

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANATOMİ ANABİLİM DALI**



**FORMALDEHİT UYGULANAN
SIÇANLARIN KARACİĞER
DOKUSUNDA ASPROSİN VE SUBFATİN
İMMÜN REAKTİVİTESİ ÜZERİNE
KARVAKROL'ÜN ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Elif EMRE

2021

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mesut AKSAKAL

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Murat ÖGETÜRK

Anatomi Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Murat ÖGETÜRK

Danışman

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Murat ÖGETÜRK

Prof. Dr. Ahmet KAVAKLI

Prof. Dr. Süleyman AYDIN

Prof. Dr. Evren KÖSE

Doc. Dr. Mustafa CANBOLAT



ETİK BEYAN

Kendime ait çalışmalar ile bu tez çalışmasını gerçekleştirdiğimi, çalışmaların planlanmasından, bulgularının elde edilmesine ve yazım aşamasına kadar tüm aşamalarında etiğe aykırı davranışım olmadığını, bu tezdeki tüm bilgileri ve verileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması içinde yer alan ancak bu tez çalışmasının bulguları arasında yer almayan verilere, bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

Elif EMRE

Prof. Dr. Murat ÖGETÜRK
Danışman

Anatomi Anabilim Dalı
ELAĞIĞ

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimin süresince bilgi, birikim ve tecrübelerinden faydalandığım, insani, ahlaki ve etik değerleri ile örnek edindiğim, desteklerini benden esirgemeyen kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Murat ÖGETÜRK'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Anatomi Anabilim Dalına yıllarca emek veren, eğitimim süresince beni yönlendiren ve manevi desteğini hep hissettiğim bölümümüz emekli öğretim üyesi Prof. Dr. Oya SAĞIROĞLU'na, yanında çalışmaktan mutluluk duyduğum, mesleki olarak yetişmemde katkısı büyük olan Prof. Dr. Ahmet KAVAKLI'ya, Dr. Öğretim Üyesi Ramazan Fazıl AKKOÇ ve asistan arkadaşlarıma,

Tez sürecinin en başından itibaren fikirlerine başvurduğum, sonraki süreçlerde de desteği ve ilgisiyle her daim yanımda hissettiğim Prof. Dr. Süleyman AYDIN ve Doc. Dr. Tuncay KULOĞLU'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tezin deneysel süreçlerinde yardımını esirgemeyen Dr. Fatma Tuba Karakaş, Uzm. Dr. Sena ÖZCAN, Doc. Dr. Taner AKBULUT ve ekip arkadaşlarına, istatistik analiz konusunda destek aldığım Doc. Dr. İbrahim ŞAHİN'e teşekkür ederim.

Başta sevgisiyle her koşulda yanımda olan yol arkadaşım Uzm. Dr. Sadettin EMRE olmak üzere tüm aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Dr. Elif EMRE

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI.....	ii
ETİK BEYAN.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
KISALTMALAR LİSTESİ.....	xi
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT.....	3
3. GİRİŞ.....	5
3.1. Formaldehit.....	6
3.1.1. Formaldehitin Özellikleri.....	6
3.1.2. Formaldehitin Kaynakları ve Kullanım Alanları.....	7
3.1.3. Formaldehit Maruziyet Miktarının Ölçülmesi ve Kabul Edilebilir Sınırları.....	9
3.1.4. Formaldehitin Zararlı Etkileri.....	10
3.1.5. Formaldehit Maruziyetinin Karaciğer Üzerine Etkileri.....	12
3.2. Karaciğer.....	13
3.2.1. Karaciğer Embriyolojisi.....	13
3.2.2. Karaciğer Histolojisi.....	15
3.2.3. Karaciğer Anatomisi.....	16
3.2.3.1. Karaciğerin Damarları.....	23

3.2.3.2.Karaciğerin Lenf Drenajı.....	24
3.2.3.3.Karaciğerin Sinirleri.....	24
3.2.3.4.Karaciğerin Fonksiyonları.....	25
3.3.Reaktif Oksijen Türleri, Antioksidanlar ve Oksidatif Stres.....	26
3.3.1 Antioksidanlar.....	27
3.3.1.1.Karvakrol.....	27
3.4.Adipoz Doku ve Adipokinler.....	32
3.4.1.Asprosin.....	32
3.4.2.Subfatin (Metrnl protein).....	37
4. GEREÇ VE YÖNTEM	42
4.1. Deney Hayvanları.....	42
4.2. Deney Gruplarının Oluşturulması.....	42
4.3. CAR doz ve uygulama yönteminin belirlenmesi.....	43
4.4. Deney Prosedürü.....	43
4.5. Karaciğer Dokusunun Homojenizasyonu ve Saklanması.....	48
4.6. Analitik Ölçümler.....	48
4.6.1. TAS Ölçümü.....	48
4.6.2. TOS Ölçümü.....	49
4.6.3. Asprosin Ölçümü.....	50
4.6.4. Subfatin Ölçümü.....	51
4.7. İmmünohistokimya.....	52
4.7.1. TUNEL metodu.....	53
4.8. İstatistiksel analiz.....	55
5.BULGULAR.....	56

5.1. Klinik Bulgular.....	56
5.2. Biyokimyasal Bulgular.....	58
5.2.1. Kan TAS ve TOS seviyeleri.....	59
5.2.2. Karaciğer Doku Süpernatantlarında TAS ve TOS Seviyeleri.....	60
5.2.3. Kan Asprosin ve Subfatin Seviyeleri.....	61
5.2.4. Karaciğer Doku Süpernatantlarında Asprosin ve Subfatin Seviyeleri.....	63
5.3. İmmunohistokimyasal Bulgular.....	64
5.3.1. Asprosin İmmünreaktivitesi.....	64
5.3.2. Subfatin İmmünreaktivitesi.....	68
5.3.4. TUNEL bulguları.....	72
6. TARTIŞMA.....	77
7. KAYNAKLAR.....	87
8. ÖZGEÇMİŞ.....	99

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Sıçan yeminin içeriği.....	44
Tablo 2. Deney gruplarına uygulanan işlemlerin zaman çizelgesi.....	47
Tablo 3. TUNEL boyama prosedürü.....	55
Tablo 4. Kan ve karaciğer dokusu biyokimyasal parametrelerin değişimi.....	58
Tablo 5. Asprosin histoskor.....	68
Tablo 6. Subfatin histoskor.....	72
Tablo 7. Apoptotik indeks.....	76

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Metanolden formaldehit eldesi.....	7
Şekil 2. Embriyolojik gelişimin yaklaşık 4. haftası (soldan bakış).....	14
Şekil 3. Karaciğerin histolojik çizimi.....	15
Şekil 4. Diafragmatik yüzün önden görünüşü.....	17
Şekil 5. Diafragmatik yüzün arkadan görünümü.....	19
Şekil 6. Visseral yüzün alttan görünüşü.....	20
Şekil 7. Segmental sınırların karaciğer üzerinde izdüşümü.....	22
Şekil 8. Karvakrolün moleküler yapısı.....	28
Şekil 9. Asprosinin etki mekanizması.....	34
Şekil 10. Asprosinin merkezi ve periferel etkileri.....	34
Şekil 11. Beyaz yağ dokusunun esmerleşmesi.....	38
Şekil 12. Beyaz adipoz doku ve nörositlerde subfatinin bilinen işlevleri.....	39
Şekil 13. Formaldehit ölçümlerinden temsili görsel sonuçlar.....	45
Şekil 14. Formaldehit uygulama düzeneğinin şeması.....	46
Şekil 15. Asprosin kiti için ELISA protokol basamakları.....	50
Şekil 16. Subfatin kiti için ELISA protokol basamakları.....	51
Şekil 17. Deney sonunda sıçanların tüylerindeki renk değişimi.....	57
Şekil 18. Kan TAS ve kan TOS seviyeleri.....	60
Şekil 19. Karaciğer doku süpernatantlarında TAS ve TOS seviyeleri.....	61
Şekil 20. Kan asprosin ve kan subfatin seviyeleri.....	62
Şekil 21. Karaciğer doku süpernatantlarında asprosin ve subfatin seviyeleri.....	64
Şekil 22. Karaciğer dokusunda kontrol grubuna ait asprosin immünreaktivitesi.....	65

Şekil 23. Karaciğer dokusunda CAR-20 grubuna ait asprosin immünreaktivitesi.....	66
Şekil 24. Karaciğer dokusunda CAR-40 grubuna ait asprosin immünreaktivitesi.....	66
Şekil 25. Karaciğer dokusunda FA grubuna ait asprosin immünreaktivitesi.....	67
Şekil 26. Karaciğer dokusunda FA+CAR-20 grubuna ait asprosin immünreaktivitesi.....	67
Şekil 27. Karaciğer dokusunda FA+CAR-40 grubuna ait asprosin immünreaktivitesi.....	68
Şekil 28. Karaciğer dokusunda kontrol grubuna ait subfatin immünreaktivitesi..	69
Şekil 29. Karaciğer dokusunda CAR-20 grubuna ait subfatin immünreaktivitesi.	70
Şekil 30. Karaciğer dokusunda CAR-40 grubuna ait subfatin immünreaktivitesi.	70
Şekil 31. Karaciğer dokusunda FA grubuna ait subfatin immünreaktivitesi.....	71
Şekil 32. Karaciğer dokusunda FA+CAR-20 grubuna ait subfatin immünreaktivitesi.....	71
Şekil 33. Karaciğer dokusunda FA+CAR-40 grubuna ait subfatin immünreaktivitesi.....	72
Şekil 34. Karaciğer dokusunda kontrol grubuna ait TUNEL pozitifliği.....	73
Şekil 35. Karaciğer dokusunda CAR-20 grubuna ait TUNEL pozitifliği.....	74
Şekil 36. Karaciğer dokusunda FA grubuna ait TUNEL pozitifliği.....	74
Şekil 37. Karaciğer dokusunda CAR-40 grubuna ait TUNEL pozitifliği.....	75
Şekil 38. Karaciğer dokusunda FA+CAR-40 grubuna ait TUNEL pozitifliği.....	75
Şekil 39. Karaciğer dokusunda FA+CAR-20 grubuna ait TUNEL pozitifliği.....	76

KISALTMALAR LİSTESİ

A.	: Arteria
AKT	: Protein Kinaz B
cAMP	: Siklik adenzin monofosfat
CAT	: Katalaz
ChREBP	: Karbonhidrata duyarlı eleman bağlayıcı protein
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ERK1/2	: Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz
FA	: Formaldehit
FBN1	: Fibrillin 1
GABA	: Gama aminobütirik asit
GLUT	: Glukoz taşıyıcı tip
GSH	: Glutatyon
GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz
IARC	: Uluslararası kanser araştırmaları ajansı
IL-39	: Interleukin 39
i.p.	: intraperitoneal
JNK	: c-Jun N-terminal kinaz
KIU	: Kallikrein İnhibitor Unit
Lig.	: Ligamentum
M.	: Musculus
MDA	: Malondialdehit
N.	: Nervus

nmol	: nanomol
OLFR 734	: Olfactor reseptör 734
PBS	: phosphate buffer saline
PI3-K	: Fosfoinozidit 3-Kinaz
PKA	: Protein kinaz A
PKCδ	: Protein kinaz C delta
POMC	: Pro-opiomelanokortin
PPARγ	: Peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptör gama
Proc.	: Processus
ROS	: Reaktif oksijen türleri
rpm	: revolution per minute
SERCA2	: Sarko / endoplazmik retikulum Ca ²⁺ -ATPaz
SOD	: Süperoksit dismutaz
SUB	: Subfatin
TAS	: Total antioksidan durum
TLR	: Toll benzeri reseptör
TOS	: Total oksidan durum
TRP	: Geçici reseptör potansiyeli
U	: Unit
V.	: Vena

1. ÖZET

Toksik dozlarda formaldehit (FA) dokularda oksidatif hasara sebep olur ve enerji metabolizmasını bozar. Yağ dokusundan sentezlenen asprosin (ASP) ve subfatin (SUB) enerji metabolizmasının düzenlenmesinde etkili adipokinlerdir. Çalışmada FA'ya maruz bırakılan sıçanların ASP ve SUB immünreaktivitesi üzerine antioksidan ve hepatoprotektif özellikleri bilinen karvakrolün (CAR) etkilerinin immunohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle belirlenmesi amaçlandı.

42 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçanlar, Grup I (Kontrol), Grup II (CAR-20), Grup III (CAR-40), Grup IV (FA), Grup V (FA+ CAR-20) ve Grup VI (FA+CAR-40) olarak ayrıldı. Formaldehit alan gruplara doz 10 ppm (8 saat/gün, 5 gün/hafta) olacak şekilde inhalasyon yoluyla, CAR alan gruplar ise 20 ve 40 mg/kg/48 saat iki farklı doz olacak şekilde i.p. yolla 4 hafta boyunca uygulandı. Kan ve karaciğer doku örneklerinde enzim bağlantılı immünosorbent testi (ELISA) ile ASP, SUB, total oksidan (TOS) ve total antioksidan (TAS) seviyelerine bakılırken, immünohistokimyasal yöntemle ASP ve SUB immünreaktiviteleri, TUNEL metodu ile apoptotik hücre miktarı belirlendi.

Formaldehit maruziyeti karaciğer dokusunda ciddi oksidatif hasarlara neden oldu. TOS seviyesini yükseltirken, apoptotik hücre sayısını artırdı. Uygulanan 20 mg/kg CAR karaciğer dokusunda apoptotik hücre sayısını azaltırken, TOS seviyelerini de düşürdü. Ancak 40 mg/kg dozundaki CAR kontrol grubuna kıyasla apoptozisi artırdı. Formaldehit ile birlikte uygulanan 40 mg/kg CAR, karaciğer dokusunda TOS değerini FA grubuna göre azaltsa da, tek başına uygulandığında kan TOS değerini kontrol grubuna göre yükseltti. Ayrıca FA

maruziyeti karaciğer dokusunda ve kanda ASP ve SUB immünreaktivitelerini azalttı. Ancak bu değerler CAR ilavesi ile tersine çevrildi.

Bu bilgiler ışığında, FA'nın enerji metabolizmasını bozduğu ve CAR'ın uygun dozlarda FA'nın yıkıcı etkilerini azalttığı, yüksek dozlarda ise zararlı olabileceği söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Formaldehit, Karvakrol, Asprosin, Subfatin, Karaciğer

2. ABSTRACT

Examination of the Effects of Carvacrol on Asprosin and Subfatin Immune Reactivity in Liver Tissue of rats Exposed to Formaldehyde

Toxic doses of formaldehyde (FA) in tissues cause oxidative damage and impairs energy metabolism. Asprosin (ASP) and subfatin (SUB) synthesized from adipose tissue are adipokines that are effective in the regulation of energy metabolism. The purpose of this study was to determine the effects of carvacrol (CAR), which is known as an antioxidant and hepatoprotective properties immunohistochemically and biochemically in the ASP and SUB in rats exposed to FA.

42 Wistar Albino male rats were divided into groups as Group I (Control), Group II (CAR-20), Group III (CAR-40), Group IV (FA), Group V (FA+ CAR-20) and Group VI (FA+CAR-40). The groups receiving FA were administered with 10 ppm (8 hours/day, 5 days/week) by inhalation while the groups receiving CAR were administered via i.p. (intraperitoneal injection) as two different doses of 20 and 40 mg/kg/48 hours for 4 weeks. ASP, SUB, total oxidant (TOS), and total antioxidant (TAS) levels in blood and liver tissue samples were measured by using ELISA method while ASP and SUB immunoreactivities were determined by using immunohistochemical method and the number of apoptotic cells was determined by using TUNEL method.

Exposure of FA in the liver tissues resulted in severe oxidative damage. It enhanced the number of apoptotic cells while causing in the increment of the TOS

level. The applied 20 mg/kg of CAR in liver tissue resulted in the decrement of the number of apoptotic cells and TOS levels. However, CAR at a dose of 40 mg/kg resulted in the increment of apoptosis when compared with the control group. Although 40 mg/kg CAR and FA applied together resulted in the decrement of TOS value in liver tissue when compared with the FA group while when applied alone TOS value increased when compared with the control group. Also, FA exposure causes a decrement of ASP and SUB immunoreactivities level in liver tissue and in plasma. However, these values were reversed by addition CAR.

In view of the present findings, it is suggested that FA disrupts energy metabolism and CAR ameliorates the destructive effects of FA when used appropriate doses, while it might be harmful at high doses.

Keywords: Formaldehyde, Carvacrol, Asprosin, Subfatin, Liver

3. GİRİŞ

İnsanların çoğu gününün büyük bir bölümünü iç mekanlarda geçirir. Bu sebeple iç mekanların hava kalitesi sağlık için önem arz etmektedir. Kapalı alanlarda hava kirliliğine neden olan en önemli uçucu organik bileşiklerden biri formaldehittir (FA) (1). Boya ve plastik sanayi, yapı izolasyon malzemeleri, halı, mobilya, duvar kaplamaları gibi birçok ürün iç mekan FA kaynaklarıdır. Ev temizlik ürünleri ve kozmetik ürünleri de FA içermektedir (2). Ayrıca sigara dumanı, egzoz dumanı ve orman yangınları da soluduğumuz havaya formaldehit yaymaktadır. Dolayısıyla insanlar gün içerisinde iç ve dış mekanlarda sürekli FA'ya maruz kalmaktadır (2, 3).

Tıp alanında da FA kullanımı sıklıkla görülmektedir. Kadavralar ve organlar FA içeren solüsyonlarla tespit edilir. Anatomistler ve tıp öğrencileri kadavra eğitimi sırasında FA gazına sıklıkla maruz kalırlar. Ayrıca histoloji ve patoloji laboratuvarlarında da tespit solüsyonu olarak kullanılır (4).

Formaldehitin solunum, sinir, üreme ve sindirim sistemleri gibi birçok sistem üzerinde yıkıcı etkileri bulunmaktadır (5, 6). Maruz kalan kişilerde normal popülasyona göre kan, beyin, karaciğer ve kolon kanserleri daha fazla görülmektedir (5).

Formaldehitin enerji metabolizması üzerine etkileri az sayıda çalışma ile gösterilmiştir. Formaldehite aşırı maruziyet serebral korteks nöronlarında sitokrom oksidaz aktivitesini azaltarak enerji metabolizmasını etkilemektedir (7). İnsülin ile etkileşime girerek FA-insülin kompleksleri oluşturur. Bu durum insülin eksikliğine ve sonucunda hiperglisemiye neden olur (8).

Formaldehitin enerji metabolizması için önemli organlardan biri olan karaciğer üzerinde de toksik etkisi bulunur (9). Karaciğer ve yağ dokusunda oksidatif hasar oluşturduğu, ayrıca karaciğer yağlanmasına neden olduğu bilinmektedir (10). Memelilerde glukoz ve lipid homeostazında rol oynayan başlıca organlardan olan karaciğer ve yağ dokusundaki bu değişikliklerin, FA'nın enerji metabolizması üzerindeki olumsuz etkilerinin nedenlerinden biri olduğu düşünülebilir. Bu durumda enerji kullanmak zorunda olan tüm canlı hücrelerin FA toksisitesinden etkilenmesi beklenir. Yağ dokudan sentezlenip enerji metabolizmasında görev aldığı bilinen subfatin (SUB) ve asprosin'in (ASP), FA kaynaklı enerji metabolizmasında gelişen değişimlerden nasıl etkilendiği bilinmemektedir.

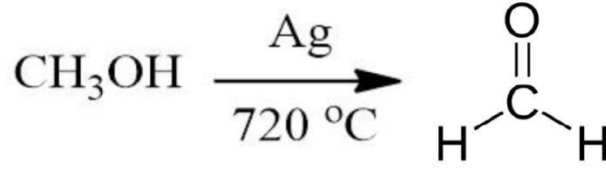
Bu çalışmada, antioksidan ve hepatoprotektif etki gösteren karvakrolün (CAR) FA'nın karaciğer dokusunda oluşturduğu oksidatif hasara etkisi ve bu metabolik olaylardan enerji metabolizmasında görev alan ASP ve SUB'un nasıl etkilendiği detaylı bir şekilde incelendi.

3.1. Formaldehit

3.1.1. Formaldehitin Özellikleri

Formaldehit tüm canlılarda görülen normal bir metabolittir (11). Kapalı kimyasal formülü CH_2O olan FA, ilk olarak 1955'te Alexander Butlerov tarafından tanımlanmıştır. İlk saf olmayan kimyasal sentezi ise 1867 yılında Alman kimyager August Wilhelm von Hofmann tarafından gerçekleştirilmiştir. (12). 1892 yılında ise Alman kimyager Friedrich August Kekule' von Stradonitz saf FA formuna ulaşmayı başarmıştır (13). Formaldehit 300-600 °C'de bir metal

oksit katalizör üzerinde, metanol'ün oksidasyonu sonucunda elde edilmektedir (14) (Şekil 1).



Şekil 1. Metanolden formaldehit eldesi

Aldehit ailesinin üyesi olan FA keskin kokulu, yanıcı, renksiz irritan bir gazdır. Su, eter, aseton ve etanolde iyi çözünmektedir (12). Gaz halinin havadaki miktarı pars per million (ppm) olarak ifade edilir. Sıvı miktarları mililitre (ml), dokuda ise nanogram (ng) birimiyle ifade edilmektedir. Polimerize olmuş katı haline paraformaldehit denilirken, %37'lik sulu çözeltisine ise formol veya formalin adı verilmektedir. Ayrıca FA, methanal, methylene oxide, oxymethylene, methylaldehyde ve oxomethane isimleriyle de bilinmektedir. Sulu çözeltilerini stabilize etmek için %10-15 metanol eklenebilmektedir. Molekül ağırlığı 30.03 g/mol, kaynama noktası -21 °C, erime noktası -92 °C'dir. Çok reaktif bir bileşik olup, oda sıcaklığında hızla gaz halini almaktadır (12, 15-17).

3.1.2. Formaldehitin Kaynakları ve Kullanım Alanları

Formaldehit günlük metabolizmanın bir parçası olarak üretilen ara maddelerden biridir. Serin, metiyonin, kolin ve glisin'in metabolize olması sırasında üretilmektedir. Üretilen bu FA, timidin, pürin ve bazı aminoasitlerin sentezinde kullanılmakta ya da dehidrogenaz enzimi ile formik asite yıkılmaktadır (16, 17). Endojen FA birikimi, en çok karaciğer ve böbreklerde görülür. Bunun

yanı sıra kahverengi ve beyaz yağ dokusu, kas, beyin, kornea ve retinada da birikim görülmüştür (18).

Eksojen formaldehite maruz kalmanın olası yolları solunum, oral ve cilt yolu ile emilimdir (19). Solunum ve oral yolla alınan FA kolayca emilirken cilt yoluyla emilimi çok az gerçekleşmektedir (17). Çiğ meyveler ve çiğ sebzelerde ise değişen miktarlarda doğal bir bileşen olarak tespit edilmiştir. Elma türlerinde 6,3 ila 22,3 mg/kg arası, muzda 16,3 mg/kg, karnıbaharda 26,9 mg/kg FA varlığından söz edilir (20, 21). Ayrıca et, süt, süt ürünlerinde, balık ve kabuklu deniz hayvanlarının yapısında da çeşitli miktarlarda bulunmaktadır. Bazı peynir türlerine, kurutulmuş besinlere ve balık gibi bazı yiyeceklere koruyucu madde olarak eklenebilmektedir (17). Hızlıca formata metabolize edildiğinden yiyecekler yoluyla alınan FA miktarını tahmin etmek zordur (17, 22).

Solunum yolu ile maruz kalınan FA'nın önemli bir kaynağı alt atmosferdeki hava kirliliğidir. Motorlu taşıtların egzoz dumanı bunun önemli sebeplerindendir. Sigara ve diğer tütün ürünleri de önemli FA kaynağıdır. Kapalı alanda içilen tek bir sigara ortamdaki FA miktarını yaklaşık 0.21 ppm artırır. Her bir paket ile ortalama 0.38 mg FA vücuda alınmaktadır. Gazlı ocaklar ve açık şömineler solunan havadaki diğer FA kaynaklarıdır (17, 23, 24).

Antiseptikler, bulaşık deterjanları, halı yıkama ürünleri, ilaçlar, kozmetik ürünler gibi günlük hayatta temas ettiğimiz pek çok ürün FA içermektedir. Endüstrinin pek çok alanında kullanılan FA, plastik ve boya sanayi, yalıtım malzemeleri, zemin panelleri, suntalar, kumaşlar, deri ürünleri ve mobilya imalatında da kullanıldığından yaşam alanlarımızda sıklıkla bulunmaktadır. Ayakkabılar ve tekstil ürünleri FA içermektedir (17, 25, 26).

Formaldehit sağlık alanında, özellikle de laboratuvarlarda sıklıkla kullanılmaktadır. Tıp, diş hekimliği, veteriner ve biyoloji alanlarında çalışanlar daha sıklıkla FA'ya maruz kalmaktadır. Anatomi laboratuvarlarında kadavra tahniti ve muhafazasında, patoloji ve histoloji laboratuvarlarında doku fiksasyonunda, diş hekimliğinde ise kaplama yapımında kullanılmaktadır (15, 27, 28). Formaldehit aşıların hazırlanması (29), protein incelemelerinde izotop etiketlenmesi ve çapraz bağlama maddesi olarak da sıklıkla kullanılan bir kimyasaldır (30, 31).

3.1.3. Formaldehit Maruziyet Miktarının ölülmesi ve Kabul Edilebilir Sınırları

Formaldehit endojen olarak üretilebilen bir metabolittir. Maruz kalınan eksojen FA, vücuda alındıktan sonra hızla metabolize edilir. Bu sebeple alınan eksojen FA miktarı kan, idrar, gaita ve vücut sıvılarında tespit edilememektedir. FA maruziyetini değerlendirmek için çalışma ortamında çalışanın ağız-burun seviyesine yakın olacak şekilde bir yaka kartı veya cihaz takılmaktadır (17). Belirli bir süre sonunda difüzyon yolu ile biriken FA miktarı değerlendirilebilmektedir. Günde 8 saat çalışma süresince uzun süreli ve tekrar edilen maruziyetlerde çalışanın sağlığını bozmayacak sınır 0.75 ppm kabul edilirken, bir çalışma gününün herhangi bir anında aşılmaması gereken sınır 2 ppm olarak belirlenmiştir (32).

Formaldehit vücuda girdikten sonra eritrositlerde ve karaciğerde bulunan formaldehit dehidrogenaz enzimi ile formik asite yıkılarak idrar ve gaita ile atılır. Ayrıca akciğerlerde karbondioksite okside edilerek solunum yolu ile vücuttan

atılır (17, 32, 33). Sağlıklı insan vücudunda karaciğerin dakikada 22 mg formaldehiti metabolize edebildiği hesaplanmıştır (34). Bu miktarın aşılması, karaciğer başta olmak üzere birçok organda toksisiteye neden olmaktadır.

3.1.4. Formaldehitin Zararlı Etkileri

Formaldehit vücuda solunan havayla, oral ve dermal yolla alınabilir (3). Maruziyet şekline ve miktarına göre etkileri değişiklik göstermektedir. Dermal yolla FA maruziyeti sonucu ölüm vakası bildirilmemiştir. Alerjik reaksiyon, küçük deri ülserleri, epidermiste hiperplazi, kontakt dermatit gibi bulgular görülmüştür (17, 25).

Oral yolla FA maruziyeti genellikle intihar amacı veya kaza ile olmaktadır. Bu şekilde alınan FA miktarının net olarak tespit edilmesi mümkün değildir. Oral yolla FA maruziyeti sonucu mide ağrısı, kusma, disfaji, orofarinks ve özofagusta ülser, kanama, perforasyon görülebilmektedir. Apne, bradipne, akut solunum stresi gibi solunum sistemine ait sıkıntılar yaşanabilmektedir. Ayrıca hipotansiyon, anüri, böbrek yetmezliği, ikter, hepatomegali, laterji, felç, bilinç kaybı yaşayan vakalar bildirilmiştir (17, 35).

Formaldehitin toksik etkileri doza ve maruziyet süresine bağımlı olsa da 0.24 ppm gibi düşük dozda dahi iritan etkileri görülmüştür (36). Formaldehit 0.05-1 ppm arası kötü koku şeklinde hissedilir. 0.05-2 ppm arası gözde irritasyon, 0.1-25 ppm arası burun ve boğazda irritasyon görülebilmektedir. 5-20 ppm arası göz, burun ve farinkste yanma, gözde yaşarma, dispne, öksürük gibi belirtiler ortaya çıkabilmektedir. 20 ppm üstünde pulmoner ödem ve pnömoni, 100 ppm üstünde ise ölüm gerçekleşebilmektedir (24).

Çeşitli şiddetlerde kas ve eklem ağrısına neden olabilir. Kısa süreli bellekte bozulma, hafıza kaybı, öğrenme kapasitesinde azalma, dikkat dağınıklığı, duygudurum değişikliği gibi nörolojik sistemle ilgili bozukluklar görülmüştür (11, 17, 37, 38).

Formaldehitin teratojenik etkileri de bulunmaktadır. Plesantayı geçebilmekte, gebeliklerde spontan abortus, düşük doğum ağırlıklı bebek gibi sorunlara sebep olabilmektedir. Ayrıca erkeklerde sperm morfolojinde bozulma ve sayısında azalmaya sebep olmaktadır (39-41).

Formaldehit hücrelere nonenzimatik şekilde bağlanarak canlı dokuda nekroz, iltihabi reaksiyon, alerji ve sitotoksikite gibi tepkilere sebep olur. Ölü dokularda ise antimikrobiyal etkisi sebebiyle çürümeyi durdurur ve tespit fonksiyonu gösterir. Nükleik asitlere bağlanması sonucu da toksik etkiye yol açar. DNA ile reaksiyonu kalıcı denatürasyonlara sebep olmaktadır (42-44).

Uluslararası kanser araştırmaları ajansı (IARC) FA'yı resmi olarak "kesin insan kansorejeni" olarak sınıflandırmıştır (45). Burunda, nazofarinks ve akciğerlerde kansere neden olduğu gösterilmiştir (17, 46, 47). Formaldehite maruz kalan kişilerde normal popülasyona göre kan, beyin, karaciğer ve kolon kanserlerinden ölüm oranlarının daha fazla olduğu saptanmıştır (5).

Formaldehit insanlar ve hayvanlarda immun sistemin işleyişini değiştirerek, enfeksiyöz ajanları ve neoplastik hücreleri tanıma kapasitesini azaltmaktadır (48). İmmüsupresyona ve otoimmün hastalıklara sebep olabilmektedir (48, 49).

Formaldehite aşırı maruziyetin serebral korteks nöronlarında enerji metabolizmasını etkilediği gösterilmiştir (7). İnsülin ile etkileşime girerek FA-

insülin kompleksleri oluşturur. Bu durum insülin eksikliğine ve sonucunda hiperglisemiye neden olur (8).

Formaldehit böbrek dokusundaki glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitelerini düşürerek antioksidan savunma sistemine zarar vermekte, oksidatif hasara neden olmaktadır. Formaldehite maruz kalan sıçanlarda oksidatif hasar tespitinde önemli bir parametre olan malondialdehit (MDA) seviyesinin de anlamlı olarak arttığı bulunmuştur (50). Yapılan başka çalışmalarda da FA'nın akciğer ve karaciğer üzerinde oluşturduğu oksidatif hasara dikkat çekilmiştir (4, 51).

3.1.5. Formaldehit Maruziyetinin Karaciğer Üzerine Etkileri

Formaldehit insan karaciğerinde formaldehit dehidrogenaz aracılığıyla formik asite metabolize olmaktadır. Sağlıklı insanda dakikada 22 mg FA'yı metabolize edebildiği hesaplanmıştır (34). Bu miktardan fazla FA'ya maruz kalmak enerji metabolizması için önemli organlardan olan karaciğer üzerinde toksik etki oluşturmaktadır (9). Bununla beraber karaciğerde adipoz doku birikimine neden olmaktadır (10).

Formaldehite maruz kalan fare embriyolarının karaciğerinde kromozom kırılmaları ve poliploidler olduğu tespit edilmiş, ayrıca karaciğer kanserinde artış saptanmıştır (41, 52).

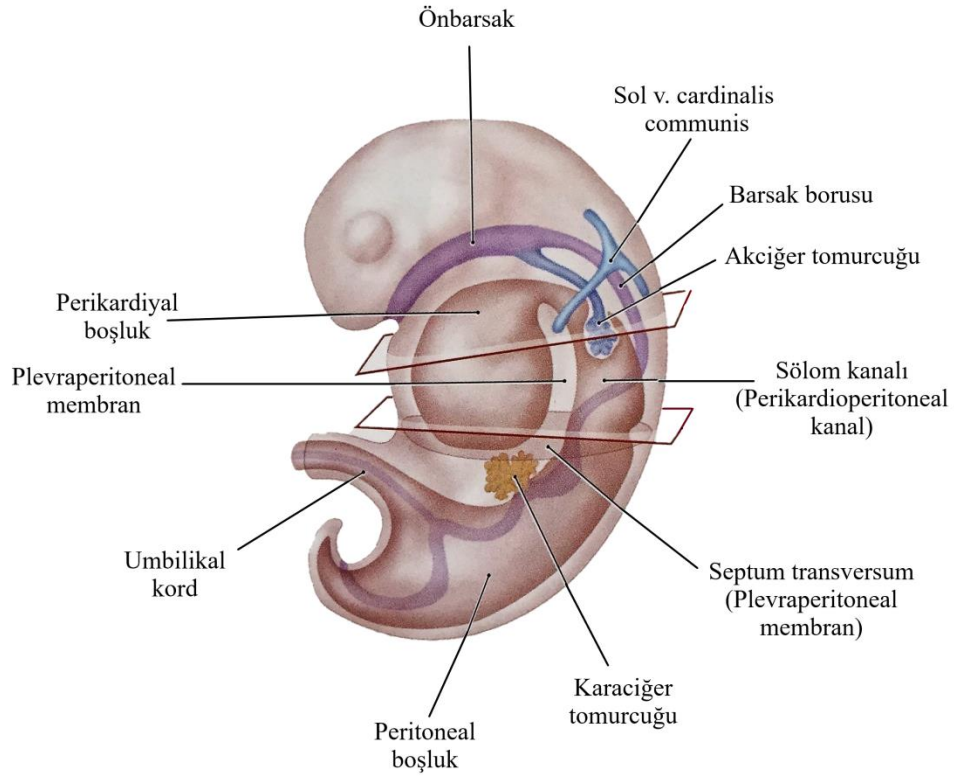
Formaldehit uygulanan sıçanların karaciğer dokusu ışık mikroskopuyla incelendiğinde sinuzoidlerin genişlediği, portal alan ve v. centralis'ler etrafında mononükleer hücre infiltrasyonlarının varlığı gösterilmiştir. Hepatositlerin bir kısmının sitoplazmasında vakuolizasyon görülürken, bazılarında ise

hiperkromatik çekirdek varlığı tespit edilmiştir. Dokudaki suda çözülmeyen polisakkaritleri gösteren PAS boyası ile portal alan etrafındaki hepatositler boyandığında, PAS (-) olduğu, dolayısıyla glikojenin olmadığı belirtilmiştir. Formaldehit maruziyeti ile oluşan stres sonucu karaciğer dokusunda ilk glikojenin yıkıldığı ve FA'nın karaciğere direkt mekanizma ile hasar oluşturduğu gösterilmiştir (53). Ayrıca FA karaciğer dokusunda lokal hücresel nekroz ve sentrilobüler vakuolizasyona neden olmaktadır (54).

3.2. Karaciğer

3.2.1. Karaciğer Embriyolojisi

Hepatik divertikül (karaciğer tomurcuğu) ovulasyondan 22-24 gün sonra ön bağırsağın kaudal parçasında bir hücre yoğunlaşması olarak görülmeye başlar ve septum transversum'a doğru uzanır. Hepatik düvertikülün kranial ve kaudal iki bölümü vardır. Daha büyük olan kranial parçasına primordium hepaticum (ilkel karaciğer) denilir. Buradaki epitel hücre kordonları mezenşim içine doğru uzanarak karaciğer sinüzoidlerini oluşturmak üzere farklılaşır. Endoderm hücreleri ise intrahepatik safra yollarının epitelini oluşturur. Hepatik divertikülün kaudal parçasından ise vesica biliaris ve canalis cysticus oluşur. Başlangıçta epitel hücreleri ile dolu olan safra yolları, zamanla hücrelerin dejenere olması ile kanala dönüşür (55).



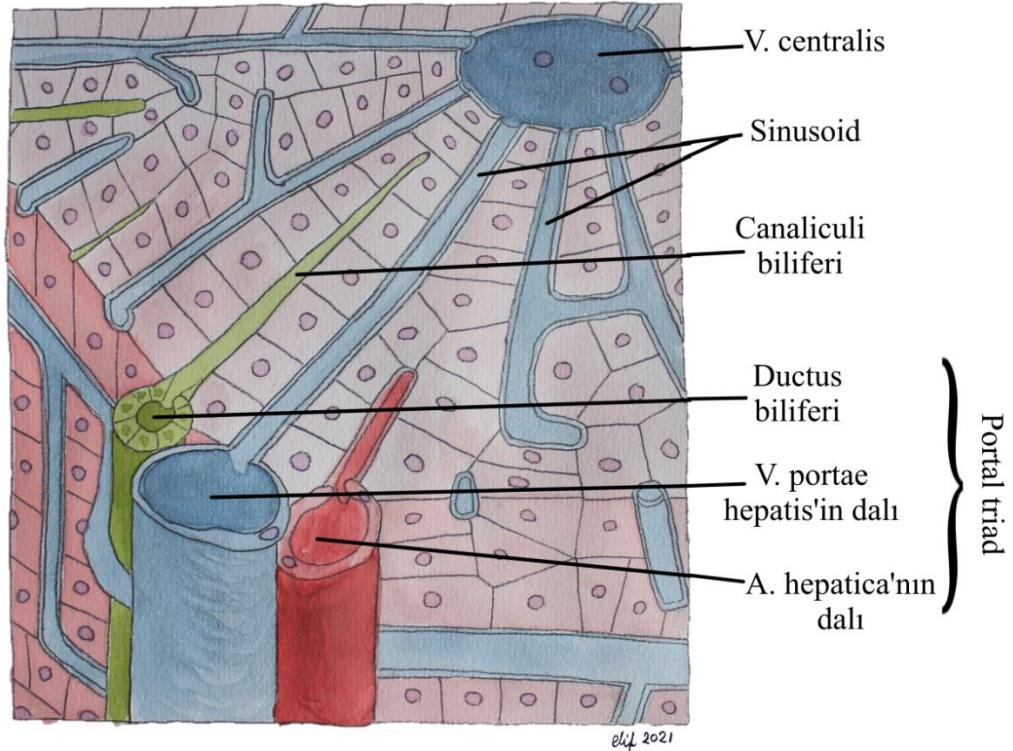
Şekil 2. Embriyolojik gelişimin yaklaşık 4. haftası (soldan bakış) (56)

Hematopoez 6. haftada başlar, 20. haftalarda en yüksek düzeye ulaşır. 30. hafta civarında gittikçe azalmaya başlar. 10. haftada karaciğer karın boşluğunun büyük kısmını doldurur. Başlangıçta sağ ve sol lob aynı büyüklükte iken zamanla sağ lob daha da fazla gelişir. Safra üretimi 12. haftada başlamaktadır. 13. haftadan sonra safra mekonyuma karışarak koyu yeşil renk vermeye başlar (55, 57, 58). Karaciğer fonksiyonlarındaki gelişme doğumdan sonra da devam eder. Doğumdan sonra 12. ayda karaciğer fonksiyonları erişkin seviyesine ulaşır (55).

3.2.2. Karaciğer Histolojisi

Karaciğer kahverenginde, gevrek yapıda bir organdır. Künt travmalarda rüptüre olmaya meyillidir (59). Büyük bir kısmı dışta periton ile kaplıdır. Periton'un altında tunica fibrosa (Glisson kapsülü) adı verilen fibröz bağ dokusu ile sarılıdır. Tunica fibrosa özellikle peritonsuz bölgelerde daha kalın ve kuvvetlidir. Porta hepatis bölgesinde damarların etrafını da saran Glisson kapsülü, karaciğer dokusunun içerisine doğru da ilerleyerek lob ve lobüllere ayırır. Lobüller karaciğerin yapısal ve fonksiyonel en küçük birimleridir (60-62).

Klasik karaciğer lobülü, ortada santral ven, etrafında ışınal tarzda dizilmiş hepatosit kordonları ve periferde portal alanlarla sınırlandırılmış yapılardır. Altıgen şeklindedir. Portal alanlarda v. porta ve a. hepatica'nın dalları ve bir safra kanalı bulunur. Bu üçlü yapıya portal triad denilir. Aynı zamanda portal alanda lenf damarları ve sinir yapıları da yer alır (60, 62).



Şekil 3. Karaciğerin histolojik çizimi (Gartner histoloji atlasından esinlenerek çizilmiştir (63))

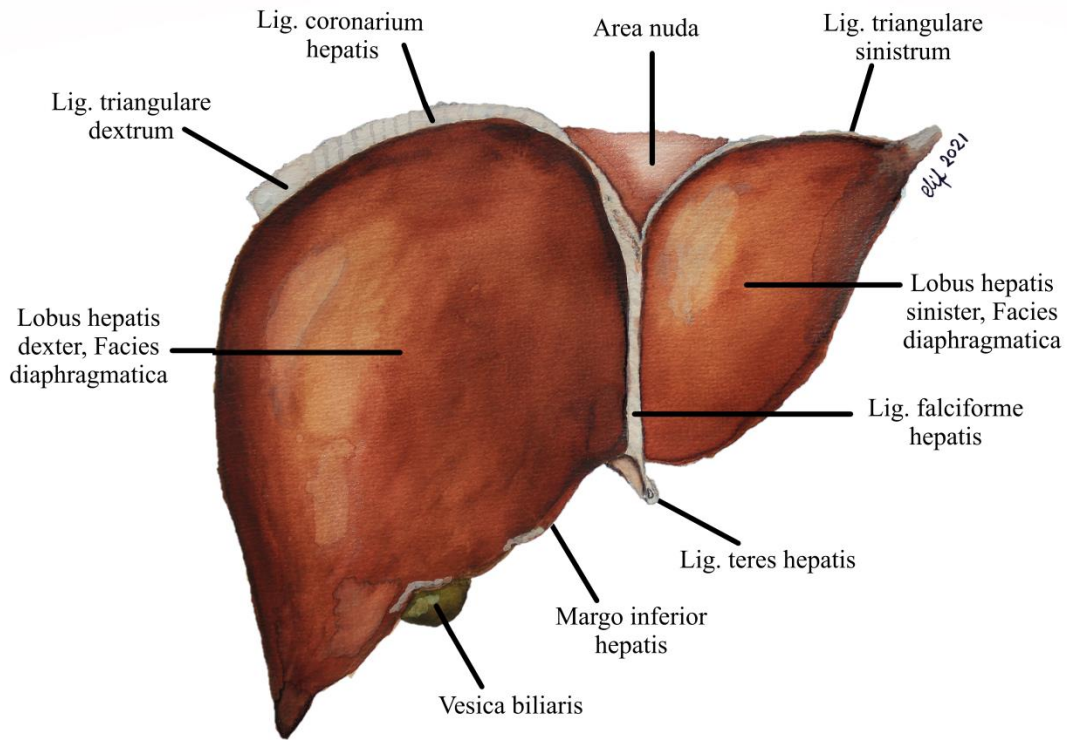
Hepatositler karaciğer parankim hacminin yaklaşık %80'ini oluşturmaktadır (59, 62). Santral venden periferik doğru ışınal tarzda dizilmiş hücre kordonlarıdır. Hepatositlerin birbirlerine bakan yüzlerinde canaliculi biliferi denilen ince safra kanalları bulunur. Hepatosit kordonların aralarında düzensiz şekilli kapiller olan karaciğer sinüzoidleri bulunur. Sinüzoidlere kan portal alanda ilerleyen intralobüler damarlardan gelir. Vena porta ve a. hepatica propria aracılığı ile gelen iki farklı kan sinüzoidlerde karışır. Sinüzoidler pencereli kapiller özelliğine sahip olup hepatositler arasında madde alışverişine izin verir (60, 62). Ayrıca duvarlarında bulunan özelleşmiş monosit hücreleri olan Kupffer hücreleri kan yoluyla gelen antijenleri, mikroorganizmaları, tümör hücrelerini, hasarlanmış eritrositleri ve demiri fagosit eder (59, 60, 62).

3.2.3. Karaciğer Anatomisi

Karaciğer, karın boşluğunun sağ üst tarafında regio hypochondriaca dextra'nın tamamını ve regio epigastrica'nın büyük kısmını dolduran regio hypochondriaca sinistra'ya doğru da uzanan vücudun en büyük bezidir. Üst sınırı diaphragma hizasında iken alt sınırı arcus costalis'tir. Karaciğer transvers ekseninde 25-30 cm, sağ tarafta sagittal ekseninde 15-16 cm ve vertikal ekseninde 8-12 cm ebatındadır. 1200-1800 gr ağırlığı ile erişkin vücut kütlelerinin yaklaşık %2'sini oluşturur. Bu oran fetüs ve çocuklarda %5-10'a kadar çıkmaktadır (59, 64).

Diaphragma ile komşuluk yapan facies diaphragmatica hepatis ve karın organları ile komşuluk yapan facies visceralis hepatis olmak üzere iki yüzü vardır. Bu iki yüzün arasında arka ve altta olmak üzere iki de kenarı vardır. Keskin olan margo inferior hepatis üzerinde iki çentik bulunur. Incisura ligamenti teretis

denilen birinci çentik orta hattın sağında bulunur ve fissura ligamenti teretis'in başlangıç yeridir. İkinci çentik ise orta hattın 4-5 cm sağında, sağı m. rectus abdominis'in lateral kenarının sağı arcus costarum'u kestiğı noktadır. Bu noktaya Murphy noktası adı verilmekte olup, safra kesesinin fundus'u bu noktada bulunmaktadır (Şekil 4).



Şekil 4. Diafragmatik yüzün önden görünüşü (Prometheus anatomi atlasından esinlenerek çizilmiştir) (56)

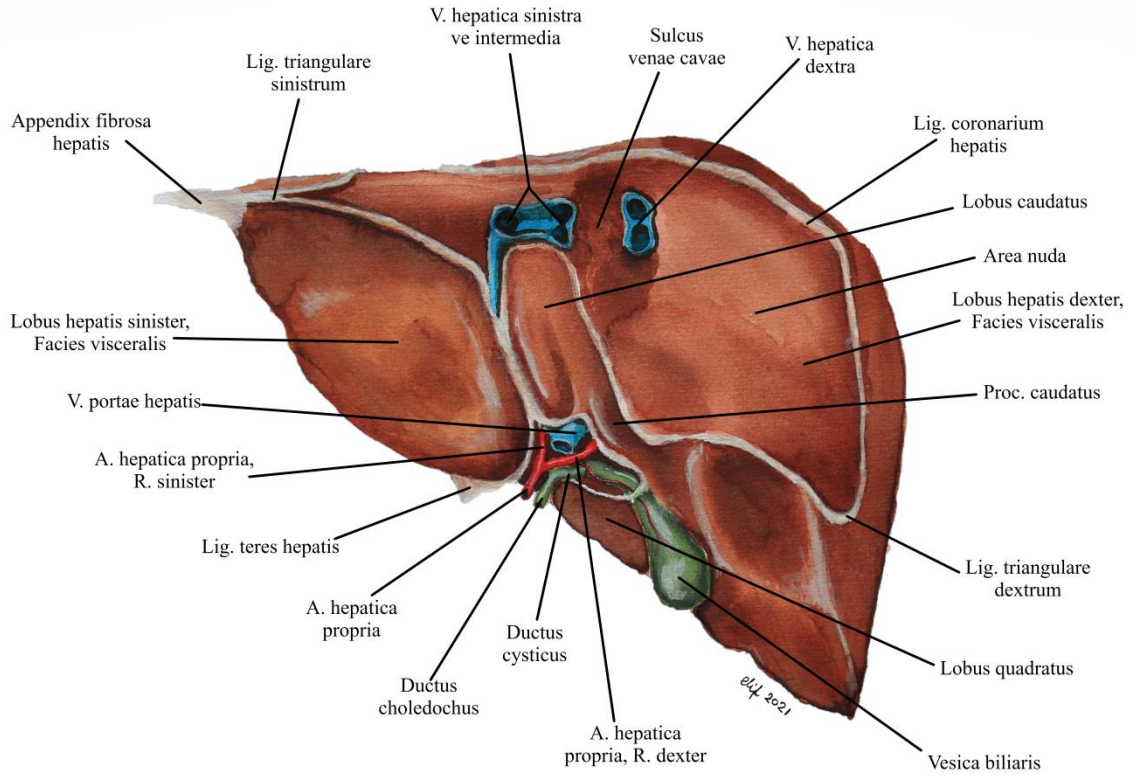
Facies diaphragmatica hepatis diaphragmanın altına uyacak şekilde düzgün yüzeyli ve konveks olup, baktığı yöne göre pars superior faciei diaphragmaticae hepatis, pars anterior faciei diaphragmaticae hepatis, pars posterior faciei diaphragmaticae hepatis, pars dextra faciei diaphragmaticae hepatis olarak dört bölüme ayrılmaktadır (59). Facies diaphragmatica'nın büyük

bölümü peritonla kaplı (pars libera) iken, pars posterior'un büyük bölümü ve pars anterior'daki lig. falciforme hepatis'in iki yaprağı arası peritonsuzdur (area nuda; pars affixa) (59).

Pars superior; diaphragma aracılığı ile sağda pleura ve akciğerlerle, solda pericardium ve kalp ile komşudur. Kalbin karaciğer üzerinde bıraktığı ize impressio cardiaca hepatis denilmektedir. Büyük bölümü periton ile örtülü iken sadece arka kısmında küçük bir bölümünde periton bulunmaz. Pars posterior'a doğru da devam eden, lig. coronarium ile sınırlanan bu peritonsuz alana area nuda hepatis ismi verilmektedir (59, 65).

Pars anterior; sağ tarafta 6-10. kıkırdak ve kemik kostalar ile sol tarafta ise 7-8. kıkırdak kostalar ile komşuluk yapmaktadır. Ayrıca orta hatta proc. xiphoideus ile komşudur. Her iki arcus costalis arasında kalan bölgede karın ön duvarı ile komşuluk yapar. Lig falciforme hepatis'in bulunduğu bölge hariç periton ile sarılıdır (59).

Pars posterior; orta kısmı vertebralar ile komşu olup vertebraların gövdelerine uyacak şekilde konkavdır. Bunun hemen sağında v. cava inferior'un izi sulcus venae cavae inferioris denilen oluk bulunmaktadır. Sulcus vena cavae'nın tabanında v. hepatica'ların v. cava inferior'a açıldığı delikler bulunmaktadır. Büyük kısmı peritonsuz olan pars posterior, peritonsuz bölgede gevşek bağ dokusu ile diaphragmaya tutunmaktadır. Area nuda hepatis adı verilen bu peritonsuz alanın etrafı lig. coronarium ile çevrilidir. Area nuda'nın küçük bir bölümü pars superior'a doğru devam etmektedir (59, 65) (Şekil 5).



Şekil 5. Diafragmatik yüzün arkadan görünümü (Prometheus anatomi atlasından esinlenerek çizilmiştir) (56)

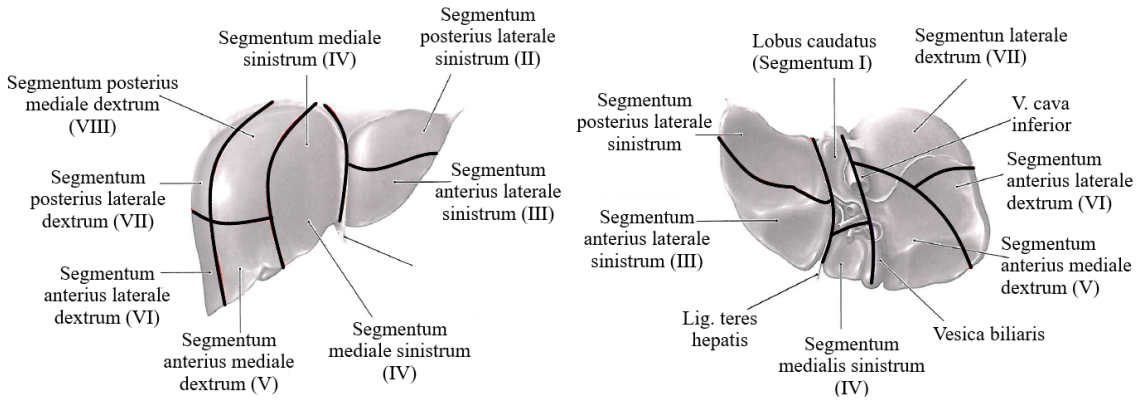
Pars dextra; tamamı peritonla kaplı olan bu bölüm diaphragma aracılığı ile sağ taraf kostalarla komşuluk yapmaktadır. Yüzeyinde bu kostaların izleri impressiones costales görülür. Biyopsi işleminde bu bölge tercih edilir (59, 64).

Arkaya, aşağıya ve sola bakan, karın içi organlar ile komşu yüzüne facies visceralis hepatis denilmektedir. Bu yüze bütün olarak bakıldığında H harfine benzeyen oluşumlar bulunmaktadır (Şekil 6). Sağ taraftaki sagittal oluk sulcus sagittalis dexter olarak isimlendirilir. Sulcus sagittalis dexter'in ön yarısını fossa vesica biliaris (felleae), arka yarısını ise sulcus venae cavae inferioris oluşturmaktadır. H harfini oluşturan sol taraftaki sagittal yarı ise fissura sagittalis

Karaciğerin lobus hepatis dexter ve sinister olarak isimlendirilen iki büyük lobu, lobus quadratus ve lobus caudatus olarak isimlendirilen iki küçük lobu vardır (59, 65). Lobus quadratus ve lobus caudatus anatomik olarak lobus hepatis dexter'e aittir. Damarsal yapıları incelendiğinde ise fonksiyonel olarak lobus hepatis sinister'e ait olduğu görülmektedir (61, 65). Lobus hepatis dexter karaciğerin yaklaşık 5/6'sını oluşturur. Facies diaphragmatica'nın pars anteriorunda bulunan lig. falciforma hepatis ile lobus dexter ve lobus sinister birbirinden ayrılır. Lobus hepatis dexter, visceral yüzde fissura ligamenti teretis ve fissura ligamenti venosi ile sınırlanır. Sulcus sagittalis dexter ile fissura sagittalis sinistra arasında kalan ve anatomik olarak lobus hepatis dexter'e ait olan bu iki küçük lobdan, lobus quadratus porta hepatis'in önünde, lobus caudatus ise porta hepatis'in arkasında yer almaktadır (59, 65, 66).

Karaciğerin visseral yüzünde komşu organların yaptığı izler bulunur. Lobus hepatis dexter'in visseral yüzünde en önde flexura coli dextra'nın oturduğu impressio colica hepatis bulunur. Bunun arkasında sağ böbreğin oturduğu impressio renalis hepatis ve sağ böbrek üstü bezinin bir kısmının oturduğu impressio suprarenalis hepatis bulunmaktadır. Ayrıca impressio renalisin sol tarafında pars descendens duodeni'nin oturduğu impressio duodenalis hepatis yer alır. Lobus hepatis sinister'in visseral yüzünde ise midenin oturduğu impressio gastrica hepatis bulunur. Bunun solunda lobus caudatus'a yakın bölümünde omentum minusa doğru uzanan kabarıntıya tuber omentale hepatis denilmektedir. Lobus caudatus'un üzerinde sol tarafta proc. papillaris, sağ tarafta proc. caudatus denilen iki adet çıkıntı bulunur (59, 61, 65) (Şekil 6).

Karaciğer, kanlanma ve safra drenajı dikkate alınarak segmentlere ayrılmıştır. Couinaud segmentleri adı verilen bu 8 segment Şekil 7’de görüldüğü gibidir. Her segmentin kendine ait hepatik ve portal veni, arteriel beslenmesi, safra drenaj kanalı bulunmaktadır (61, 66).



Şekil 7. Segmental sınırların karaciğer üzerinde izdüşümü (56)

Karaciğerden karın ön duvarına ve diaphragmaya doğru uzanan 6 adet bağ bulunmaktadır. Lig. falciforme hepatis, lig. coronarium, lig. hepatorenale, lig. triangulare dextrum ve lig. triangulare sinistrum peritonun oluşturduğu bağlar iken, lig. teres hepatis fetal hayatta aktif olan v. umbilicalis’in kapanmasıyla oluşan embriyolojik bir bağdır (59). Bazı kaynaklar karaciğer ile mide ve duodenum arasındaki omentum minus’u oluşturan lig. hepatogastricum ve lig. hepatoduodenale’yi de karaciğerin bağları arasında saymaktadır (61, 66).

Karaciğer karın boşluğundaki en büyük organ olmasına rağmen, karın boşluğunun sağ üst kısmında pozisyonunu korumaktadır. Bu şekilde konumunu koruyabilmesi karın içindeki negatif hava basıncı, karın kaslarının tonusu, periton plikaları, diğer organların üzerine oturması, v. cava inferior ve v. hepatica’lar ile

karın arka duvarına tutunması sayesinde. Ayrıca karaciğer area nuda bölgesinde gevşek bağ dokusu ve lig. coronarium, lig. triangulare dextrum, lig. triangulare sinistrum bağları aracılığı ile de diaphragmaya tutunur (59, 64).

3.2.3.1. Karaciğerin Damarları

Karaciğer a. hepatica propria aracılığı ile gelen oksijenden zengin kan ile beslenir. A. hepatica propria, truncus coeliacus'dan ayrılan a. hepatica communis'in dalıdır. Porta hepatis'ten geçen a. hepatica propria r. dexter ve r. sinister olmak üzere iki dala ayrılır, sonrasında interlobuler ve intersegmental dallara ayrılarak tüm karaciğere dağılır. A. hepatica'nın dalları karaciğer dokusu içerisinde dağılırken anastomoz yapmazlar (59, 65).

Karaciğere ayrıca besinden zengin v. porta hepatis gelmektedir. V. mesenterica superior ve v. lienalis'in birleşmesiyle oluşan v. porta hepatis sindirim kanalından (canalis analis'in son bölümü hariç), pankreas, dalak ve safra kesesinden gelen venöz kanı taşımaktadır. Sinüzoidlerde v. porta hepatis ve a. hepatica propria'dan gelen kanlar karışır ve v. centralis'e dökülürler. V. centralis'e ulaşan kanın %20'si a. hepatica propria ve %80'i v. porta hepatis aracılığı ile gelmektedir (59, 65, 66).

V. centralis'ler birleşerek v. sublobularis'leri, v. sublobularis'ler de birleşerek v. hepatica'ları oluştururlar. V. hepatica'lar karaciğerin pars posterior'undaki sulcus vena cava'dan çıkarak v. cava inferior'a dökülürler (59, 64).

3.2.3.2. Karaciğerin Lenf Drenajı

Karaciğer'in lenf drenajı yüzeysel lenf drenajı ve derin lenf drenajı olarak iki kısımda incelenir (59, 65).

Yüzeysel lenfler periton altı gevşek bağ dokusu içerisinde bulunur. Diyafragmatik yüzdeki lenf damarlarının bir kısmı for. vena cava'dan geçerek vena cava inferior'un terminal bölümündeki lenf nodlarına, bir kısmı hiatus oesophageus'tan geçerek nodi lymphoidei pericardiaci laterales'e drene olur. Diğer kısımları ise porta hepatis'teki nodi lymphoidei hepatici ve truncus coeliacus'un etrafındaki nodi lymphoidei coeliaci'ye drene olur (59, 65).

Derin lenf damarları birleşerek inen ve çıkan iki ana lenf damarı oluşturur. Çıkan lenf damarı v. cava inferior etrafındaki lenf nodlarına, inen lenf damarı ise nodi lymphoidei hepatici'ye drene olur (59, 65).

3.2.3.3. Karaciğerin Sinirleri

Karaciğer'in parasempatik uyarısı vagal truncus'ların rr. hepatici dallarından gelir. Sempatik uyarısı ise nn. splanchnici'den gelir. Sempatik ve parasempatik lifler plexus coeliacus adı verilen bir ağ oluşturur. Bu ağdan çıkan lifler damarlar üzerinde ilerleyerek karaciğer dokusunda dağılır (59, 64).

Karaciğer'in visseral duyusu 8-11. torakal segmentlere taşınır. Bu nedenle karaciğerden kaynaklanan ağrılar 10. interkostal sinirin dermatom alanında hissedilir. Ayrıca sağ n. phrenicus'un uç dalları diaphragmayı geçerek karaciğer üzerindeki peritondan somatik duyu alırlar. Bu sebeple karaciğer ve safra kesesi kaynaklı n. phrenicus ile taşınan duyular, n. supraclavicularis ile aynı segmentte olduğundan, sağ omuz bölgesinde ağrı olarak hissedilebilir (59, 61, 64).

3.2.3.4. Karaciğerin Fonksiyonları

Karaciğer safra salgılar ve bu salgı safra kanalları vasıtasıyla duodenuma iletir. Bu fonksiyonuyla karaciğer ekzokrin bez özelliği gösterir. Günlük safra üretimi yaklaşık olarak 700-1200 ml kadardır. Safra sıvısının içerisinde safra tuzları, kolesterol, lesitin, elektrolitler ve su bulunmaktadır. Safra özellikle yağların emiliminde büyük bir öneme sahiptir (64, 66).

Karaciğer karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasında önemli rol oynar. Glukozu glikojene çevirerek depo eder. Ayrıca yağ, demir ve vitamin depolanmasında görev alır. Albumin, protrombin, fibrinojen ve koagülasyon faktörlerinden bazılarını sentezler. Bu fonksiyonlarıyla karaciğer endokrin bez özelliği gösterir. Karaciğer üzerinden elimine olan pek çok ilacın atılması ve hormonların dolaşımdan temizlenmesi gibi pek çok metabolik olayı üstlenmektedir (64, 66).

Karaciğere a. hepatica propria ve v. porta hepatis vasıtası ile dakikada yaklaşık 1500 ml kan gelmektedir. Büyük bir kısmı sindirim organlarından gelen bu kanın içerisinde bulunan mikroorganizmalar veya yabancı partiküller, karaciğer sinuzoidlerinden geçerken, Kupffer hücreleri vasıtasıyla fagosit edildikçe dolaşımdan uzaklaştırılır (66).

Karaciğerde metabolize olan ilaçlar ve toksik maddeler, karaciğerin metabolize etme hızından daha fazla miktarda vücuda alınırsa hepatotoksisite oluşur. Kupffer hücrelerinin hepatotoksisite sırasında reaktif oksijen kaynağı olduğu, inaktive edilmesi sonucu oksidatif hasarın azaldığı görülmüştür. Benzer şekilde karaciğerde iskemi sonrası reperfüzyonda, Kupffer hücrelerinde ortaya

ıkan reaktif oksijen türleri (ROS) oksidatif stres oluşturarak hasarı artırmaktadır (67, 68).

Karaciğerde yapısal veya fonksiyonel anormallikler ile sonuçlanan pek çok bozukluk ROS'un artmasıyla karakterizedir ve genellikle patogenezi oksidatif stresle açıklanabilmektedir (69). Alkolik karaciğer hastalığı, karaciğer fibroproliferatif hastalıkları, non-alkolik karaciğer yağlanması gibi karaciğer hastalıklarında ve toksik madde maruziyeti sonucu gelişen hepatotoksistide bazı antioksidan maddelerin etkinlikleri gösterilmiştir (69-72).

3.3. Reaktif Oksijen Türleri, Antioksidanlar ve Oksidatif Stres

Reaktif oksijen türleri, hem fizyolojik hem patolojik koşullar altında üretilen, çoğunu serbest radikallerin oluşturduğu, kimyasal reaktivitesi çok yüksek olan oksijen formlarıdır (73). Yüksek reaktivitesinden dolayı protein, lipid, DNA ve nükleotid koenzimler gibi birçok yapıya zarar verebilmektedir (74, 75).

Vücutta farklı hücrelerde farklı serbest radikallere karşı bir takım savunma sistemleri bulunmaktadır. Bu şekilde ROS kontrol altında tutulabilmektedir (74). Serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonları önleyen, serbest radikalleri yakalayan ve stabilize eden maddelere antioksidan maddeler denilmektedir (75, 76).

Normal metabolizma içerisinde oluşan ve stabilize edilen bu ROS oksidatif denge içerisindedir. Ancak serbest radikal oluşma hızı yükselir ya da antioksidan aktivite azalırsa, hücre içerisindeki serbest radikal miktarında artış olur. Serbest radikallerin artışı ve sebep olduğu olumsuz etkiye oksidatif stres denilmektedir (77).

Formaldehit vücutta antioksidan savunma sistemine zarar vermekte ve oksidatif stres oluşturmaktadır (50). Yapılan çeşitli çalışmalarda FA'nın prefrontal kortekste, hipokampusta, akciğer ve karaciğer dokusunda oksidatif hasar oluşturduğu ve bazı antioksidanların bu oksidatif hasarı azalttığı gösterilmiştir (2, 51, 53, 78).

3.3.1. Antioksidanlar

Antioksidanları endojen ve eksojen olarak iki gruba ayırmak mümkündür. Endojen antioksidanlar ise enzimatik ve nonenzimatik olarak sınıflandırılır (79).

Enzimatik yapıdaki antioksidanlara örnek olarak süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon redüktaz (GR) verilebilir. Enzim yapısında olmayanlara ise glutatyon (GSH), melatonin, ürik asit, albümin, bilirubin, selenyum örnek olarak sayılabilir (79).

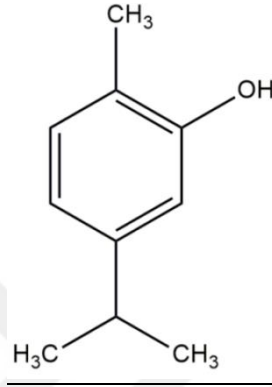
Eksojen antioksidanlar dışarıdan alınan antioksidanlar olup α -Tokoferal (Vitamin E), β -karoten (Vitamin A), askorbik asit (Vitamin C) ve folik asit (Vitamin B9), kahve, çinko, karnozin ve terpen bileşikleri gibi yiyeceklerin yapısında bulunan maddelerdir (79, 80).

Bu çalışmada antioksidan özelliği olan monopenen yapıdaki karvakrolün (CAR) FA'nın oluşturduğu oksidatif hasar üzerindeki etkisi araştırıldı.

3.3.1.1. Karvakrol

Karvakrol (CAR), labiatae ailesinde *origanum* (kekik) cinsinden elde edilen aromatik yapıda bir monoterpenik fenoldür (81, 82). Karvakrol *Origanum vulgare* (kekik otu), *Tymus vulgaris* (bahçe kekiği), *Satureja* (Kaya kekiği),

Thymbra (zahter) ve *Coridothymus* (acı kekik) cinsleri de dahil olmak üzere Labiatae (*Lamiaceae*) ailesinin pek çok üyesinde ve *Lepidium flavum*, yabani bergamot gibi pek çok aromatik bitki türünde de bulunmaktadır (82-84). Karvakrolün moleküler yapısı şekil 8’de gösterilmiştir (85, 86).



Şekil 8. Karvakrolün moleküler yapısı

2-metil-5-(1-metiletil) fenol adıyla bilinen CAR’ın kapalı formülü $C_{10}H_{14}O$ şeklindedir. Molekül ağırlığı 150.22 g/mol, yoğunluğu 0.976 g/cm³, erime sıcaklığı 0 °C ve kaynama sıcaklığı 236-237 °C’dir (87).

Yapılan bir çalışmada, CAR’ın ROS’dan olan hidrojen peroksit karşı konsantrasyona bağlı koruyucu etkisi gösterilmiştir (88). Etanolle beslenen farelerin hipokampuslerindeki oksidatif stresi engellemesi (89) gibi CAR’ın antioksidan özelliğini gösteren çok sayıda başka çalışmalar mevcuttur (85, 88, 90, 91).

Karvakrol, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA: Food and Drug Administration) tarafından genel olarak güvenli (GRAS: Generally Regarded as Safe) kategorisine dahil edilmiştir (87, 92). Kümes hayvanlarının et kalitesini

iyileştirmek için kullanılan doğal takviyelerden biridir (93). Yemlere katkı maddesi olarak eklenmesi ile aflatoksin üremesini azalttığı gösterilmiştir (87). Antifungal (94-96) ve insektisidal (97) aktivite gösterir.

Gilling ve ark. (98), yaptıkları bir çalışma CAR'ın murine norovirusü inaktive etmede etkili olduğunu göstermişlerdir. Doğrudan viral kapsid ve RNA'ya etki ederek antimikrobiyal aktivite göstermektedir. Gıdalarda kullanımı güvenli olduğundan diğer antimikrobiyallerin kullanılamayacağı gıdalarda veya gıda ile temas eden bölgelerde güvenle kullanılabilir (98). Hoş kokusu sebebiyle kozmetik formülasyonlarda koku bileşeni olarak da kullanılan CAR aynı zamanda dezenfektan ve fungusit olarak da kullanılabilir (99). Karvakrol diş hekimliği pratiğinde odontalji, hassas dentin, alveolar abse tedavisinde ve diş pulpası kanallarının enfeksiyonunda antiseptik olarak kullanılmıştır (100).

Karvakrolün akciğer (101), meme (102) ve kolon kanseri (103) hücre dizileri üzerinde anti-proliferatif bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Lösemide CAR uygulanmasının mitokondrideki kaspaz-3 ile akut promiyelositik lösemi hücrelerinde ve T lenfosit hücrelerinde apoptoza sebep olarak antikanserojen etkide bulunduğu belirlenmiştir (104). Ayrıca CAR'ın oral skuamöz hücreli karsinomda hücre proliferasyonunu, hücre göçünü ve istilasını inhibe ettiği, kanser hücrelerinin yapışma yeteneğini bozduğu ve apoptozu indüklediği rapor edilmiştir (105).

Karvakrol vasküler dokuyu da etkilemektedir. İzole sıçan aortunda endotelden bağımsız bir gevşeme tetikler. Vasküler doku öncesinde kontraktıl ajanlarla uyarıldığında uygulanan CAR'ın baskın bir vazodilatör etki gösterdiği

belirtilmiştir (106, 107). Karvakrol trombositlerde tromboksan A2 üretiminin azalmasına ve sonucunda hafif antiplatelet etkiye sebep olur (108).

Uyanoglu ve ark. (109) yaptıkları çalışmada, parsiyel hepatektomi uygulanan sıçanlarda CAR'ın hepatik rejenerasyonu artırdığını gözlemişlerdir. Canbek ve ark. (110) iskemi / reperfüzyon uygulamasından 60 dk önce verilen CAR'ın karaciğerde koruyucu etki yaptığını ve uygulanan dozun hepatotoksik olmadığını bildirmişlerdir.

Çeşitli ağrı testlerinde elde edilen sonuçlar CAR'ın nosisepsiyon üzerine önemli inhibitör etki oluşturduğunu göstermektedir. Etki mekanizmasını anlaşılması adına verilen nalokson ve L-arginin sayesinde etkisinin opioid sistem veya nitrik oksit yolağından olmadığı, farklı bir yol ile antinosiseptif etki oluşturduğu öne sürülmüştür (111-113).

Karvakrol'ün geçici reseptör potansiyeli (Transient Receptor Potential; TRP) kanallarını düzenlediği gösterilmiştir (114). Dil, deri ve burunda yüksek oranda bulunan ısıya duyarlı TRPV3 kanalını aktive ederken (100), ışığa duyarlı TRPL ve oksidatif strese duyarlı TRPM7'yi inhibe ettiği (114) gösterilmiştir. TRPM7'nin oksijensiz kalan nöronların ölüm mekanizmasında aracı olduğu da belirlenmiştir (115). Parnas ve ark. (114) yaptıkları çalışma ile TRPM7'nin CAR ile inhibisyonunun iskemik beyin hasarına karşı hücre ölümünü azaltarak nöral dokuları koruduğunu tespit ettiler. Ayrıca TRPM7 inhibisyonunun insülin salgılanmasını teşvik ettiği, yüksek glukoz ile indüklenen nöron apoptozuna karşı koruma sağladığı rapor edilmiştir (116). Bu anlamda CAR ile gerçekleşen TRPM7 inhibisyonunun da benzer şekilde insülin salgılanmasına ve nöron apoptozuna karşı koruma sağladığı düşünülebilir.

Diyabetik farelerle gerçekleştirilen çalışmada CAR'ın rastgele kan şekeri ölçüm seviyelerini düşürdüğü gösterilmiştir. Hiperglisemik yanıtlardan olan aortanın hiper kasılmasını da inhibe ettiği belirtilmiştir. CAR'ın bu vazodilatör etkisinin PI3K / AKT sinyal yolu üzerinden gerçekleştiği düşünülmüştür (117).

PI3K / AKT sinyalinin, insülin aracılı glukoz taşıyan GLUT4'ün hücre zarına katılımını teşvik ettiği bilinmektedir (118). Karvakrol PI3K / AKT sinyal yolu ile plazma membranında GLUT4 translokasyonunu arttırmaktadır (119). Hou ve ark. (119), diyabetik farelerde kardiyak yeniden şekillenme ve sol ventrikül işlev bozukluğunu inceledikleri çalışmalarında, CAR'ın anlamlı olarak kardiyak yeniden şekillenmeye karşı koruduğu ve GLUT4 translokasyonu sonucu glukoz alımının artması ile sol ventrikül fonksiyonunu iyileştirdiğini rapor etmişlerdir.

Diğer besin içerikleri aynı olmak koşuluyla, yüksek yağlı diyetle eklenen CAR'ın farelerin vücut ağırlığı artışını ve iç organlardaki toplam yağ yastığı ağırlığını önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir. Diyetteki CAR'ın toll benzeri reseptör 2'yi (TLR2) inhibe edip visseral yağ dokularındaki proinflamatuvar sitokinlerin üretimini zayıflatarak adipogenez ve termojenez modülasyonu ile vücut ağırlığını azalttığı düşünülmektedir. Ayrıca elde edilen sonuçlar fibroblast büyüme faktörü 1 ve galanın aracılı sinyali deprese ederek visseral adipogenez engellediğini göstermektedir (120). İnsan ve fare hücre hatları üzerinde yapılan çalışmada CAR'ın adipojenik farklılaşmayı azalttığı gösterilmiştir. Bu etkisini hem adiposit olgunlaşması için gerekli olan otofajiyi azaltarak, hem de karbonhidrat yanıt elemanı bağlama proteini (ChREBP) ekspresyonunun azaltarak yaptığı bildirilmiştir (121).

3.4. Adipoz Doku ve Adipokinler

Adipoz dokunun temel bileşeni adipositlerdir. Bunun yanında adipoz doku endotel hücreleri, kan hücreleri, fibroblastlar, makrofajlar, preadipositler gibi çeşitli hücre tipleri içerirler. Preadipositlerin olgun adipositlere dönüşüm süreci adipogenez olarak tanımlanır (122).

Önceleri sadece serbest yağ asidi kaynağı veya trigliseridler için pasif bir depo görevi gördüğü düşünülen adipoz dokunun günümüzde artık pek çok işlevi olduğu bilinmektedir. Preadipositler olgun adipositleri oluşturmak üzere farklılaştıkça çok çeşitli enzimler, adipokinler, büyüme faktörü ve hormonlar sentezleme yeteneği de kazanır (123, 124).

Yağ dokusundan salgılanan 600'den fazla bilinen adipokin vardır. Bunlar beslenme, iştah, enerji dengesi, insülin ve glukoz metabolizması, lipid metabolizması, inflamasyon gibi birçok fizyolojik süreçte rol almaktadır (125, 126).

Adipokinlere ilgi her geçen gün artmakta ve hala yeni adipokinler keşfedilmektedir. Bu çalışmada yakın zamanda tanımlanan adipokinlerden olan Asprosin (ASP) ve Subfatin (Metrnl protein-SUB) incelendi. (127, 128).

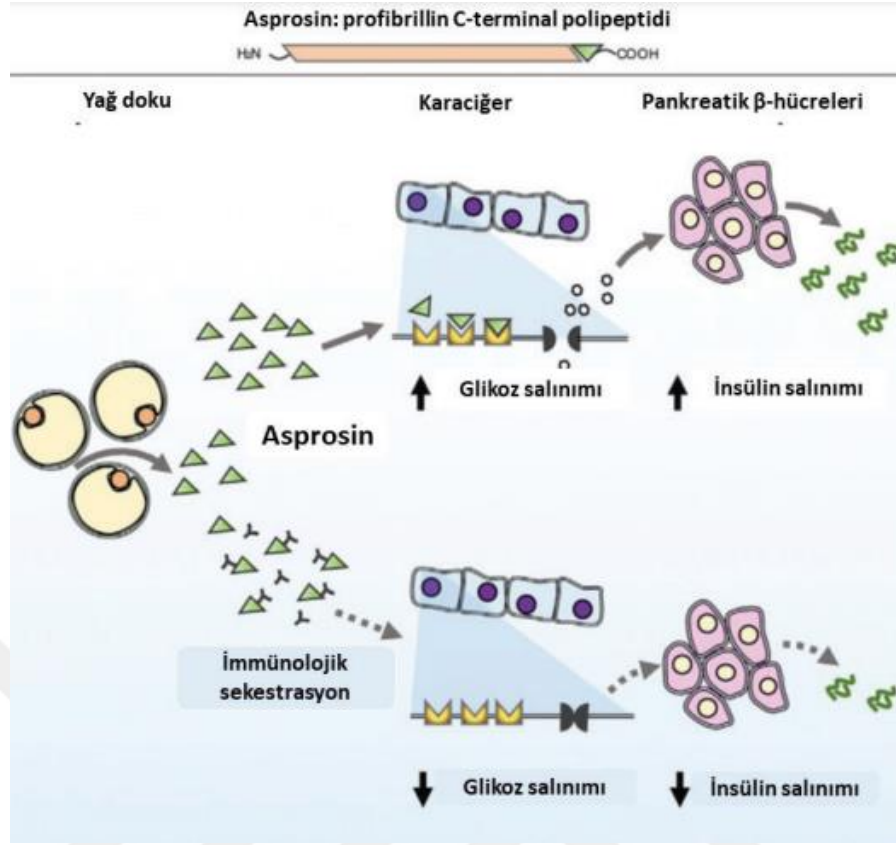
3.4.1. Asprosin

Asprosin (ASP) ilk olarak Romere ve arkadaşları (127) tarafından yenidoğan progeroid sendromlu bireyler üzerinde yapılan araştırmalar sonucu tespit edilen bir hormondur. 140 aminoasitli bir protein olan ASP, fibrillin 1 (FBN1) geni tarafından kodlanan profibrilininin c terminal bölünme ürünüdür. FBN1, mRNA profiline bakıldığı zaman en yüksek beyaz yağ dokusunda tespit

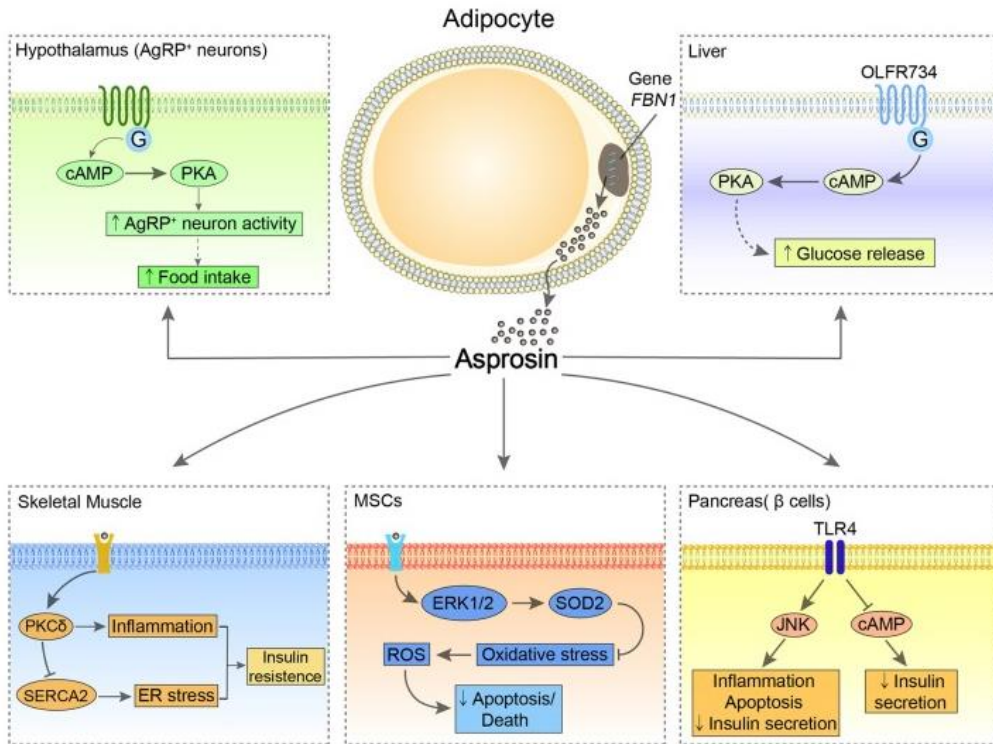
edilmiştir. Beyaz yağ dokusu ASP kaynağı gibi görüldüğünden isimlendirmede yunanca beyaz anlamında ‘aspros’ kelimesinden türetilen asprosin kullanılmıştır (127). Asprosinin ana kaynağı adipoz doku olmasıyla birlikte kalp, akciğer, böbrek, tükürük bezi, pankreas β hücresi gibi başka dokuların da plazma ASP miktarını etkilediği düşünülmektedir (127, 129, 130).

Asprosinin genetik eksikliği (FBN1 geni) insanlarda iştah azalması, lipodistrofi ve plazma insülin seviyesinde düşüş ile sonuçlanırken, obez kişilerde ise kan ASP seviyesi normalden yüksek bulunmuştur. Yüksek ASP seviyesi monoklonal antikor yardımıyla normal seviyelere düşürülürse iştah azalması ve kilo kaybı yaşanmaktadır (131). Rekombinant ASP enjeksiyonu ile kan şekerinde artışa ve hiperinsülinemiye sebep olmaktadır. İnsülin direncinde plazma ASP değeri artmış olarak tespit edilmektedir (132). Monoklonal antikor yardımıyla ASP seviyesinin düşürülmesi insülin duyarlılığını artırmakta, metabolik sendromda görülen hiperinsülizme karşı korumaktadır (132, 133) (Şekil 9). Ayrıca ASP diğer birçok adipokinin aksine cinsiyetler arası anlamlı bir farklılık göstermemektedir (124).

Asprosin, açlık kaynaklı bir hormondur. Açlıkta dolaşımdaki ASP seviyeleri artarken, gıda alımı ile birlikte hızla düşerek, beslenme ile uyumlu bir sirkadiyen ritim gösterir (127). Asprosin glukoz metabolizması, insülin direnci ve hücre apoptozuna etki ederek merkezi sinir sistemi, periferik doku ve organlarda çeşitli etkiler göstermektedir (134). Bu etkileri sayesinde enerji alımında doğrudan, enerji tüketiminde ise dolaylı olarak rol oynamakta ve vücudun enerji regülasyonunda önem arz etmektedir (135) (Şekil 10).



Şekil 9. Asprosinin etki mekanizması (127)



Şekil 10. Asprosinin merkezi ve periferel etkileri (134)

İyot-125 ile işaretlenmiş ASP proteinleri intravenöz enjekte edilip vücuttaki dağılımının incelendiği bir çalışmada, işaretli ASP'nin en fazla karaciğer dokusunda birikim yaptığı tespit edilmiştir. Asprosin seviyesindeki artış karaciğerde G protein-cAMP-PKA yolunu aktive ederek hepatik glukoz salınımını sağlamaktadır. Bu işlevi gerçekleştirirken glukagon, katekolaminler ve glukakortikoidler gibi glukoz salınımını kontrol eden katabolik hormonların plazmadaki seviyelerini değiştirmemektedir (127). Bu durum ASP'nin hepatik glukoz salınımına bir yüzey reseptörü vasıtasıyla gerçekleştirdiğini düşündürmektedir. Bir çalışmada koku alma reseptörü OLFR734'ün, karaciğerden hepatik glukoz salınmasında ASP reseptörü olarak görev aldığı belirtilmiş olmasına rağmen, başka reseptörlerin de etkili olup olmadığı net olarak belirlenememiştir (127, 136). Asprosinin hepatik glukoz salınımını sağladığı ancak çevre dokuların hücre içine glukoz alım mekanizmasına etki etmediği gösterilmiştir. Açlık durumunda karaciğerdeki glukozun kana salınması beyin fonksiyonlarının sorunsuz devam etmesi için hayati öneme sahiptir. Bu sebeple plazma glukozunun hassas şekilde ayarlanması gerekmektedir. Plazma glukoz düzeyindeki artış ASP üretimini negatif geri bildirim yoluyla inhibe etmektedir (127).

Asprosin kan-beyin bariyerini de geçebilmektedir. Enerji metabolizmasının düzenlenmesinde etkili hipotalamustaki oreksijenik agouti gen ilişkili protein nöronlarını cAMP bağımlı mekanizma ile uyararak anoreksijenik gamaaminobütirik asit (GABA) bağımlı pro-opiomelanokortin (POMC) nöronlarını inhine eder. Bu sayede iştahı artırır, uzun vadede yağ depolanmasını sağlar (131).

Asprosinin mezenkimal kök hücreleri oksidatif stres kaynaklı apoptozisten koruduğu gösterilmiştir. Asprosin ile ön muamele yapılmış mezenkimal kök hücrelerin miyokard enfarktüsü üzerindeki iyileştirici etkisinin artmış olduğu tespit edilmiştir (137).

Asprosinin iskelet kası hücrelerinin yüzeyine yüksek afinite ile bağlandığı gösterilmiştir. Bu miyosit yüzeyinde ASP için bir reseptör bulunduğunu düşündürmekle beraber net bir bilgiye ulaşılamamıştır. Asprosin miyosit yüzeyindeki reseptör ile protein kinaz C delta (PKC δ) / SERCA2 aracılı endoplazmik retikulum stres/ inflamasyon yollarını aktive ederek iskelet kasında insülin direncini artırır. Asprosin tedavisinin miyositlerdeki ROS'un etkilememesi, oksidatif stresten bağımsız olarak insülin direncine neden olduğunu göstermektedir. Bundan dolayı ASP'nin baskılanmasının tip 2 diyabetis mellitus patofizyolojisinin yönetilmesinde etkili bir yöntem olabileceği düşünülmektedir (130, 133).

Hiperlipidemik koşullar altında pankreas β hücresinde ve adipositlerde ASP üretiminde artış gözlenmektedir. Rekombinant ASP'nin toll benzeri reseptör'e (TLR4) bağlandığı ve TLR4 / JNK aracılı sinyal yolu ile inflamasyonu artırdığı bulunmuştur. Bu şekilde pankreas β hücresinde işlev bozukluğuna ve apoptoza neden olduğu görülmüştür (130, 133).

Serum ASP düzeyi, tip 2 diabetes mellitus (T2DM)'lu hastalarda normal popülasyona göre daha yüksek tespit edilmiştir. Ek olarak bel çevresi, açlık plazma glukozu, hemoglobin A1c (HbA1c), trigliserit ve insülin rezistans testi ile de anlamlı pozitif ilişki gösterilmiştir (124, 132). Farklı bir çalışmada metabolik sendromu olan T2DM hastalarının asprosin düzeyleri metabolik sendromu

olmayan T2DM hastalarından yüksek bulunmuştur (138). Romere ve arkadaşlarının (127) çalışmasına göre rekombinant ASP enjeksiyonu hiperglisemi ve hiperinsülinemiye sebep olurken, ASP'ye özgü bir antikor ile nötralizasyonu insülin duyarlılığında artışı, plazma glukozu ve insülin seviyesinde azalmayı sağlamaktadır. Serum ASP'nin bir biyobelirteç olarak diyabet erken tanısında kullanılabileceği ve tedavi protokolünde yer alabileceği düşünülmektedir (134, 139).

Obez kişilerde serum ASP seviyeleri normal bireylere göre daha yüksek ölçülmüştür. Asprosine özgü bir antikor kullanılarak serum ASP düzeyleri düşürüldüğünde, kilo kaybı ve iştah azalması gözlemlenmiştir (131, 140, 141).

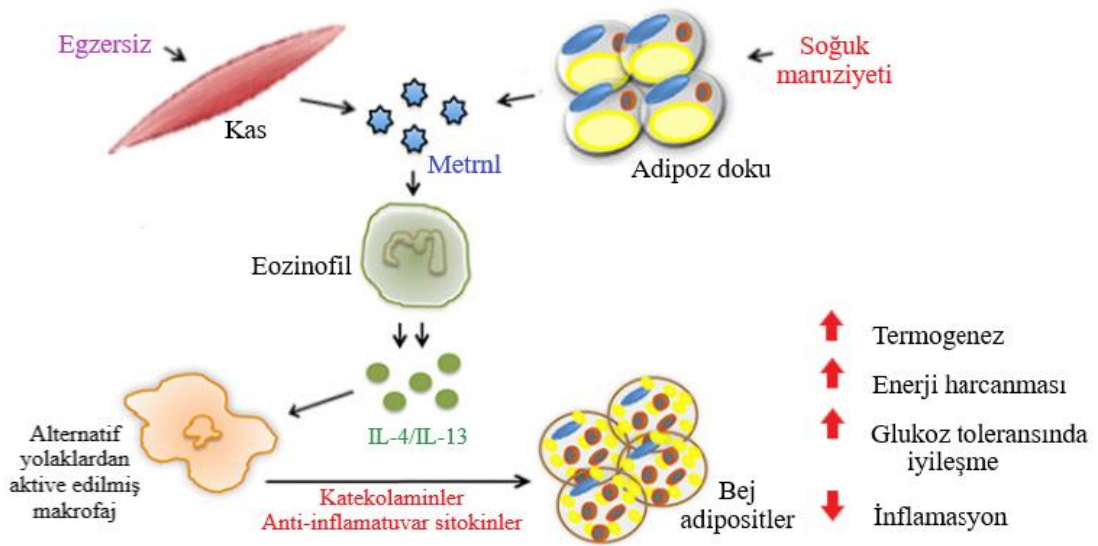
Polikistik over sendromu olan kadınlarda yapılan bir çalışmada, yüksek kan ASP seviyeleri tespit edilmiştir. Asprosin seviyelerinin insülin direnci ve beden kitle indeksi ile pozitif korelasyon gösterdiği de gösterilmiştir (142, 143).

3.4.2. Subfatin (Metrnl)

Metrn geni ile kodlanan yeni bir nörotrofik faktör olan Meteorin isimli protein ilk olarak Nishino ve arkadaşları tarafından 2004 yılında tanımlanmıştır. Diğer organlarda da az miktarda bulunmasına karşın, esas olarak beyin dokularından salgılanan, glial hücrelerin meteora benzer uzun kuyruklu hücrelere farklılaşmasında rol oynayan proteine bu fonksiyonundan dolayı meteorin adı verilmiştir (144). Sonrasında yapı olarak meteorine benzer ancak işlevi tanımlanmamış bir protein, kamuya açık veri tabanlarında meteorin benzeri (Metrnl) ismiyle taranmaya başlamıştır. Meteorinden farklı olarak başlıca salgılama yeri beyin dokusu değildir. En fazla deri altı yağ dokusunda tespit

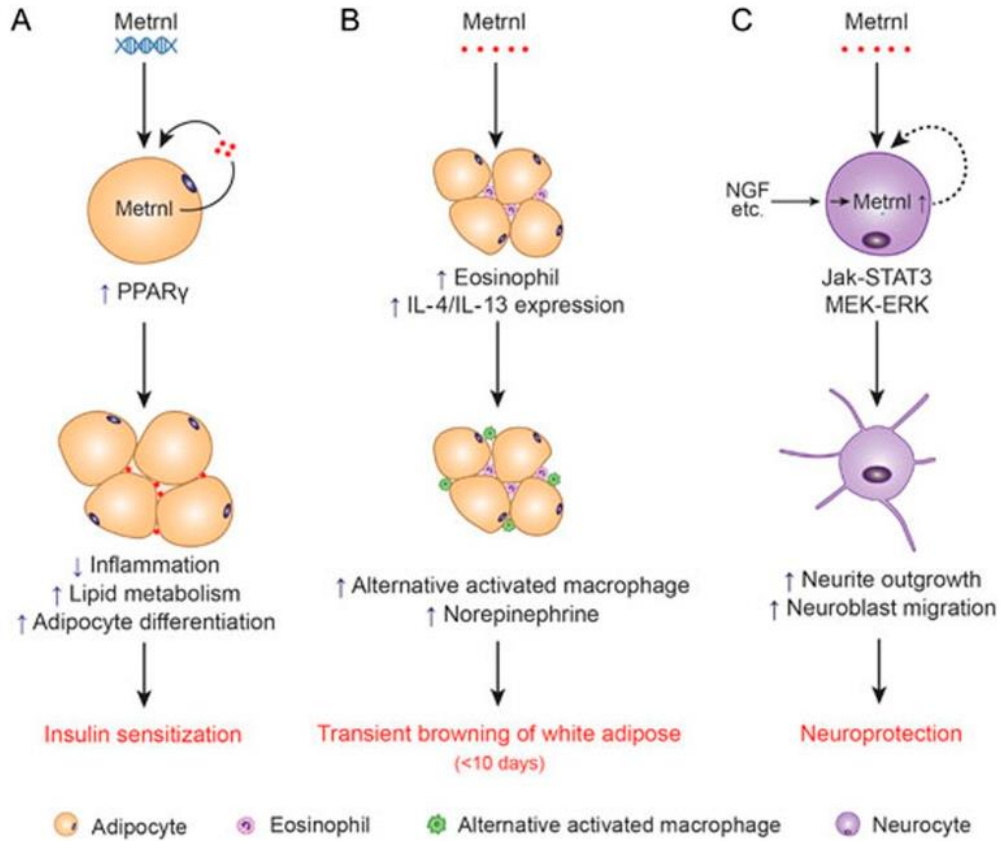
edilen Metrnl ayrıca vücuttaki diğer bölgelerdeki yağ dokuları, karaciğer, kalp, kas ve meteorine göre daha az miktarda olmak üzere beyin dokusunda da varlığı gösterilmiştir (128). Nöral gelişime, beyaz yağ dokusunun esmerleşmesine ve insülin duyarlılığına etkileri vardır. (128, 145). Salgılanması ve işlevleri daha ayrıntılı keşfedildikten sonra Metrnl denilen bu proteine bazı çalışmalarda cometin, subfatin (SUB) ve interleukin 39 (IL-39) gibi isimlendirmeler yapılmıştır (128, 146, 147).

Subfatin, beyaz yağ dokusunda kahverengi yağ dokusuna göre daha yüksek oranda tespit edilmiştir. Kahverengi yağ dokusu daha fazla enerji yakarken, beyaz yağ dokusu daha çok enerji biriktirme görevi üstlenir (128). Egzersiz ve soğuğa maruz kalma sonrasında dolaşımdaki seviyesi artış gösteren SUB, eozinofil bağımlı interlökin-4 ve makrofaj aktivasyonu yolu ile beyaz yağ dokusunun esmerleşmesini ve tüm vücutta enerji tüketiminin artmasını sağlar (148) (Şekil 11 ve 12-B).



Şekil 11. Beyaz yağ dokusunun esmerleşmesi (148)

Subfatin peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptör gama (PPAR γ) yolu aracılığıyla yağ dokusu inflamasyonunu azaltır, adiposit farklılaşmasını ve lipid metabolizmasını artırır (145, 146) (Şekil 12-A). Bu etkileriyle obez ve diyabetik farelerde insülin direncini antagonize eder (145, 148). Subfatinin eksikliği insülin direncini artırırken, aşırı salgılanması yüksek yağlı diyet veya leptin delesyonu ile indüklenen insülin direncini önlemektedir (145). Ayrıca kronik yüksek yağlı diyet alınması SUB seviyesinde düşüşe neden olurken, düzenli yapılan egzersiz plazma SUB seviyesini anlamlı şekilde artırmakta, tüm dokularda metabolizmayı artırarak obezite riskini azaltmaktadır (149).



Şekil 12. Beyaz adipoz doku ve nörositlerde subfatinin bilinen işlevleri (146)

Tip 2 diyabet hastalarında SUB seviyeleri tutarsızlık göstermektedir. Bazı çalışmalar (150-152) tip 2 diyabetli hastalarda serum SUB miktarının azaldığını söylerken, bazıları ise tip 2 diyabetli hastalardaki SUB miktarının kontrol hastalarına göre arttığını belirtmişlerdir (153-155).

Polikistik over sendromlu hastalarda SUB seviyelerinin azaldığı bulunmuştur. Ayrıca hastalarda FSH değerleri yükseldikçe SUB seviyesinin düştüğü rapor edilmiştir (156).

Subfatin interlekin 4 (IL-4) salgılanmasını artırarak anti-inflamatuar sitokinleri artırır (148). Serum SUB'un yağ dokusundaki kronik yüksek yağlı diyetle ilgili inflamasyonu inhibe ettiği tesbit edilmiştir (145).

Jorgensen ve arkadaşlarının (147) çalışması SUB'un nörit büyümesi ve subventriküler bölge nöroblast göçünü indüklediğini göstermektedir. Bu işlevini JAK-STAT3 ve MEK-ERK yolları aracılığıyla yaptığı tahmin edilmektedir. Zheng ve arkadaşları (146) da bunlara ek olarak in vivo spiral ganglion nöronlarının hayatta kalmasında nörotrofik aktivite gösterdiğini bildirmiştir (Şekil 12-C).

Formaldehit birçok dokuya toksit etkisi olan, oksidatif stres oluşturan ve enerji metabolizmasını bozan bir maddedir. Kaynakları ve bu kaynakların günlük yaşamdaki yeri de düşünüldüğünde insan sağlığını tehdit ettiği aşıkardır. Özellikle anatomist, histolog, patolog gibi meslek grupları sürekli olarak formaldehite maruz kalması kalıcı sorunları da beraberinde getirmektedir. Antioksidan moleküller bu hasarların azalması veya ortadan kalkmasına yardımcı olmaktadır. Karvakrol güçlü antioksidan özelliği olan ve pek çok oksidan maddeye karşı yararlı olduğu gösterilen bir monoterpenik fenoldür. Ancak formaldehitin

oluşturduğu oksidatif stres üzerindeki etkisini araştıran bir çalışma daha önce yapılmamıştır. Formaldehite aşırı maruziyetin, insülin eksikliğine ve hiperglisemiye sebep olduğu, serebral korteks nöronlarında enerji metabolizmasını etkilediği bilinmektedir. Fakat enerji metabolizmasında görev alan insülin-glukoz dengesiyle bağlantısı olduğu keşfedilen asprosin ve subfatin adipokinlerine etkisi bilinmemektedir. Dolayısıyla bu çalışmada;

1. İnhaler formaldehite maruz kalan ratların karaciğer dokularındaki hasara çeşitli dozlarda verilen karvakrolün olumlu etkisinin olup olmadığının belirlenmesi,
2. Formaldehit maruziyeti sonrası total oksidan ve total antioksidan kapasiteye karvakrolün nasıl etki ettiğinin tespiti ve
3. İnhaler formaldehite maruz kalan ratların karaciğer doku ve kanlarındaki asprosin ve subfatin değer değişimleri ile olası değişimler üzerine çeşitli dozlarda uygulanan karvakrolün etkisinin açığa çıkarılması amaçlandı.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmaya Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu Başkanlığının 10.04.2019 tarih ve 2019/09 sayılı toplantısının 95 nolu karar onayı ile başlanmıştır.

4.1. Deney Hayvanları

Çalışmamızda Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nden temin edilen ağırlıkları 210-300 gr arasında değişen 8-10 haftalık 42 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçanlar kullanıldı.

4.2. Deney Gruplarının Oluşturulması

Başlangıçta tüm hayvanlar her grupta 7 sıçan olacak şekilde rastgele 6 gruba ayrıldı. Deney süresi 4 hafta olarak planlandı.

Grup 1 (Kontrol Grubu): Sıçanlar normal atmosfer havasına maruz bırakıldı ve herhangi bir işlem uygulanmadı.

Grup 2 (FA grubu): Bu gruptaki sıçanlar deney süresi boyunca 100x50x20 cm ebatlarındaki cam fanus içerisinde solunum yolu ile 10 ppm (8 saat/gün, 5 gün/hafta) formaldehite maruz bırakıldı.

Grup 3 (CAR-20 Grubu): Normal atmosfer havasına maruz bırakılan sıçanlara her 48 saatte 1 kez karvakrol uygulaması (20 mg/kg i.p.) yapıldı.

Grup 4 (CAR-40 Grubu): Bu gruptaki sıçanlara Grup 3 ile aynı prosedür uygulandı. Sadece karvakrol dozu iki katına (40 mg/kg i.p.) çıkarıldı.

Grup 5 (FA+ CAR-20): Sıçanlar deney süresi boyunca 100x50x20 cm ebatlarındaki cam fanus içerisinde solunum yolu ile 10 ppm (8 saat/gün, 5

gün/hafta) formaldehite maruz bırakıldı. Ayrıca her 48 saatte 1 kez karvakrol uygulaması (20 mg/kg i.p.) yapıldı.

Grup 6 (FA+ CAR-40): Bu gruptaki sıçanlara Grup 5 ile aynı prosedür uygulandı. Sadece karvakrol dozu 40 mg/kg i.p. olarak belirlendi.

4.3. CAR doz ve uygulama yönteminin belirlenmesi

CAR intraperitoneal veya oral, tek doz veya ardışık dozlar şeklinde uygulanabilen bir maddedir (110, 157, 158). 5 mg/kg'dan 200 mg/kg'a kadar çeşitli dozlarda uygulama söz konusu iken yaygın olarak kullanılan doz 25-50-100 mg/kg'dır (91, 158, 159). 100 mg/kg'lık dozun 2-3 gün uygulanmasının ardından fatal etki görülmüştür (159). İlgili literatür taramamızda elde ettiğimiz veriler göz önünde bulundurularak 20 mg/kg ve 40 mg/kg dozlarda, 48 saatte bir kez intraperitoneal olarak uygulama kararı verildi (160, 161). Uygulanacak dozlar Bakır ve ark. (91) çalışmasındaki gibi günlük olarak serum fizyolojik içerisinde çözdürülerek hazırlandı.

4.4. Deney Prosedürü

Çalışmada kullanılan sıçanlar 22-25 °C oda ısısında 12 saat ışık (07:00-19:00) ve 12 saat karanlıkta (19:00-07:00) tutularak, özel olarak yaptırılan ve her gün altları temizlenen kafeslerde beslendi. Sıçanlara Elazığ Yem Sanayi A.Ş. Yem Fabrikası'nda özel olarak hazırlanmış pelet yemler çelik kaplarda verildi. Pelet yemlerin içeriği Tablo 1'de gösterilmiştir. Kafeslerde sürekli paslanmaz çelik bilyeli cam biberonlarda normal çeşme suyu bulunduruldu. Tüm hayvanların *ad libitum* yem ve su alımları sağlandı.

Tablo 1. Sıçan yeminin içeriği (% olarak)

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

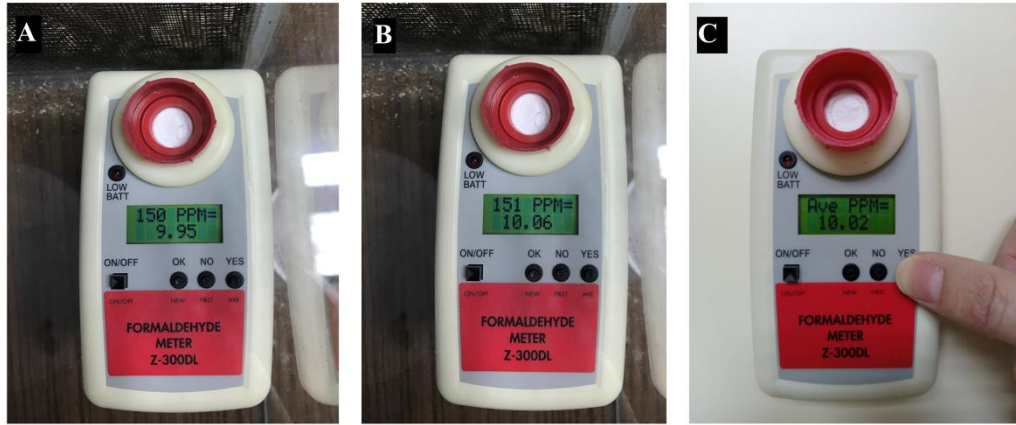
* 1 gramında: 4800 IU A, 960 IU D₃, 12 mg E, 0.8 mg K₃, 0.8 mg B₁, 2.4 mg B₂, 1.2 mg B₆, 0.006 mg B₁₂ vitaminleri, 16 mg Nikotin amid, D. Panth. 0.32 mg Folik asit, 0.02 mg D-Biotin, 50 mg kolin klorür, 20 mg çinko, Basitrasin, 32 mg Mn, 16 mg Fe, 24 mg Zn, 2 mg Cu, 0.8 mg I, 0.2 mg Co, 0.06 mg Se, 4 mg Antioksidan ve 200 mg Ca içermektedir.

** %18 fosfor, %25 kalsiyum, %2 flor'dan oluşur.

Formaldehite maruz bırakılan olan 3 grup (Grup 2, 5 ve 6), Aydın ve arkadaşlarının (51) çalışmasındaki uygulama prosedürüne uyularak, özel hazırlanmış 20x50x100 cm ebatlarındaki cam fanuslarda 8 saat/gün, 5 gün/hafta süre ile tutuldu. Bu cam fanusların 20 cm'lik karşılıklı iki yüzüne hava giriş çıkışını sağlamak için 0.5 cm çapında iki delik açıldı. Kafes 30 cm / 70 cm olacak şekilde iki ayrı bölmeye ayrıldı. 30 cm'lik kısma FA kaynağı yerleştirilirken, 70 cm'lik kısımda sıçanlar yerleştirildi. İki bölüm arası FA'nın eşit dağılımına engel olmayacak ve sıçanların FA kaynağına ulaşmasını engelleyecek şekilde 1 mm çapında delikleri bulunan tel elek ile bölündü. Bu bölmelerin üst kısımlarına sıçanları yerleştirmek ve FA miktarını ayarlamak için 10.5 cm çapında delikler açıldı. Ancak deney sırasında sıçanların kaçmaması ve dışarıdaki FA içermeyen havadan solumamaları için üstte bulunan bu delikler kapak ile kapatıldı.

Formaldehit kaynağı olarak, FA emdirilmiş pamuk topları kullanıldı. Aydın ve arkadaşlarının (51) tarif ettiği prosedür küçük bir modifikasyon ile

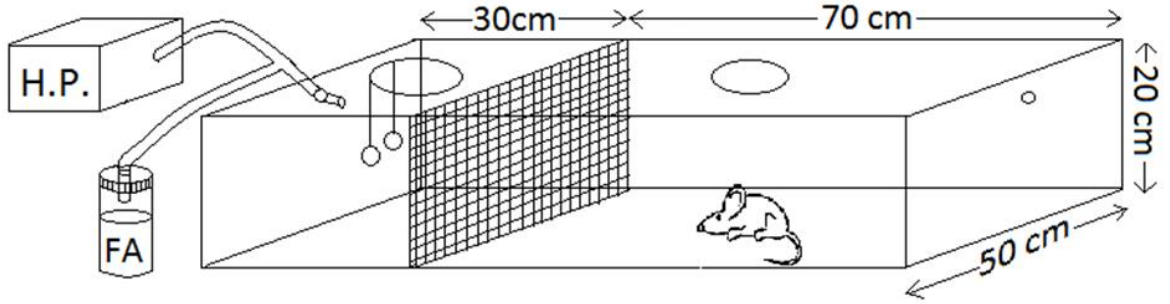
tatbik edildi. Pamuktan yapılan küreler pamuk ip ile sarılarak 2 cm çaplı pamuk topları elde edildi. 10 ppm FA dengesini sağlamak için her bir cam fanusa 2 adet küre tavandan 5 cm sarkacak şekilde asıldı. %37'lik FA 1/10 oranında sulandırıldı. Her bir kürenin merkezine elde edilen FA çözeltisinden 1 ml enjekte edildi. Bu şekilde FA'nın yavaş salınımı sağlandı ve uzun süre sabit bir FA değeri elde edildi. Saatlik ölçümler yapıldı. FA seviyesinin düşmesi halinde tekrar pamuk topunun merkezine 1 ml FA çözeltisi enjekte edilerek ortalama FA değeri uygulama süresince 10 ppm seviyesinde tutulmaya çalışıldı.



Şekil 13. Formaldehit ölçümlerinden temsili görsel sonuçlar (A ve B: gün içi anlık ölçümler, C: gün sonu ortalama değeri)

Havadan ağır olan FA'nın zemine çökmesini engellemek amacıyla, FA kaynağının bulunduğu taraftaki hava deliğine ayarlanabilir serum seti ile hava pompası bağlandı. Pompa devamlı hava üfleyerek çöken FA'nın ortama dağılmasını sağladı. Ayrıca 50 ml'lik ependorf tüplere hazırlanan FA çözeltisinden 40 ml eklendi. Ependorf tüpten çıkan hortum hava pompasının hortumuna bağlandı. Tüpte bulunan FA çözeltisi sayesinde sürekli olarak havaya

karışan FA, pompa ile ortama iletildi. Bu şekilde FA miktarı sabit tutuldu (Şekil 14).



Şekil 14. Formaldehit uygulama düzeneğinin şeması (FA: Formaldehit çözeltisi, H.P: hava pompası)

Cam fanus içindeki FA konsantrasyonu, kalibrasyonu yapılmış bir FA monitörü (Enviromental Sensors Co. Boca Raton FL 33432 USA-Catalog No: ZDL-300) ile takip edildi. Sekiz saatlik ağırlıklı ortalama göre $[Doz = (konsantrasyon \times zaman) / 8 \text{ saat}]$ istenilen konsantrasyon ayarlandı. Sıçanlar kafeslere getirilmeden 5 gün önce kafeslerde FA uygulamasına başlandı. Formaldehit seviyesi ortalama 10 ppm olarak ayarlandıktan sonra deneysel çalışma başlatıldı.

İşi gereği FA'ya temas halinde olan meslek grupları genellikle haftanın beş günü, günde 8 saat FA'ya maruz kalmaktadırlar. Bu sebeple çalışmamızda FA maruziyet süresini benzer şekilde planladık. Formaldehit uygulanan grup 2, 5 ve 6'da yer alan hayvanlar deney süresi olan 28 gün boyunca hafta içi beş gün, saat 08.30-16.30 saatleri arası özel hazırlanan cam fanus içerisinde tutuldu. FÜDAM'da zehirli gazların tahliye edilmesine yönelik bir havalandırma sistemi

olmadığından, FA uygulamaları zehirli gaz tahliye sistemi olan Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi laboratuvarında gerçekleştirildi. Formaldehit uygulanmayacak sıçanlar tüm gün ve FA uygulama saati tamamlanan sıçanlar uygulamadan sonra FÜDAM'da barındırıldı.

Serum fizyolojik içerisinde çözünen CAR, grup 3 ve 5'deki sıçanlara 20 mg/kg, grup 4 ve 6'daki sıçanlara 40 mg/kg dozunda 48 saatte bir kez i.p olarak uygulandı.

Tablo 2. Deney gruplarına uygulanan işlemlerin zaman çizelgesi

Gün	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
CAR (i.p.)	X		X		X		X		X		X		X	
FA maruziyeti	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+		
Gün	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
CAR (i.p.)	X		X		X		X		X		X		X	
FA maruziyeti	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+		

(X: Grup III, Grup IV, Grup V, Grup VI. +: Grup II, Grup V, Grup VI)

Deney süresi sonunda tüm gruplardaki sıçanlar kan değerlerinin etkilenmemesi için anestezisiz dekapitasyon yöntemi ile kurban edildi. Kanlar 250 Kallikrein İnhibitor Unit (KIU) aprotinin içeren biyokimya tüplerinin içine alındı. 4000 rpm'de santrifüj edildi. Ayrılan plazmalar ependorf tüplere alınarak çalışılacağı güne kadar -20 °C'de saklandı. Biyokimyasal analizler için bir parça karaciğer dokusu ayrılarak -20 °C'de saklandı. Karaciğer dokularının geri kalan kısmı histolojik analizler için %10'luk FA bulunan kaplara atıldı.

4.5. Karaciğer Dokusunun Homojenizasyonu ve Saklanması

Biyokimya analizleri için -20 °C’de bekleyen karaciğer dokuları sırayla çıkartılarak içerisinden 100 mg’lık parçalar ependorf tüpe alındı. +4 °C’de 0,5 lt distile su içerisine 5 tablet phospate buffer saline (PBS) çözündürülerek fosfat tamponu hazırlandı. Karaciğer dokusu bulunan ependorf tüplerin içerisine PBS çözeltisi eklenerek toplam hacim bir ml’ye tamamlandı. Her bir ependorf içerisine 100 µl 0.5 mm çaplı zirkonyum oksit boncuklarından ilave edildi. Bullet Blender adındaki homojenizatöre yerleştirilen ependorf tüpler 8 şiddetinde 5 dakika homojenize edildi. Tam homojenize olmayan dokular 5 dakika daha homojenize edildi. Elde edilen supernatant tabaka yeni bir ependorfa alınarak +4 °C’de 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra üstteki süpernatant ayrı bir ependorfa alınarak çalışılacağı zamana kadar -20 °C’de saklandı.

4.6. Analitik Ölçümler

4.6.1. TAS Ölçümü

Kan TAS düzeyleri Sun Red Rat Total Antioxidant Status ELISA kiti (Katolog no: 201-11-2672. Sunred Biological Technology Co., Ltd., Shanghai, CHINA) ile kit kataloğundaki belirtilen çalışma prosedürlerine uygun olarak çalışıldı.

Rat TAS ELISA kitinin ölçüm aralığı 0.2 - 60 U/ml, sensitivitesi 0.175 U/ml, Intra-Assay: CV<%9, Inter-Assay: CV<%11 idi. Doku supernatantlarında TAS ölçümlerinin doğruluğunu göstermek için biyokimyasal assay geçerlilik deneyleri (recovery, lineerite, sensitivity, specifity, intra ve inter assay deneyleri)

daha önce tarif edildiği gibi yapıldı (162). Mevcut kitin doku supernatantlarında da TAS seviyesini aynı duyarlılıkta ölçtüğü tespit edildi.

Plate yıkamalarında otomatik yıkayıcı Bio-Tek ELX50 (BioTek Instruments, USA), absorbans okumalarında ChroMate, Microplate Reader P4300 cihazları (Awareness Technology Instruments, USA) kullanıldı. Sonuçlar Unite / mililitre (U/mL) olarak verildi (163).

4.6.2. TOS Ölçümü

Kan TOS düzeyleri Sun Red Rat Total Oxidant Status ELISA kiti (Katolog no: 201-11-1669. Sunred Biological Technology Co., Ltd., Shanghai, CHINA) ile kit kataloğundaki belirtilen çalışma prosedürlerine uygun olarak çalışıldı.

Rat TOS ELISA kitinin ölçüm aralığı 0.1 - 20 nmol/ml, sensitivitesi 0.073 nmol/ml, Intra-Assay: CV<%8, Inter-Assay: CV<%10 idi. Doku supernatantlarında TOS ölçümlerinin doğruluğunu göstermek için biyokimyasal assay geçerlilik deneyleri (recovery, lineerite, sensitivity, specifity, intra ve inter assay deneyleri) daha önce tarif edildiği gibi yapıldı (162). Mevcut kitin doku supernatantlarında da TOS seviyesini aynı duyarlılıkta ölçtüğü tespit edildi.

Plate yıkamalarında otomatik yıkayıcı Bio-Tek ELX50 (BioTek Instruments, USA), absorbans okumalarında ChroMate, Microplate Reader P4300 cihazları (Awareness Technology Instruments, USA) kullanıldı. Sonuçlar nanomol / mililitre (nmol/mL) olarak verildi (164).

4.6.3. Asprosin Ölçümü

Kan Asprosin düzeyleri Sun Red Rat Asprosin ELISA kiti (Katolog no: 201-11-5748. Sunred Biological Technology Co., Ltd., Shanghai, CHINA) ile kit kataloğundaki belirtilen çalışma prosedürlerine uygun olarak çalışıldı (Şekil 15).

Kit prosedürüne göre standart çözeltiler hazırlanır. Standart kuyucuklarına asprosin standartlarından 50 µL, örnek kuyucuklarına örneklerden 40 µL eklenir.



Örneklerin olduğu kuyucuklara 10 µL Biotin (asprosin) antibody eklenir.
Kör hariç diğer tüm kuyucuklara 50 µL Streptavidin-HRP Conjugate Reagent eklenir.



37 °C'de 60 dk inkübe edilir.
30 kez distile su ile sulandırılmış yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkanır.



Tüm kuyucuklara 50 µL Chromogen Solution A ve 50 µL Chromogen Solution B eklenir.
37 °C'de 10 dk inkübe edilir.



Tüm kuyucuklara 50 µL Stop Solution eklenir.
450 nm dalga boyunda okutulur.

Şekil 15. Asprosin kiti için ELISA protokol basamakları

Plate yıkamalarında otomatik yıkayıcı Bio-Tek ELX50 (BioTek Instruments, USA), absorbans okumalarında ChroMate, Microplate Reader P4300 cihazları (Awareness Technology Instruments, USA) kullanıldı. Sonuçlar nanogram / mililitre (ng/mL) olarak verildi.

Rat Asprosin ELISA kitinin ölçüm aralığı 1.5 - 400 ng/ml, sensitivitesi 0.127 ng/ml, Intra-Assay: CV<%10, Inter-Assay: CV<%12 idi. Doku supernatantlarında asprosin ölçümlerinin doğruluğunu göstermek için

biyokimyasal assay geçerlilik deneyleri (recovery, lineerite, sensitivity, specificity, intra ve inter assay deneyleri) daha önce tarif edildiği gibi yapıldı (162). Mevcut kitin doku supernatantlarında da asprosin seviyesini aynı duyarlılıkta ölçtüğü tespit edildi.

4.6.4. Subfatin Ölçümü

Kan Subfatin düzeyleri Sun Red Rat Meteorin-like protein (Subfatin/METRNL) ELISA kiti (Katolog no: 201-11-6038. Sunred Biological Technology Co., Ltd., Shanghai, CHINA) ile kit kataloğundaki belirtilen çalışma prosedürlerine uygun olarak çalışıldı (Şekil 16).

Kit prosedürüne göre standart çözeltiler hazırlanır. Standart kuyucuklarına Subfatin standartlarından 50 µL, örnek kuyucuklarına örneklerden 40 µL eklenir.



Örneklerin olduğu kuyucuklara 10 µL Biotin (subfatin) antibody eklenir.
Kör hariç diğer tüm kuyucuklara 50 µL Streptavidin-HRP Conjugate Reagent eklenir.



37 °C'de 60 dk inkübe edilir.
30 kez distile su ile sulandırılmış yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkanır.



Tüm kuyucuklara 50 µL Chromogen Solution A ve 50 µL Chromogen Solution B eklenir.
37 °C'de 10 dk inkübe edilir.



Tüm kuyucuklara 50 µL Stop Solution eklenir.
450 nm dalga boyunda okutulur.

Şekil 16. Subfatin kiti için ELISA protokol basamakları

Rat Subfatin ELISA kitinin ölçüm aralığı 0.1 - 30 ng/ml idi. Doku supernatantlarında subfatin ölçümlerinin doğruluğunu göstermek için biyokimyasal assay geçerlilik deneyleri (recovery, lineerite, sensitivity, specifity, intra ve inter assay deneyleri) daha önce tarif edildiği gibi yapıldı (162). Mevcut kitin doku supernatantlarında da subfatin seviyesini aynı duyarlılıkta ölçtüğü tespit edildi.

Plate yıkamalarında otomatik yıkayıcı Bio-Tek ELX50 (BioTek Instruments, USA), absorbans okumalarında ChroMate, Microplate Reader P4300 cihazları (Awareness Technology Instruments, USA) kullanıldı. Sonuçlar nanogram / mililitre (ng/mL) olarak verildi.

4.7. İmmünohistokimya

%10'luk formaldehit çözeltisine alınarak fikse edilen karaciğer dokuları rutin doku takip prosedürü uygulanarak parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan 4-6 µm kalınlığında kesitler alınarak polilizinli lamlara yerleştirildi. Dokular deparafinize edilerek dereceli alkol serisinden geçirildi. Antigen retrieval için mikrodalga fırında (750 W) sitrat tampon solüsyonunda pH:6'da 7+5 dakika kaynatıldı. Kaynatma işlemi sonrasında dokular oda ısısında 20 dakika bekletilerek soğutuldu. 3x5 dakika PBS ile yıkanan dokular endojen peroksidaz aktivitesini önlemek amacıyla hidrojen peroksid blok solüsyonunda 5 dakika inkübe edilerek. Tekrar 3x5 dakika PBS ile yıkanan dokulara 5 dakika Ultra V Block solüsyonu uygulandı. 1/200 oranında dilue edilen primer antikorlar asprosin ve subfatin (anti- asprosin antibody, FNab09797, Fine Test, China ve MetrnL Polyclonal Antibody, PA5- 38043, Invitrogen, USA) ile 60 dakika nemli ortamda

oda ısısında inkübe edildi. Primer antikor uygulamasından sonra dokular tekrar PBS ile 3x5 dakika yıkandı. Sonrasında sekonder antikor (biotinylated Goat Anti-Poliyvalent (anti-mouse / rabbit IgG), TP-125-BN, Lab Vision Corporation, USA) ile 30 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildi. Sekonder antikor uygulamasından sonra dokular PBS ile 3x5 dakika yıkandı Streptavidin Peroxidase ile 30 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildi. PBS içerisine alınan dokulara 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) Substrate + AEC Chromogen solusyonu damlatıldı. Işık mikroskopunda görüntü sinyali alındıktan sonra eş zamanlı olarak PBS ile yıkamaya alındı. Dokulara Mayer's hematoxilen ile zıt boyaması yapılarak PBS ve distile sudan geçirildi. Uygun kapatma solusyonu (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

4.7.1. TUNEL Metodu

Parafin bloklardan 5-6 µm kalınlığında kesitler alınarak polilizinli lamlara yerleştirildi. ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon, cat no: S7101, USA) kullanılarak apoptoza giden hücreler belirlendi. Uygulama sırasında üretici firmanın talimatlarına uyuldu.

Dokular xylene ile deparafinize edildi. Dereceli alkol serisinden geçirilerek PBS ile yıkandı. 10 dakika % 0.05'lik proteinase K ile inkübe edilen

dokular sonrasında endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için % 3 hydrogen peroxide ile 5 dakika inkübe edildi. Dokular PBS ile yıkanıp Equilibration Buffer ile 6 dakika inkübe edildi. Sonrasında 60 dakika 37° C’ de nemli ortamda çalışma solüsyonu (%70 µl Reaction Buffer+%30 TdT Enzyme) ile inkübe edildi. Stop/Wash Buffer da 10 dakika bekletilen dokular, 30 dakika Anti-Digoxigenin-Perosidaz ile muamele edildi. Apoptotik hücreler diaminobenzidine (DAB) substratı ile görüntülendi. Harris hematoxilen ile zıt boyası yapılarak uygun kapatma solüsyonu ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Leica DM500 mikroskobunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı (Leica DFC295).

TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde Harris hematoxilen ile maviye boyanmış çekirdekler normal, kahverengi nükleer boyanma gösteren hücreler apoptotik olarak değerlendirildi. Kesitlerde 10'luk büyütme ile incelenirken rastgele seçilen alanlarda, normal ve apoptotik en az 500 hücre sayıldı. Seçilen alanda apoptotik hücrelerin, toplam (normal + apoptotik) hücelere oranlanması ile Apoptotik indeks (AI)’i hesaplandı.

Tablo 3. 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 hematoksilin	1-5 dakika
19	Distile su	5 dakika
20	%80, %96 ve %100 etil alkol	1'er dakika
21	Xylol	2X5
22	Kapatma medyumunu kullanılarak lamel ile kapatma.	

4.8. İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizler SPSS 22.00 (Statistical Package for the Social Sciences 22.00) paket programı ile hazırlandı. Araştırma parametreleri ortalama $\pm$ standard sapma (Standard Deviation: SD) ile sunuldu. İki grup arasında verilerin karşılaştırılması Mann Whitney U testi, ikiden fazla grup arasında genel karşılaştırmada Kruskal Wallis testi kullanıldı. Sonuçlar için $p \leq 0,05$ en düşük istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi.

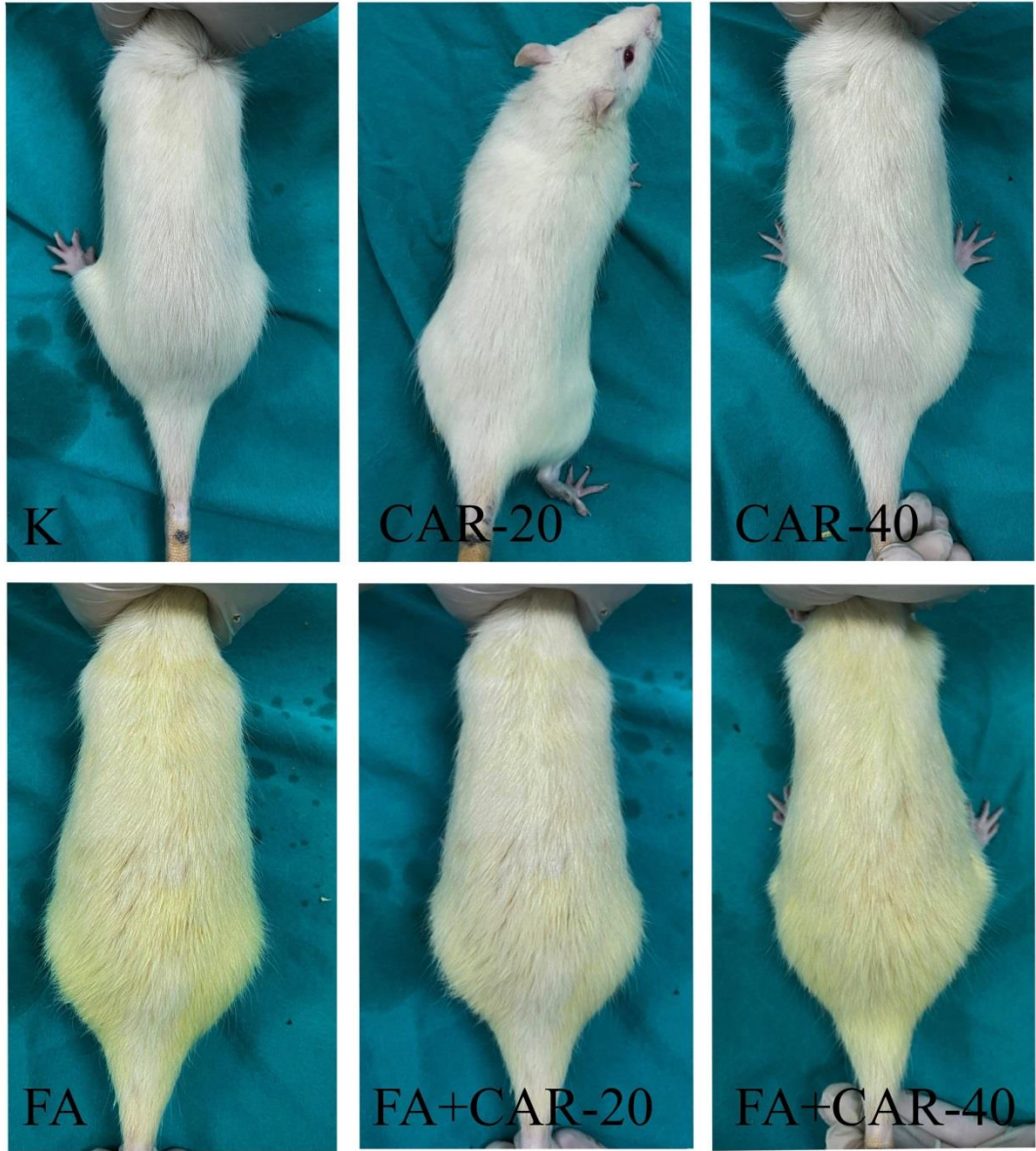
5. BULGULAR

5.1. Klinik Bulgular

Tüm sıçanlar deney süresi boyunca hayatta kaldı. Kontrol grubu ile kıyaslandığında FA alan gruplarda yem ve su tüketiminde azalma gözlemlendi. Deneyin ilk ve son günü yapılan ağırlık ölçümleri incelendiğinde, kontrol grubundaki hayvanların deney süresi boyunca ortalama 121 gr aldıkları tespit edildi. CAR-20 ve CAR-40 gruplarında yer alan hayvanların kilo artışları ortalama 120,6 gr ile birbirleriyle ve kontrol grubuyla benzerdi. FA alan tüm gruplarda kilo alımının ortalama 105,6 gr ile kontrol, CAR-20 ve CAR-40 gruplarına göre daha az olduğu tespit edildi. FA+CAR-40 grubunda yer alan sıçanlar ortalama 90 gr kilo artışı ile en az kilo alan hayvanlardı.

Sadece formaldehit alan grupta gözlerde sulanma, sık sık göz kırpması, burnunu temizleme, yalanma ve bitkinlik gibi davranışlar gözlemlenirken, bu davranışlar FA ve CAR'ın birlikte verildiği gruplarda daha az gözlemlendi.

Deney boyunca FA salınımı yapan beyaz pamuk kürelerinde herhangi bir sararma gözlenmezken, FA, FA+CAR-20 ve FA+CAR-40 gruplarındaki sıçanların tüylerinde kontrol grubuna kıyasla belirgin sararma gözlemlendi. FA ve FA+CAR-40 gruplarındaki sıçanların tüylerindeki sararma miktarı yakın iken, FA+CAR-20 grubundaki sıçanların tüylerindeki sararma miktarı daha azdı. CAR-20 ve CAR-40 alan grupların tüy renkleri kontrol grubu ile benzerdi (Şekil 17).



Şekil 17. Deney sonunda sıçanların tüylerindeki renk değişimi

Tablo 4. Kan ve karaciğer dokusu biyokimyasal parametrelerin değişimi (her bir grupta n=7)

Parametre	Kontrol	FA	CAR-20	CAR-40	FA + CAR-20	FA + CAR-40
Kan						
TAS (mmol/L)	4,89 ± 1,24	5,28 ± 1,23	6,83 ± 0,96 a¹, b¹	7,06 ± 2,59 a¹	6,16 ± 1,85	6,37 ± 1,86
TOS (mmol/L)	1,71 ± 0,50	2,54 ± 0,60 a²	2,11 ± 0,81	2,34 ± 0,31 a¹	2,17 ± 0,61	2,41 ± 0,72 a¹
Asprosin (ng/mL)	48,41 ± 19,49	28,43 ± 6,84 a¹	39,10 ± 13,06 b¹	57,90 ± 15,05 b², c	38,06 ± 13,92 d	51,28 ± 27,94
Subfatin (ng/mL)	4,35 ± 1,46	3,37 ± 1,24	5,35 ± 1,47 b¹	4,28 ± 1,37	4,74 ± 2,88	3,90 ± 1,31
Doku						
TAS (ng/mg yaş doku)	0,049 ± 0,014	0,057 ± 0,018	0,069 ± 0,015 a¹	0,081 ± 0,032 a¹	0,067 ± 0,010	0,070 ± 0,035
TOS (ng/mg yaş doku)	0,036 ± 0,006	0,042 ± 0,013	0,031 ± 0,004	0,031 ± 0,013 b¹	0,039 ± 0,017	0,029 ± 0,007 b¹
Asprosin (ng/mg yaş doku)	0,525 ± 0,171	0,398 ± 0,187	0,955 ± 0,291 a¹, b²	0,939 ± 0,275 a², b²	0,859 ± 0,362 a¹, b²	0,826 ± 0,301 a¹, b²
Subfatin (ng/mg yaş doku)	0,040 ± 0,010	0,032 ± 0,009	0,038 ± 0,015	0,037 ± 0,010	0,044 ± 0,013	0,047 ± 0,013 b¹

CAR: Karvakrol, FA: Formaldehit, TOS: Total oksidan durum, TAS: Total antioksidan durum.

a¹; kontrole göre anlamlı ($p < 0.05$).

a²; kontrole göre anlamlı ($p < 0.01$).

b¹; FA ya göre anlamlı ($p < 0.05$).

b²; FA ya göre anlamlı ($p < 0.01$).

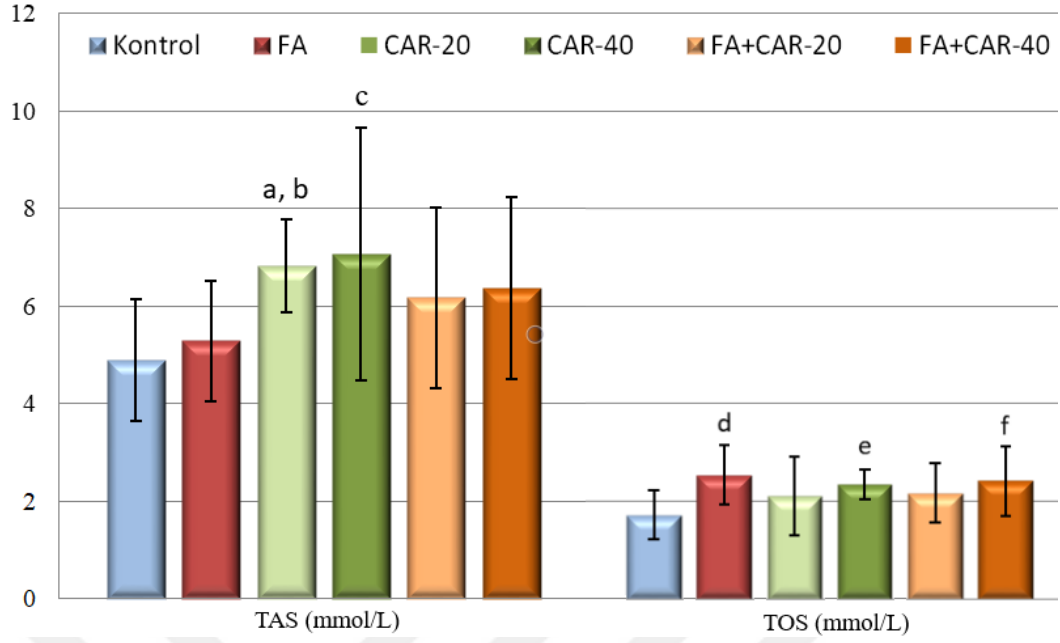
c; CAR-20 e göre anlamlı ($p < 0.05$).

d; CAR-40 e göre anlamlı ($p < 0.05$).

5.2.1. Kanda TAS ve TOS seviyeleri

Çalışmada kan TAS değerleri incelendiğinde en fazla CAR-40 grubunda olmak üzere tüm gruplarda artış olduğu, CAR gruplarındaki (CAR-20 ve CAR-40) artışın doza bağımlı ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0.05$). Ancak beraberinde FA'nın da verildiği FA+CAR-20 ve FA+CAR-40 gruplarında CAR'a bağılı bu artışın bir miktar azaldığı, CAR'ın TAS değeri üzerindeki potansiyel etkisini FA'nın zayıflattığı gözlemlendi. FA grubu TAS değeri CAR-20 grubu ile kıyaslandığında anlamlı olarak daha düşük tespit edildi ($p<0.05$).

Kan TOS düzeyleri incelendiğinde tüm gruplarda artış söz konusu iken, en fazla artışa FA'nın neden olduğu görüldü. Karvakrol gruplarındaki (CAR-20 ve CAR-40) etkinin doza bağımlı ancak FA'ya göre daha az olduğu, FA ile birlikte (FA+CAR-20 ve FA+CAR-40) uygulandığında ise etkisinin arttığı gözlemlendi. FA ($p<0.01$), CAR-40 ve FA+CAR-40 ($p<0.05$) gruplarındaki artış kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıydı.



FA: Formaldehit. CAR: Karvakrol. TAS: Toplam antioksidan durum. TOS: Toplam oksidan durum.

a: Kontrol grubu ile CAR-20 grubu kıyaslandığında ($p < 0,05$).

b: Formaldehit grubu ile CAR-20 grubu kıyaslandığında ($p < 0,05$).

c: Kontrol grubu ile CAR-40 grubu kıyaslandığında ($p < 0,05$).

d: Kontrol grubu ile FA grubu kıyaslandığında ($p < 0,01$).

e: Kontrol grubu ile CAR-40 grubu kıyaslandığında ($p < 0,05$).

f: Kontrol grubu ile FA+ CAR-40 grubu kıyaslandığında ($p < 0,05$).

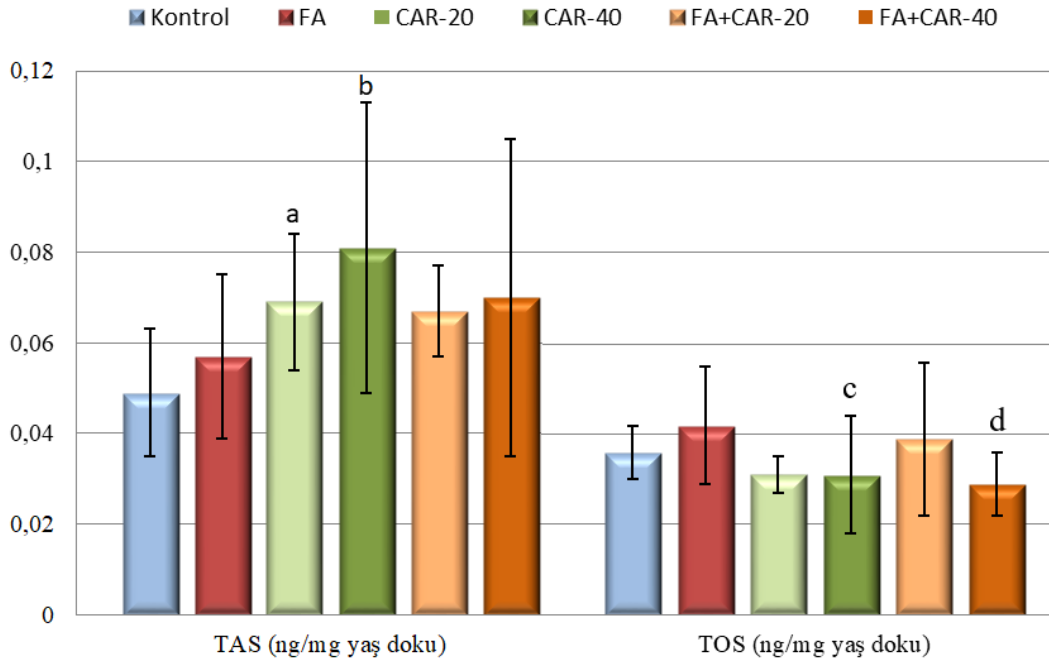
Şekil 18. Kan TAS ve Kan TOS Seviyeleri

5.2.2. Karaciğer Doku Süpernatantlarında TAS ve TOS Seviyeleri

Karaciğer doku süpernatantı TAS değerleri kontrol grubu ile kıyaslandığında en fazla CAR-40 grubunda olmak üzere tüm gruplarda artış izlendi. Söz konusu artış sadece CAR verilen gruplarda (CAR-20 ve CAR-40) istatistiksel olarak anlamlı olup dozla da ilişkili olduğu tespit edildi. Formaldehit verilmesi tek başına TAS değerini bir miktar artırsa da, CAR ile birlikte (FA+CAR-20 ve FA+CAR-40) verildiğinde CAR'ın TAS üzerindeki etkisini azalttığı gözlemlendi.

Karaciğer doku süpernatantı TOS düzeyleri incelendiğinde, FA'nın TOS seviyesini arttırdığı, CAR'ın ise azalttığı belirlendi. En yüksek değer FA grubunda

görülürken, beraberinde CAR uygulanan gruplarda (FA+CAR-20 ve FA+CAR-40) TOS değerinin FA grubuna göre düştüğü, bu düşüşün FA+CAR-40 grubunda istatistiksel olarak anlamlı seviyelerde olduğu bulundu. CAR-40 grubunun TOS düzeyi de FA grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük idi.



FA: Formaldehit. CAR: Karvakrol. TAS: Toplam antioksidan durum. TOS: Toplam oksidan durum.

a: Kontrol grubu ile CAR-20 grubu kıyaslandığında ($p < 0,05$).

b: Kontrol grubu ile CAR-40 grubu kıyaslandığında ($p < 0,05$).

c: FA grubu ile CAR-40 grubu kıyaslandığında ($p < 0,05$).

d: FA grubu ile FA+CAR-40 grubu kıyaslandığında ($p < 0,05$).

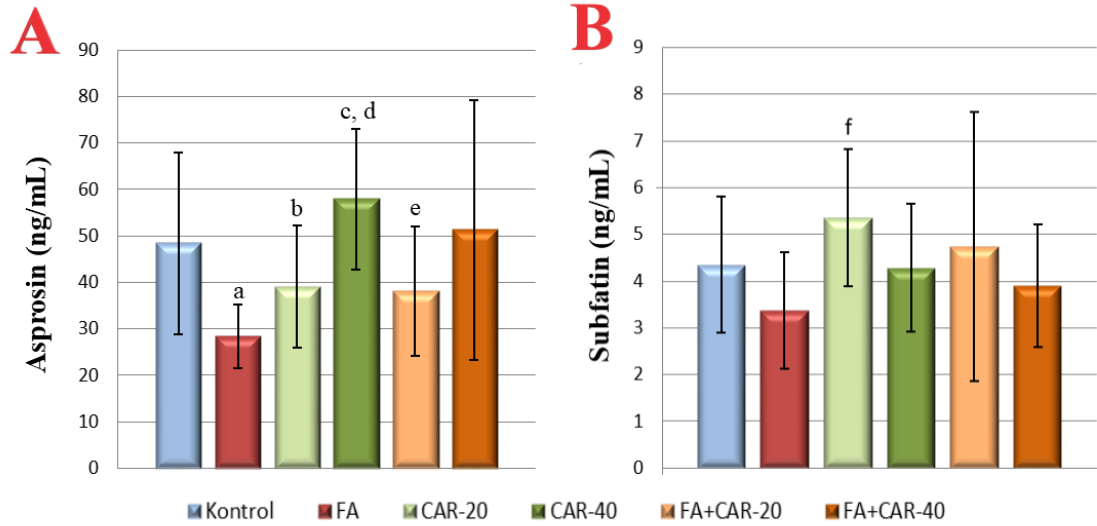
Şekil 19. Karaciğer Doku Süpernatantlarında TAS ve TOS Seviyeleri

5.2.3. Kan Asprosin ve Subfatin Seviyeleri

Çalışmada kan ASP düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında FA, CAR-20 ve FA+CAR-20 gruplarında bir düşüş gözlemlenmekte ancak bu düşüş sadece FA grubunda istatistiksel olarak anlamlı seviyelerde tespit edilmekte idi. CAR-40 ve FA+CAR-40 gruplarının kan ASP düzeylerinde kontrol grubuna göre

bir miktar artma söz konusu idi ($p>0.05$). Bu bulgular ile FA ve CAR-20'nin ASP düzeyini azalttığı CAR-40'ın ise artırdığı sonucuna varılmaktadır. CAR-40 grubunun kan ASP düzeyi FA, CAR-20 ve FA+CAR-20 gruplarına göre, CAR-20 grubunun ASP düzeyi ise FA grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek tespit edildi.

Çalışmamızda en düşük kan SUB değeri FA grubunun idi. CAR-20 grubu SUB değeri kontrol grubuna göre yüksek iken, CAR-40 yakın seviyelerde idi ($p>0.05$). FA+CAR-20 ve FA+CAR-40 gruplarının kan SUB değerleri incelendiğinde, FA grubuna göre yüksek, CAR-20 ve CAR-40 gruplarına göre düşük bulundu ($p>0.05$). Bu farklar istatistiksel olarak anlamlı olmayıp sadece CAR-20 grubu ile FA grubu arasında anlamlı fark tespit edildi ($p<0.05$).



FA: Formaldehit. CAR: Karvakrol.

a: Kontrol grubu ile FA grubu kıyaslandığında ($p < 0,05$).

b: FA grubu ile CAR-20 grubu kıyaslandığında ($p < 0,05$).

c: FA grubu ile CAR-40 grubu kıyaslandığında ($p < 0,01$).

d: CAR-20 grubu ile CAR-40 grubu kıyaslandığında ($p < 0,05$).

e: CAR-40 grubu ile FA+CAR-20 grubu kıyaslandığında ($p < 0,05$).

f: FA grubu ile CAR-20 grubu kıyaslandığında ($p < 0,05$).

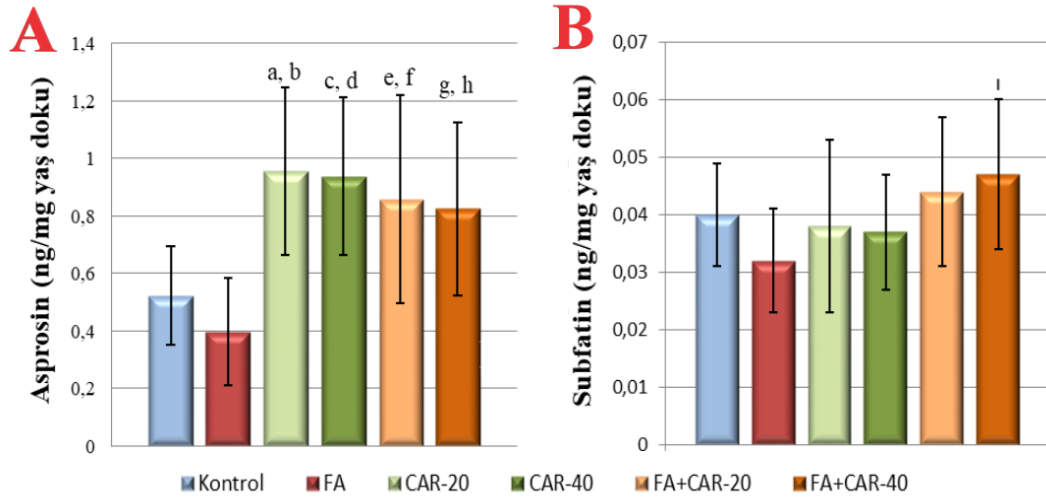
Şekil 20. Kan Asprosin (A) ve Kan Subfatin (B) Seviyeleri

5.2.4. Karaciğer Doku Süpernatantlarında Asprosin ve Subfatin

Seviyeleri

Karaciğer doku süpernatantı ASP değerleri kontrol grubu ile kıyaslandığında FA grubu hariç diğer grupların tamamında anlamlı olarak arttı ($p<0.05$). FA grubunda kontrol grubuna kıyasla bir miktar düşüş gözlemlendi. Bu düşüş kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değil iken ($p>0.05$) diğer tüm gruplara göre (CAR-20, CAR-40, FA+CAR-20, FA+CAR-40) anlamlıydı ($p<0.01$). Karvakrol karaciğer doku süpernatantındaki ASP düzeyini artırırken, FA eklendiğinde (FA+CAR-20, FA+CAR-40) bu etkisinin az da olsa zayıfladığı gözlemlendi.

Karaciğer doku süpernatantı SUB değerleri kontrol grubu ile kıyaslandığında FA grubunda daha fazla olmak üzere, FA, CAR-20 ve CAR-40 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir düşüş söz konusuydu ($p>0.05$). FA+CAR-20 ve FA+CAR-40 gruplarında ise bir miktar yükselme gözlemlendi. Sadece FA+CAR-40 grubunun SUB değerindeki artış FA grubuna göre anlamlı yüksek tespit edildi ($p<0.05$).



FA: Formaldehit, CAR: Karvakrol.

a: Kontrol grubu ile CAR-20 grubu kıyaslandığında ($p < 0,05$).

b: FA grubu ile CAR-20 grubu kıyaslandığında ($p < 0,01$).

c: Kontrol grubu ile CAR-40 grubu kıyaslandığında ($p < 0,01$).

d: FA grubu ile CAR-40 grubu kıyaslandığında ($p < 0,01$).

e: Kontrol grubu ile FA+CAR-20 grubu kıyaslandığında ($p < 0,05$).

f: FA grubu ile FA+CAR-20 grubu kıyaslandığında ($p < 0,01$).

g: Kontrol grubu ile FA+CAR-40 grubu kıyaslandığında ($p < 0,05$).

h: FA grubu ile FA+CAR-40 grubu kıyaslandığında ($p < 0,01$).

i: FA grubu ile FA+CAR-40 grubu kıyaslandığında ($p < 0,05$).

Şekil 21. Karaciğer Doku Süpernatantlarında Asprosin (A) ve Subfatin (B) Seviyeleri

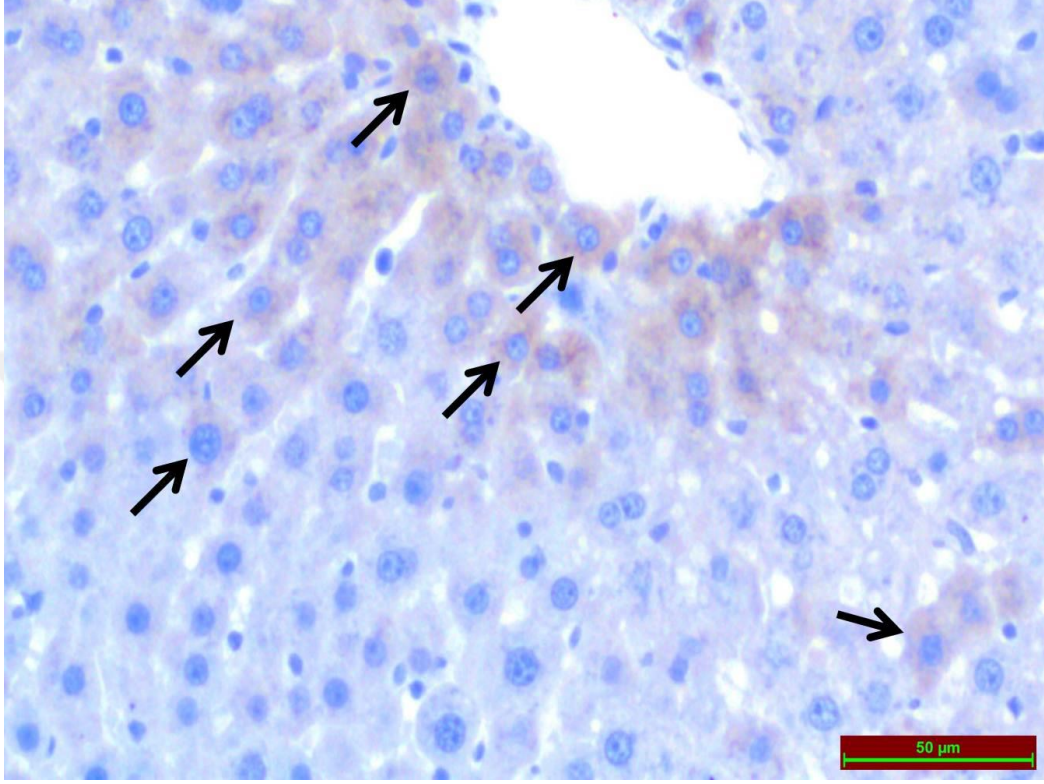
5.3. İmmunohistokimyasal Bulgular

5.3.1. Asprosin İmmünreaktivitesi

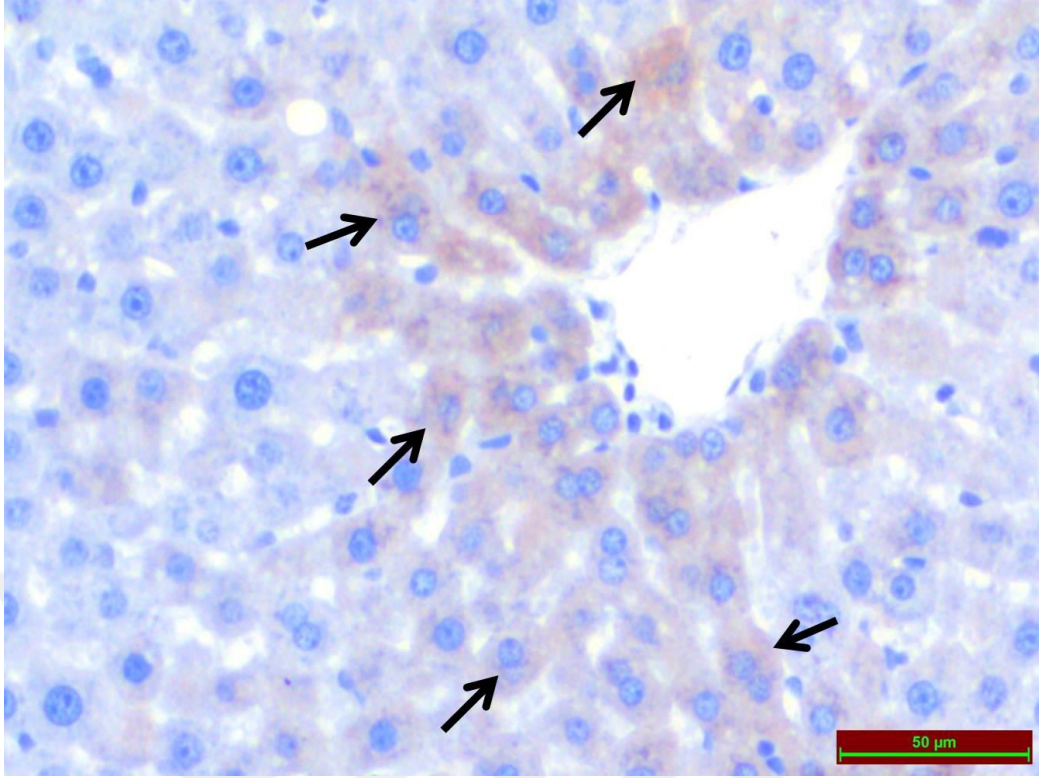
Asprosin immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyama ışık mikroskopi altında incelendi. Asprosin immünreaktivitesi karaciğer dokusunda hepatositlerde (ok) gözlemlendi.

Karaciğer dokusunda; ASP immünreaktivitesi (ok); Kontrol grubu (Şekil 22) ile CAR-20 (Şekil 23) ($p=0,805$) ve CAR-40 (Şekil 24) ($p=0,209$) gruplarında benzerdi. Formaldehit ASP immünreaktivitesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttı (Şekil 25) ($p<0,001$). FA grubu ile kıyaslandığında ise ASP immünreaktivitesi FA+CAR-20 (Şekil 26) ($p<0,001$) ve

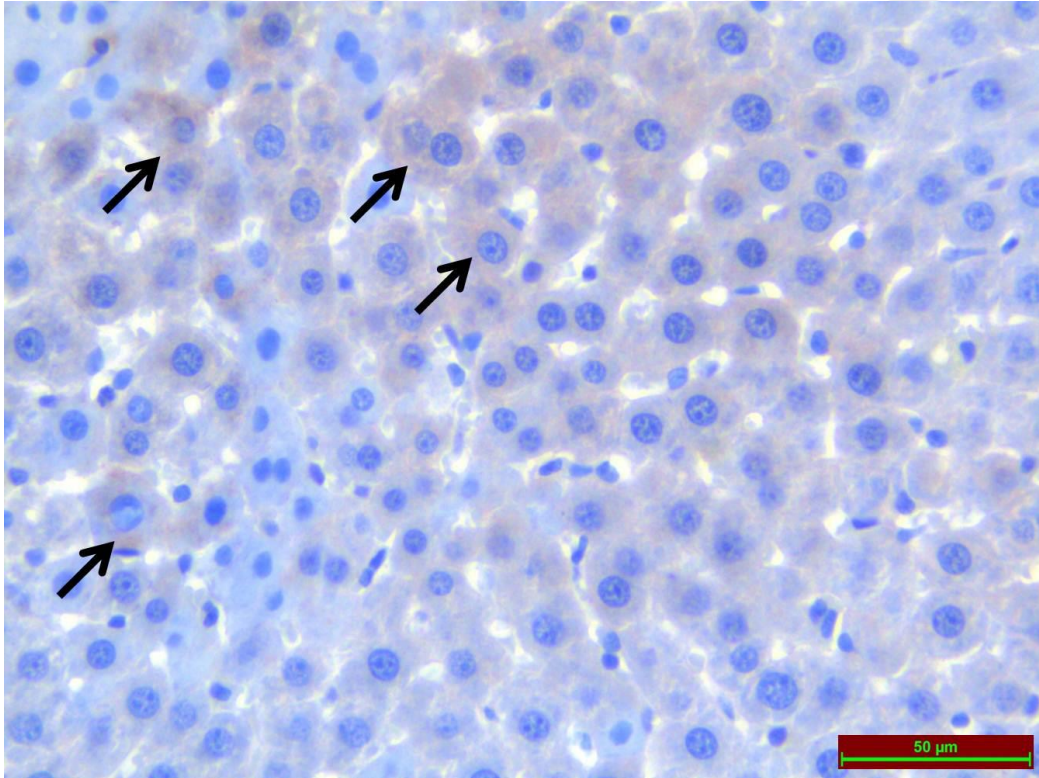
FA+CAR-40 (Şekil 27) ($p<0,001$) gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış olarak izlendi.



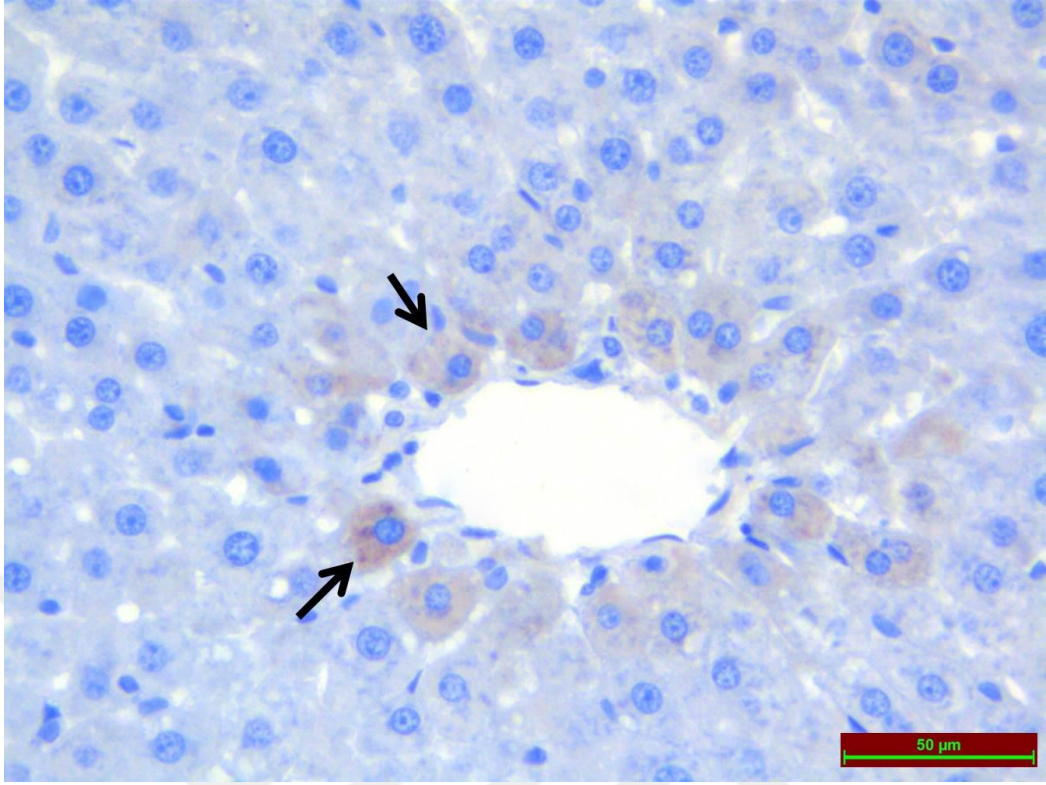
Şekil 22. Karaciğer dokusunda kontrol grubuna ait asprosin immünreaktivitesi



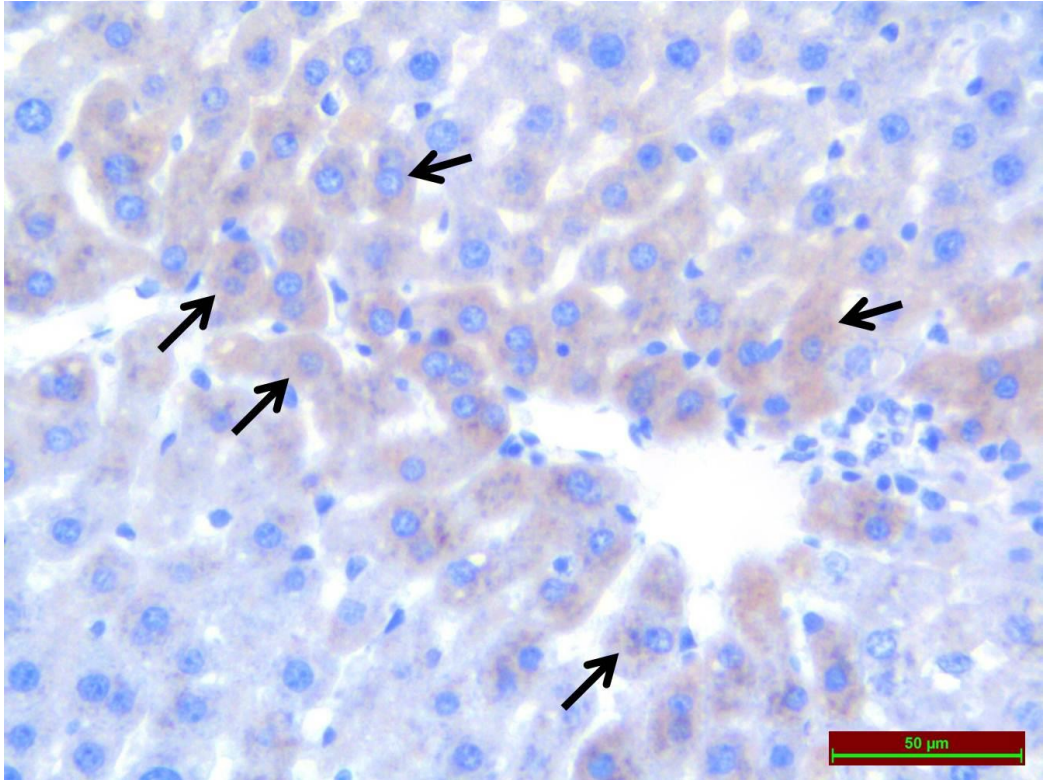
Şekil 23. Karaciğer dokusunda CAR-20 grubuna ait asprosin immünreaktivitesi



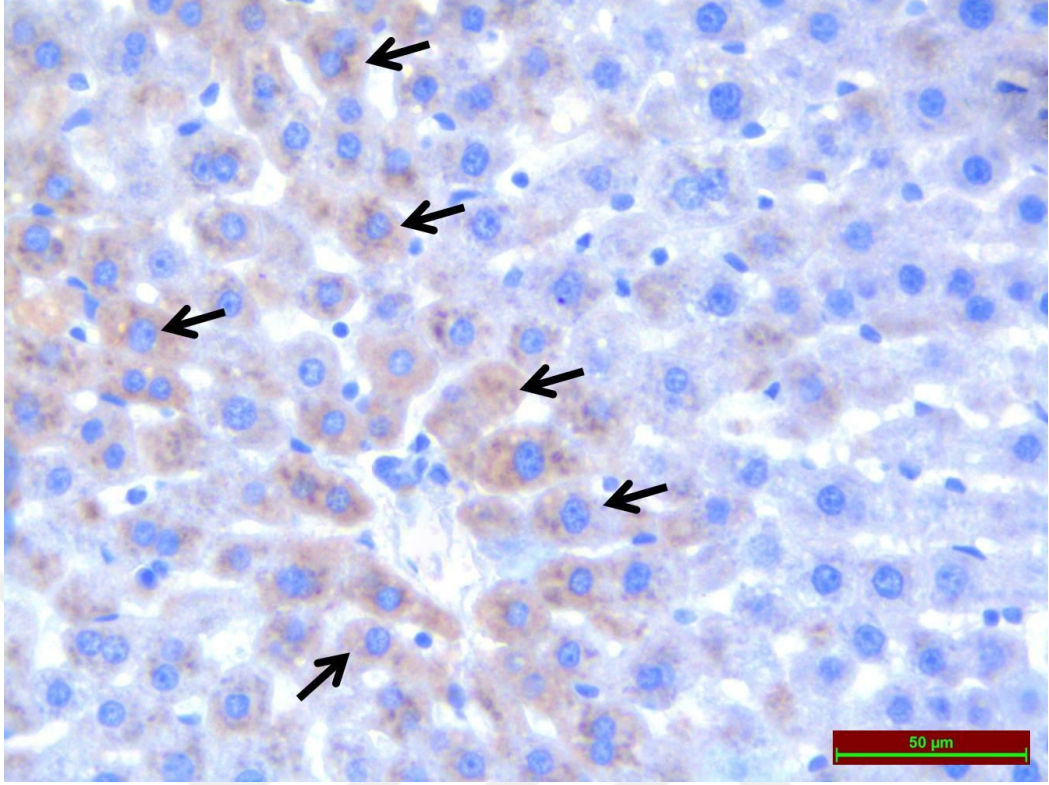
Şekil 24. Karaciğer dokusunda CAR-40 grubuna ait asprosin immünreaktivitesi



Şekil 25. Karaciğer dokusunda FA grubuna ait asprosin immünreaktivitesi



Şekil 26. Karaciğer dokusunda FA+CAR-20 grubuna ait asprosin immünreaktivitesi



Şekil 27. Karaciğer dokusunda FA+CAR-40 grubuna ait asprosin immünreaktivitesi

Tablo 5. Asprosin histoskor

	Kontrol	FA	CAR-20	CAR-40	FA + CAR-20	FA + CAR-40
Asprosin histoskor	0,90	0,20	0,80	0,90	0,90	0,90
Median (min-max)	(0,80-1,80)	(0,10-0,45) ^a	(0,80-1,80)	(0,60-1,80)	(0,60-1,80) ^b	(0,60-1,80) ^b

Değerler median, min-max olarak verilmiştir.

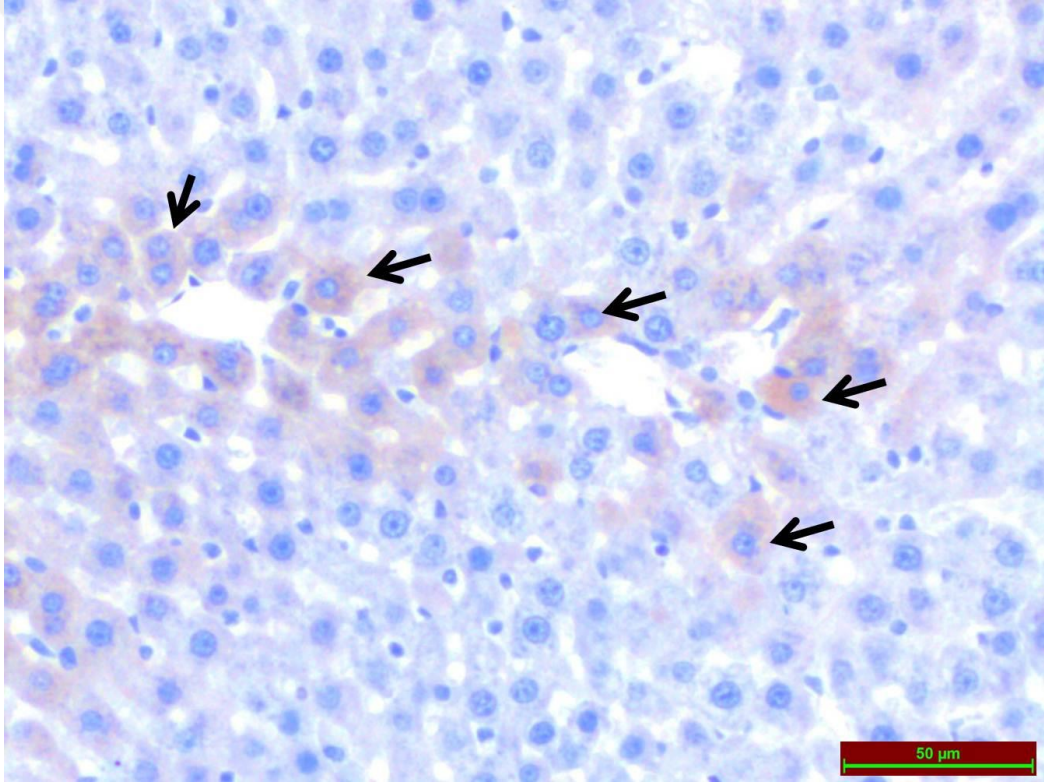
a, Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

b, FA grubu ile karşılaştırıldığında, ($p < 0,003$).

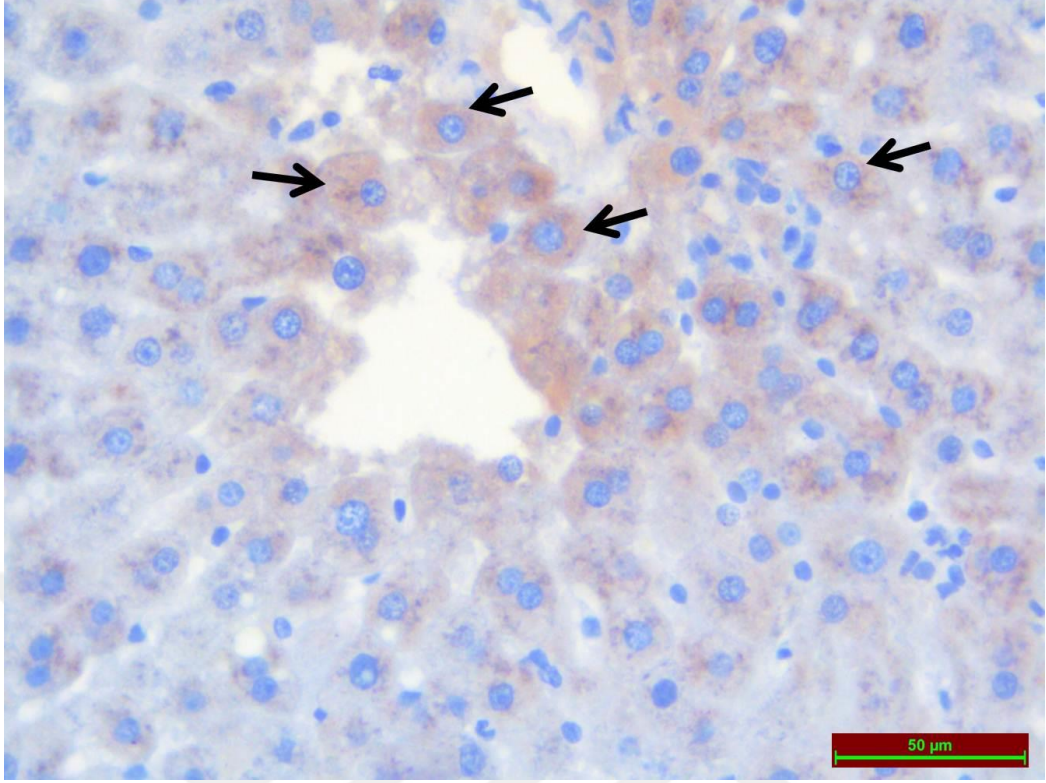
5.3.2. Subfatin İmmünreaktivitesi

Subfatin immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyama ışık mikroskopi altında incelendi. Karaciğer dokusunda SUB immünreaktivitesi hepatositlerde (ok) gözlendi.

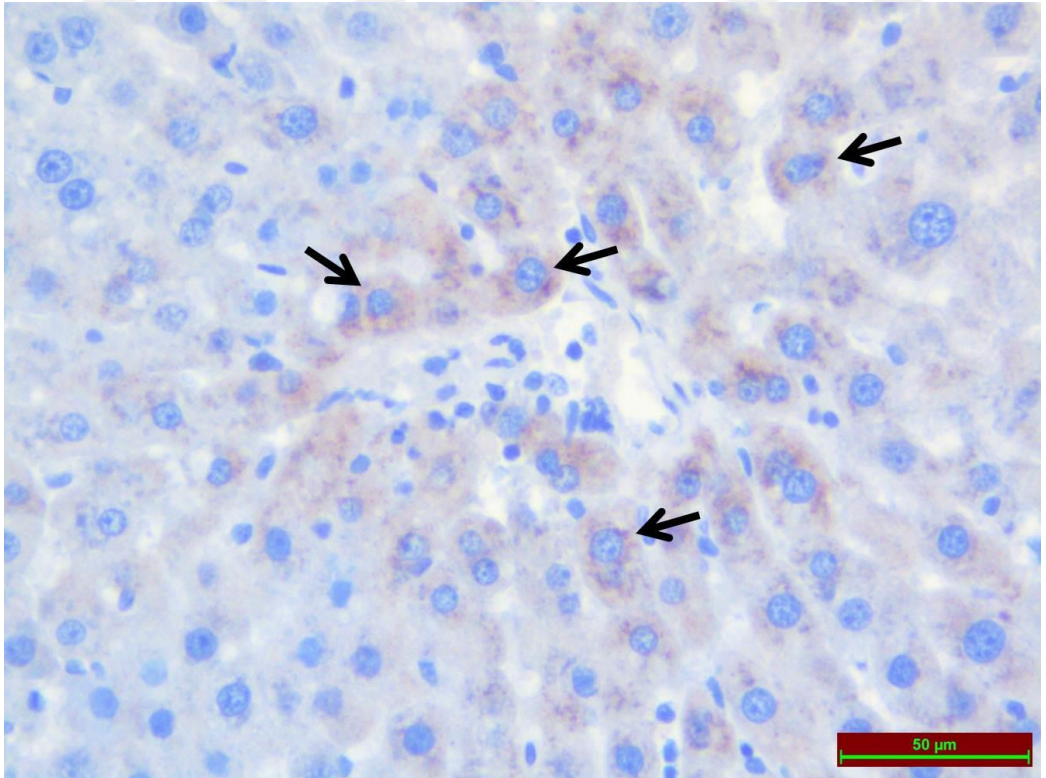
Karaciğer dokusunda; SUB immünreaktivitesi (ok); Kontrol grubu ile (Şekil 28) CAR-20 (Şekil 29) ($p=0,805$) ve CAR-40 (Şekil 30) ($p=0,209$) gruplarında benzerdi. Kontrol grubuyla kıyaslandığında FA (Şekil 31) grubunda SUB immünreaktivitesi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış olarak bulundu ($p<0,001$). FA grubu ile kıyaslandığında ise SUB immünreaktivitesi FA+CAR-20 (Şekil 32) ($p<0,001$) ve FA+CAR-40 (Şekil 33) ($p<0,001$) gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış olarak izlendi.



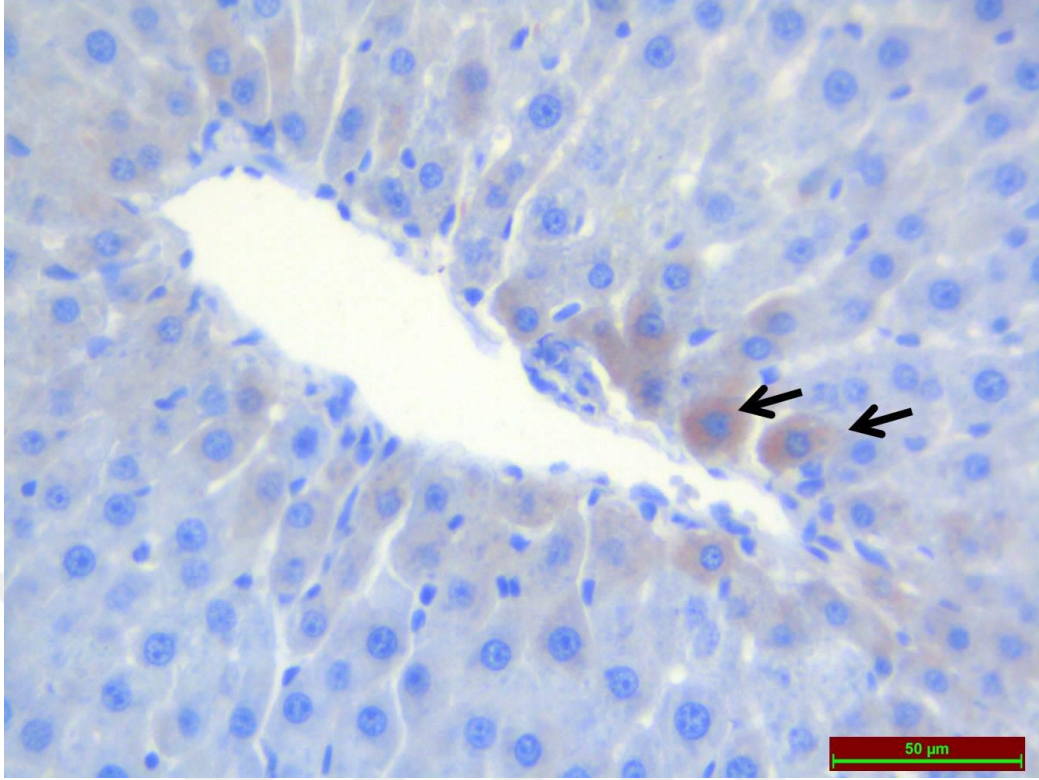
Şekil 28. Karaciğer dokusunda kontrol grubuna ait subfatin immünreaktivitesi



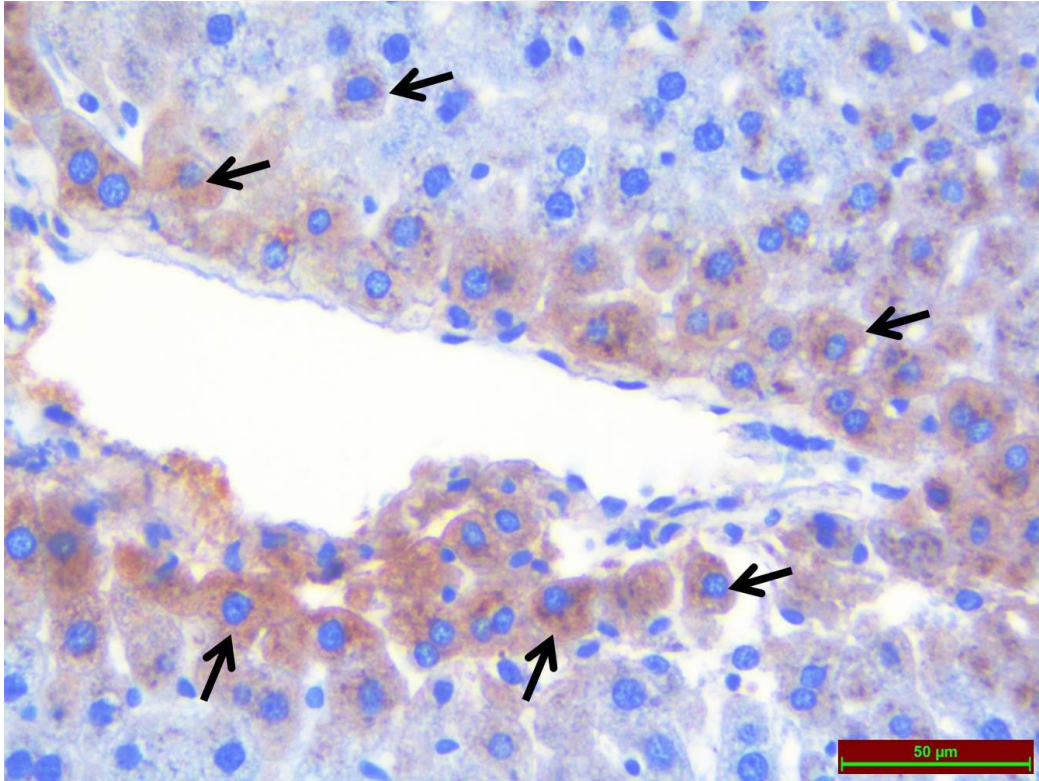
Şekil 29. Karaciğer dokusunda CAR-20 grubuna ait subfatin immünreaktivitesi



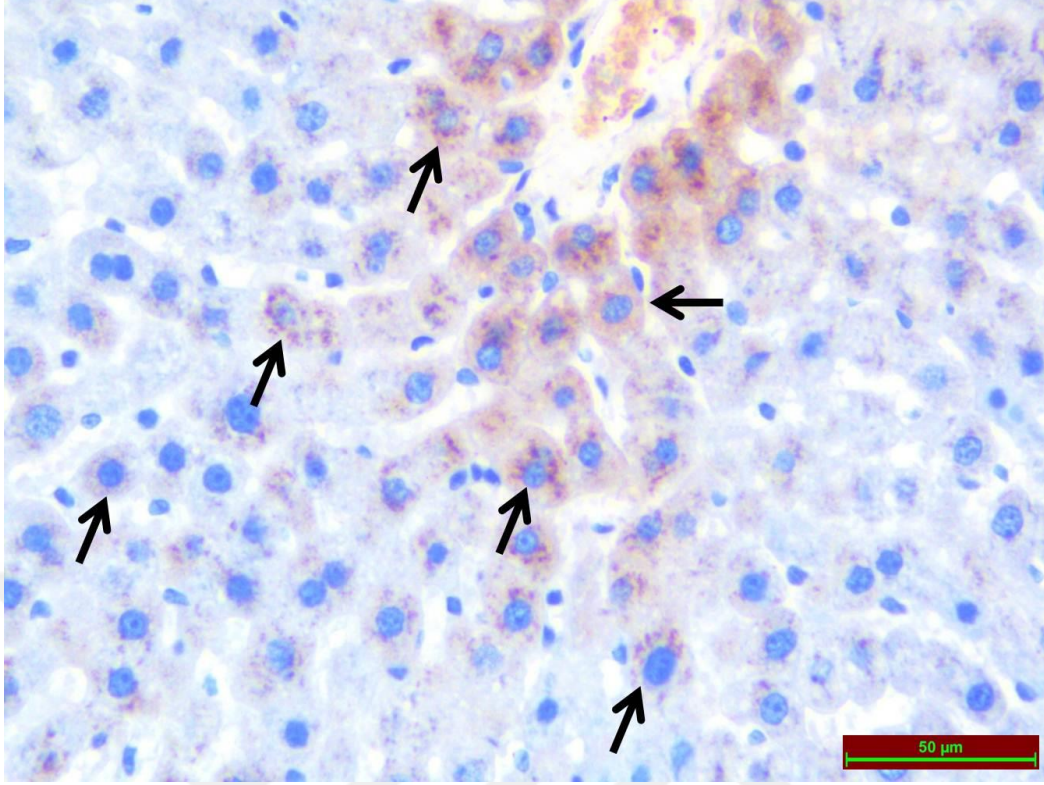
Şekil 30. Karaciğer dokusunda CAR-40 grubuna ait subfatin immünreaktivitesi



Şekil 31. Karaciğer dokusunda FA grubuna ait subfatin immünreaktivitesi



Şekil 32. Karaciğer dokusunda FA+CAR-20 grubuna ait subfatin immünreaktivitesi



Şekil 33. Karaciğer dokusunda FA+CAR-40 grubuna ait subfatin immünreaktivitesi

Tablo 6. Subfatin histoskor

	Kontrol	FA	CAR-20	CAR-40	FA + CAR-20	FA + CAR-40
Subfatin histoskor	0,80	0,20	0,80	0,90	0,90	0,80
Median (min-max)	(0,45-1,20)	(0,10-0,3) ^a	(0,60-1,20)	(0,60-1,20)	(0,60-1,20) ^b	(0,60-1,20) ^b

Değerler median, min-max olarak verilmiştir.

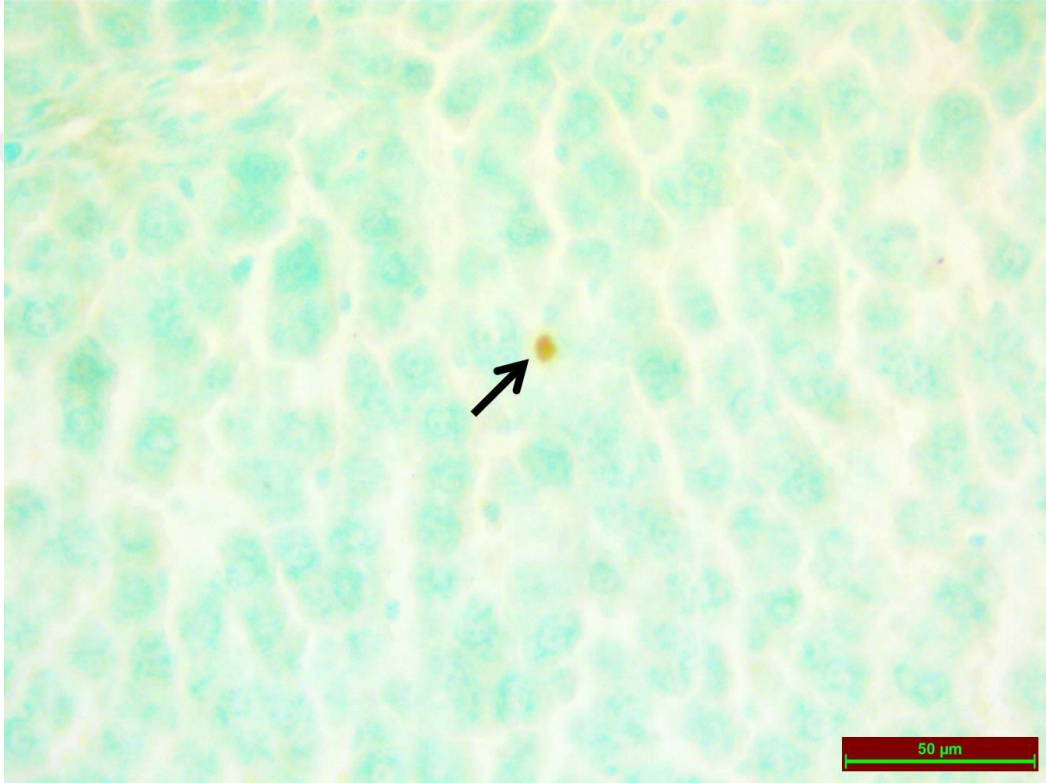
a, Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

b, FA grubu ile karşılaştırıldığında, ($p < 0,003$).

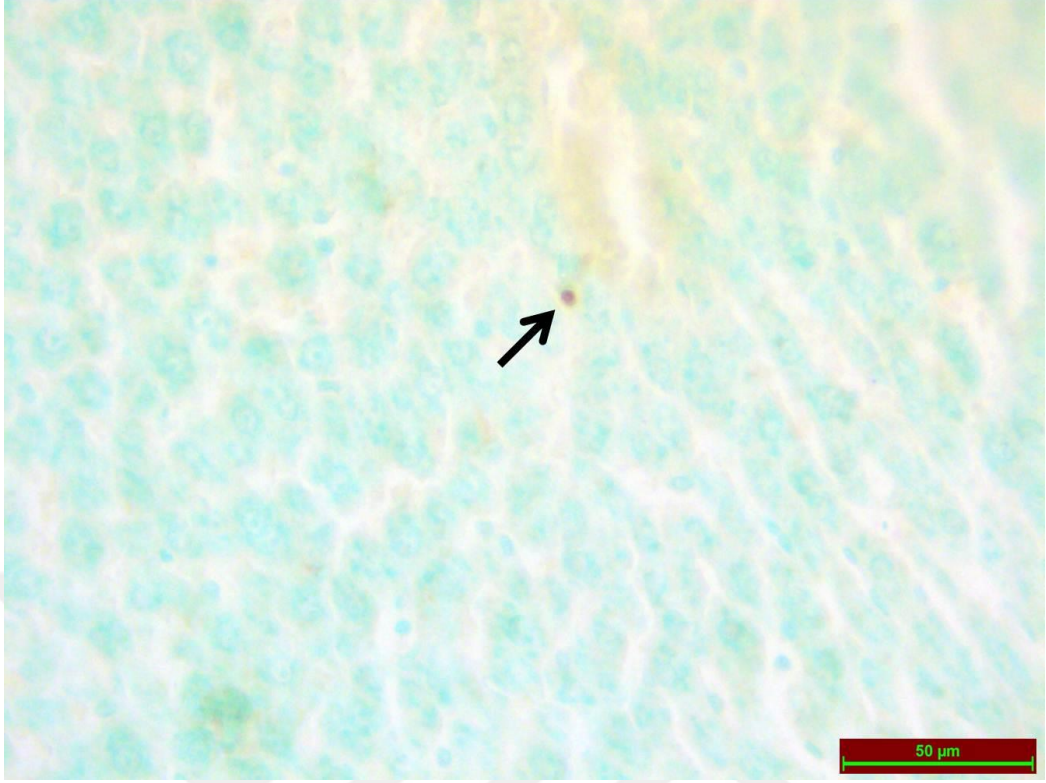
5.3.4. TUNEL Bulguları

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; TUNEL pozitifliği (ok); Kontrol (Şekil 34) ve CAR-20 (Şekil 35) gruplarında benzerdi ($p=1,00$). Kontrol grubuyla

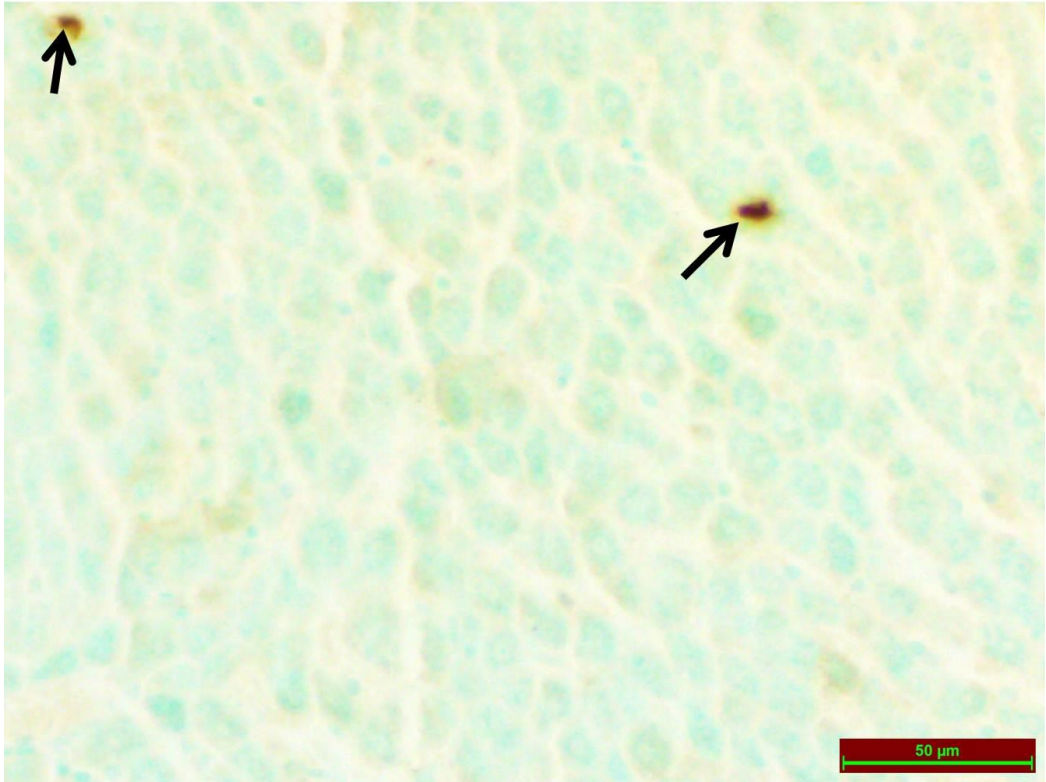
kıyaslandığında FA (Şekil 36) ($p<0,001$), CAR-40 (Şekil 37) ($p<0,001$) ve FA+CAR-40 (Şekil 38) ($p<0,001$) gruplarında TUNEL pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış bulundu. FA grubu ile kıyaslandığında ise TUNEL pozitifliği FA+CAR-20 (Şekil 39) ($p<0,001$) grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış olarak izlendi.



Şekil 34. Karaciğer dokusunda kontrol grubuna ait TUNEL pozitifliği



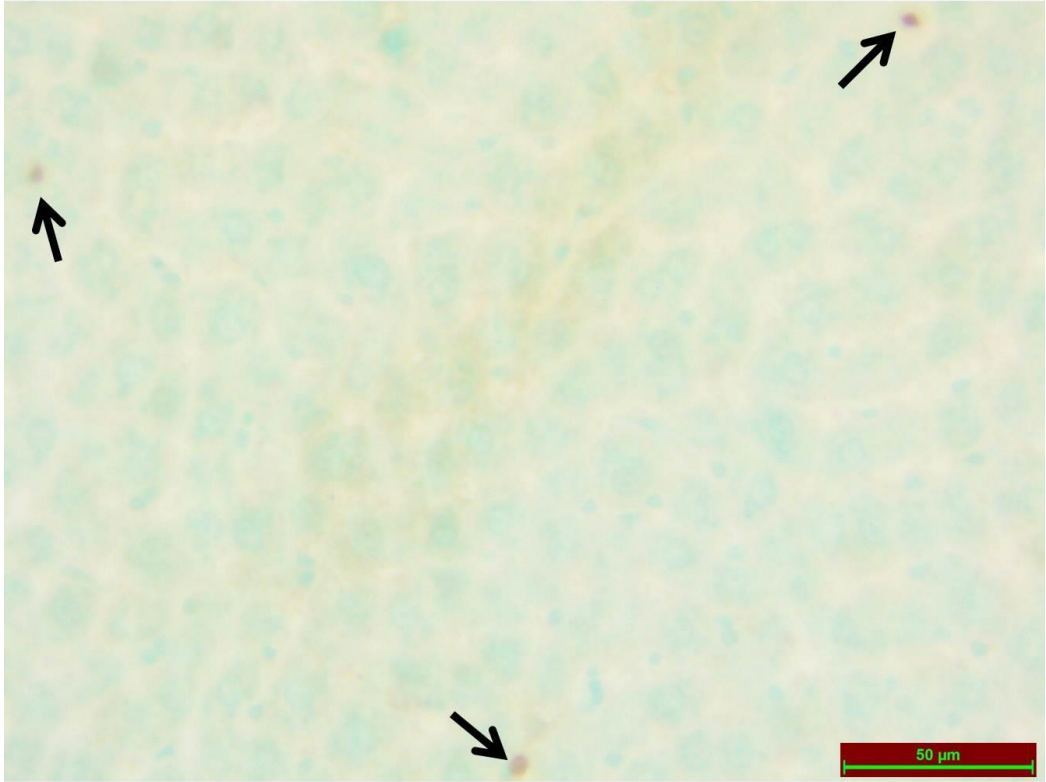
Şekil 35. Karaciğer dokusunda CAR-20 grubuna ait TUNEL pozitifliği



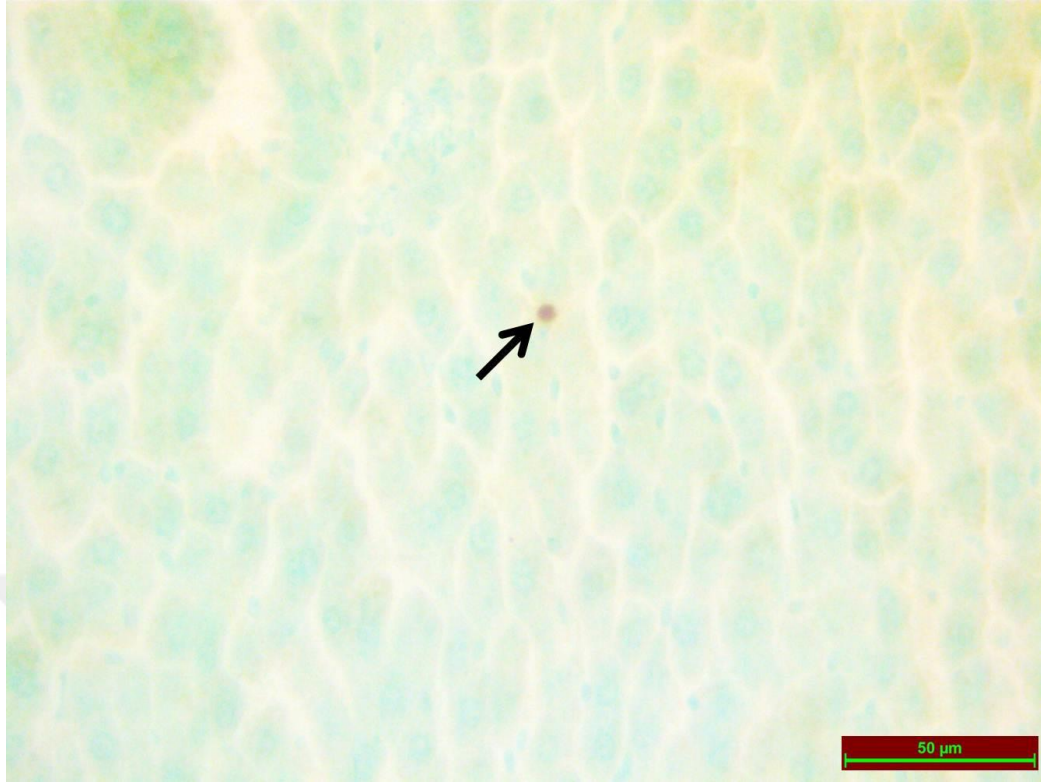
Şekil 36. Karaciğer dokusunda FA grubuna ait TUNEL pozitifliği



Şekil 37. Karaciğer dokusunda CAR-40 grubuna ait TUNEL pozitifliği



Şekil 38. Karaciğer dokusunda FA+CAR-40 grubuna ait TUNEL pozitifliği



Şekil 39. Karaciğer dokusunda FA+CAR-20 grubuna ait TUNEL pozitifliği

Tablo 7. Apoptotik indeks

	Kontrol	FA	CAR-20	CAR-40	FA + CAR-20	FA + CAR-40
Apoptotik İndeks	1,00	8,00	1,00	9,00	1,00	9,00
Median (min-max)	(1,00-2,00)	(5,00-12,00) ^a	(1,00-3,00)	(4,00-12,00) ^a	(1,00-3,00) ^b	(6,00-10,00) ^a

Değerler median, min-max olarak verilmiştir.

a, Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

b, FA grubu ile karşılaştırıldığında, ($p < 0,003$).

6. TARTIŞMA

Formaldehit tüm canlılarda görülen normal metabolizmanın bir ürünü olmasının yanında tükettiğimiz gıdalarda da bulunmaktadır (11, 21). Ayrıca yaşadığımız ve çalıştığımız ortamlarda da sıkça maruz kaldığımız solunum, ağız ve cilt yolu ile vücudumuza girebilen zararlı bir maddedir (17, 19). Vücudumuzdaki tüm dokular FA'yı formik asite metabolize etme yeteneğine sahiptir. Ancak belli bir kapasitenin üzerinde FA maruziyeti göz ve burunda irritasyon, baş ağrısı, öksürük, dispne gibi semptomlara sebep olmaktadır (17). Ayrıca biyolojik sistem üzerine olumsuz etki göstermekte, dokularda hasara neden olmakta, oksidan kapasiteyi artırmakta, enerji metabolizmasının regülasyonunu bozmaktadır (7, 9, 51). Dolayısıyla maruz kalınan FA'nın zararlı etkilerini ortadan kaldırmak veya azaltabilmek önem arz etmektedir. Daha önce yapılan birçok deneysel çalışmada subkutan ve intraperitoneal enjeksiyon gibi FA için olası maruz kalma yöntemleri denenmiştir (9, 165). Ancak anatomist ve patoloğların çalışma şartları göz önünde bulundurulduğunda FA'ya maruz kalma biçimi çoğunlukla inhaler yol olduğundan, bu çalışmada da sıçanlar 4 hafta boyunca (8 saat/gün, 5 gün/hafta) inhaler FA'ya maruz bırakıldı. Çalışmada sıçanların karaciğer dokusunda CAR'ın olumlu etkisinin olup olmadığı, bu doku ve kanlarda enerji metabolizmasında görevli asprosin ve subfatin miktarlarının CAR verilmesine bağlı olarak nasıl değiştiği, CAR verilmesinin antioksidan ve oksidan kapasiteleri nasıl etkilediği ve bu dokudaki apoptotik durumlar araştırıldı.

Çalışmamızda FA'ya maruz kalan sıçanlarda gözlerde sulanma, burun akıntısı, yalanma davranışlarında artış görüldü. Formaldehitin iritan etkisine bağlı olduğunu düşündüğümüz bu bulgular pek çok çalışma ile örtüşmektedir (51, 166).

CAR verilen gruplarda bu bulgulara kısmi bir azalma gözlemlendi. Literatürde CAR ve FA ilişkisini araştıran bir çalışma olmadığından bulguları karşılaştırma olanağı olmadı. Ancak hücre sağ kalım ve proliferasyonunu artıran, oksidatif stresi azaltarak antioksidan özellik gösteren CAR'ın bu özellikleri sayesinde bulguları azaltmış olabileceğini düşünüyoruz (90, 108).

Daha önce yapılan bazı çalışmalarda FA alan grupların deney süresince hiç kilo almadıkları, hatta kilo kaybına uğradıklarından bahsedilmektedir (51, 166, 167). Merzoug ve Toumi'nin gebe sıçanlarda yaptığı çalışmada (168) ise FA'ya maruz kalan sıçanların kontrol grubuna göre daha yavaş kilo aldığı rapor edilmiştir. Çalışmamızda ise benzer şekilde FA'ya maruz kalan sıçanlarda iştahsızlık ve halsizlik gözlemlendi. Deney sonu ve deney başlangıç kilo farkları incelendiğinde, Merzoug ve Toumi'nin çalışması ile uyumlu olarak FA'ya maruz kalan grupların diğer gruplara göre daha az kilo aldığı tespit edildi. CAR-20 ve CAR-40 alan grupların kilo alımları kontrol grubu ile yakınsa, FA+CAR-20 alan grup FA grubu ile benzer kilo artışına sahipti. Ancak FA+CAR-40 alan grup tüm gruplara göre daha az kilo alımı gösterdi. Wang ve ark. (89) tarafından yapılan çalışmada etanol ile birlikte verilen farklı dozlardaki CAR'ın (25, 50, 100 mg/kg) sıçanların kilo alımlarına anlamlı bir etki gösterilmediği tespit edilmiştir. Bu durum CAR-40'ın tek başına veya etanolle verildiğinde bir iştahsızlığa sebep olmazken, FA ile birlikte verildiğinde metabolizmaya fazladan yük olduğunu düşündürdü.

Çalışmada inhaler FA'ya maruz kalan sıçanların tüylerinde deneyin dördüncü gününden sonra belirgin hale gelen sararmalar gözlemlendi. Kafes içerisindeki FA enjeksiyonu yapılan pamuk topları hala beyaz kalırken, FA alan

tüm sıçanların tüylerinde sararma görülmesi, bu sararmanın ortamda bulunan FA'nın yüzeye yapışması ile değil, vücuda alınan FA'nın sebep olduğu bir reaksiyon sonucu meydana geldiğini kanıtlar nitelikte idi. Daha önce yapılan çalışmalarda da benzer şekilde tüylerde sararmalar gözlenmiştir (51, 166, 169). Yıldız ve Göze'nin (170) deri altına bölgesel FA uygulayarak yaptığı bir çalışmada sararma sadece FA uygulanan bölge ile sınırlı kalmıştır. Bu çalışmalar da sararmanın FA kaynaklı olduğunu desteklemektedir. Sararmanın tüy yapısında bulunan "kynurenine" adlı protein ile FA'nın reaksiyonu sonucu oluştuğuna dair bildirimlere karşın (171, 172) Aydın ve ark. (51) sararmanın metabolik olaylar sonucu ortaya çıkan keton ve amonyak varlığında FA'nın 3,5-diasetil-1,4-dihidrotoludin'e dönüşmesinden kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir. Kynurenine proteininin sarı renk verme özelliği bulunmaz iken, 3,5-diasetil-1,4-dihidrotoludin sarı renk veren bir kimyasal olup, formaldehit varlığının spektrofotometrik olarak ölçülmesinde kullanılmaktadır. Bu sebeple biz de sararmanın keton ve amonyak varlığında FA'nın 3,5-diasetil-1,4-dihidrotoludin'e dönüşmesinden kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Aydın ve ark. (51) yaptığı çalışmada antioksidan madde olarak verdikleri karnozin ile tüylerdeki sararmanın belirgin olarak beyazladığını göstermişlerdir. Çalışmamızda farklı bir antioksidan madde olan CAR kullandık. Ancak FA alan gruplara verilen CAR tüylerdeki bu sararmayı tamamen engelleyemedi. CAR-20 verilen grupta FA alan gruba göre bir renk açılması söz konusu iken CAR-40 verilen grup FA alan grupla benzerdi. Bu sebeple FA'nın etkilerini nötralize etmek için CAR-20'nin daha uygun bir doz olduğunu düşünüyoruz.

Canlı hücrelerde devamlı oksidasyon olayları meydana gelmekte, oluşan ROS antioksidanlar ile bir denge içerisinde etkisiz hale getirilmektedir. Dışarıdan maruz kaldığımız reaktif oksijen maddeler bu oksidasyonu artırmakta ve oksidan-antioksidan dengesini bozabilmektedir (173). Formaldehit de bu dengeyi bozarak oksidatif hasar meydana getiren bir maddedir (2, 51). Bu çalışmada sıçanlar inhaler FA'ya maruz bırakılarak total oksidan ve antioksidan kapasiteleri ölçüldü. Formaldehit maruziyetinin karaciğer dokusunda ve kanda oksidan kapasiteyi artırdığı tespit edildi. Ayrıca yapılan TUNEL boyama ile karaciğer dokusunda apoptotik hücre sayısını artırdığı görüldü. Daha önce yapılan birçok çalışmada bizim verilerimizle benzer şekilde FA maruziyetinin total oksidan kapasite ve apoptozisi artırdığı gösterilmiştir (51, 166). Hem kan hem doku örneklerinde FA+CAR-20 ve FA+CAR-40 gruplarında oksidan kapasite FA grubuna göre düşük bulundu. Üstelik karaciğer dokusunda CAR-20 ve CAR-40 gruplarında kontrol grubu ile kıyaslandığında dahi oksidan kapasitede bir azalma gözlemlendi. Daha önce yapılan çalışmalarda benzer şekilde CAR'ın ROS'a karşı antioksidan özellik gösterdiği ve oksidan kapasiteyi azalttığı bulunmuştur (85, 88). Ancak kanda CAR-20 ve CAR-40 gruplarında oksidan kapasitede artış tespit edildi. Özellikle CAR-40 alan grupta bu artış kontrol grubuna göre anlamlıydı. Çalışmamız TUNEL boyama sonuçlarında da FA+CAR-20 grubunda apoptotik hücre sayısı FA grubuna göre azalmakta iken CAR-40 ve FA+CAR-40 gruplarında FA grubu ile benzer tespit edilmiştir. Suo ve ark.(174) çalışmasında tek doz uygulanan 75 mg/kg'lık CAR'ın iskemi-reperfüzyon sonucu oluşan apoptozisi azalttığından bahsedilirken, aksine bazı çalışmalarda yüksek doz CAR'ın oksidatif hasara hatta ölüme sebep olduğundan da söz edilmektedir (159,

175). Çalışmamızla elde ettiğimiz sonuçlarda CAR'ın oksidan kapasiteyi bazı durumlarda artırırken bazı durumlarda azaltması, benzer şekilde apoptoza etkisi, uygulanan toplam doza ve dokuya bağlı farklı etkisinden kaynaklandığını düşündürdü.

Çalışmada FA alan grupta total antioksidan kapasite bir miktar artmış bulundu. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi. Söz konusu artışın FA'nın biyolojik sistemlere etkisi ile endojen antioksidan (süperoksit dismutaz, katalaz gibi) sentezinin artması sonucu gerçekleştiği kanısındayız. Sadece CAR alan grupların tamamında da total antioksidan kapasitede kontrole göre anlamlı bir artış tespit edildi. FA ve CAR'ın birlikte verildiği tüm gruplarda antioksidan kapasite FA'ya kıyasla yüksek bulunurken, sadece CAR verilen gruplara göre kısmi bir düşüş izlendi. Güncel literatürde FA maruziyeti ve CAR ilişkisini inceleyen başka bir çalışma olmadığından verilerimizi kıyaslayamamaktayız. Ancak çalışmamızla benzer şekilde CAR'ın antioksidan özelliğini gösteren çok sayıda çalışma vardır (85, 88, 90).

Çalışmamızda kan ve doku asprosin seviyeleri incelendiğinde, FA grubunda kontrol grubuna göre bir düşüş söz konusu olup, bu düşüş kanda anlamlı seviyelerdedir. Benzer şekilde FA grubu karaciğer dokusunda ASP immunreaktivitesinin azaldığı tespit edildi. FA insülin ile etkileşime girerek insülin-FA kompleksleri oluşturur. Bu durum serum insülin seviyesinin düşmesine ve hiperglisemi oluşmasına neden olmaktadır (8). Romere ve ark. (127) serum ASP seviyesinin açlık ile artarken beslenme ile hızla düştüğünden bahsetmiştir. Açlıkta salgılanan bir protein olan ASP'nin hiperglisemik durumdan dolayı düşük tespit edilmiş olması muhtemeldir. Ayrıca Strubelt ve ark. (176) FA

kaynaklı hepatoksisiteyi elektron mikroskobuyla incelemiş, FA'nın mitokondrileri membranlarında rüptür ve krista kaybına sebep olduğunu, hücrelerin oksijen tüketimini azalttığını bildirmişlerdir. Mitokondrisi hasarlanmış hücrenin enerji metabolizması bozulacağından ASP sentezinin de azalması beklenir. Çünkü biyolojik sistemler maximum ekonomi ilkesine (Kleiber kanunu) göre çalışırlar. Enerji metabolizması tahrip edilirse, bu mekanizmada kullanılan proteinlerin de üretimi azalacaktır. Kocaman ve Kuloğlu'nun (177) çalışmasında diyabetik sıçanların serum asprosin düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmış tespit edilirken, Naimeyan ve ark. (178) çalışmasında diyabeti olan kişilerde sağlıklı kontrollere göre serum ASP konsantrasyonu yükselmiş olarak tespit edilmiştir. Çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmesi ASP'nin kan şekeri, insülin miktarı, insülin duyarlılığı gibi enerji metabolizmasının pek çok faktöründen etkilenmesi olabilir. Formaldehit maruziyeti ve ASP ilişkisini inceleyen güncel literatür bulunamadığından sonuçlarımızı karşılaştıramıyoruz. Ancak sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada FA gibi toksik bir madde olan metotreksat uygulanmasının ardından sıçan karaciğer dokularında ASP immunreaktivitesinin azaldığı gösterilmiştir (179). Bir diğer çalışmada da kanser tedavisinde kullanılan ancak hepatotoksik yan etkileri olduğu bilinen siklofosfamid'in karaciğer dokusundaki ASP immunreaktivitesini azalttığından bahsedilmiştir (180). Bu sonuçlar da bizim bulgularımızla paralellik göstermektedir.

CAR-20 grubunun kan değerleri hariç CAR alan hayvanların ASP düzeylerinde artış gözlemlendi. Bu artışlar doku örneklerinde kontrol grubuna göre anlamlı seviyelerde idi. Gommers ve ark. (116) yaptıkları bir çalışmada CAR'ın TRPM7 kanallarını inhibe ederek insülin salgılanmasını teşvik ettiğinden söz

etmişlerdir. Çalışmamızdaki sonuçlarla benzer olarak, CAR alımıyla insülin salgılanmasındaki artışın, kan şekeri düşürmesi ve ASP üretimini artırması beklenebilir. Ayrıca Liu ve ark.'nın (117) çalışması diyabetik farelerde CAR'ın rastgele kan şekeri ölçümlerini düşürdüğünü, hiperglisemiye azalttığını göstermiştir. Bu şekilde kan şekerinin düşmesi ASP salgısını artırabilmektedir. FA+CAR-20 ve FA+CAR-40 grupları incelendiğinde kan ve doku ASP seviyeleri CAR-20 ve CAR-40 gruplarına göre daha düşük iken, FA grubuna göre daha yüksek tespit edildi. FA+CAR-20 ve FA+CAR-40 gruplarının karaciğer dokusunda yapılan immunohistokimyasal boyamada da ASP immunreaktivitesi FA grubuna kıyasla yüksek olduğu gözlemlendi. Bu durumda FA ile düşen ASP seviyesinin CAR takviyesi ile tekrar yükseldiğinden söz etmek mümkündür. Çalışmamızla benzer şekilde, Vural (179) yaptığı çalışma ile FA gibi toksik bir madde olan metotreksat uygulamasına bağlı karaciğer dokusunda düşen ASP immunreaktivitesinin antioksidan özelliği olan N-asetilsistein verilmesi sonucunda anlamlı olarak arttığını göstermiştir.

Çalışmamızda FA grubu SUB seviyeleri incelendiğinde, hem doku hem kan örneklerinde kontrol grubuna göre bir miktar düşme tespit edildi. FA+CAR-20 ve FA+CAR-40 gruplarının kan SUB değerleri, FA grubuna göre yüksek, CAR-20 ve CAR-40 gruplarına göre düşük bulundu. Bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildi. Benzer şekilde karaciğer dokusunda SUB immunreaktivitesi FA grubunda düşük olarak gözlenirken, FA+CAR-20 ve FA+CAR-40 gruplarında FA grubuna kıyasla yüksek olduğu görüldü. Subfatin üretiminin büyük çoğunluğu deri altı yağ dokusunda yapılmaktadır (128). Verilerimize bakıldığında deney sonu kilo alımları en düşük olan FA ve

FA+CAR-40 grubunun kan SUB değerleri de diğer gruplara göre düşük ölçüldü. Ancak tüm veriler deney sonu ağırlık değişimleri ile tam bir uyum içinde değildi. Bu sebeple tek başına yağ kütlesiyle ilişkilendirmek doğru olmayacaktır. Bae'nin (149) alışmasında egzersizin SUB seviyelerini anlamlı şekilde artırdığından bahsederken, Tok'un (181) yürüttüğü çalışmanın raporunda diyet ve egzersizin akut dönemde SUB seviyelerinde bir yükselmeye neden olurken, uzun vadede bu değerin başlangıç seviyelerine gerilediğinden söz edilmiştir. Yapılan literatür taramasında FA ve SUB ilişkisini araştıran başka bir çalışmaya rastlanmadığından verilerimizi karşılaştıramadık. Ancak FA ve enerji metabolizmasında etkili bir protein olan irisin ile yapılan bir çalışmada da bizim verilerimizle benzer şekilde FA maruziyetinin irisin miktarını düşürdüğünden bahsedilmiştir (51). İrisin SUB ile benzer şekilde beyaz yağ dokusunu esmerleşmesini sağlayan, egzersizle miktarında artış gözlenen bir proteindir (182). İnsülin duyarlılığını artırır. Obezite ve glukoz hemostazının iyileşmesini sağlar (183). Bu zellikleri ile SUB'a benzerlik gösteren irisin, FA maruziyetinde kan ve karaciğer dokusunda azalmaktadır. Subfatin'in enerji ihtiyacı, egzersiz, diyet içeriği ve miktarı gibi enerji metabolizmasını etkileyen pek çok durumda değişiklik gösterdiği belirtilmektedir (148, 149). Bu çok yönlü etkileşimler, verilerimizdeki tutarsızlıkların izahı olabilir.

Ayrıca bu çalışmadaki ASP ve SUB'un kan ve dokudaki miktarları mukayese edildiğinde, kanda dokuya göre yaklaşık 60-100 kat daha fazla olduğu görülmektedir. Bunun muhtemel sebebi ASP ve SUB'un birçok dokuda sentezlenip kan havuzuna salgılanmasıdır.

Bu çalışmada glukoz ve lipid profillerine bakılmamıştır. Daha önce yapılan çok sayıda çalışma (51, 91, 120, 166) ile FA'nın ve CAR'ın bu parametreler üzerine etkisi gösterilmiş olup, tekrardan kaçınmak amacıyla çalışmaya bilinçli dahil edilmemiştir.

Formaldehit maruziyetinin zararlı etkilerini ortadan kaldırmak veya azaltmak için bu güne kadar pek çok antioksidan madde ile çalışmalar yapılmış ve koruyucu etkileri bildirilmiştir (50, 51, 166). Çalışmamızda FA maruziyeti sonucu oluşan karaciğer hasarına CAR'ın etkisi incelenmiştir. 28 günlük deney süresi boyunca her 48 saatte bir uygulanan 20 mg/kg CAR'ın FA'nın olumsuz etkilerini azalttığı tespit edildi. Sıçanların klinik bulgularını hafiflettiği, tüy rengindeki FA'ya bağlı sararmayı azalttığı görüldü. Karaciğer dokusunda apoptotik hücre sayısını azaltırken TOS seviyelerini de düşürdü. Ancak aynı süre ve şekilde uygulanan 40 mg/kg dozundaki CAR'ın, apoptotik hücre sayısını azaltmadığı aksine kontrol grubuna kıyasla apoptozisi artırdığı tespit edildi. Formaldehit ile birlikte uygulanan 40 mg/kg CAR, karaciğer dokusunda TOS değerini FA'ya göre anlamlı azaltsa da, tek başına uygulandığında kan TOS değerini kontrole göre anlamlı olarak yükseltti.

Çalışmamızda enerji metabolizmasında görevli ASP ve SUB değerleri de ölçüldü. Formaldehit uygulaması ile hem kan hem dokudaki ASP ve SUB değerlerinin düştüğü CAR ilavesi ile doku ve kanda ölçülen ASP ve SUB değerlerinin tekrar yükseldiği gözlemlendi. Benzer şekilde immunohistokimyasal boyamalarda da FA verilen gruplarda ASP ve SUB immunreaktivitesinde azalma tespit edilirken, CAR ilavesi ile tekrar yükseldiği görüldü.

Karvakrol'ün birçok çalışmada olumlu etkilerinden bahsedilse de yaptığımız kontrollü çalışmada beklenenin aksine bir takım dalgalanmalara sebep olduğu görüldü. Bu dalgalanmaların nedeni mevcut verilerle tam olarak açıklanamazsa, tedavi edici doz belirlemeye yönelik yeni deneysel çalışmalar ile CAR'ın antioksidan özelliğinin tekrar sorgulanması gerektiğini düşünmekteyiz. Ayrıca diğer enerji düzenleyici moleküller üzerindeki etkisinin araştırılması büyük katkı sağlayacaktır

Sonuç olarak, FA'nın oluşturduğu doku hasarının yanı sıra, enerji metabolizmasında düzenleyici rol oynayan ASP ve SUB gibi hormon ve proteinleri olumsuz etkilediği, antioksidan özellikleri ile bilinen CAR'ın uygun dozlarının FA kaynaklı tüm yıkıcı etkilere karşı yararlı olduğu, yüksek dozlarının ise zararlı olabileceği söylenebilir.

Gelecekte yapılacak ileri ve kapsamlı çalışmalar ile elde edilecek bulgular ışığında, özellikle işi gereği FA'ya sıklıkla maruz kalan bireylerde oluşan zararlı etkileri azaltmak amacı ile uygun doz CAR'ın tek başına veya diğer antioksidan maddelerle kombinlenerek uygulanmasının faydalı olabileceği kanaatindeyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Gong Y, Wei Y, Cheng J, *et al.* Health risk assessment and personal exposure to Volatile Organic Compounds (VOCs) in metro carriages - A case study in Shanghai, China. *Sci Total Environ* 2017; 574: 1432-1438.
2. Zararsız İ, Kuş İ, Yılmaz HR, Köse E, Sarsılmaz M. Deneyisel formaldehit toksisitesi sonucu hipokampusta oluşan doku hasarına karşı omega-3 yağ asitlerinin antioksidan etkileri. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi* 2008; 22: 59-64.
3. Kaden DA, Mandin C, Nielsen GD, Wolkoff P. Formaldehide. In: World Health Organization. WHO Guidelines For Indoor Air Quality: Selected Pollutants. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe 2010: 103-156.
4. Zararsız İ, Kuş İ, Çolakoğlu N ve ark. Formaldehit maruziyeti sonucu sıçan akciğerinde oluşan oksidatif hasara karşı melatonin hormonunun koruyucu etkisi: Işık mikroskopik ve biyokimyasal çalışma. *Van Tıp Dergisi* 2004; 11: 105-112.
5. Shaham J, Bomstein Y, Meltzer A, *et al.* DNA-protein crosslinks, a biomarker of exposure to formaldehyde—in vitro and in vivo studies. *Carcinogenesis* 1996; 17: 121-125.
6. Schlink K, Janssen K, Nitzsche S, *et al.* Activity of O6-methylguanine DNA methyltransferase in mononuclear blood cells of formaldehyde-exposed medical students. *Arch Toxicol* 1999; 73: 15-21.
7. Liu T, Bai XT. Effect of formaldehyde on energy metabolism in postnatal rat cortex neurons in culture. *Wei Sheng Yan Jiu* 2005; 34: 275-277.
8. Tan T, Zhang Y, Luo W, *et al.* Formaldehyde induces diabetes-associated cognitive impairments. *Faseb j* 2018; 32: 3669-3679.
9. Bakar E, Ulucam E, Cerkezayabekir 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: 1406-1415.
10. Kum S, Sandikci M, Eren U, Metin N. Effects of formaldehyde and xylene inhalations on fatty liver and kidney in adult and developing rats. *J Anim Vet Adv* 2010; 9: 396-401.
11. Tulpule K, Dringen R. Formaldehyde in brain: an overlooked player in neurodegeneration. *J Neurochem* 2013; 127: 7-21.
12. Salthammer T, Mentese S, Marutzky R. Formaldehyde in the indoor environment. *Chem Rev* 2010; 110: 2536-2572.
13. Freeman E. "OTC Employees and Formaldehyde Exposure: Industrial Indiscipline or Corporate Irresponsibility". <https://www.theperspective.org/formaldehyde.html> 20.09.2021
14. Gilbert M. *Brydson's Plastics Materials*. 8th Edition. England: Butterworth-Heinemann 2017.
15. Smith AE. Formaldehyde. *Occup Med* 1992; 42: 83-88.
16. Report of the federal panel on formaldehyde. *Environ Health Perspect* 1982; 43: 139-168.

17. Koplan JP. U.S. Toxicological profile for formaldehyde, agency for toxic substances and disease registry division of toxicology/toxicology information branch, Georgia, 1999. <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp111.pdf> 20.09.2021
18. Trocho C, Pardo R, Rafecas I, *et al.* Formaldehyde derived from dietary aspartame binds to tissue components in vivo. *Life Sci* 1998; 63: 337-349.
19. Bruinen de Bruin Y, Koistinen K, Kephelopoulos S, *et al.* Characterisation of urban inhalation exposures to benzene, formaldehyde and acetaldehyde in the European Union: comparison of measured and modelled exposure data. *Environ Sci Pollut Res Int* 2008; 15: 417-430.
20. Interim acute exposure guideline levels (AEGs) for formaldehyde. https://www.epa.gov/sites/default/files/2014-07/documents/formaldehyde_tsd_interim_07_2008.v1_0.pdf 20.09.2021
21. Alam N. Post-harvest fishery losses and mitigation measure. In: Alam N, Toxic chemicals in fish in Bangladesh: AU Department of Fisheries Technology, 2014.
22. Feron VJ, Til HP, Vrijer F, *et al.* Aldehydes: occurrence, carcinogenic potential, mechanism of action and risk assessment. *Mutat Res* 1991; 259: 363-385.
23. Godish T. Formaldehyde exposures from tobacco smoke: a review. *Am J Public Health* 1989; 79: 1044-1045.
24. Bernstein RS, Stayner LT, Elliott LJ, *et al.* Inhalation exposure to formaldehyde: an overview of its toxicology, epidemiology, monitoring, and control. *Am Ind Hyg Assoc J* 1984; 45: 778-785.
25. Groot AC, Veenstra M. Formaldehyde-releasers in cosmetics in the USA and in Europe. *Contact Dermatitis* 2010; 62: 221-224.
26. Tang X, Bai Y, Duong A, *et al.* Formaldehyde in China: Production, consumption, exposure levels, and health effects. *Environ Int* 2009; 35: 1210-1224.
27. Kriebel D, Sama SR, Cocanour B. Reversible pulmonary responses to formaldehyde. A study of clinical anatomy students. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148: 1509-1515.
28. Cohen BI, Pagnillo MK, Musikant BL, Deutsch AS. Formaldehyde evaluation from endodontic materials. *Oral Health* 1998; 88: 37-39.
29. Leppla SH, Robbins JB, Schneerson R, Shiloach J. Development of an improved vaccine for anthrax. *J Clin Invest* 2002; 110: 141-144.
30. Jentoft JE, Jentoft N, Gerken TA, Dearborn DG. ¹³C NMR studies of ribonuclease A methylated with [¹³C] Formaldehyde. *J Biol Chem* 1979; 254: 4366-4370.
31. Gold TB, Smith SL, Digenis GA. Studies on the influence of pH and pancreatin on ¹³C-formaldehyde-induced gelatin cross-links using nuclear magnetic resonance. *Pharm Dev Technol* 1996; 1: 21-26.
32. T.C. Sağlık Bakanlığı, Sağlık hizmetleri genel müdürlüğü. Formaldehit ve ksilen ölçüm standartları hakkında genelge <https://shgmtetikikdb.saglik.gov.tr/Eklenti/2526/0/genelge-20145formaldehitksilenpdf.pdf> 20.09.2021

33. Sapmaz HI. Solunan formaldehitin sıçanlarda humoral immünite üzerine etkilerinin incelenmesi. Tıpta Uzmanlık Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, Anatomi Anabilim Dalı, 2010.
34. Clary JJ, Sullivan JB. Formaldehyde. Clinical Environmental Health and Toxic Exposures. 2nd Edition, Philadelphia, ABD: Williams & Wilkins, 1999.
35. Restani P, Galli CL. Oral toxicity of formaldehyde and its derivatives. Crit Rev Toxicol 1991; 21: 315-328.
36. Imbus HR. Clinical evaluation of patients with complaints related to formaldehyde exposure. J Allergy Clin Immunol 1985; 76: 831-840.
37. Aktaş H. Mersin ili patoloji laboratuvarları çalışanlarında formaldehit maruziyeti ile bellek arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi. Tıpta Uzmanlık Tezi. Mersin: Mersin Üniversitesi, Halk Sağlığı Anabilim Dalı, 2016.
38. Lu Z, Li CM, Qiao Y, Yan Y, Yang X. Effect of inhaled formaldehyde on learning and memory of mice. Indoor Air 2008; 18: 77-83.
39. Taskinen H, Kyyrönen P, Hemminki K, *et al.* Laboratory work and pregnancy outcome. J Occup Med 1994; 36: 311-319.
40. Ward JB, Hokanson JA, Smith ER, *et al.* Sperm count, morphology and fluorescent body frequency in autopsy service workers exposed to formaldehyde. Mutat Res 1984; 130: 417-424.
41. Thrasher JD, Kilburn KH. Embryo toxicity and teratogenicity of formaldehyde. Arch Environ Health 2001; 56: 300-311.
42. Bolt HM. Experimental toxicology of formaldehyde. J Cancer Res Clin Oncol 1987; 113: 305-309.
43. Upreti RK, Farooqui MY, Ahmed AE, Ansari GA. Toxicokinetics and molecular interaction of [14C]-formaldehyde in rats. Arch Environ Contam Toxicol 1987; 16: 263-273.
44. Auerbach C, Moutschen-Dahmen M, Moutschen J. Genetic and cytogenetical effects of formaldehyde and related compounds. Mutat Res 1977; 39: 317-361.
45. WHO. A review of human carcinogens. Part F: Chemical agents and related occupations. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon, France, 2012.
46. Nelson N, Levine RJ, Albert RE, *et al.* Contribution of formaldehyde to respiratory cancer. Environ Health Perspect 1986; 70: 23-35.
47. 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.
48. Veraldi A, Costantini AS, Bolejack V, *et al.* Immunotoxic effects of chemicals: A matrix for occupational and environmental epidemiological studies. Am J Ind Med 2006; 49: 1046-1055.
49. Bigazzi PE. Autoimmunity induced by chemicals. J Toxicol Clin Toxicol 1988; 26: 125-156.

50. Zararsiz I, Sarsilmaz M, Tas U, *et al.* Protective effect of melatonin against formaldehyde-induced kidney damage in rats. *Toxicol Ind Health* 2007; 2: 573-579.
51. 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.
52. Hauptmann M, Lubin JH, Stewart PA, Hayes RB, Blair A. Mortality from solid cancers among workers in formaldehyde industries. *Am J Epidemiol* 2004; 159: 1117-1130.
53. Zararsız İ, Sarsılmaz M, Sönmez MF ve ark. Kadavra Tespitinde Kullanılan Formaldehitin Sıçan Karaciğerinde Oluşturduğu Hasar ve Buna Omega-3 Yağ Asitlerinin Etkisi. *Fırat Tıp Dergisi* 2005; 10 103-107.
54. Beall JR, Ulsamer AG. Formaldehyde and hepatotoxicity: a review. *J Toxicol Environ Health* 1984; 14: 1-21.
55. Eşrefoğlu M. Embriyoloji. 1. Baskı, İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi, 2017.
56. Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K. Prometheus LernAtlas der Anatomie, vol. 2. 3rd Edition, Stuttgart Germany: Thieme Georg Verlag, 2018.
57. Schoenwolf G, Bleyl S, Brauer P, West PF. Larsen's human embryology. 5th Edition, New York; Edinburg: Churchill Livingstone, 2014.
58. Sadler TW. Langman's Medical Embryology, 14th Edition, Philadelphia: Wolter Kluwer Lippincott Williams & Wilkins, 2010.
59. Arıncı K, Elhan A. Anatomi, 6. Baskı, Ankara: Güneş Tıp Kitabevler, 2016.
60. Eşrefoğlu M. Özel Histoloji, 2.Baskı, İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi, 2016.
61. Arifoğlu Y. Her Yönüyle Anatomi, 3. Baskı, İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi, 2021.
62. Ovalle WK, Nahirney PC. Netter's Essential Histology. Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P (Çeviren). 1. Baskı, Ankara: Güneş Tıp Kitabevi, 2009.
63. Gartner LP, Hiatt JL. Color textbook of histology, 3nd Edition, Edinburg: Saunders, 2007.
64. Gökmen FG. Sistemik Anatomi, 1. Baskı, İzmir: İzmir Güven Kitabevi, 2003.
65. Sancak B, Cumhuri M. Fonksiyonel Anatomi (Baş Boyun ve İç Organlar), 8.Baskı, Ankara: ODTU Yayıncılık, 2014.
66. Yıldırım M. Resimli Sistematik Anatomi, 1. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2013.
67. Jaeschke H, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ. Superoxide generation by Kupffer cells and priming of neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Free Radic Res Commun* 1991; 15: 277-284.
68. Jaeschke H, Farhood A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol* 1991; 260: 355-362.

69. Cichoż-Lach H, Michalak A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 8082-8091.
70. Izadi F, Farrokhzad A, Tamizifar B, Tarrahi MJ, Entezari MH. Effect of sour tea supplementation on liver enzymes, lipid profile, blood pressure, and antioxidant status in patients with non-alcoholic fatty liver disease: A double-blind randomized controlled clinical trial. *Phytother Res* 2021; 35: 477-485.
71. Rašković A, Milanović I, Pavlović N, *et al.* Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. *BMC Complement Altern Med* 2014; 14: 225.
72. Zhao H, Li H, Lai Q, *et al.* Antioxidant and hepatoprotective activities of modified polysaccharides from *coprinus comatus* in mice with alcohol-induced liver injury. *Int J Biol Macromol* 2019; 127: 476-485.
73. Nawar WW. Lipids. In: Food Chemistry, OR Fennema (Editors). New York: Marcel Dekker Inc, 1996.
74. Diplock AT. Healthy lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. ILSI Europe concise monograph series. Scientific Research 1998.
75. Koca N, Karadeniz F. Serbest radikal oluşum mekanizmaları ve vücuttaki antioksidan savunma sistemleri. *Gıda Mühendisliği Dergisi* 2003; 16: 32-37.
76. Elliot JG. Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. *Food Tech* 1999; 53: 46-48.
77. Esrefoglu M. Cell injury and death: Oxidative stress and antioxidant defense system: Review. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2009; 29: 1660-1676.
78. Kuş İ, Zararsız İ, Yılmaz HR, *et al.* Sıçan prefrontal korteksinde formaldehit maruziyetiyle oluşan oksidatif hasara karşı melatonin gormonunun koruyucu etkisi. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 2004; 13: 1-7.
79. Karabulut H, Gulay MŞ. Antioksidanlar. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2016; 1: 65-65.
80. González-Burgos E, Gómez-Serranillos MP. Terpene compounds in nature: a review of their potential antioxidant activity. *Curr Med Chem* 2012; 19: 5319-5341.
81. Suntres ZE, Coccimiglio J, Alipour M. The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2015; 55: 304-318.
82. Baser KHC. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Curr Pharm Des* 2008; 14: 3106-3119.
83. Aristatile B, Al-Numair KS, Veeramani C, Pugalendi KV. Antihyperlipidemic effect of carvacrol on D-galactosamine-induced hepatotoxic rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2009; 20: 15-27.
84. Aydın S, Baser KHC, Ozturk Y. The chemistry and pharmacology of origanum (Kekik) Water. Conference: Proceeding of the 27th International Symposium on Essential Oils, 8-11 September 1996, Vienna, Austria, Eds. Ch.Franz, A.Mathe and G.Buchbauer, p. 52-60, At: Vienna, Austria 1997.

85. Alma MH, Mavi A, Yildirim A, Digrak M, Hirata T. Screening chemical composition and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *Origanum syriacum* L. growing in Turkey. *Biol Pharm Bull* 2003; 26: 1725-1729.
86. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int J Food Microbiol* 2004; 94: 223-253.
87. Yin HB, Chen CH, Kollanoor-Johny A, Darre MJ, Venkitanarayanan K. Controlling *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production in poultry feed using carvacrol and trans-cinnamaldehyde. *Poult Sci* 2015; 94: 2183-2190.
88. Coccimiglio J, Alipour M, Jiang ZH, Gottardo C, Suntres Z. Antioxidant, antibacterial, and cytotoxic activities of the ethanolic *origanum vulgare* extract and its major constituents. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016: 1404505.
89. Wang P, Luo Q, Qiao H, *et al.* The neuroprotective effects of carvacrol on ethanol-induced hippocampal neurons impairment via the antioxidative and antiapoptotic pathways. *Oxid Med Cell Longev* 2017; 2017: 4079425.
90. Yuan G, Lv H, Yang B, Chen X, Sun H. Physical Properties, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Chitosan Films Containing Carvacrol and Pomegranate Peel Extract. *Molecules* 2015; 20: 11034-11045.
91. Bakır M, Geyikoglu F, Colak S, *et al.* The carvacrol ameliorates acute pancreatitis-induced liver injury via antioxidant response. *Cytotechnology* 2016; 68: 1131-1146.
92. Higuera L, López-Carballo G, Cerisuelo JP, Gavara R, Hernández-Muñoz P. Preparation and characterization of chitosan/HP- β -cyclodextrins composites with high sorption capacity for carvacrol. *Carbohydr Polym* 2013; 97: 262-268.
93. Luna A, Lábague MC, Zygadlo JA, Marin RH. Effects of thymol and carvacrol feed supplementation on lipid oxidation in broiler meat. *Poult Sci* 2010; 89: 366-370.
94. Rao A, Zhang Y, Muend S, Rao R. Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 5062-5069.
95. Ahmad A, Khan A, Akhtar F, *et al.* Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011; 30: 41-50.
96. Zhang J, Ma S, Du S, Chen S, Sun H. Antifungal activity of thymol and carvacrol against postharvest pathogens *Botrytis cinerea*. *J Food Sci Technol* 2019; 56: 2611-2620.
97. Tang X, Chen S, Wang L. Purification and identification of carvacrol from the root of *Stellera chamaejasme* and research on its insecticidal activity. *Nat Prod Res* 2011; 25: 320-325.
98. Gilling DH, Kitajima M, Torrey JR, Bright KR. Antiviral efficacy and mechanisms of action of oregano essential oil and its primary component carvacrol against murine norovirus. *J Appl Microbiol* 2014; 116: 1149-1163.
99. Andersen A. Final report on the safety assessment of sodium p-chloro-m-cresol, p-chloro-m-cresol, chlorothymol, mixed cresols, m-cresol, o-cresol, p-cresol, isopropyl cresols, thymol, o-cymen-5-ol, and carvacrol. *Int J Toxicol* 2006; 25 Suppl 1: 29-127.

100. Xu H, Delling M, Jun JC, Clapham DE. Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. *Nat Neurosci* 2006; 9: 628-635.
101. Koparal AT, Zeytinoglu M. Effects of carvacrol on a human non-small cell lung cancer (NSCLC) cell line, A549. *Cytotechnology* 2003; 43: 149-154.
102. Arunasree KM. Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231. *Phytomedicine* 2010; 17: 581-588.
103. Fan K, Li X, Cao Y, *et al.* Carvacrol inhibits proliferation and induces apoptosis in human colon cancer cells. *Anticancer Drugs* 2015; 26: 813-823.
104. Bhakkiyalakshmi E, Suganya N, Sireesh D, *et al.* Carvacrol induces mitochondria-mediated apoptosis in HL-60 promyelocytic and Jurkat T lymphoma cells. *Eur J Pharmacol* 2016; 772: 92-98.
105. Dai W, Sun C, Huang S, Zhou Q. Carvacrol suppresses proliferation and invasion in human oral squamous cell carcinoma. *Onco Targets Ther* 2016; 9: 2297-2304.
106. Peixoto-Neves D, Silva-Alves KS, Gomes MDM, *et al.* Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. *Fundam Clin Pharmacol* 2010; 24: 341-350.
107. Testai L, Chericoni S, Martelli A, *et al.* Voltage-operated potassium (Kv) channels contribute to endothelium-dependent vasorelaxation of carvacrol on rat aorta. *J Pharm Pharmacol* 2016; 68: 1177-1183.
108. Karkabounas S, Kostoula OK, Daskalou T, *et al.* Anticarcinogenic and antiplatelet effects of carvacrol. *Exp Oncol* 2006; 28: 121-125.
109. Uyanoglu M, Canbek M, Aral E, Baser KHC. Effects of carvacrol upon the liver of rats undergoing partial hepatectomy. *Phytomedicine* 2008; 15: 226-229.
110. Canbek M, Uyanoglu M, Bayramoglu G, *et al.* Effects of carvacrol on defects of ischemia-reperfusion in the rat liver. *Phytomedicine* 2008; 15: 447-452.
111. Guimarães AG, Xavier MA, de Santana MT, *et al.* Carvacrol attenuates mechanical hypernociception and inflammatory response. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2012; 385: 253-263.
112. Souza ACA, Abreu FF, Diniz LRL, *et al.* The inclusion complex of carvacrol and beta-cyclodextrin reduces acute skeletal muscle inflammation and nociception in rats. *Pharmacol Rep* 2018; 70: 1139-1145.
113. Melo FHC, Rios ERV, Rocha NFM, *et al.* Antinociceptive activity of carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice. *J Pharm Pharmacol* 2012; 64: 1722-1729.
114. Parnas M, Peters M, Dadon D, *et al.* Carvacrol is a novel inhibitor of *Drosophila* TRPL and mammalian TRPM7 channels. *Cell Calcium* 2009; 45: 300-309.
115. Aarts M, Iihara K, Wei WL, *et al.* A key role for TRPM7 channels in anoxic neuronal death. *Cell* 2003; 115: 863-877.
116. Gommers LMM, Hill TG, Ashcroft FM, Baaij JHF. Low extracellular magnesium does not impair glucose-stimulated insulin secretion. *PLoS One* 2019; 14: e0217925.

117. Liu Y, Wei J, Ma KT, *et al.* Carvacrol protects against diabetes-induced hypercontractility in the aorta through activation of the PI3K/Akt pathway. *Biomed Pharmacother* 2020; 125: 109825.
118. Szablewski L. Glucose transporters in healthy heart and in cardiac disease. *Int J Cardiol* 2017; 230: 70-75.
119. Hou N, Mai Y, Qiu X, *et al.* Carvacrol attenuates diabetic cardiomyopathy by modulating the PI3K/AKT/GLUT4 pathway in diabetic mice. *Front Pharmacol* 2019; 10: 998-998.
120. Cho S, Choi Y, Park S, Park T. Carvacrol prevents diet-induced obesity by modulating gene expressions involved in adipogenesis and inflammation in mice fed with high-fat diet. *J Nutr Biochem* 2012; 23: 192-201.
121. Spalletta S, Flati V, Toniato E, *et al.* Carvacrol reduces adipogenic differentiation by modulating autophagy and ChREBP expression. *PLoS One* 2018; 13: e0206894.
122. Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 1998; 78: 783-809.
123. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11: 327-332.
124. Wang Y, Qu H, Xiong X, *et al.* Plasma asprosin concentrations are increased in individuals with glucose dysregulation and correlated with insulin resistance and first-phase insulin secretion. *Mediators Inflamm* 2018; 2018: 9471583.
125. Aktas G, Sit M, Tekce H. New adipokines: Leptin, adiponectin and omentin. *Abant Medical Journal* 2013; 2: 56-62.
126. Lehr S, Hartwig S, Sell H. Adipokines: A treasure trove for the discovery of biomarkers for metabolic disorders. *Proteomics Clin Appl* 2012; 6: 91-101.
127. Romere C, Duerrschmid C, Bournat J, *et al.* Asprosin, a fasting-induced glucogenic protein hormone. *Cell* 2016; 165: 566-579.
128. Li ZY, Zheng SL, Wang P, *et al.* Subfatin is a novel adipokine and unlike Meteorin in adipose and brain expression. *CNS Neurosci Ther* 2014; 20: 344-354.
129. Ugur K, Aydin S. Saliva and blood asprosin hormone concentration associated with obesity. *Int J Endocrinol* 2019; 2019: 2521096.
130. Lee T, Yun S, Jeong JH, Jung TW. Asprosin impairs insulin secretion in response to glucose and viability through TLR4/JNK-mediated inflammation. *Mol Cell Endocrinol* 2019; 486: 96-104.
131. Duerrschmid C, He Y, Wang C, *et al.* Asprosin is a centrally acting orexigenic hormone. *Nat Med* 2017; 23: 1444-1453.
132. Zhang L, Chen C, Zhou N, Fu YM, Cheng XB. Circulating asprosin concentrations are increased in type 2 diabetes mellitus and independently associated with fasting glucose and triglyceride. *Clinica Chimica Acta* 2019; 489: 183-188.
133. Jung TW, Kim HC, Kim HU, *et al.* Asprosin attenuates insulin signaling pathway through PKC δ -activated ER stress and inflammation in skeletal muscle. *J Cell Physiol* 2019; 234: 20888-20899.

134. Yuan M, Li W, Zhu Y, Yu B, Wu J. Asprosin: A novel player in metabolic diseases. *Front endocrinol* 2020; 11: 64-64.
135. Hoffmann JG, Xie W, Chopra AR. Energy regulation mechanism and therapeutic potential of asprosin. *Diabetes* 2020; 69: 559-566.
136. Li EW, Shan HL, Chen LQ, *et al.* OLF734 mediates glucose metabolism as a receptor of asprosin. *Cell Metab* 2019; 30: 319-328.
137. Zhang ZB, Tan YZ, Zhu LW, *et al.* Asprosin improves the survival of mesenchymal stromal cells in myocardial infarction by inhibiting apoptosis via the activated ERK1/2-SOD2 pathway. *Life Sci* 2019; 231: 116554.
138. Acara AÇ, Güler A. Investigation of the relationship between asprosin levels and metabolic parameters observed in clinical follow-up in patients with type 2 diabetes. *The Journal of Basic and Clinical Health Sciences* 2019; 3: 128-133.
139. Elnagar A, El-Belbasi H, Rehan I, El-Dawy K. Asprosin: A novel biomarker of type 2 diabetes mellitus. *Slov Vet Res* 2018; 55: 333-347.
140. Wang M, Yin C, Wang L, *et al.* Serum asprosin concentrations are increased and associated with insulin resistance in children with obesity. *Ann Nutr Metab* 2019; 75: 205-212.
141. Wang CY, Lin TA, Liu KH, *et al.* Serum asprosin levels and bariatric surgery outcomes in obese adults. *Int J Obes* 2019; 43: 1019-1025.
142. Alan M, Gurlek B, Yilmaz A, *et al.* Asprosin: a novel peptide hormone related to insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol* 2019; 35: 220-223.
143. Li X, Liao M, Shen R, *et al.* Plasma asprosin levels are associated with glucose metabolism, lipid, and sex hormone profiles in females with metabolic-related diseases. *Mediators Inflamm* 2018; 2018: 7375294.
144. Nishino J, Yamashita K, Hashiguchi H, *et al.* Meteorin: a secreted protein that regulates glial cell differentiation and promotes axonal extension. *Embo j* 2004; 23: 1998-2008.
145. Li ZY, Song J, Zheng SL, *et al.* Adipocyte metnl antagonizes insulin resistance through PPAR γ signaling. *Diabetes* 2015; 64: 4011-4022.
146. Zheng SL, Li ZY, Song J, Liu JM, Miao CY. Metnl: a secreted protein with new emerging functions. *Acta Pharmacol Sin* 2016; 37: 571-579.
147. Jørgensen JR, Fransson A, Fjord-Larsen L, *et al.* Cometin is a novel neurotrophic factor that promotes neurite outgrowth and neuroblast migration in vitro and supports survival of spiral ganglion neurons in vivo. *Exp Neurol* 2012; 233: 172-181.
148. Rao RR, Long JZ, White JP, *et al.* Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis. *Cell* 2014; 157: 1279-1291.
149. Bae JY. Aerobic exercise increases meteorin-like protein in muscle and adipose tissue of chronic high-fat diet-induced obese mice. *Biomed Res Int* 2018; 2018: 6283932.
150. Dadmanesh M, Aghajani H, Fadaei R, Ghorban K. Lower serum levels of Meteorin-like/Subfatin in patients with coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus are

negatively associated with insulin resistance and inflammatory cytokines. PLoS One 2018; 13: e0204180.

151. Fadaei R, Dadmanesh M, Moradi N, *et al.* Serum levels of subfatin in patients with type 2 diabetes mellitus and its association with vascular adhesion molecules. Arch Physiol Biochem 2020; 126: 335-340.
152. Lee JH, Kang YE, Kim JM, *et al.* Serum Meteorin-like protein levels decreased in patients newly diagnosed with type 2 diabetes. Diabetes Res Clin Pract 2018; 135: 7-10.
153. Wang K, Li F, Wang C, *et al.* Serum levels of Meteorin-like (Metrnl) are increased in patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus and are associated with insulin resistance. Med Sci Monit 2019; 25: 2337-2343.
154. Chung HS, Hwang SY, Choi JH, *et al.* Implications of circulating Meteorin-like (Metrnl) level in human subjects with type 2 diabetes. Diabetes Res Clin Pract 2018; 136: 100-107.
155. AlKhairi I, Cherian P, Abu-Farha M, *et al.* Increased expression of Meteorin-like hormone in type 2 diabetes and obesity and its association with Irisin. Cells 2019; 8: 1283-1283.
156. Deniz R, Yavuzkir S, Ugur K, *et al.* Subfatin and asprosin, two new metabolic players of polycystic ovary syndrome. J Obstet Gynaecol 2021; 41: 279-284.
157. Yu W, Liu Q, Zhu S. Carvacrol protects against acute myocardial infarction of rats via anti-oxidative and anti-apoptotic pathways. Biol Pharm Bull 2013; 36: 579-584.
158. Aristatile B, Al-Assaf AH, Pugalendi KV. Carvacrol ameliorates the PPAR-A and cytochrome P450 expression on D-galactosamine induced hepatotoxicity rats. African journal of traditional, complementary, and alternative medicines : AJTCAM 2014; 11: 118-123.
159. Mahmoodi M, Amiri H, Ayoobi F, *et al.* Carvacrol ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis through modulating pro- and anti-inflammatory cytokines. Life Sci 2019; 219: 257-263.
160. Samarghandian S, Farkhondeh T, Samini F, Borji A. Protective effects of carvacrol against oxidative stress induced by chronic stress in rat's brain, liver, and kidney. Biochem Res Int 2016; 2016: 2645237.
161. Sivaranjani A, Sivagami G, Nalini N. Chemopreventive effect of carvacrol on 1,2-dimethylhydrazine induced experimental colon carcinogenesis. J Cancer Res Ther 2016; 12: 755-762.
162. Aydin S. A comparison of ghrelin, glucose, alpha-amylase and protein levels in saliva from diabetics. J Biochem Mol Biol 2007; 40: 29-35.
163. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. Clin Biochem 2004; 37: 277-285.
164. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. Clin Biochem 2005; 38: 1103-1111.

165. Motojima Y, Matsuura T, Yoshimura M, *et al.* Comparison of the induction of c-fos-eGFP and fos protein in the rat spinal cord and hypothalamus resulting from subcutaneous capsaicin or formalin injection. *Neuroscience* 2017; 356: 64-77.
166. 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: 223-229.
167. Jung WW, Kim EM, Lee EH, *et al.* Formaldehyde exposure induces airway inflammation by increasing eosinophil infiltrations through the regulation of reactive oxygen species production. *Environ Toxicol Pharmacol* 2007; 24: 174-182.
168. Merzoug S, Toumi ML. Effects of hesperidin on formaldehyde-induced toxicity in pregnant rats. *Excli j* 2017; 16: 400-413.
169. Köse E, Sarsilmaz M, Meydan S, *et al.* Solunum yoluyla formaldehit ve lavanta uygulanan sıçan testislerinin değerlendirilmesi; Bir histolojik çalışma. *Turgut Özal Tıp Dergisi* 2010; 3:169-173.
170. Yıldız E, Göze F. Kemelerde formaldehitin kemik iliği, deri, dalak, karaciğer, akciğer ve böbrek üzerine etkisinin histopatolojik olarak değerlendirilmesi. *Türk Patoloji Dergisi* 1997; 13: 57-59.
171. Wilmer JW, Woutersen RA, Appelman LM, Leeman WR, Feron VJ. Subchronic (13-week) inhalation toxicity study of formaldehyde in male rats: 8-hour intermittent versus 8-hour continuous exposures. *Toxicol Lett* 1989; 47: 287-293.
172. Wilmer JW, Woutersen RA, Appelman LM, Leeman WR, Feron VJ. Subacute (4-week) inhalation toxicity study of formaldehyde in male rats: 8-hour intermittent versus 8-hour continuous exposures. *J Appl Toxicol* 1987; 7: 15-16.
173. DüNDAR Y, Aslan R. Oksidan-antioksidan denge ve korunmasında vitaminlerin rolü. *Hayvancılık Araştırma Dergisi* 1999; 9: 32-39.
174. Suo L, Kang K, Wang X, *et al.* Carvacrol alleviates ischemia reperfusion injury by regulating the PI3K-Akt pathway in rats. *PLoS One* 2014; 9: e104043.
175. Gul ASD, Fadillioglu E, Karabulut I, Yesilyurt A, Delibasi T. The effects of oral carvacrol treatment against H2O2 induced injury on isolated pancreas islet cells of rats. *Islets* 2013; 5: 149-155.
176. Strubelt O, Younes M, Pentz R, Kühnel W. Mechanistic study on formaldehyde-induced hepatotoxicity. *J Toxicol Environ Health* 1989; 27: 351-366.
177. Kocaman N, Kuloğlu T. Expression of asprosin in rat hepatic, renal, heart, gastric, testicular and brain tissues and its changes in a streptozotocin-induced diabetes mellitus model. *Tissue Cell* 2020; 66: 101397.
178. Naiemian S, Naeemipour M, Zarei M, *et al.* Serum concentration of asprosin in new-onset type 2 diabetes. *Diabetol Metab Syndr* 2020; 12: 65-65.
179. Vural O. Deneysel metotreksat uygulanan sıçanların karaciğer dokularında asprosin immünreaktivitesi üzerine NAS (N-asetilsistein)'in etkilerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2019.

180. Türk A. Siklofosfamid uygulanan sıçanların karaciğer dokusunda asprosin immünreaktivitesi üzerine vitamin D'nin etkileri. Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2021.
181. Tok Ö. Tip 2 diyabet ve insülin direnci olan bireylerde beslenme ve egzersiz tedavisinin bazı serum miyokin ve adipokin düzeyleri üzerine etkisinin değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Ankara: Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2019.
182. Boström P, Wu J, Jedrychowski MP *et al.* A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* 2012; 481: 463-468.
183. Chen N, Li Q, Liu J, Jia S. Irisin, an exercise-induced myokine as a metabolic regulator: an updated narrative review. *Diabetes Metab Res Rev* 2016; 32: 51-59.

