı bildirilmiştir (160). Asetaminofen kaynaklı hepatotoksisite modeli oluşturulan bir çalışmada AST ve ALT enzim düzeylerinde artış olurken, terapötik amaçlı verilen TQ ile artan enzimlerde normale yakın düzelme olduğu bildirilmiştir (108). Bizim çalışmamızda da FA maruziyeti ile artan AST ve ALT seviyeleri, TQ tedavisi ile azalma gösterdi.

Gültekin ve ark. (161) yaptıkları çalışmada; I/R ile hepatik hasar oluşturulan sıçanların AST ve ALT seviyelerinin önemli ölçüde arttığını, I/R uygulanıp beraberinde O₃ tedavisi verilen sıçanlarda ise AST ve ALT seviyelerinin I/R grubuna göre daha düşük olduğunu bildirmiştir. Karaciğerde I/R ile oluşturulan başka bir hepatik hasar çalışmasında da I/R sonucu artan AST ve ALT düzeylerinin O₃ tedavisi ile düştüğü bildirilmiştir (151). Çalışmamızda da literatürle benzer şekilde FA ile artan AST ve ALT düzeyleri, O₃ tedavisi alan grupta azalma gösterdi.

Çalışmamızda FA'ya maruz kalıp hem TQ hem de O₃ alan sıçanların AST ve ALT değerlerine baktığımızda; FA ile ciddi anlamda bozulma olmasına karşın, ikili antioksidan tedavimizin negatif etkileşim yapmayıp aksine AST ve ALT değerlerini kontrol grubu değerlerine yakın seviyeye indirdiği tesbit edildi.

Total antioksidan kapasite ölçümü oksidatif stresin göstergelerinden biridir. Canlı organizmada oksidatif stres, oksidan ve antioksidan moleküllerin oluşum hızları ile ortamdan süpürülmeleri arasında oluşan bir dengedir. TAS serumda bulunan tüm antioksidan molekülleri, TOS ise oksidan maddelerinin tümünü içermektedir (162).

Yapılmış olan birçok deneysel çalışma bize FA'nın oksidan-antioksidan dengeyi bozduğunu, serbest radikal düzeyinde artışa neden olup böylelikle oksidatif hasar oluşturduğunu göstermektedir (36, 61). Aydın ve ark. (137) yaptıkları çalışmada; FA maruziyetinin TAS seviyelerinde düşmeye neden olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan diğer bir deneysel çalışmada Akkoç ve ark. (163); FA'ya maruz bırakılan sıçanların böbrek dokuları, karaciğer dokuları ve kanlarında TOS seviyelerinin arttığını, TAS seviyelerinin ise azaldığını rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da FA maruziyeti oksidan etki yaparak sıçanların karaciğer doku homojenatlarında ve serumlarında TOS seviyelerinde artma, TAS seviyelerinde ise azalma meydana getirdi.

Badary ve ark. (88) yaptıkları in vitro çalışmada; doğrudan TQ'nun potent bir süperoksit anyon toplayıcısı olup olmadığını araştırmışlar ve TQ'nun çeşitli serbest radikalleri toplayabilme yeteneğinden dolayı güçlü bir antioksidan potansiyele sahip olduğunu bulmuşlardır. Yıldız ve ark. (164) yaptığı karaciğer I/R modeli çalışmada; tedavi amaçlı verdikleri ip N. Sativa'nın TOS seviyelerini anlamlı derecede düşürdüğünü, TAS seviyelerini ise anlamlı düzeyde arttırdığını rapor etmişlerdir. Yaptığımız çalışmada tek başına TQ verilen sıçanların karaciğer doku homojenatlarında ve serumlarında TOS değeri kontrol grubunun TOS değerleri ile hemen hemen eşitlik gösterirken, TAS değeri kontrol grubuna göre artış gösterdi. FA'ya maruz bırakılıp TQ tedavisi alan sıçanların da karaciğer dokularında ve serumlarında FA maruziyetine bağlı artan TOS değerlerinde azalma, azalan TAS değerlerinde ise artma meydana geldi.

Tusat ve ark. (165) ratlarda oluşturdukları testis torsiyonu modelinde; O₃'nun koruyucu etkilerini çalışmış, O₃'nun artan TOS seviyelerini düşürdüğünü rapor

etmişlerdir. Chi ve ark. (166) yaptıkları çalışmada; testis I/R hasarı modelinde uygulanan O₃'nun deney gruplarına göre TOS düzeylerini düşürdüğünü, TAS seviyesini ise değiştirmedigi bildirmişlerdir. Çalışmamızda tek başına O₃ verilen sıçanların karaciğer dokularında ve kanlarında TOS değeri kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik oluşturmazken, TAS değeri kontrol grubuna göre artış gösterdi. FA'ya maruz bırakılıp O₃ tedavisi alan sıçanların da karaciğer dokularında ve kanlarında FA maruziyetine bağlı artan TOS değerlerinde azalma, azalan TAS değerlerinde ise artma meydana geldi.

Yaptığımız çalışmada hem FA'ya maruz bırakılıp hem de TQ ve O₃ tedavisinin birlikte verildiği sıçanların karaciğer ve serum örneklerinde TAS ve TOS değişimi incelendiğinde; FA ile TOS değerlerinde artma ve TAS değerlerinde azalma, buna karşın ikili antioksidan tedavimizin negatif etkileşim yapmayıp FA ile artan TOS değerlerini düşürdüğünü, azalan TAS değerlerini ise yükselttiğini görebiliyoruz. Bu verilerle TQ ve O₃'nun uygulandığı dozların antioksidatif etkili olduğunu, iki antioksidan maddenin birbiriyle negatif etkileşim göstermediğini söyleyebilmekteyiz.

CD68 , monosit soyundaki hücreler (örn; monositik fagositler, osteoklastlar), dolaşımdaki makrofajlar ve doku makrofajları (örn; Kupffer hücreleri, mikrogliya) tarafından yüksek oranda eksprese edilen bir proteindir (68). Çöpçü reseptör ailesinin bir üyesi olan CD68 proteini, makrofajların ilgili bölgeye ulaştırılıp o bölgede aktivasyonunda, fagositozun artırılmasında ve hücrel artıkların temizlenmesinde görev almaktadır (69).

Skyba ve ark. (71) KOAH tanılı hastalarda yaptıkları çalışmada; obez kişilerde CD68 ve TNF- α gen düzeylerinin ciddi oranda yüksek bulunduğunu ve adipoz dokuda var olan bu genlerin adiposit hücre yoğunluğu ve vücut kütle indeksi ile doğru orantılı ilişki gösterdiğini, aksine insülin hassasiyeti ile de ters orantılı ilişki gösterdiğini rapor etmişlerdir. Bunun yanı sıra adipoz dokuda yer alan CD68, TNF- α ve IL-6 gen düzeylerinin birbirleriyle ilişkili olduğu ve KOAH hastalarının adipoz dokularında hastalık sürecinde makrofajların, gelişen inflamasyona ivme kazandırdığı rapor edilmiştir (72).

Thenappan ve ark. (73) yaptıkları çalışmada; pulmoner dokuda CD68 pozitif makrofajların biriktiğini, biriken CD68 pozitif makrofajların akciğerde inflamasyonu ve anormal anjiyogenezi başlatan önemli faktör olduğunu, bu değişikliklerin neden

olduğu hepatopulmoner sendromun kontrol altına alınabilmesi için de biriken makrofajların yok edilmesi gerektiğini rapor etmişlerdir.

Golbar ve ark. (167) çalışmalarında; CLD (lipozomal klodronat)-Lipo enjeksiyonunun TAA (tiyoasetamid) kaynaklı karaciğer hasarında CD68 ve CD163 makrofajlarının tükenmesine neden olduğunu rapor etmişlerdir. Hepatik makrofajların doku hasarında ve hepatotoksisitede yeniden şekillenmede önemli rollerinin olduğunu bildirmişlerdir.

Yapılan diğer bir çalışmada sıçanlarda I/R sonucu oluşan enfarkta karşı O₃ tedavisinin kalbi koruyuculuğu araştırılmış, enfarkt oluşan sıçanların kesitlerinde CD68 immün boyamalarının yoğun şekilde izlendiği, fakat O₃ tedavisi verilen gruptaki sıçanların kesitlerinde bu immün boyamaların yoğunluğunun çok azaldığı bildirilmiştir (168).

Başka bir çalışmada ise deneysel hipotiroidizm ile ilişkili alkolsüz yağlı karaciğer hastalığında TQ tedavisi incelenmiş, CD68 hücrelerinin kontrol grubunda pek görülmediği, propiltiourasil verilen grupta hem lobüler hem de portal alanda sayıca arttığı, buna karşı oluşan hasarı tedavi etmek amacıyla TQ verilen gruplarda ise kontrol grubunda olduğu gibi CD68 hücrelerinin pek görülmediği rapor edilmiştir (169).

Bizim çalışmamızda da literatürde yer alan çalışmalarla benzer şekilde CD68 hücreleri kontrol grubunda pek görülmedi. FA verilen grupta toksisite sonrası oluşan hepatik hasarın göstergesi olarak CD68 hücreleri yoğun miktarda artarken, FA'ya maruziyet sonrası TQ ve O₃ tedavisi alan gruplarda ise artan CD68 hücre yoğunluğunda azalma izlendi. Çalışmamızda elde ettiğimiz önemli bir veri ise; kontrol grubundaki sıçanların karaciğer dokularında CD68 hücreleri pek görülmezken O₃ verilen sıçanların karaciğer dokularında görülen CD68 hücre sayısında artış olmasıdır. TQ verilen grupta kontrol grubu ile benzer oranda CD68 hücresi izlenirken, TQ+O₃ verilen grupta O₃'a bağlı artış gösteren CD68 hücre sayısında hafif azalma gözlemlendi. Literatürde sağlıklı deney hayvanlarına verilen O₃'nun CD68 yoğunluğuna etkisiyle ilgili bir veriye rastlanmamış olup daha fazla çalışma yapılması gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

Bu güne kadar yapılan birçok çalışmada FA'nın çeşitli dokularda apoptozisi indüklediği bildirilmiştir (170-172). Bunun yanında TQ'nun, değişik toksik maddeler

tarafından indüklenen farklı apoptotik belirteçlerin ekspresyonunda azalmaya (173-176) ve antioksidan olarak kullandığımız diğer bir ajan olan O₃'nun da apoptotik gen ekspresyonunda azalmaya veya histolojik olarak apoptotik indeksde azalmaya neden olduğu rapor edilmiştir (177-179).

Çalışmamızda FA'ya maruz kalan sıçanların karaciğer dokularında TUNEL pozitifliğinde (apoptotik indeks) artış saptandı. Antioksidan olarak TQ ve O₃ uygulanan sıçan karaciğer dokularında ise FA maruziyeti ile artan TUNEL pozitifliğinde azalma izlendi. Bu da bize; FA toksisitesi ile bozulmuş karaciğer histolojisinin, TQ ve O₃ etkisi ile tekrar düzeldiğini, antioksidan etken maddelerimizin sadece kan parametrelerinde değil mikroskopik incelemede de etkinliğinin yüksek olduğunu göstermektedir.

Bu çalışma; Sprague-Dawley cinsi erkek sıçanlarda FA ile oluşturulan hepatotoksisite modelinde, TQ ve O₃ etkilerinin araştırılması için yapıldı ve sonuç olarak:

1. Sıçanların ilk ve son ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı olmayan farklılık saptandı.
2. FA'ya maruz kalan farklı dört gruptaki sıçanlarda tüylerde renk değişikliği, klinik gözlemde bozulmalar saptandı.
3. Karaciğerde hepatotoksisite göstergesi olan AST ve ALT değerleri kontrol grubuna göre FA verilen grupta anlamlı şekilde yükseldi ($p < 0,05$).
4. Kontrol grubu sıçanlara göre FA verilen sıçanların karaciğer dokularında ve kanlarında GSH ve CAT ($p = 0,05$), GPx ve SOD ($p = 0,001$) değerlerinde anlamlı düşüş, MDA ($p = 0,001$) değerlerinde ise anlamlı artış oldu.
5. FA toksikasyonu sıçanların hem kan hem de karaciğer dokularında TOS ($p > 0,05$) düzeylerinde artışa, TAS ($p = 0,03$) düzeylerinde ise anlamlı bir düşüşe neden oldu.
6. Tek başına TQ veya tek başına O₃ tedavisi AST ve ALT değerlerinde anlamlı bir değişiklik yapmadı. Fakat FA maruziyeti ile yükselen değerleri normale yakın değerlere düşürdü.
7. Tek başına TQ veya tek başına O₃ tedavisi kan ve karaciğer dokusundaki MDA, GSH, CAT, GPx ve SOD değerlerinde anlamlı bir değişiklik yapmadı.

Fakat FA maruziyeti ile bozulan değerlerde anlamlı fark oluşturacak düzeltilmelere neden oldu.

8. TQ veya O₃'nun tek başına verilmesi TAS ve TOS değerlerinde anlamlı olmayan sapmalara neden oldu. TQ antioksidan etkinliği ile FA'nın bilinen toksik etkilerinden dolayı artan TOS değerlerini azalttı, azalmış olan TAS değerlerini ise yükseltti.
9. Sağlıklı sıçanlara uygulanan O₃, TUNEL değerlendirmesinde kontrol grubu ile benzer sonuçlara neden oldu, fakat CD68 hücre yoğunluğunu ($p<0,001$) istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırdı. Bu da bize, patolojik bir durum yokken O₃'nun sağlıklı dokuda mikroskopik düzeyde oksidan etki yaptığını gösteriyor.
10. İmmünohistokimyasal olarak FA maruziyeti, TUNEL ve CD68 immünreaktivitesi değerlendirmelerinde toksik sonuçlara neden oldu.
11. FA maruziyeti ile birlikte verilen TQ, CD68 immünreaktivitesinde ($p=0,004$) ve TUNEL değerlendirmesinde ($p<0,001$) anlamlı antioksidan etki yaptı.
12. FA ile birlikte verilen O₃, TUNEL değerlendirmesinde ($p<0,001$) ve CD68 immünreaktivitesinde ($p<0,001$) kuvvetli antioksidan etki gösterdi.
13. FA ile birlikte TQ+O₃ uygulaması; CD68 immünreaktivitesinde ($p<0,001$), TUNEL değerlendirmesinde ($p<0,001$) , kan ve karaciğer dokularında FA toksikasyonunun neden olduğu tüm parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı düzeltilmelere neden oldu.

Elde edilen tüm bu veriler değerlendirildiğinde; FA'nın karaciğerde ciddi doku hasarına neden olduğu ve TQ ile O₃'nun bu hasarı önlemede ve düzeltmede etkin rol oynadığı söylenebilir.

5. KAYNAKLAR

1. Cheney JE, Collins CH. Formaldehyde disinfection in laboratories: limitations and hazards. *Br J Biomed Sci* 1995; 52: 195-201.
2. Smith AE. Formaldehyde. *Occup Med* 1992; 42: 83-88.
3. Salthammer T, Mentese S, Marutzky R. Formaldehyde in the indoor environment. *Chem Rev* 2010; 110: 2536-2572.
4. Loew OU. Formaldehyd und dessen Condensation. *Journal für praktische Chemie* 1886; 33: 321–351.
5. Tang X, Bai Y, Duong A, Smith MT, Li L, Zhang L. Formaldehyde in China: production, consumption, exposure levels, and health effects. *Environ Int* 2009; 35: 1210- 1224.
6. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for Formaldehyde. Atlanta, 1999; 188-269
7. The Perspective. <http://www.theperspective.org/formaldehyde.html> 01.09.2017.
8. Formaldehyde Council Report. Air toxics, formaldehyde and risk characterization. <http://www.formaldehyde.org> 01.09.2017.
9. Feron VJ, Til HP, Vrijer F, Woutersen RA, Cassee FR, Bladeren PJ. Aldehydes: occurrence, carcinogenic potential, mechanism of action and risk assessment. *Mutat Res*. 1991; 259: 363-385.
10. Collins JJ, Esmen NA, Hall TA. A review and meta-analysis of formaldehyde exposure and pancreatic cancer. *Am J Ind Med*. 2001; 39: 336-345.
11. WHO-ROE: World Health Organization, Regional Office for Europe, Formaldehyde, Copenhagen, 2001.
12. De Groot AC, Veenstra M. Formaldehyde-releasers in cosmetics in the USA and in Europe. *Contact Dermatitis* 2010; 62: 221-224.
13. Duong A, Steinmaus C, McHale CM, Vaughan CP, Zhang L. Reproductive and developmental toxicity of formaldehyde: a systematic review. *Mutat Res* 2011; 728: 118-138.
14. Irmak Sapmaz H. Solunan Formaldehitin Sıçanlarda Humoral İmmünite Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Uzmanlık Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, 2010.
15. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), Formaldehyde Sampling of FEMA Temporary- Housing Trailers, 2006.
16. Kaden DA, Mandin C, Nielsen GD Wolkoff P. Formaldehyde. In: World Health Organization. WHO Guidelines For Indoor Air Quality: Selected Pollutants. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe 2010; 103-156.

17. Speit G, Linsenmeyer R, Duong G, Bausinger J. Investigations on potential co-mutagenic effects of formaldehyde. *Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen* 2014; 760: 48-56.
18. Tulpule K, Dringen R. Formaldehyde in brain: an overlooked player in neurodegeneration? *J Neurochem* 2013; 127: 7-21.
19. Cikmaz S, Kutoglu T, Kanter M, Mesut R. Effect of formaldehyde inhalation on rat livers: a light and electron microscopic study. *Toxicol Ind Health* 2010; 26: 113-119.
20. Beall JR, Ulsamer AG. Formaldehyde and hepatotoxicity. *J Toxicol Environ Health* 1984; 14: 1-21.
21. Coggon D, Ntani G, Harris EC, Palmer KT. Upper airway cancer, myeloid leukemia, and other cancers in a cohort of British chemical workers exposed to formaldehyde. *Am J Epidemiol* 2014; 179: 1301-1311.
22. Strubelt O, Younes M, Pentz R, Kühnel W. Mechanistic study on formaldehyde-induced hepatotoxicity. *Toxicol Environ Health*, 1989; 27(3): 351-366.
23. Akşit H, Akşit D, Bildik A, Kara H, Yavuz Ö, Seyrek K. Deneysel karaciğer intoksikasyonunda N-asetil sistein'in glutatyon metabolizması ve lipid peroksidasyonuna etkileri. *Ankara Üniv. Vet Fak Derg*, 2015; 62: 1-5.
24. Naya M, Nakanishi J. Risk assessment of formaldehyde for the general population in Japan. *Regul Toxicol Pharmacol* 2005; 43: 232-248.
25. Uchiyama S, Matsushima E, Tokunaga H, Otsubo Y, Ando M. Determination of orthophthalaldehyde in air using 2,4-dinitrophenylhydrazine-impregnated silica cartridge and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2006; 1116: 165-171.
26. Canbilen A, Sezen Ş, Avunduk MC, Çon NE. Formaldehit ve toksik etkileri. *Genel Tıp Dergisi* 1999; 9: 33-39.
27. Kriebel D, Myers D, Cheng M, Woskie S, Cocanour B. Shortterm effect of formaldehyde on peak expiratory flow and irritant symptoms. *Arch Environ Health* 2001; 56: 11-18.
28. Lino-dos-Santos-Franco A, Amemiya RM, Oliveira AP, Damazo AS, Breithaupt-Faloppa AC, Vitoretti LB, et al. The putative role of ovary removal and progesterone when considering the effect of formaldehyde exposure on lung inflammation induced by ovalbumin. *Clinics (Sao Paulo)* 2013; 68: 1528-1536.
29. Lino-dos-Santos-Franco A, Amemiya RM, Ligeiro de Oliveira AP, Breithaupt-Faloppa AC, Damazo AS, Oliveira-Filho RM, Tavares-de-Lima W. Differential effects of female sex hormones on cellular recruitment and tracheal reactivity after formaldehyde exposure. *Toxicol Lett* 2011; 205: 327-335.
30. Lino dos Santos Franco A, Domingos HV, Damazo AS, Breithaupt-Faloppa AC, Ligeiro de Oliveira AP, Costa SKP, et al. Reduced allergic lung inflammation in rats following formaldehyde exposure: long term effects on multiple effector systems. *Toxicology* 2009; 256: 157-163.

31. Rager JE, Smeester L, Jaspers I, Sexton KG, Fry RC. Epigenetic changes induced by air toxics: formaldehyde exposure alters miRNA expression profiles in human lung cells. *Environ Health Perspect* 2011; 119: 494-500.
32. Restani P, Galli CL. Oral toxicity of formaldehyde and its derivatives. *Crit Rev Toxicol* 1991; 21: 315-328.
33. Swami PC, Raval R, Kaur, Kaur J: Accidental intraoral injection of formalin during extraction: Department of Oral and Maxillofacial Surgery. *Dental College and Research Centre*. 2015; 54(3): 351-352.
34. Malek FA, Möritz KU, Fanghanel J. A study on the effect of inhalative formaldehyde exposure on water labyrinth test performance in rats. *Annals of Anatomy*, 2003; 185: 277-285.
35. Songur A, Ozen OA, Sarsilmaz M. The toxic effects of formaldehyde on the nervous system. *Rev Environ Contam Toxicol*. 2010; 203: 105-118.
36. İnci M, Zararsız İ, Davarcı M, Görür S: Toxic effects of formaldehyde on the urinary system. *Türk Journal Urol*. 2013; 39(1): 48-52.
37. Shimizu K, Sugita M, Yokote R, Sekii H, Miyake H, Kiyota K. Intestinal edema caused by ingested formalin. *Chudoku Kenkyu*. 2003; 16: 447-451.
38. Roldán J, Frauca C, Dueñas A. Alcohol intoxication. *Anales Sist Sanit Navar* 2003; 26: 129-139.
39. Askaripour M, Hasanpour A, Hosseini F, Moshrefi M, Moshtaghi G, Hasannejad M, Nematollahi-Mahani SN: The effect of aqueous extract of *Rosa damascena* on formaldehydeinduced toxicity in mice testes. *Pharmaceutical biology*, 2017; 56(1): 12-17.
40. Walrath J, Fraumeni JF, Jr. Cancer and other causes of death among embalmers. *Cancer Res* 1984; 44: 4638-4641.
41. Harrington JM, Oakes D. Mortality study of British pathologists 1974-80. *Br J Ind Med* 1984; 41: 188-191.
42. Stroup NE, Blair A, Erikson GE. Brain cancer and other causes of death in anatomists. *J Natl Cancer Inst* 1986; 77: 1217-1224.
43. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volume 88: Formaldehyde, 2-Butoxyethanol and 1-tert-Butoxypropan-2-ol. International Agency for Research on Cancer; Lyon, 2006; 17-20.
44. Sadler TW. Langman's Medikal Embriyoloji. 11. Baskı, Başaklar AC (Çeviren). Ankara, Palme Yayıncılık, 2011; 292-293.
45. Moore KL, Persaud TVN. Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi. Dalçık H, Yıldırım M. (Çeviren). Ankara, Nobel Tıp Kitabevi, 2009.
46. Eşrefoğlu M. Özel Histoloji, 2. Baskı, İstanbul Tıp Kitabevi, İstanbul, 2016; 147-149.

47. Gartner PL, Hiatt JL. Hücre Biyolojisi ve Histolojisi. Hürdağ C. (Çeviren). İstanbul Tıp Kitapevi, 2016.
48. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley R. Temel Histoloji. Solakoğlu S. (Çeviren). Nobel Tıp Kitapevi, 2015.
49. Arıncı K, Elhan A. Anatomi, 6.Baskı, 1. Cilt, Güneş Tıp Kitapevi, Ankara, 2016; 265-275.
50. Sancak B, Cumhur M. Fonksiyonel Anatomi (Baş Boyun ve İç Organlar). 11. Baskı, Ankara, ODTÜ Yayıncılık, 2017.
51. Sobotta İnsan Anatomisi Atlası, 4. Türkçe Baskı, 2. Cilt, İstanbul, 1994.
52. Juza RM, Pauli EM. Clinical and surgical anatomy of the liver: A review for clinicians. Clin Anat 2014; 27: 764-769.
53. Diehl-Jones WL, Askin DF. The neonatal liver, Part 1: embryology, anatomy, and physiology. Neonatal Netw 2002; 21: 5-12.
54. Gövsa Gökmen F. Sistemantik Anatomi. İzmir Güven Kitabevi, İzmir, 2003.
55. Bachı A, Dalle-Donne I, Scaloni A. Redox proteomics: chemical principles, methodological approaches and biological/biomedical promises. Chem Rev. 2013; 113: 596-698.
56. Janos Z, Krishnamurti D. Oxidative Stres and Disease Nutrients and Cell Signaling. Taylor & Francis, Los Angeles, California, 2005.
57. Eşrefoğlu M. Cell Injury and Death: Oxidative Stress and Antioxidant Defense System: Review. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2009; 29: 1660-1676.
58. Elkins KL, Cowley SC, Bosio CM. Innate and adaptive immunity to Francisella. Ann N Y Acad Sci. 2007; 1105: 284-324.
59. Bergamini CM, Gambetti S, Dondi A, Cervellati C. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. Curr Pharm Des 2004; 10: 1611-1626.
60. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. Toxicol Pathol. 2002; 30(6): 620-650.
61. Zararsız I, Sarsilmaz M, Tas U, Kuş I, Meydan S, Ozan E. Protective effect of melatonin against formaldehydeinduced kidney damage in rats. Toxicol Ind Health 2007; 23: 573-579.
62. Zararsız I, Sonmez MF, Yilmaz HR, Taş U, Kuş I, Kavaklı A, Sarsilmaz M. Effects of ω -3 essential fatty acids against formaldehyde-induced nephropathy in rats. Toxicol Ind Health 2006; 22: 223-229.
63. Vertuani S, Angusti A, Manfredini S. The antioxidants and proantioxidants network: an overview. Curr Pharm Des 2004; 10: 1677-1694.

64. Noguchi N, Watanabe A, Shi H. Diverse functions of antioxidants. *Free Radic Res* 2000; 33: 809-817.
65. Pietta P. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* 2000; 63: 1035-1042.
66. Macedo SR, Leal PM, Braga TT, Barioni ED, de Oliveira Duro S, Horliana RTAC, et al. A. Photobiomodulation therapy decreases oxidative stress in the lung tissue after formaldehyde exposure: role of oxidant/antioxidant enzymes. *Mediators Inflamm.* 2016; 2016: 9303126.
67. Mori Y, Izawa T, Takenaka S, Kuwamura M, Yamate J. Participation of functionally different macrophage populations and monocyte chemoattractant protein-1 in early stages of thioacetamide-induced rat hepatic injury. *Toxicol Pathol.* 2009; 37: 463-73.
68. Holness CL, Simmons DL. Molecular Cloning of CD68, a Human Macrophage Marker Related to Lysosomal Glycoproteins. *Blood*, 1993; 81(6): 1607-1613.
69. Strobl H, Scheinecker C, Csmarits B, Majdic O, Knapp W. Flow cytometric Analysis of Intracellular CD68 Molecule Expression in Normal and Malignant Haemopoiesis. *British Journal of Haematology*, 1995; 90: 774-782.
70. Sun AR, Panchal SK, Friis T, Sekar S, Crawford R, Brown L, et al. Obesity-Associated Metabolic Syndrome Spontaneously Induces Infiltration of Proinflammatory Macrophage in Synovium and Promotes Osteoarthritis, *PLoS ONE*, 2017; 12(8): 1-22.
71. Skyba P, Ukropec J, Pobeha P, Ukropcova B, Joppa P, Kurdiova T, et al. Metabolic Phenotype and Adipose Tissue Inflammation in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Mediators of Inflammation*, 2010; 1-9.
72. Rubin CS, Lai E, Rosen OM. Acquisition of Increased Hormone Sensitivity during in vitro Adipocyte Development. *The Journal of Biological Chemistry*, 1977; 252: 3554-3557.
73. Thenappan T, Goel A, Marsboom G, Fang YH, Toth PT, Zhang HJ, et al. A central role for CD68(+) macrophages in hepatopulmonary syndrome. Reversal by macrophage depletion *Am J Respir Crit Care Med.* 2011; 183: 1080-1091.
74. Ahmad A, Husain A, Mujeeb M, Khan SA, Najmi AK, Siddique NA, Damanhour Z.A, Anwar F. A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2013; 3(5):337-352.
75. Nickavar B, Mojab F, Javidnia K, Amoli MA. Chemical composition of the fixed and volatile oils of *Nigella sativa* L. from Iran, *Z Naturforsch C.* 2003; 58, 9-10: 629-631.
76. Hajhashemi V, Ghannadi A, Jafarabadi H. Black cumin seed essential oil, as a potent analgesic and antiinflammatory drug, *Phytother Res.* 2004; 18, 3: 195-199.
77. Randhawa MA. ve Al-Ghamdi MS. Anticancer activity of *Nigella sativa* (black seed)-a review, *Am J Chin Med.* 2011; 39, 6: 1075-1091.
78. Altındağ F. Prenatal Uygulanan Diklofenak Sodyum ve Timokinonun Postnatal Sıçan Testis Hücrelerine Etkilerinin Stereolojik Yöntemlerle Araştırılması. Doktora Tezi, Van: Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2018.

79. Shuid AN, Mohamed N, Mohamed IN, Othman F, Suhaimi F, Ramli ESM, et al. *Nigella sativa*: a potential antiosteoporotic agent, *Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012; 1-6.
80. Hosseinzadeh H, Parvardeh S. Anticonvulsant effects of thymoquinone, the major constituent of *N sativa* seeds in mice, *Phytomedicine*, 2004; 11: 56-64.
81. Arslan SO, Gelir E, Armutçu F, Coşkun O, Gürel A, Sayan H, Çelik IL. The protective effect of thymoquinone on ethanol-induced acute gastric damage in the rat, *Nutrition Research*, 2005; 25: 673-680.
82. Pari L, Sankaranarayanan C. Beneficial effects of thymoquinone on hepatic key enzymes in streptozotocin–nicotinamide induced diabetic rats, *Life Sciences*, 2009; 85: 23-26, 830-834.
83. Gali-Muhtasib H, Diab-Assaf M, Boltze C, Al-Hmaira J, Hartig R, Roessner A, Schneider-Stok R. Thymoquinone extracted from black seed triggers apoptotic cell death in human colorectal cancer cells via a p53- dependent mechanism, *Int J Oncol*, 2004a; 25(4): 857-866.
84. Kaseb AO, Chinnakannu K, Chen D, Sivanandam A, Tejawani S, Menon M, et al. Androgen receptor and E2F-1 targeted thymoquinone therapy for hormone-refractory prostate cancer, *Cancer Res*. 2007; 67(16): 7782-7788.
85. Ahmed WA, Hassan SA, Galeb FM, El-Taweel MA, Abu-Bedair FA. The in vitro promising therapeutic activity of thymoquinone on hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line, *Global Veterinaria*, 2008; 2 (5): 233- 241.
86. Burits M, Bucar F. Antioxidant activity of *N sativa* Essential oil. *Phytother Res*. 2000; 14: 323-328.
87. Kanter M, Meral I, Dede S, Cemek M, Özbek H, Uygan I, Gündüz H. Effects of *Nigella Sativa* L. and *Urtica Dioca* L. on Lipid Peroxidation, Antioxidant Enzyme Systems and Some Liver Enzymes in CCl₄-Treated Rats. *J Vet Med A*, 2003; 50: 264-268.
88. Badary OA, Taha RA, Gamal el-Din AM, Abdel-Wahab MH. Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. *Drug Chem Toxicol*, 2003; 26: 87-98.
89. El-Dakhakhny M, Madı NJ, Lember N, Ammon HPT. *Nigella sativa* oil, nigellone and derived thymoquinone inhibit synthesis of 5-lipoxygenase products in polymorphonuclear leukocytes from rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2002; 81: 161-164.
90. Woo CC, Kumar AP, Sethi G, Tan KH. Thymoquinone, Potential cure for inflammatory disorders and cancer, *Biochem Pharmacol*, 2012; 83(4): 443-451.
91. Badary OA, Abd-Ellah MF, El-Mahdy MA, Salama SA, Hamada FM. Anticlastogenic activity of thymoquinone against benzo(a)pyrene in mice, *Food and Chemical Toxicology*. 2007; 45(1): 88–92.
92. Gali-Muhtasib HU, Abou Kheir WG, Kheir LA, Darwiche N, Crooks PA. Molecular pathway for thymoquinone-induced cell-cycle arrest and apoptosis in neoplastic keratinocytes, *Anticancer Drugs*, 2004b; 15(4): 389-399.

93. Roepke M, Diestel A, Bajbouj K, Walluscheck D, Schonfeld P, Roessner A, et al. Lack of p53 augments thymoquinone-induced apoptosis and caspase activation in human osteosarcoma cells, *Cancer Biol Ther*, 2007; 6(2): 160-169.
94. Ali BH. and Blunden G. Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*, *Phytother Res*, 2003; 17, 4: 299-305.
95. El-Abhar HS, Abdallah DM, Saleh S. Gastroprotective activity of nigella sativa oil and its constituent, thymoquinone, against gastric mucosal injury induced by ischaemia/reperfusion in rats, *J Ethnopharmacol*, 2003; 84(2-3): 251-258.
96. Al-Gharably N, Badary O, Nagi MN, Al- Shabanah OA, Al-Sawaf HA, Al-Rikabi AC, Al-Bekairi AM. Protective effect of thymoquinone against carbontetrachloride-induced hepatotoxicity in mice, *Res Commun Pharmacol Toxicol*, 1997; 2: 41-50.
97. Enomoto S, Asano R, Iwahori Y, Narui T, Okada Y, Singab AN, Okuyama T. Hematological studies on black cumin oil from the seeds of *N sativa* L. *Biol Pharm Bull*, 2001; 24: 307-310.
98. Nagi MN, Almakki H.A. Thymoquinone supplementation induces quinone reductase and glutathione transferase in mice liver: possible role in 118 protection against chemical carcinogenesis and toxicity, *Phytother Res*, 2009; 23: 1295-1298.
99. Aycan İÖ, Tüfek A, Tokgöz O, Evliyaoğlu O, Fırat U, Kavaka GÖ, et al. Thymoquinone treatment against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats, *Int J Surg*, 2014; 12 (3): 213-218.
100. Alsaif MA. Effect of thymoquinone on ethanol-induced hepatotoxicity in Wistwar rats. *J of Med Sci*, 2007; 7(7): 1164-1170.
101. Loncar M, Stipetic D, Matosevic Z, Ozone Application in Dentistry. *AMR*, 2009; 40: 136-137.
102. http://www.siemens.com/history/pool/perseunlichkeiten/gruendergeneration/werner_von_siemens_en.pdf, Werner von Siemens, 10.05.2013
103. <http://ozofresh.co.uk/the-ozone-timeline-the-full-history-of-ozone.html>, The Full History of Ozone, 10.05.2013
104. Rubin MB. The history of ozone. *Bull Hist Chem*. 2001; 26(1): 40-56.
105. Bocci V. Scientific and medical aspects of ozone therapy. state of the art. *AMR*. 2006; 37: 425-435.
106. Viebahn-Haensler R. Ozonun Tıpta Kullanımı. 4. Baskı, İstanbul: Yelken Basım, 2006.
107. Sağlık Bakanlığı Geleneksel Ve Tamamlayıcı Tıp Uygulamaları Yönetmeliği, <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2014/10/20141027-3.htm> 27.10.2014
108. Azarpazhooh A, Limeback H. The application of ozone in dentistry: A systematic review of literature. *Journal of Dentistry*, 2008; 36: 104-116.

109. Di Paolo N, Bocci V, Gaggioti E. Ozone therapy editorial review. *Int J Artificial Organs* 2004; 27: 168-175.
110. Bocci V. Biological and clinical effects of ozone: Has ozone therapy a future in medicine, *Br J Biomed Sci* 1999; 56: 270-279.
111. Heng S, Yeung KL, Djafer M, Schrotter JC. A novel membrane reactor for ozone water treatment. *J Membr Sci*, 2007; 289: 67-75.
112. Bocci V. Ozone as janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. *Mediators Inflamm* 2004; 13(1): 3-11.
113. Chen J, Davidson JH. Ozone production in the positive dc corona discharge: model and comparison to experiments. *Plas Chem and Plas Proc* 2002; 22: 495-522.
114. Rowland FS. Stratospheric ozone depletion. *Phil Trans R Soc B*. 2006; 361: 769-790.
115. Bocci V. Is it true that ozone is always toxic? The end of a dogma. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2006; 216: 493-504.
116. Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett*. 2000; 486: 10-13.
117. Aslan MK, Boybeyi Ö, Şenyücel FM, Ayva Ş, Kısa Ü, Aksoy N, et al. Protective effect of intraperitoneal ozone application in experimental ovarian ischemia/reperfusion injury *J Pediatric Surgery* article number 2012; 47(9): 1730-1734.
118. Özler M. The use of ozone gas for Medical Purposes: *TAF Prev Med Bull* 2009; 8(1): 59-64.
119. Tuşat M. Rat Testisindeki İskemi-Reperfüzyon Hasarı Sonucu Oluşan Oksidatif Stres ve Histopatolojik Değişiklikler Üzerine Medikal Ozonun Etkileri. *Uzmanlık Tezi, Trabzon: Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı*, 2012.
120. Korkmaz A, Oter S, Sadir S, Coskun O, Topal T, Ozler M, Bilgic H. Peroxynitrite may be involved in bladder damage caused by cyclophosphamide in rats. *J Urol*. 2005; 173(5): 1793-1796.
121. Elvis AM, Ekta JS. Ozone therapy: A clinical review. *J Nat Sci Biol Med* 2011; 2(1): 66-70.
122. Viebahn-Hänsler R, León Fernández OS, Fahmy Z. Ozone in medicine: the low-dose ozone concept-guidelines and treatment strategies ozone: science & engineering. *J Int Ozone Ass* 2012; 34(6): 408-424.
123. Fitzpatrick E, Holland OJ, Vanderlelie JJ. Ozone therapy for the treatment of chronic wounds: A systematic review. *Int Wound Journal* 2018; 15(4): 633-644.
124. Bocci V. A reasonable Approach for the Treatment of HIV Infection in the Early Phase with Ozonotherapy (Autohaemotherapy). How 'Inflammatory' cytokines may have A therapeutic Role *Mediators of Inflammation*. 1994; 3: 315-321.

125. Bocci V. Ozonotherapy as a Possible Biological Response Modifier in Cancer *Forsch Komplementarmed* 1998; 5: 54-60.
126. Valacchi G, Bocci V. Studies on the biological effects of ozone: 10. Release of factors from ozonated human platelets. *Mediators Inflamm.* 1999; 8(4-5): 205-209.
127. Rakovsky S ve Zaikov G. Application of ozone in medicine, *Chemistry & Chemical Technology*, 2009; 3(3): 237-248.
128. Wang YM, Cai ZM, Lu YH. Medical ozone injection at lumbar Jiaji (EX-B2) points for 100 cases of lumbar vertebrae disc. *Zhongguo Zhen Jiu.* 2012; 32(10): 939-940.
129. Melchionda D, Milillo P, Manente G, Stoppino L, Macarini L. Treatment of radiculopathies: a study of efficacy and tollerability of paravertebral oxygenozone injections compared with pharmacological anti-inflammatory treatment. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2012; 26(3): 467-474.
130. Bocci V. Does ozone therapy normalize the cellular redox balance? Implications for therapy of human immunodeficiency virus infection and several other diseases. *Med Hypotheses.* 1996; 46(2): 150-154.
131. Spector A. Oxidative stress-induced cataract: mechanism of action, *Faseb J.* 1995; 9(12): 1173-1182.
132. Spain ozone therapy society of medical professionals a. Madrid declaration on ozone therapy 2010 Available from: <https://aepromo.org/en/madrid-declaration-on-ozonotherapy/>. 20 Ocak 2020 tarihinde erişilmiştir.
133. International Scientific Committee of Ozone Therapy - ISCO3/MET/00/01 Major Autohemotherapy. Available from: <https://isco3.org/wp-content/uploads/2017/03/ISCO3-MET-00-01-MAHT-V1-03102016.pdf> 10 Şubat 2020 tarihinde erişilmiştir.
134. Fedorova T, Dubrovina N, Sokur T, Burlev A, Bakuridze E. Ozone therapy and the indices of lipid peroxidation in a complex treatment of the pregnant with iron-deficient anemia. *Meditinskii Almanakh* 2013; 3: 159-160.
135. Sagai M, Bocci V. Mechanisms of action involved in ozone therapy: Is healing induced via a mild oxidative stress? *Med Gas Research* 2011; 1: 29.
136. Bocci V. Ozone a new medical drug. Dordrecht. The Netherlands. Springer, 2005; 75-85.
137. Aydin S, Ogeturk M, Kuloglu T, Kavakli A, Aydin S. Effect of carnosine supplementation on apoptosis and irisin, total oxidant and antioxidants levels in the serum, liver and lung tissues in rats exposed to formaldehyde inhalation. *Peptides* 2015; 64: 14-23.
138. Placer ZA, Cushmann LL, Johnson BG. Estimation of products of lipid peroxidation in biological systems. *Anal Biochem* 1960; 16: 359-364.
139. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959; 82: 70-77.

140. Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer HU (Editor). *Methods of Enzymatic Analysis*. 2nd Edition, Weinheim: Verlag Chemie, 1974; 673-678.
141. Beutler E. *Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods*, 3rd Edition, Orlando: Grune & Stratton, 1984.
142. Murta GL, Campos KK, Bandeira AC, Diniz MF, Costa Gde P, Costa DC, et al. Oxidative effects on lung inflammatory response in rats exposed to different concentrations of formaldehyde. *Environ Pollut*. 2016; 211: 206-213.
143. Faghani M, Kohestani Y, Nasiri E, Moladoust H, Mesbah M. Protective effect of Vitamin E on formaldehyde-induced injuries in the rat kidney. *Gene Cell Tissue*. 2014; 1(3): e21539.
144. Ciftci G, Aksoy A, Cenesiz S, Sogut MU, Yarim GF, Nisbet C, Guvenc D, Ertekin A. Therapeutic role of curcumin in oxidative DNA damage caused by formaldehyde. *Microsc Res Tech*. 2015; 78(5): 391-395.
145. Bakar E, Ulucam E, Cerkezkayabekir A. Investigation of the protective effects of proanthocyanidin and Vitamin E against the toxic effect caused by formaldehyde on the liver tissue. *Environ Toxicol*. 2015; 30(12): 1406-1415.
146. Gerin F, Erman H, Erboga M, Sener U, Yilmaz A, Seyhan H, Gürel A. The effects of ferulic acid against oxidative stress and inflammation in formaldehyde-induced hepatotoxicity. *Inflammation*. 2016; 39(4): 1377-1386.
147. Matsuoka T, Takaki A, Ohtaki H and Shioda S: Early changes to oxidative stress levels following exposure to formaldehyde in ICR mice. *J Toxicol Sci*. 2010; 35(5): 721-730.
148. Teng S, Beard K, Pourahmad J, Moridani M, Easson E, Poon R, O'Brien PJ. The formaldehyde metabolic detoxification enzyme systems and molecular cytotoxic mechanism in isolated rat hepatocytes. *Chem Biol Interact*. 2001; 130-132(1-3): 285-296.
149. Yonar MS, Sağlam N, Yöntürk Y, Aytemur A, Koşar A. Formaldehit Uygulanan Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus Mykiss*)'nda Bazı Hematolojik Ve Antioksidan Parametrelerin Araştırılması. *Journal of Fisheries Sciences*, 2014; 8(4): 317-323.
150. Ajamieh HH, Berlanga J, Merino N, Sanchez GM, Carmona AM, Cepero SM, et al. Role of protein synthesis in the protection conferred by ozone-oxidative-preconditioning in hepatic ischaemia/reperfusion. *Transpl Int*. 2005; 18(5): 604-612.
151. León Fernández OS, Ajamieh HH, Berlanga J, Menendez S, Viebahn-Hansler R, Re L, Carmona AM. Ozone oxidative preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in a rat model of liver ischemia/ reperfusion. *Transpl Int*, 2008; 21(1): 39-48.
152. Çelik F, Göçmez C, Karaman H, Kamaşak K, Kaplan İ, Akıl E, et al. Therapeutic effects of thymoquinone in a model of neuropathic pain. *Curr Ther Res Clin Exp*, 2014; 76: 11-16.
153. Mehri S, Shahi M, Razavi BM, Vahdati HF, Hosseinzadeh H. Neuroprotective effect of thymoquinone in acrylamide-induced neurotoxicity in Wistar rats, *Iran J Basic Med Sci*, 2014; 17: 1007-1011.

154. Gökce EC, Kahveci R, Gökce A, Cemil B, Aksoy N, Sargon MF, et al. Neuroprotective effects of thymoquinone against spinal cord ischemiareperfusion injury by attenuation of inflammation, oxidative stress, and apoptosis, *J Neurosurg Spine* 2016; 24: 949-959.
155. Erdemli ME, Yigitcan B, Gul M, Bag HG, Gul S, Aksungur Z. Thymoquinone is protective against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induced hepatotoxicity. *Biotech Histochem.* 2018; 93(6): 453-462.
156. Giannini EG, Testa R, Savarino V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ*, 2005; 172(3): 367-379.
157. Pandurangan M, Kim DH. ZnO nanoparticles augment ALT, AST, ALP and LDH expressions in C2C12 cells. *Saudi J Biol Sci*, 2015; 22(6): 679-684.
158. Güleç M, Gurel A, Armutçu F. Vitamin E protects against oxidative damage caused by formaldehyde in the liver and plasma of rats. *Mol Cell Biochem*, 2006; 290(1): 61-67.
159. Sayed-Ahmed MM, Aleisa AM, Al-Rejale SS, Al-Yahya AA, Hafez MM, Nagi MN, Al-Shabanah OA. Thymoquinone attenuates diethylnitrosamine induction of hepatic carcinogenesis through antioxidant signaling. *Oxid Med Cell Longev.* 2010; 4: 254-261.
160. Abdel-Daim MM, Shaheen HM, Abushouk AI, Toraih EA, Fawzy MS, Alansari WS, et al. Thymoquinone and diallyl sulfide protect against fipronil-induced oxidative injury in rats. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2018; 25(24): 23909-23916.
161. Gultekin FA, Cakmak GK, Turkcü UO, Yurdakan G, Demir FE, Comert M. Effects of ozone oxidative preconditioning on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Invest Surg.* 2013; 26(5): 242-252.
162. Davies KJ. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB life.* 2000; 50(4-5): 279-289.
163. Akkoc RF, Ogeturk M, Aydin S, Kuloglu T, Aydin S. Effects of carnosine on apoptosis, transient receptor potential melastatin 2, and betatrophin in rats exposed to formaldehyde. *Biotech Histochem.* 2021; 96(3): 223-229.
164. Yıldız F, Çoban S, Terzi A, Ateş M, Aksoy N, Çakır H, et al. *Nigella sativa* relieves the deleterious effects of ischemia reperfusion injury on liver. *World J Gastroenterol* 2008; 14(33): 5204-5209.
165. Tusat M, Mentese A, Demir S, Alver A, Imamoglu M. Medical ozone therapy reduces oxidative stress and testicular damage in an experimental model of testicular torsion in rats. *journal of the Brazilian Society of Urology.* 2017; 43.
166. Chi KK, Zhang WH, Wang GC, Chen Z, He W, Wang SG, et al. Comparison of intraperitoneal and intraepididymal quercetin for the prevention of testicular torsion/detorsion-induced injury. *Urology.* 2017; 99: 106-111.
167. Golbar HM, Izawa T, Wijesundera KK, Bondac A, Tennakoon AH, Kuwamura M, Yamate J. Depletion of Hepatic Macrophages Aggravates Liver Lesions Induced in Rats by Thioacetamide (TAA). *Toxicol Pathol.* 2016; 44(2): 246-258.

168. Di Filippo C, Marfella R, Capodanno P, Ferraraccio F, Coppola L, Luongom M, et al. Acute oxygen-ozone administration to rats protects the heart from ischemia reperfusion infarct. *Inflamm Res*. 2008; 57(10): 445-449.
169. Ayuob NN, Abdel-Hamid AAHM, Helal GMM, Mubarak WA. Thymoquinone reverses nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) associated with experimental hypothyroidism. *Rom J Morphol Embryol*. 2019; 60(2): 479-486.
170. Tang XQ, Ren YK, Chen RQ, Zhuang YY, Fang HR, Xu JH, et al. Formaldehyde induces neurotoxicity to PC12 cells involving inhibition of paraoxonase-1 expression and activity. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2011; 38(4): 208-214.
171. Lim SK, Kim JC, Moon CJ, Kim GY, Han HJ, Park SH. Formaldehyde induces apoptosis through decreased Prx 2 via p38 MAPK in lung epithelial cells. *Toxicology*. 2010; 271(3): 100-106.
172. Zararsiz I, Kus I, Ogeturk M, Akpolat N, Köse E, Meydan S, Sarsilmaz M. Melatonin prevents formaldehyde-induced neurotoxicity in prefrontal cortex of rats: an immunohistochemical and biochemical study. *Cell Biochem Funct* 2007; 25: 413-418.
173. Helal G. K. Thymoquinone supplementation ameliorates acute endotoxemia-induced liver dysfunction in rats. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010; 23(2): 131-137.
174. El-Sheikh AA, Morsy MA, Abdalla AM, Hamouda AH, Alhaider IA. Mechanisms of thymoquinone hepatorenal protection in methotrexate-induced toxicity in rats. *Mediators Inflamm*. 2015; 859383.
175. Awad AS, Abd Al Haleem EN, El-Bakly WM, Sherief MA. Thymoquinone alleviates nonalcoholic fatty liver disease in rats via suppression of oxidative stress, inflammation, apoptosis. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2016; 389(4): 381-391.
176. Al-Malki AL, Sayed AA. Thymoquinone attenuates cisplatin-induced hepatotoxicity via nuclear factor kappa- β . *BMC Complement Altern Med*. 2014; 14: 282.
177. Alpcan S, Başar H, Aydos TR, Kul O, Kısa Ü, Basar MM. Apoptosis in testicular tissue of rats after vasectomy: Evaluation of eNOS, iNOS immunoreactivities and the effects of ozone therapy. *Turk J Urol*. 2014; 40(4): 199-206.
178. Mete F, Tarhan H, Celik O, Akarken I, Vural K, Ekin RG, et al. Comparison of intraperitoneal and intratesticular ozone therapy for the treatment of testicular ischemia-reperfusion injury in rats. *Asian J Androl*. 2017; 19(1): 43-46.
179. Güçlü A, Erken HA, Erken G, Dodurga Y, Yay A, Özçoban Ö, et al. The effects of ozone therapy on caspase pathways, TNF- α , and HIF-1 α in diabetic nephropathy. *Int. Urol. Nephrol*. 2016; 48: 441-450.

6. ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Elazığ'da doğdum. İlk, orta, lise ve yükseköğrenimimi (Tıp Fakültesi) Elazığ'da bitirdim. 2010-2014 yılları arasında Fırat Üniversitesi'nde Acil Tıp ihtisası yaptım. 2018 yılına kadar Acil Tıp Uzmanı olarak çalıştım. 2018 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalında uzmanlık yapmaya başladım.

Evli ve iki çocuk annesiyim.

