

**T.C.
ADİYAMAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KARBON TETRAKLORÜRE MARUZ KALAN SIÇANLARA NAR
SUYUNUN ANTİOKSİDAN VE YAĞ ASİT METABOLİZMASI ÜZERİNE
ETKİSİ**

SEYDA ÇAĞRI BÜLBÜL

KİMYA ANABİLİM DALI

ADİYAMAN, 2021

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KARBON TETRAKLORÜRE MARUZ KALAN SIÇANLARA NAR SUYUNUN ANTİOKSİDAN VE YAĞ ASİT METABOLİZMASI ÜZERİNE ETKİSİ

Seyda Çağrı BÜLBÜL

Adıyaman Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Ahmet ÖZKAYA

Yıl : 2021, Sayfa sayısı: IX + 26

Jüri : Dr. Öğr. Üyesi Ahmet ÖZKAYA

Prof. Dr. Adnan KURT.

Doç.Dr. Mutafa DURGUN

Bu tez çalışmasında, sıçanlarda CCl_4 ile oluşturulan oksidatif strese karşı nar suyunun koruyucu etkileri araştırıldı. Çalışmada dört grup oluşturuldu. Bu gruplar; Kontrol grubu (K), Nar suyu grubu (N), CCl_4 (C) ve CCl_4 +Nar suyu (CN) grubudur. Nar suyu 4 ml/kg ve CCl_4 0.2 ml/100gr olarak uygulandı. Sıçanların karaciğer dokularında MDA, redükte GSH, AChE, GST, Ces ve yağ asit düzeyleri belirlendi. K grubuna göre C grubu MDA düzeyi artarken, Ces enzim aktive düzeyi azaldı. C grubuna göre CN grubu MDA düzeyi azalırken, Ces ve AChE enzim aktivite düzeyleri arttı. K grubuna göre C grubu Σ PUFA düzeyi azalırken, Σ MUFA düzeyi arttı. 20:4n6 düzeyi C grubunda azalırken, 16:0 yağ asit düzeyi arttı. Nar suyu etkisiyle doymamış ve doymuş yağ asitleri üzerinde pozitif etkiler gözlemlendi.

Sonuç olarak, CCl_4 ile oluşturulan oksidatif strese karşı nar suyunun antioksidan enzim sistemine ve yağ asit düzeyleri üzerine koruyucu etkileri olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: CCl_4 , MDA, Enzim Aktivitesi, Yağ Asitleri

ABSTRACT

MSc Thesis

EFFECTS OF POMEGRANATE JUICE ON ANTIOXIDANT AND FATTY ACID METABOLISM OF RATS EXPOSED TO CARBON TETRACHLORIDE

Seyda Çağrı BÜLBÜL

Adiyaman University
Graduate Education Institute
Department of Chemistry

Supervisor : Asst. Prof. Dr. Ahmet ÖZKAYA

Year : 2021, Number of pages: IX + 26

Jury : Asst. Prof. Dr. Ahmet ÖZKAYA
Prof. Dr. Adnan KURT
Doç. Dr. Mustafa DURGUN

In this thesis study, the protective effects of pomegranate juice against oxidative stress induced by CCl₄ in rats were investigated. Four groups were formed in the study. These groups are; Control group (K), Pomegranate juice group (N), CCl₄ (C) and CCl₄ + Pomegranate juice (CN) group. Pomegranate juice was administered at 4 ml/kg and also CCl₄ as 0.2 ml/100gr. MDA, reduced GSH, AChE, GST, Ces and fatty acid levels were determined in the liver tissues of rats. Compared to the K group, while C group MDA level increased, Ces enzyme activation level decreased. According to C group, while the MDA level of CN group decreased, Ces and AChE enzyme activity levels increased. While the level of Σ PUFA in group C decreased, the level of Σ MUFA increased compared to the K group. Also, compared to K group, the 20: 4n6 level decreased whereas the 16: 0 fatty acid level increased in the C group,. Positive effects on unsaturated and saturated fatty acids were observed with the effect of pomegranate juice.

As a result, we think that pomegranate juice has protective effects on antioxidant enzyme system and fatty acid levels against oxidative stress caused by CCl₄.

Keywords: CCl₄, MDA, Enzyme Activity, Fatty Acids

DESTEKLER

Bu tez çalışması Adıyaman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından Proje No: FEFYL/2019-0002 numaralı proje ile desteklenmiştir.



BEYAN

“Karbon Tetraklorüre Maruz Kalan Sıçanlara Nar Suyunun Antioksidan ve Yağ Asit Metabolizması Üzerine Etkisi” başlıklı tezimde çalışmaların tamamen akademik kurallara ve etik değerlere sadık kalınarak yürütüldüğünü ve yazımda yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu, ayrıca alıntılardan bilimsel etiğe uygun atıf yaparak yararlanmış olduğumu beyan ederim.

Seyda Çağrı BÜLBÜL

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve deneysel çalışmalarımın her aşamasında, bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren Değerli Danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Ahmet ÖZKAYA'ya, deneylerdeki yardımlarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Miraç UÇKUN'a ve Doç.Dr Ertan YOLOĞLU'na, tez yazımı sırasında desteklerini esirgemeyen hayat arkadaşım Sultan Köse'ye teşekkür ederim.

Seyda Çağrı BÜLBÜL

İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
ABSTRACT.....	II
DESTEKLER.....	III
BEYAN.....	IV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	IX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. CCl ₄ 'ün Zararları	2
2.2. Narın Özellikleri.....	3
2.3. Redükte Glutasyon.....	4
2.4. Glutasyon-S-Transferaz	5
2.5. Karboksilesteraz Enzimi	5
2.6. Asetilkolinesteraz Enzimi	5
2.7. Malondialdehit.....	6
2.8. Yağ asitleri.....	6
2.10. Çalışmanın Amacı	7
3. MATERYAL VE METOD	8
3.1. Kimyasal Maddeler ve Organik Çözücüler	8
3.2. İnceleme Materyali	8
3.3. Kullanılan Yardımcı Aletler ve Cihazlar	8
3.4. Deney Hayvanları	8
3.5. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	9
3.6. Homojenizasyon ve Santrifüj İşlemleri	9
3.7. GSH	10
3.8. GST Aktivitesi.....	10
3.9. MDA.....	10
3.10. Ces Aktivitesi	11
3.11. AChE Aktivitesi	11
3.12. Total Protein Analizi.....	11
3.13. Lipitlerin Ekstraksiyonu	12
3.14. Yağ Asidi Metil Esterlerinin Hazırlanması	12
4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	13
5. BULGULAR.....	14
6. TARTIŞMA	17
KAYNAKLAR	20
KİŞİSEL BİLGİLER	26

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 5.5 Beyin dokusu MDA ve enzim aktivite düzeyleri	14
Çizelge 5.6 Beyin dokusu yağ asit düzeyi	15



ŞEKİLLER DİZİNİ



SİMGELER VE KISALTMALAR

AChE	: Asetilkolinesteraz
Ces	: Karboksilesteraz
GSH	: Redükte Glutatyon
GSH-P _x	: Glutatyon Peroksidaz
GST	: Glutatyon-S-Transferaz
HCl	: Hidroklorik Asit
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
H ₂ SO ₄	: Sülfürik Asit
KHCO ₃	: Potasyum Bikarbonat
MDA	: Malondialdehit
NaCl	: Sodyum Klorür
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TBA	: Trikloroasetik Asit
TCA	: Thiobarbiturik Asit
CCl ₄	: Karbontetra klorür
6:0	: Kaproik Asit
11:0	: Undekanoik Asit
14:0	: Myristik Asit
15:0	: Pentadekanoik Asit
15:1	: Cis-10 Pentadekanoik Asit
16:0	: Palmitik Asit
16:1	: Palmitoleik Asit
18:0	: Stearik Asit
18:1n9c	: Oleik Asit
18:2n6c	: Linoleik Asit
18:3n3	: Alpha Linolenik Asit
18:3n6	: Gamma Linolenik Asit
20:3n6	: Cis-8, 11, 14-Eicosatrienoik Asit
20:4n6	: Araşidonik Asit
22:6n3	: Dokosahekzanoik Asit
22:0	: Behenik Asit
24:1	: Nervonik Asit

1. GİRİŞ

İnsanlar karbon tetraklorürü (CCl_4) endüstride yoğun şekilde kullanmaktadırlar. İnsan metabolizmasına solunum ve deri yolu ile giren CCl_4 ciddi hasarlara neden olmaktadır. Radikalik ve toksik özelliği çok yüksek olan CCl_4 hücrede amino asit, lipit ve protein sentezlerine olumsuz etkileri bilinmektedir. Özellikle karaciğer dokusunda ciddi hasarlar oluşturarak siroz hastalığına neden olur. CCl_4 hücrelerde serbest radikaller üretir. Bu radikaller hücrenin çoklu doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girerek hücreye zarar verir. Hücrede lipit peroksidasyonu artıran CCl_4 , antioksidan enzim sisteminde olumsuz etkilemektedir [1].

Nar meyvesi dünyada yaygın olarak tüketilmektedir. Nar kabuğu ve suyu içğinde bulunan polifenolik türevli maddelerin yüksek antioksidan özelliği mevcuttur. Nar suyu yapısında bulunan flavonoid türevli moleküllerin antiobezite, antihipertansif, kemoterapötik, antiinflamatuvar, antiaterosklerotik ve üreme sistemi üzerine faydalı etkileri bilinmektedir [2].

Bu tez çalışmasında, CCl_4 'e maruz bırakılan sıçan karaciğer dokuları üzerine nar suyunun antioksidan enzim sistemine ve yağ asit düzeylerine koruyucu etkileri araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER**2.1. CCl₄'ün Zararları**

CCl₄ endüstri alanında kullanılan sentetik bir kimyasaldır. CCl₄ uzun atmosferik yarı ömre sahip olup, özellikle boya ve söndürücülerde kullanılmaktadır [3]. Laboratuvar hayvanları üzerinde oksidatif hasar oluşturmak içinde kullanılmaktadır [4]. Karaciğer dokusu vücudumuzun en önemli ve en büyük organlarından. Karaciğer dokusu detoksifikasyon, protein sentezi ve sindirim işlemleri yapar. Hepatotoksik bileşikler metabolizmadaki organlara çok ciddi hasar vermektedir. Toksik bileşikler karaciğer dokusunda reaktif oksijen türleri üreterek lipid peroksidasyona neden olur [5,6]. Karaciğer dokusuna zarar veren toksik moleküllerden biride CCl₄'dür. CCl₄ molekülü karaciğer dokusunda triklorometil (•CCl₃) radikaline dönüşür. CCl₄ ilk olarak endoplazmik retikulumda sitokrom P-450'nin enzimatik indirgenmesi •CCl₃ 'le metobolize edilir. Daha sonra oksijen varlığında CCl₃O₂ 'ye dönüştürülür. Bu reaktifler CCl₄ 'ün ürettiği serbest radikallerdir ve hücrede çoklu doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girerek hücreye zarar verir. Hücrede artan lipid peroksidasyon sonucunda antioksidan enzim sistemi zarar görür [7]. Ayrıca, CCl₄ plazma membranında kalsiyum iyonu geçirgenliğini arttırması sonucunda, ciddi kalsiyum homeostaz bozukluğu ve nekrotik hücre ölümüne neden olur [8]. Endüstride yoğun olarak kullanılan CCl₄ solunum yolu ve deri yoluyla insan vücuduna girebilir. Ayrıca, sinir sisteminde olumsuz etkilemektedir. Baş ağrısı, koma ve ölüm gibi belirtiler ortaya çıkar. Metabolizmaya giren CCl₄ organlardaki aminoasit salınımının bozulmasına neden olur ve protein sentezini azaltır. Özellikle karaciğer dokusunda hücresel nekroz, fibrozis, yağ dejenerasyonu ve siroza yol açar [9]. Karaciğer hücrelerine zarar veren CCl₄, kan dolaşımına aspartat aminotransferaz (AST), alkalen fosfataz (ALP) ve alanin aminotransferaz (ALT) enzimlerinin salınımına sebep olmaktadır. CCl₄ hücrede oluşturduğu radikaller ile protein, lipid, nükleik asit gibi moleküllerle kovalent bağ yaparak yapıların bozulmasına neden olur [10]. CCl₄'ün oluşturduğu doku hasarlarına karşı birçok bitkilerdeki antioksidan moleküllerin etkileri olduğu rapor edilmiştir. Özellikle bitki içeriğindeki fenolik

asitler, flavonoidler, silymerin, vitamin C ve E gibi moleküllerin CCl₄'ün oluşturduğu hasarları azalttığı bildirilmiştir [11].

2.2 Narın Özellikleri

Punicaceae familyasından olan nar *Punica*, cinsine aittir. Narın en önemli türü ve yaygın olanı *Punica granatum*. Halk arasında yaygın olarak kullanılan narın birçok etkisi bilinmektedir. Özellikle ülser, ishal, dizanteri ve mikrobiyal enfeksiyonlar ve ateş düşürmede yaygın olarak kullanılmaktadır. Nar, dünyanın birçok yerinde yetiştiriciliği yapılmaktadır. Nar meyvesi dört ana katmandan oluşur. Bu yapılar; kabul, çekirdek, tane ve zar olarak belirtilmiştir. Narın fiziksel özellikleri üzerine birçok etki mevcuttur. Bunlar iklim, cins, yetiştirme koşulları gibi birçok etkisi vardır. Nar taneleri toplam yapının yaklaşık %50'sini teşkil eder. Nar tanesi içeriğinde ise %85 su, %10 şeker ve %1,5 pektin oluşturmaktadır. Nar tanelerinde ayrıca polifenoller, yağ, protein, karbonhidrat, lif, pektin, mineraller, vitaminler bulunmaktadır [12]. Nar yaygın olarak Hindistan, Güneydoğu Asya, Çin, Tropik Afrika, Doğu Hint Adaları, Malezya ve birçok dünya ülkelerinde yaygın olarak yetiştirilen bir meyvedir. Yapılan çalışmalarda nar ishal önleyici ajan olarak kullanılmıştır. Yapılan son çalışmalarda ise narın antioksidan aktivitesi yaygın olarak belirtilmiştir [13]. Nar kabuğu ve suyu içeriğinde çok miktarda polifenol ve flavonoid türevli maddeler mevcuttur [2,14,15,16]. Nar kabuğunun sıçan karaciğerlerinde fibroza karşı etkinliği bilinmektedir. Bu etkinin nar kabuğu içeriğinde bulunan maddelerden kaynaklandığı açıklanmıştır [17]. Ayrıca; nar kabuğunun sıçan karaciğerlerinde karaciğer fibrozu önlemelerini nar kabuğun antioksidan ve antifibrotik özelliğini gösterdiği bildirilmiştir [18]. Bazı şifalı bitkiler böbrek rahatsızlığı tedavisinde kullanılmaktadır. Nefroprotektif özelliklere sahip şifalı bitkilerin nefroprotektif ajanlarla birlikte toksisiteyi azaltabilmektedir. Nar kabuğu ekstresi antioksidan özellikler sağlar. Yapısında bulunan gallik asit, ellagik asit, ellagitanninler, kateşinler, gallotanninler, antosiyaninler, kuersetinler ve ferulik asitler gibi çeşitli fenolik bileşiklerin varlığında antioksidan ve oksidatif stresi azalttığı rapor edilmiştir. Narın yapısında bulunan polifenoller, serbest radikalleri temizlemede ve

lipid oksidasyonunu engellemede önemli roller oynar. Ayrıca narın antiinflamatuar ve antikanser özellikleri vardır [19]. Nar meyvesi, suyu ve kabuğu yapısında bulunan maddelerin antioksidan kapasiteye sahiptir. Bu özelliği nedeniyle antiobezite, antihipertansif ve prostat kanseri üzerine pozitif etkiler göstermiştir. Nar suyunun önemli etkilerinden biride erkek üreme sistemi üzerinedir. Erkek sıçanlarda nar suyu tüketiminin sperm kalitesini, spermatogenetik hücre yoğunluğunu, antioksidan aktiviteyi ve testosteron düzeylerini önemli düzeyde arttırdığı bildirilmiştir. Ayrıca nar suyunun kemopreventif, kemoterapötik, antiaterosklerotik ve antiinflamatuar etkileri gösterdiği rapor edilmiştir [20]. Türkiye’de “Hicaz nar” ve “Bey nar” çeşitleri ticari olarak üretilmektedir ve tüketimi oldukça yaygındır. Ayrıca, en fazla yetiştiriciliği yapılan nar ise Hicaz narıdır. Hicaz narının fiziksel özellikleri incelendiğinde kabukları kırmızı, meyve taneleri kırmızı-viole ve tadı tatlı mayhoştur. Narın tüketim çeşitliliği fazla olmasına rağmen, genel olarak taze şekilde tüketilmektedir. Ayrıca meyve suyu, sirke, nar ekşisi, hayvan yemi ve çeşitli ilaç hammaddeleri olarak kullanılmaktadır [21].

2.3. Redükte Glutasyon

Redükte Glutasyon (GSH); glutamik asit, sistein ve glisinden oluşur. GSH antioksidan savunma sisteminin en önemli bileşenlerindendir. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) enziminin substratı olup, hidrojen peroksiti (H_2O_2) ve diğer organik peroksitleri detoksifiye etmede görev alır. GSH, hücreleri serbest radikallere karşı korur. Ayrıca, DNA sentezinde ve hasarlı DNA parçalarının onarılmasında görev alır [22].

2.4. Glutasyon-S-Transferaz

GST'ler kataliz reaksiyonlarında, elektrofilik substratlar üzerine GSH tripeptidin nükleofilik atağını kataliz ederler. GST oksidasyonla oluşan ürünlerin ya da dışarıdan alınan yabancı toksik maddelerin, vücutta bulunan diğer makromoleküller ile birleşmesini önleyip, hücre komponentlerine zarar vermeden atılmasını sağlarlar. GST hücreyi lipid peroksidasyonundan korumaktadır. Hücredeki GST enzimi pestisit, ilaçlar, kanserojenler ve elektrofilik ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda önemli bir role sahiptirler [23, 24].

2.5. Karboksilesteraz ve Asetilkolinesteraz Enzimi

Karboksilesteraz (Ces) ve Asetilkolinesteraz (AChE) enzimi esteraz enzim grubunda bulunmaktadır. Vücudumuzda biyolojik fonksiyonları farklı olan AChE, butilkolin esteraz, karboksilesteraz (Ces), kolosterolkolesterol esteraz gibi esteraz enzimleri bulunmaktadır. Bu enzimler tarafından üretilen metabolitlerdeki değişimler birçok hastalığa neden olmaktadır. Ces enzimi önemli bir detoksifikasyon enzim grubundadır. Ces enzimi esteril, amidlerin ve tiyoesterin hidrolizini katalize eden esteraz süper ailesinin bir üyesidir. Bu enzim özellikle memelilerin karaciğerlerinde yoğun olarak bulunmaktadır. Ayrıca, birçok ilaç ve ksenobiyotiklerin ekspresyonları üzerine etkileri vardır [25]. Asetilkolinesteraz enzimi (AChE) dokularda serbest ya da fosfolipidlerle bileşik halinde bulunan asetilkolini hidrolizleyen bir enzimdir. Özellikle karaciğerde ve beyin dokularında oluşur. AChE enzimi eritrositlerde, karaciğerde, dalakta, sinir uçlarında, beyinde bulunur. AChE enzimi asetilkolini kolin ve asetata dönüştürür. Esteraz enzimleri hücre yenilenmesi, çeşitli etkenler sonucunda oluşan strese yanıt oluşumunda da rol oynamaktadır [26].

2.7. Malondialdehit

Malondialdehit (MDA), doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı sonucu oluşan bir üründür. Hücrede en çok araşidonik asit (20:4n6) ve dokosaheksanoik (20:6n3) asitin etkilendiği bilinmektedir. Ayrıca, oleik asit (18:1n9c) ve linoleik asitin (18:2n6c) oksidasyonu sonucunda da çok az miktarda MDA oluşmaktadır. MDA ölçümü ile lipid peroksidasyon değerlendirilmesi yapılabilir. MDA'nın artması sonucunda hücre membran geçirgenliği arttırdığı, hücre içi iyon dengesinin bozulduğu, enzim aktivitelerinin değiştiği, DNA'nın yapısında kırılmalara olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle MDA'nın ölçülmesi, lipid peroksidasyon düzeyinin belirteci olarak kabul edilir [27].

2.8. Yağ asitleri

Yağ asitlerin yapısında, zincirin bir ucunda karboksil grubu, diğer ucunda metil grubu ve ortada ise değişik uzunlukta hidrokarbonlar bulunur. Hücre yapısı kompenetlerindendir. Çift bağ içermeyen yağ asitlerine doymuş yağ asitleri denir. Bitki ve hayvanlarda en önemli yağ asit bileşeni palmitik asit(16:0) ve stearik asittir (18:0). Bir çift bağı olan yağ asitlerine tekli doymamış yağ asitleri olarak tanımlanır ve bu özellikteki yağ asitlerin toplamına MUFA denir. En önemlileri palmitoleik (16:1) ve 18:1n9 yağ asitleridir. Yapısında birden fazla çift bağ içeren yağ asitlerine çoklu doymamış yağ asitleri denir ve bu özellikli yağ asitlerin toplamına ise PUFA olarak belirtilir. Bitki ve hayvan aleminde yağ asitleri önemli yer tutmaktadır [28].

2.10. Çalışmanın Amacı

CCl_4 insan metabolizmasına ciddi zarar vermektedir. Özellikle karaciğer dokusunda oluşturduğu hasarlar sonucunda biyomoleküllerde değişimler ve bozulmalar gözlenmektedir. Nar suyu insanların yoğun olarak kullandığı ve antioksidan moleküller bakımından zengin olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada CCl_4 'ün oluşturduğu oksidatif strese ve toksisiteye karşı nar suyunun sıçan karaciğer dokuları üzerine etkileri araştırılması yapıldı. Çalışmada, sıçan karaciğer dokusu antioksidan enzim sistemi ve yağ asitleri metabolizmasındaki değişimler tespit edildi.

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Kimyasal Maddeler ve Organik Çözücüler

Metil alkol, izopropil alkol, n-hekzan, etil alkol, Tris-EDTA tamponu, EDTA- Na_2 , H_2SO_4 , HCl, tiobarbiturik asit, H_2O_2 , trikloroasetik asit, fosfat tamponu, redükte GSH, 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoik asit, fizyolojik su ve yağ asitleri standardı kullanıldı.

3.2. İnceleme Materyali

Deneyisel çalışmada, *Wistar albino* (260 ± 10 g) erkek sıçanların karaciğer dokuları incelendi.

3.3. Kullanılan Yardımcı Aletler ve Cihazlar

Homojenizatör, santrifüj, Gaz Kromatografisi (GC-FID) cihazı, Mikroplate Ataçmanlı UV/VIS cihazı, vorteks, otomatik pipetler, su banyosu, derin dondurucu (-80°C), santrifüj tüpleri.

3.4. Deney Hayvanları

Sıçanlar, Adıyaman Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim Uygulama ve Araştırma Merkezi (ADYÜ DEHAM)'nden temin edildi ve etik kurul bu kurumdan alındı (Etik Kurul No: 2019/25). Sıçanlar standart kafeslerde beslendi. Yemler, özel çelik kaplarda verilirken, su ise özel biberonlarda verildi. Sıçanların ortam sıcaklığı $22-25^\circ\text{C}$ arasında olup, 12 saat ışıklı ve 12 saat karanlık ortamda takip edildi. Araştırmada 28 adet yetişkin, 200-250 gr ağırlığında erkek *Wistar albino* sıçan kullanıldı. Çalışmada her grupta 7 sıçan kullanarak gerçekleştirildi. Kontrol grubu (K)

(Grup 1): Kontrol grubuna 6 hafta süresince haftada iki kez CCl_4 ün çözücüsü ve sonraki 30 gün boyunca serum fizyolojik (4 ml/kg) uygulaması yapıldı.

Nar suyu grubu (N) (Grup 2): 30 gün nar suyu 4 ml/kg olacak şekilde orogastik sonda ile her gün uygulaması yapıldı. Nar taneleri meyve sıkacağından geçirilerek nar suyu elde edildi. CCl_4 grubu (C) (Grup 3): CCl_4 %50 lik zeytinyağında hazırlanarak intraperitoneal olarak 0.2 ml/100gr dozda haftada 2 kez olmak üzere 6 hafta boyunca enjekte edildi. CCl_4 + Nar suyu grubu (CN) (Grup 4): 6 hafta CCl_4 intraperitoneal 0.2 ml/ 100gr dozda haftada 2 kez enjekte edildi ve sonraki 30 gün nar suyu 4 ml/kg orogastrik uygulaması her gün yapıldı. CCl_4 uygulaması İredale ve arkadaşlarının [29] ortaya koyduğu metoda göre yapıldı. Buna göre, uygulama grubuna % 50'lik CCl_4 zeytinyağında hazırlanarak intraperitoneal olarak 0,2 ml/100gr dozda haftada iki kez olmak üzere 6 hafta boyunca enjekte edildi. Süreç sonunda bireysel CCl_4 grubunun dokuları alındı. Kombinasyonlu grup (CCl_4 + Nar suyu) uygulanan 6 haftalık sürecin sonunda CCl_4 uygulaması sonlandırılıp 30 gün boyunca nar suyu 4ml/kg her gün ora gastrik yöntemle uygulaması yapıldı. Deneysel süreç sonunda alınan karaciğer dokuları biyokimyasal parametrelerin ölçümleri için $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ derin dondurucuda bekletildi.

3.5. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Karaciğer dokusu enzim aktiviteleri Thermo-3001 Mikroplate Ataçmanlı UV/VIS cihazında yapıldı. Her örnek cihazda üç defa okundu. Çalışmada incelenen enzimlerin aktiviteleri spesifik aktivite (nmol/dk/mg protein) olarak ifade edildi.

3.6. Homojenizasyon ve Santrifüj İşlemleri

Karaciğer dokuları çelik uçlu homojenizatörde 5000 rpm'de ve 30 saniye boyunca parçalandı. Homojenizasyon işlemi tartılan doku ağırlığının 4 katına hacmine karşılık gelecek şekilde tampon kullanıldı. Fosfat tamponu (0.1M pH: 7.4 olan potasyum fosfat tamponu içinde; 0.15 M KCl, 1 mM EDTA ve 1 mM DTT) içinde

homojenizasyon yapıldı. Homojenize edilmiş karaciğer dokuları ependorf tüplerine alındı. Ependorf tüpler 4 °C ve 16000xg devirde 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısımlarında enzim aktiviteleri ölçüldü.

3.7. GSH

Karaciğer dokuları GSH düzeyi, Thermo-3001 Mikroplate Ataçmanlı UV/VIS cihazında Sedlak ve Lindsay metodu kullanılarak 412 nm de analizleri yapıldı. Dokular %50 TCA (Trikloroasetik asit) ile çöktürüldü ve 5 dk 1000xg de santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlardan 0.5 ml alınarak üzerine 2 ml Tris-EDTA tamponu (0.2 M, pH: 8.9) ve 0.1 ml 0.01 M 5,5'-ditiyo-bis-2-nitrobenzoik asit ilave edildi. Karışım oda sıcaklığında 5 dk bekletildi. Sonra, cihazda 412 nm de absorbans değerleri ölçüldü [30]. GSH düzeyi nmol/mg protein olarak verildi.

3.8. GST Aktivitesi

GST enzim aktivitesi Habig ve arkadaşlarının belirttiği yöntemle göre Thermo-3001 Mikroplate Ataçmanlı UV/VIS cihazında yapıldı [31]. Analizde %96'lık etil alkol içinde hazırlanmış olan 20mM 1-kloro-2,4 dinitrobenzen (CDNB) substrat kullanıldı. Redükte GSH kofaktör olarak kullanıldı. 0.1 M pH:6,5 olan fosfat tamponundan 100 µl, 0.002M GSH çözeltisinden 100 µl ve CDNB çözeltisinden 10 µl 96'lık mikroluka kuyucuklarına çok kanallı otomatik pipetler ile pipetlendi. Örnekler 344 nm'de cihazada okutuldu. Sonuçlar nmol/min/mg protein olarak verildi.

3.9. MDA

MDA analizi Placer tarafından geliştirilen yöntemle göre Thermo-3001 Mikroplate Ataçmanlı UV/VIS cihazında yapıldı. 0.25 N HCl içerisinde %0.375 TBA ve %15 TCA çözeltisi kullanıldı. Karaciğer doku örneklerinde MDA miktarları 532

nm’de okunan absorbans değerleri yardımıyla bulundu. Sonuçlar nmol/mg protein doku olarak kaydedildi [32].

3.10. Ces Aktivitesi

Ces enzimin aktivitesi ölçümünde substrat olarak %96’lık etil alkol içinde hazırlanan 26 mM p-nitrofenol (PNPA) kullanıldı. Reaksiyon çözeltisi, 5 µl örnek ve 0.05 M trizma pH: 7,4 olan çözeltiden 250 µl içermektedir. Bu karışım 25 °C’de ön inkübasyona bırakıldı. İşlemin son basamağında çözeltinin son konsantrasyonu 0.5 mM olacak şekilde 5 µl PNPA ilave edildi ve spektrofotometrede 405 nm’de absorbans değişimleri okundu [33,34]. Bu değerler yardımıyla karboksilesteraz aktivitesi tespit edildi. Enzim aktivite ölçümüne Thermo-3001 Mikroplate Ataçmanlı UV/VIS cihazında yapıldı. Sonuçlar nmol/min/mg protein olarak verildi.

3.11. AChE Aktivitesi

AChE enzim aktivitesi Ellman vd. (1961) tarafından belirtilen [35] ve Özmen vd. (1988) tarafından modifiye edilen yöntemle göre yapıldı [36]. AChE enzim aktivitesi Thermo-3001 Mikroplate Ataçmanlı UV/VIS cihazında ölçüldü. Substrat olarak asetilkolin iodid (ACTI) kullanıldı. Mikroplaka kuyucuklarının içerisine 10 µl süpernatant konuldu. Üzerine 0.701 mM ACTI ve pH:8 olan 0.1 M trizma çözeltisi içinde hazırlanmış 0.136 mM DTNB çözeltisinden 200 µl ilave edildi. Karışım 412 nm dalga boyunda cihazda okundu ve absorbans değişimleri tespit edildi. Sonuçlar nmol/min/mg protein olarak verildi.

3.12. Total Protein Analizi

Örneklerin total protein analizi Bradford’a göre yapıldı [37]. Sonuçlar mg protein olarak verildi. Tüm analizler üç tekrar ile yapıldı.

3.13. Lipitlerin Ekstraksiyonu ve Yağ Asidi Metil Esterlerinin Hazırlanması

Karaciğer dokularında lipit ekstraksiyonu Hara-Radin metoduna göre yapıldı [38]. Doku örneklerinden 1 g alınarak homojenizasyon tüpü içerisine alınarak 3:2 (v/v) hekzan- izopropanol karışımından 5 ml eklendi. Örnekler 30 sn homojenize edildi. Numuneler santrifüj tüplerine alınarak 4500 rpm'de 10 dk süreyle santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra süpernatant kısmı metilleştirme işlemi için tüplere alındı. Üzerine %2'lik metanolik sülfirik asitten 5 ml ilave edildi ve karışım 50 °C lik su banyosunda 15 saat süre ile metilleşmeye bırakıldı [39]. Tüpler su banyosundan çıkarılarak oda sıcaklığına kadar soğutuldu. Üzerine 5 ml %5 lik NaCl ve 5 ml hekzan ilave edilerek ekstraksiyon işlemi yapıldı. Hekzan fazı pipetle alındı ve üzerine 5 ml %2 lik KHCO_3 ile muamele edildi. Hekzan fazı deney tüpüne alındı. Hekzan fazı uzaklaştırıldıktan sonra yağ asit metillerinin üzerine 2 ml hekzan ilave edildi. Viale alınan yağ asitlerini içeren hekzan fazındaki numune Shimadzu QP 2010 Ultra Gaz Kromatografisi cihazında ve Restek Rtx 2330 kolonunda okuması gerçekleştirildi.

4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel değerlendirme SPSS 20,0 programı ile gerçekleştirildi. Oluşturulan grupların arasındaki karşılaştırmada Varyans analizi olarak ANOVA kullanıldı. Grupların arasındaki farklılıklar TUKEY testi ile tespit edildi ve standart sapma olarak standart error (SE) alındı.



5. BULGULAR

Çizelge 1. Karaciğer Dokusu MDA ve Enzim Aktivite Düzeyleri

Parametreler	K	N	C	CN
MDA (nmol/mg protein)	0.094±0,008	0.088±0,005 ^x	0.131±0.011 ^a	0.092±0.007 ^x
GSH (μmol/mg protein)	0,112±0,005216	0,145±0,011 ^{az}	0,085±0,005 ^a	0,108±0,007 ^x
Ces (nmol/min/mg protein)	1273,468±46,317	1346,852±121,031 ^z	728,251±48,773 ^c	1478,539±102,407 ^z
AChE(nmol/min/mg protein)	6,828±0,545	8,536±,436 ^z	4,939±0,177	8,907±0,917 ^z
GST(nmol/min/mg protein)	40,256±1,141	37,052±1,641	36,910±2,182	36,221±1,010
GR(nmol/min/mg protein)	2,501±,220	2,826±,264	2,607±,412	2,872±,513

K grubuna göre karşılaştırma. a: p<0.05, b: p<0.01, c:p<0.001

C grubuna göre karşılaştırma. x: p<0.05, y: p<0.01, z:p<0.001

Karaciğer dokusu MDA ve enzim aktivite düzeyleri Çizelge 1’de gösterilmiştir. K grubu MDA düzeyine göre C grubunda artış gözlemlendi (p<0.05). C grubu MDA düzeyine göre N ve CN gruplarında azalış tespit edildi (p <0.05). N grubu GSH düzeyi K ve C gruplarına göre artış saptandı (p<0.05; p<0.001). C grubu GSH düzeyi K, N ve CN gruplarına göre azaldığı tespit edildi (p>0.05; p<0.001). C grubu Ces enzim aktivite düzeyi K, N ve CN gruplarına göre istatistiksel olarak önemli düzeyde azaldı (p<0.001). K grubu AChE enzim aktivite düzeyi N ve CN gruplarına göre nispi oranda azaldığı gözlemlendi (p>0.05). Ancak, C grubu AChE enzim aktivite düzeyi N ve CN gruplarına göre istatistiksel olarak önemli düzeyde azaldığı tespit edildi (p<0.001). Tüm grupların GST ve GR enzim aktivite düzeyleri arasında istatistiksel fark gözlenmedi (p> 0.05).

Çizelge 2. Karaciğer dokusu yağ asit düzeyi (%)

Yağ asitleri	K	N	C	CN
4:0	0.082±0.007	0.078±0.007 ^x	0.107±0.107	0.082±0.082
6:0	0.070±0.003	0.059±0.002 ^y	0.080±0.004	0.062±0.004 ^x
14:0	0.299±0.017	0.152±0.011 ^y	0.405±0.052	0.377±0.078
15:0	0.317±0.013	0.210±0.007 ^z	0.499±0.088 ^a	0.342±0.013
16:0	20,544±0.276	18,221±0.139 ^{bz}	23,212±0.471 ^c	20,689±0.618 ^z
17:0	0.751±0.037	0.665±0.031 ^x	0.974±0.135	0.707±0.042
18:0	21.035±0.406	22.139±0.235 ^x	19.126±0.926	19.088±0.799
20:0	0.086±0.007	0.100±0.005	0.089±0.005	0.089±0.003
22:0	0.181±0.008	0.153±0.010 ^z	0.265±0.029 ^b	0.186±0.008 ^x
23:0	0.171±0.010	0.166±0.007	0.209±0.027	0.177±0.012
24:0	0.264±0.004	0.308±0.010	0.159±0.016	0.293±0.013
ΣSFA	43.800±0.750	42.251±0.645 ^x	45.247±0.851	42.092±0.782 ^x
16:1	0.426±0.039	0.246±0.023	0.698±0.103	0.857±0.307
18:1n9t	0.062±0.005	0.028±0.001 ^c	0.036±0.005 ^b	0.049±0.004
18:1n9c	5.521±0.279	4.515±0.221 ^z	8.415±0.677 ^a	8.624±0.850 ^b
20:1n9	0.221±0.012	0.203±0.018	0.289±0.057	0.160±0.003 ^x
24:1	0.092±0.004	0.105±0.005 ^z	0.197±0.015 ^c	0.115±0.004 ^z
ΣMUFA	6.322±0.204	5.097±0.301 ^z	9.635±0.411 ^c	9.805±0.385 ^c
18:2n6c	16.700±0.382	16.644±0.358	15.934±0.626	19.009±0.340 ^{bz}
18:3n6	0.175±0.013	0.185±0.012	0.167±0.016	0.195±0.008
18:3n3	0.392±0.032	0.411±0.013	0.279±0.032	0.484±0.052 ^y
20:2n6	0.524±0.030	0.703±0.067 ^{ax}	0.495±0.026	0.570±0.039
20:3n6	0.720±0.030	0.547±0.028 ^z	0.949±0.079 ^a	0.755±0.047
20:4n6	25.831±0.347	28.626±0.513 ^{az}	20.831±0.529 ^c	22.210±1.096 ^b
20:5n3	0.174±0.014	0.159±0.010	0.111±0.015 ^a	0.142±0.011
22:6n3	5.362±0.205	5.377±0.147	6.352±0.558	4.738±0.213 ^y
ΣPUFA	49.878±0.874	52.652±0.901 ^z	45.118±0.753 ^b	48.103±0.812 ^y
ΣUSFA	56.200±0.985	57.749±0.847 ^x	54.753±0.651	57.908±0.953 ^x

K grubuna göre karşılaştırma. a: p<0.05, b: p<0.01, c: p<0.001

C grubuna göre karşılaştırma. x: p<0.05, y: p<0.01, z: p<0.001

K grubuna göre C grubu ΣPUFA düzeyi azalırken, ΣMUFA düzeyi arttı. 20:4n6 düzeyi C grubunda azalırken, 16:0 yağ asit düzeyi arttı. Nar suyu etkisiyle bireysel doymamış ve doymuş yağ asitleri üzerine pozitif etkiler gözlemlendi.

Karaciğer dokusu yağ asitleri Çizelge 2’de gösterilmiştir. K grubu toplam doymamış yağ asitleri Σ SFA düzeyi ile N ve CN grupları arasında fark olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$). C grubu Σ SFA düzeyi CN ve N gruplarına göre arttığı tespit edildi ($p<0.05$). K grubu tekli doymamış yağ asitleri Σ MUFA düzeyi ile N grubu arasında istatistiksel fark olmadığı saptandı ($p>0.05$). K grubu Σ MUFA düzeyine göre C ve CN gruplarında artış saptandı ($p<0.001$). C grubu Σ MUFA düzeyi N grubuna göre yüksek çıktığı tespit edildi ($p<0.001$). K grubu çoklu doymamış yağ asitleri Σ PUFA düzeyine göre C grubunda azalma tespit edildi ($p<0.01$). C grubu Σ PUFA düzeyine göre N ve CN düzeylerinde artış gözlemlendi ($p<0.01$; $p<0.001$). K grubu toplam doymamış yağ asit Σ USFA düzeyine göre C grubunda nispi azalış tespit edildi ($p>0.05$). C grubu Σ USFA düzeyine göre N ve CN gruplarında artış gözlemlendi ($p<0.05$). Karaciğer dokusu bireysel yağ asit düzeyleri incelendiğinde, C grubu 15:0, 16:0, 22:0, 18:1n9c, 24:1, 20:3n6 yağ asit düzeyleri K grubuna göre arttığı tespit edilirken, 20:4n6 ve 20:5n3 yağ asit düzeylerinin K grubuna göre azaldığı gözlemlendi. N grubu 16:0 ve 18:1n9t yağ asit düzeyleri K grubuna göre azalırken, 20:2n6 ve 20:4n6 yağ asit düzeylerinin K grubuna göre arttığı saptandı. CN grubu 6:0, 16:0, 22:0, 20:1n9, 24:1 ve 22:6n3 yağ asit düzeyleri C grubuna göre azalırken, 18:2n6c yağ asit düzeyi C grubuna göre arttığı gözlemlendi.

6.TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, CCl₄ maruz bırakılan sıçan karaciğer dokuları üzerine nar suyunun antioksidan enzimler ve yağ asit düzeyleri üzerine biyokimyasal etkileri araştırıldı.

Karaciğer hastalıkları dünya çapında önemli bir problemdir. Labaratuvar şartlarında karaciğer hasarı oluşturmada en yaygın olarak kullanılan kimyasal madde CCl₄'dür. Özellikle CCl₄ toksik etkileri radikal özelliğinin yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. Hücrede serbest radikal düzeylerini arttırarak lipid peroksidasyona neden olmaktadır. CCl₄'ün en önemli özelliğinden birisi de karaciğerde fibroz hasarını arttırmasıdır. Karaciğer hasarının azaltılmasında antioksidan moleküller önemli rol oynadığı bilinmektedir. Özellikle doğal antioksidanlar karaciğer hasarını önlemede ve iyileştirmede önemli rol oynadığı bilinmektedir. Nar meyvesinin kabuğu ve suyu içerisinde önemli antioksidan moleküller mevcuttur. Narın antioksidan, antiateroklerotik, antikanser gibi birçok biyokimyasal özelliği vardır [40].

Çalışmada, CCl₄ verilen bireysel grubun MDA düzeyini arttırdığı tespit edildi. Artan MDA düzeyini ise kombinasyonlu grupta nar suyunun antioksidan etkisiyle azaldığı tespit edildi. Ayrıca, CCl₄ verilen bireysel grupta GSH düzeyinin azaldığı gözlemlendi. Nar suyunun etkisiyle kombinasyonlu grupta GSH düzeyini arttırdığı tespit edildi. GSH, serbest radikallerin detoksifikasyonu ve toksik moleküllerin atılmasında önemli rol oynar. Dokulardaki GSH'ın azalması ve tükenmesi, serbest radikallere karşı hücrel savunmanın bozulmasına yol açar ve peroksidatif hasara neden olur. Bu sebeple GSH, endojen ve eksojen bileşiklerin detoksifikasyonu dahil olmak üzere birçok hücrel işlemde rol oynamaktadır [41].

CCl₄ hücrede lipidperoksidasyon düzeyini arttırmaktadır. Lipid peroksidasyon sonucunda MDA düzeyinin arttığı gözlenmektedir [42]. Yapılan birçok çalışmada CCl₄ 'ün lipid peroksidasyonu arttırmak antioksidan enzim sistemini azalttığı tespit edilmiştir. CCl₄'e maruz bırakılan fare karaciğer dokusunda MDA, AST, ALT düzeylerinin arttığı, antioksidan enzimlerden katalaz, GSH-Px, GSH ve SOD enzimlerinin düzeylerinin azaldığı tespit edilmiştir [43].

Başka bir çalışmada ise, CCl₄ uygulaması yapılan fare karaciğer dokularında artan MDA düzeyi ve azalan GSH, GSH-Px ve SOD enzim aktivite düzeyleri rapor edilmiştir [44]. Yapılan bir çalışmada, nar kabuğu ekstratının CCl₄'ün oluşturduğu karaciğer hasarlarına karşı olumlu etkileri rapor edilmiştir. Nar kabuğu ekstentinin rat karaciğer dokularında CCl₄ 'ün oluşturduğu fibroza karşı koruyucu olabileceği rapor edilmiştir. Ayrıca CCl₄'ün oluşturduğu artan MDA düzeyini nar kabuğu ekstratının azalttığı bildirmiştir [45]. CCl₄'le akut karaciğer hasarı oluşturulan rat karaciğer dokularına nar ekstentinin etkinliği araştırmasında, nar ekstratının hepatoprotektif aktivitesinin olduğu bildirilmiştir. Nar ekstentinin lipit peroksidasyonu engellediği, azalan CAT, SOD ve GSH düzeylerini düzelttiği açıklanmıştır. Ayrıca, CCl₄'ün karaciğer de oluşturduğu histopatolojik hasarları, nar ekstentinin düzelttiği de rapor edilmiştir [46]. Çalışmamızda, enzim aktivite düzeyleri incelendiğinde, Ces enzim aktivite düzeyi CCl₄ grubunda önemli düzeyde azaldığı, nar suyu verilen bireysel ve kombinasyonlu gruplarda önemli düzeyde arttığı gözlemlendi. Karaciğer dokusu AchE enzim aktivite düzeyi CCl₄ grubunda nispi oranda kontrol grubuna göre azalırken, nar suyu verilen gruplarda önemli düzeyde arttığı tespit edildi. CCl₄ grubu GST düzeyi ise kontrol grubuna göre nispi oranda azalırken tüm gruplarda istatistiksel fark olmadığı gözlemlendi. Bu bulgulardan en önemli sonucumuz Ces enzim aktivite düzeylerinin de olduğu tespit edilmiştir. Yapılan literatür araştırmalarında, ratlarda CCl₄ 'ün ve nar suyunun Ces enzim aktivite düzeylerine biyokimyasal etkileri çalışmalarının olmadığı tespit edildi. Ces enzimi esteraz enzim grubunda bulunmaktadır. Vücudumuzda biyolojik fonksiyonları farklı olan AChE, butilkolin esteraz, karboksil esteraz (Ces), kolosterolkolesterol esteraz gibi enzimler mevcuttur. Bu enzimler tarafından üretilen metabolitlerdeki değişimler birçok hastalığa neden olmaktadır. Ces enzimi önemli bir detoksifikasyon enzim grubundadır. Ces enzimi esterih, amidlerin ve tiyoesterin hidrolizini katalize eden esteraz süper ailesinin bir üyesidir. Bu enzim özellikle memelilerin karaciğerlerinde yoğun olarak bulunmaktadır. Ayrıca, birçok ilaç ve ksenobiyotiklerin ekspressionları üzerine etkileri vardır [25,47,48,49]. Çalışmada CCl₄ 'ün rat karaciğerlerde oluşturduğu toksite sonucunda Ces enzimi ihlibisyonu gözlemlendi ve nar suyunun bu inhibisyonu engelleyerek aktivitelerini arttırdığı tespit edildi. Önemli bir detoksifikasyon enzimlerinden biride GST enzimidir. Bu enzim

serbest radikal savunucusu olarak bilinmektedir [50] Çalışmamızda, GST enzim aktivitesi CCl₄ grubunda nispi oranda düştüğünü, nar verilen gruplarda ise bir artış olmadığı tespit edildi. Çalışmada, karaciğer dokusu yağ asit düzeyleri üzerine CCl₄ 'ün negatif etkilerini göstermekteyiz. CCl₄ 'ün toplam doymuş yağ asit düzeylerini ise azalttığı tespit edildi. Özellikle 20:4n6 yağ asit üzerine CCl₄ 'ün azaltıcı etkisi tespit edildi. 20:4n6 yağ asidi üzerine nar suyu verilen gruplarda arttığı gözlemlendi. Önemli sonuçlarımızdan biride, CCl₄'ün 18:1n9c yağ asit düzeyini arttırmasıdır. Kombinasyonlu grupta nar suyunun bu yağ asidi üzerine etkisini gözlemleyemedik. Majör yağ asitlerinde 16:0 düzeyi CCl₄ grubunda önemli düzeyde artarken, nar suyu verilen kombinasyonlu grupta 16:0 yağ asit düzeyini kontrol grubu seviyesine düşürdüğü saptandı. Siroz hastası olan insanlarda linoleik, dihome- gama- linolenik ve araşidonik asidin düzeylerinin azaldığı rapor edilmiştir [51]. Ayrıca, CCl₄ uygulanan rat plazma yağ asit düzeylerinde PUFA düzeyinin azaldığı bildirilmiştir [52]. Yapılan önemli bir çalışmada, CCl₄ verilen rat karaciğerlerinde ve plazmalarında palmitik ve oleik asidin önemli düzeyde arttığı, linoleik ve araşidonik asidin azaldığı rapor edilmiştir [53]. CCl₄'ün sıçanlarda ve diğer hayvan türlerinde uzun süreli intraperitoneal enjeksiyonu sonucunda karaciğer nekroz ve yağ dejenerasyonuna neden olmaktadır [54]. Linoleik ve araşidonik asit seviyelerindeki düşüşün nedeni olarak, CCl₄ 'ün oluşturduğu radikallerin bu yağ asitleri ile reaksiyona girmesi olduğu bildirilmiştir [55]. Çalışmanın sonucu olarak, CCl₄ maruz kalan rat karaciğer dokularında MDA, 16:0 18:1n9c, Σ SFA, Σ MUFA düzeyleri artarken, nar suyunun antioksidan etkisiyle lipid peroksidasyonu, enzim aktivitelerini ve doymamış yağ asit düzeylerini düzelttiği tespit edildi.

Sonuç olarak, CCl₄'ün oluşturulduğu karaciğer biyokimyasal parametreler üzerine nar suyunun düzeltici etkisi olduğunu düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- [1] C.Yang, J.Fang, T.Hong, T.Wang, Y.Zhou, T.Lin, Potential antioxidant properties and hepatoprotective effects of an aqueous extract formula derived from three Chinese medicinal herbs against CCl₄-induced liver injury in rats, *International Immunopharmacology*, 15:106–113, 2011)
- [2] N.P. Seeram, L.S. Adams, S.M. Henning, Y.Niu, Y.Zhang, M.G. Nair, et al. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J Nutr Biochem.*;16:360–7, 2005
- [3] A.M. Pope, D.P. Rall, *Environmental Medicine. National Academy Press*, Washington, DC, USA. 1995
- [4] N.S. Radulovic, P.J. Randjelovic, N.M. Stojanovic , et al., Influence of methyl and isopropyl n-methyl antranilates on carbon tetrachloride-induced changes in rat liver morphology and function. *FU Phys. Chem. Tech.* 11, 67–73, 2013
- [5] D.T.P. Lien, C.T.K. Hoang, N.T. Hanh, D.X. Chu, P.T.B. Tram, H.T. Toan, Hepatoprotective effect of tofu processed from germinated soybean on carbon tetrachloride induced chronic liver injury in mice, *J. Food Health Sci.* 3 (1): 1–11,2017
- [6] S. Sreelatha, P.R. Padma, M. Umadevi, Protective effects of coriandrum sativum extracts on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats, *Food Chem. Toxicol.* 47 :702–708,2009
- [7] M. Hamid, D. Liu, Y. Abdulrahim, Y. Liu, G. Qian, A. Khan, F. Gan, K. Huang, Amelioration of CCl₄-induced liver injury in rats by selenizing astragalus polysaccharides: role of proinflammatory cytokines, oxidative stress and hepatic stellate cells, *Res. Vet. Sci.* 114 :202–211,2017
- [8] A.K. Al-Asmari, M.T. Athar, H.M. Al-Shahrani, S.I. Al-Dakheel, M.A. Al-Ghamdi, Efficacy of lepidium sativum against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity and determination of its bioactive compounds by GC-MS, *Toxicol. Rep.* 2 :1319–1326, 2015

- [9] A.Zira, S.Kostidisa, S.Theocharisb, F.Sigalac, S.B. Engelsend, I.Andreadoua, E. Mikrosa, H NMR-based metabonomics approach in a rat model of acute liver injury and regeneration induced by CCl₄ administration, *Toxicology*, 303:115– 124,2013
- [10] A.M.Al-Dbass, S.K.Al- Daihan, R.Shafi Bhat, Agaricus blazei murill as an efficient hepatoprotective and antioxidant agent against CCl₄-induced liver injury in rats, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19:303-309, 2012
- [11] P. Ramasamy, N. Subhapradha, V. Shanmugam, A. Shanmugam, Protective effect of chitosan from Sepia kobeensis (Hoyle 1885) cuttlebone against CCl₄ induced hepatic injury *International Journal of Biological Macromolecules*, 65:559–563. 2014
- [12] A.Vatansever, nar ve ürünlerinin fizikokimyasal ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi, *Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, 2018
- [13] R.P. Singh, M.K. Chidambara, G.K. Jayaprakasha Studies on the antioxidant activity of pomegranate (Punica granatum) peel and seed extracts using in vitro models. *J Agric Food Chem.*;50:81–6, 2002
- [14] M. Aviram, L. Dornfeld, Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. *Atherosclerosis*. 158:195–8. 2001
- [15] A.M. Gomez , A.M. Caravaca, V. Verardo, M. Toselli, A. Segura, A. Carretero, A. Fernandez, A. Gutierrez, M.F. Caboni, Determination of the major phenolic compounds in pomegranate juices by HPLC-DAD-ESI-MS. *J Agric Food Chem.*;61:5328–37, 2013
- [16] M. Aviram, N. Volkova, R. Coleman , M. Dreher, M.K. Reddy, D. Ferreira, et al. Pomegranate phenolics from the peels, arils, and flowers are antiatherogenic: studies in vivo in atherosclerotic apolipoprotein e-deficient (E0) mice and in vitro in cultured macrophages and lipoproteins. *J Agric Food Chem.*;56:1148–57, 2008
- [17] K.J. Salwe, D.O. Sachdev, Y. Bahurupi, M. Kumarappan. Evaluation of antidiabetic, hypolipidemic and antioxidant activity of hydroalcoholic extract of leaves and fruit peel of Punicagranatum in male Wistar albino rats. *J Nat Sci Biol Med.*;6:56–62, 2015

- [18] A. Sadeghipour , M. Eidi, A.I. Kavgani , R.Ghahramani, S. Shahabzadeh, Anissian A. Lipid lowering effect of punicagranatum L. Peel in high lipid diet Fed male rats. *Evid Based Complement Alternat Med.*;2014:432650, 2014
- [19] N.M. Emam, S. Anjum, H.A. Okail, M.A.R. Ibrahim, T. Ahmad, Pomegranate peel extract protects against carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity in mice through increasing antioxidants status, *Biomedical Reports* 13: 13, 2020
- [20] Z.S. Ibrahim, A. Nassan, M.M. Solıman, Ameliorative effects of pomegranate on carbon tetrachloride hepatotoxicity in rats: A molecular and histopathological study, *Molecular Medicine Reports* 13: 3653-3660, 2016
- [21] H. Şengül, Narda Bulunan Antosiyaninlerin Biyoyararlılığına Gıda Matrisi ve Bileşenlerinin Etkisi, *İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, 2013
- [22] S. Chavan, L. Sava, V. Saxena, S. Pillai, A. Sontakke, D. İngöle, ‘‘ Reduced glutathione: Importance of specimen collection’’, *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, vol. 20, no. 1, pp. 150-152, 2005
- [23] R.N. Armstrong, ‘‘Structure, catalytic mechanism and evolution of the glutathione transferases’’, *Chemical Research in Toxicology*, vol.10, no. 1, pp. 2-18, 1997
- [24] M.A. Gyamfi, I.I. Ohtani, E. Shinno, Y. Aniya, ‘‘ Inhibition of glutathione s-transferases by Thonningianin A, isolated from the African medicinal herb, Thonningia sanguinea, in vitro’’, *Food Chemical Toxicology*, vol. 42, no. 9, pp. 1401-1408, 2004
- [25] M. Alipour, M. Khoobi, A. Foroumadi, H. Nadri, A. Moradi, A. Sakhteman, M. Ghandi, A. Shafiee, *Bioorg Med Chem*, 2012, 20, 7214-7222
- [26] A.Güven, ‘‘İmprotance of acetylcholinesterase and its inhibitors’’, *Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, vol.6, no. 1-2, pp. 145-151, 2000
- [27] D.D. Rio, A.J. Stewart, N.A. Pellegrini, ‘‘A review of recent studies on malondialdehyde az toxic molecule and biological marker of oxidative stress’’, *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases*, vol. 15, no. 4, pp. 316-328, 2005
- [28] M. Aksoy, *Beslenme Biyokimyası*. Ankara:Hatiboglu Yayınları, 2008
- [29] J.P. Iredale, R.C. Benyon, J. Pickering, M. McCullen, M. Northrop, S. Pawley, C. Hovell, and M.J. Arthur. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver

fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest.* 1998;102(3):538–549

[30] J. Sedlak, R.H. Lindsay, ‘‘Essimation of total, protein-bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman’s reagent’’, *Analytical Biochemistry*, vol.25, no. 1, pp. 192-205, 1968

[31] W.H. Habig, M.J. Pabst, W.B. Jakoby, ‘‘Glutathione-S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation’’, *Journal of biological Chemistry*, vol. 249, no. 22, pp. 7130-7139, 1974

[32] Z.A. Placer, L.L. Cushman, B.C. Johnson, ‘‘Estimation of product of lipid peroxidation (malony dialdehyde) in biochemical systems’’, *Analytical Biochemistry*, vol.16, no. 2, pp. 359-364, 1996

[33] U. Nousiainen, R. Törrönen, ‘‘Differentiation of microsomal and cytosolic carboxylesterases in the rat liver by in vivo and in vitro inhibition’’, *General Pharmacology; The Vascular System*, vol.15, no. 3, pp. 223-227, 1984

[34] P. Santhoshkumar, T. Shivanandappa, ‘‘In vitro sequestration of two organophosphorus homologs by the rat liver’’, *Chemico-biological interactions*, vol.119, pp. 227-282, 1999

[35] G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Andres, R.M. Featherstone, ‘‘A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity’’, *Biochemical Pharmacology*, vol.7, no. 2, pp. 88-95, 1961

[36] M. Özmen, S.E. Dominguez, A.Fairbrother, ‘‘Effects of dietary azinphos methyl on selected plasma and tissue biomarkers of the gray-tailed vole’’, *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, vol.60, no. 2, pp. 194-201, 1998

[37] M.M. Bradford, ‘‘A rapid and sensitive method fort he quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protindyebinding’’, *Analytical Biochemistry.*, vol.72, no. 1-2, pp. 248-254, 1976

[38] A. Hara, N.S. Radin, ‘‘Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent’’, *Analytical Biochemistry*, vol. 90, no. 1, pp. 420-426, 1978

[39] W.W. Christie, ‘‘*Gas Chromatography and Lipids*’’, Glasgow: The Oil Press, 1992.

- [40] I.S. Ashoush, O.I. El-Batawy, G.A. El-Shourbagy, Antioxidant activity and hepatoprotective effect of pomegranate peel and whey powders in rats. *Annals of Agricultural Science*, 58(1), 27–32. 2013
- [41] S.M.K.R. Zaidi, T.M. Al-Qirim, N. Banu, Effects of antioxidant vitamins on glutathione depletion and lipid peroxidation induced by restraint stress in the rat liver. *Drugs* 6, 157–165, 2005
- [42] S.Raj, K.M Gothandam, Hepatoprotective effect of polyphenols rich methanolic extract of *Amorphophallus commutatus* var. *wayanadensis* against CCl₄ induced hepatic injury in swiss albino mice, *Food and Chemical Toxicology* 67:105-112, 2014
- [43] S Zhang, B Lu, X Han, L Xu, Y Qi, L Yin, Y Xu, Y Zhao, K Liu, J Peng, Protection of the flavonoid fraction from *Rosa laevigata* Michx fruit against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice, *Food and Chemical Toxicology*, 55:60–69, 2013
- [44] H Yu, L Zheng, L Yin, L Xu, Y Qi, X Han, Y Xu, K Liu, J Peng Protective effects of the total saponins from *Dioscorea nipponica* Makino against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice through suppression of apoptosis and inflammation, *International Immunopharmacology*, 19:233–244, 2014
- [45] X We, S Lic, T Li, L Liu, Y Liu, H Wang, Y Zhou, F Liang, X Yu, W Zang, M Zhao, Z Zhao, Pomegranate peel extract ameliorates liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats through suppressing p38MAPK/Nrf2 pathway, *Journal of Functional Foods*, 65: 103712, 2020
- [46] A. Vora, V. Londhe, N. Pandita, Herbosomes enhance the *in vivo* antioxidant activity and bioavailability of punicalagins from standardized pomegranate extract, *Journal of Functional Foods*, 12: 540–548, 2015
- [47] M. K Ross, A. Borazjani, C.C. Edwards, P. M. Potter, *Biochem Pharmacol.* 2006, 71(5), 657-69
- [48] E.W. Morgan, B. Yan, D. Greenway, A. Parkinson, *Arch Biochem and Biophys.* 1994, 315(2), 513-526
- [49] R. S. Holmes, M. W. Wright, S. J. F. Laulerkind, L. A. Cox, M. Hosokawa, T. Imai, S. Ishibashi, R. Lehner, M. Miyazaki, E. J. Perkins, P. M. Potter, M. R.

- Redinbo, J. Robert, T. Satoh __, T. Yamashita, B. Yan, T. Yokoi, R. Zechner, L. J. Maltais, __ *Mamm Genome*. 2010, 21(9-10), 427–44
- [50] S. Amjad, S. Umesalma, *J Mol Biomark Diagn*. 2015, 6(1), 1–7
- [51] J. Gonzalez, J.L. Periago, A. Gil, E. Cabre, A. Abad- Lacruz, M.A. Gassull , F. Sanchez de Mediha, *Metabolism*, Volume 41, Issue 9, 954 – 960
- [52] J.Gonzfilez. Deficiencia de Acidos Grasos Poliinsaturados en la Cirrosis Hepatica. Doctoral Thesis. Universidad de Granada, Granada, Spain, 1990
- [53] L. Fontana, E. Moreira, M. I. Torres, J. L. Periago, F. Sanchez De Medin, A. Gil, Effects of dietary polyunsaturated fatty acids and nucleotides on tissue fatty acid profiles of rats with carbon tetrachloride-induced liver damage, *Clinical Nutrition* 18(2): 93-101, 1999
- [54] G.Poli, M.U Diansani, K.H Cheeseman, T.F Slater, J.Lang, H.Esterbaner. Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by carbon tetrachloride or ADP-iron in isolated rat hepatocytes and rat liver microsomal suspensions. *Biochem J*. 227:629-638, 1985