

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI



SIÇANLARDA KARBONTETRAKLORÜR İLE
OLUŞTURULACAK KARACİĞER HASARINA
KARŞI UYGULANAN OZON TEDAVİSİNİN ETKİLERİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

MERVE KAVAKLI KARAKAŞ

2021

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mesut AKSAKAL

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu Tez Yüksek Lisans Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Dürrin Özlem DABAK

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı

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

Prof. Dr. Leyla CANPOLAT KOYUTÜRK

Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

.....

.....

.....

.....

.....



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 gösterdiğini beyan ederim.

Merve KAVAKLI KARAKAŞ

Tarih:

İmza:

Danışman

Prof. Dr. Leyla CANPOLAT KOYUTÜRK

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

ELA ZİĞ

İTHAF SAYFASI

Sevgili Aileme ve Babama teşekkür ederim.



TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim sürecinde bilgi ve birikiminden faydalandığım tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Leyla CANPOLAT KOYUTÜRK'e, yüksek lisans tezi çalışmalarım boyunca yardım ve önerilerini esirgemeyen tez izleme komitesi kurul üyeleri Sayın Prof. Dr. Ahmet KAVAKLI'ya, Doç. Dr. Tuncay KULOĞLU'na, Dr. Öğr. Üyesi Ramazan Fazıl AKKOÇ'a, Arş. Gör. Dr. Merve KAVAK BALGETİR'e ve Arş. Gör. Dr. Sena ÖZCAN YILDIRIM'a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, eğitimimdeki değerli katkılarından dolayı Sayın Prof. Dr. Dürrin Özlem DABAK ve teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında bana destek olan, Öğr. Gör. Tuba YALÇIN'a ve Arş. Gör. Dr. Nalan KAYA TEKTEMUR ve Arş. Gör. Dr. Ahmet TEKTEMUR'a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmama TF.19.50 numaralı proje kapsamında sağladığı finansmandan dolayı FÜBAP'a teşekkür ederim.

Son olarak eğitim hayatım boyunca desteklerini her zaman hissettiğim aileme ve sevgili eşim Psikolog Furkan KARAKAŞ'a çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
ETİK BEYAN	iii
İTHAF SAYFASI	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLO LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
KISALTMALAR	xi
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ	3
3.1. Karaciğer Genel Yapısı	3
3.1.1. Karaciğerin Anatomisi ve Fizyolojisi	4
3.1.1.1. Karaciğerin Görevleri	5
3.1.2. Karaciğerin Embriyolojik Gelişimi	8
3.1.3. Karaciğerin Histolojisi	11
3.2. Karbon Tetraklorür (CCl ₄)	12
3.2.1. CCl ₄ Etki Mekanizması	14

3.3. Ozon	15
3.3.1. Tanım ve Tarihçe	15
3.3.2. Medikal Ozonun Etki Mekanizması	18
4.GEREÇ ve YÖNTEM	23
4.1. Deney Hayvanları ve Beslenmeleri	23
4.2. Deney Gruplarının Oluşturulması	24
4.3. Doku Örneklerinin Alınması	25
4.4. Histokimyasal Boyama	25
4.5. TUNEL Metodu	26
4.6. İstatistiksel Analiz	28
5.BULGULAR	29
5.1.Tunel Bulgular	29
5.2. Histolojik Bulgular	31
6.TARTIŞMA	36
7. KAYNAKLAR	39
8. ÖZGEÇMİŞ	45

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Deney hayvanlarına verilen sıçan yeminin terkibi	24
Tablo 2. Histolojik takip serileri	26
Tablo 3. TUNEL boyama protokolü	27



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	Karaciğerin genel yapısı	4
Şekil 2.	Karaciğer anatomisi	5
Şekil 3.	Karaciğerin görevleri	8
Şekil 4.	Biliyer sistem embriyolojik gelişim aşamaları A: 4. hafta, B ve C: 5. hafta, D: 6. hafta	11
Şekil 5.	CCl_4 moleküler yapısı	13
Şekil 6.	Oksijen ve O_3 molekülünün yapıları	16
Şekil 7.	UV etkisiyle O_3 oluşumu: UV etkisiyle oksijen iki adet oksijen atomuna ayrılır. Daha sonra serbest oksijen atomlarından bir tanesi oksijenle birleşerek O_3 'u oluşturur	16
Şekil 8.	Medikal O_3 uygulamasından sonra ortaya çıkan temel biyolojik etkiler	22
Şekil 9.	Negatif kontrol TUNEL boyama	30
Şekil 10.	Pozitif kontrol TUNEL boyama	30
Şekil 11.	CCl_4 TUNEL boyama	30
Şekil 12.	$\text{CCl}_4 + \text{O}_3$ TUNEL boyama	31
Şekil 13.	Negatif kontrol grubuna ait kesit. Normal histolojik görünümlü hepatositler (kırmızı ok) ve Vena sentralis (V.S), hafif vasküler konjesyon	31
Şekil 14.	Pozitif kontrol grubuna ait kesit. Hafif sinüzoidal dilatasyon	32
Şekil 15.	Pozitif kontrol grubuna ait kesit. Vasküler konjesyon (siyah yıldız), Hafif sinüzoidal dilatasyon	32

- Şekil 16.** CCl₄ grubuna ait kesit. Portal alanda mononükleer hücrelerde artış 33
- Şekil 17.** CCl₄ grubuna ait kesit. Az sayıda hepatositte mikroveziküler yağlanma ve mononükleer hücre artışı 33
- Şekil 18.** CCl₄ grubuna ait kesit. V. centralis ve sinozoidler arasında mononükleer hücre infiltrasyonu 34
- Şekil 19.** CCl₄ + O₃ grubuna ait kesit. Glikojenini kaybetmiş hepatositler (siyah ok), central dizilimde bozulma, damarda konjesyon 34
- Şekil 20.** CCl₄ + O₃ grubuna ait kesit. Bazı alanlarda glikojen içeriği boşalmış hepatositler (siyah ok). Heterokromatik ve piknotik çekirdekli hepatositler 35

KISALTMALAR

BMP	: Kemik Morfojenetik Proteinler
CHCl₃	: Triklorometan
CCl₃	: Triklorometil
CCl₃O₂	: Triklorometilperoksil
CCl₄	: Karbon Tetraklorür
ÇDYA	: Çoklu Doymamış Yağ Asidi
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EGF	: Endotelyal Büyüme Faktörü
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
GSH-redüktaz	: Glutasyon Redüktaz
GSH-peroksidaz	: Glutasyon Peroksidaz
GSH-transferaz	: Glutasyon Transferaz
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
H&E	: Hematoksilen- Eozin
HO-1	: Hemoksijenaz-1
IL-1h	: İnterlökin 1h
IL-8	: İnterlökin 8
LOÜ	: Lipid Oksidasyon Ürünleri
NH₃	: Amonyak
NO	: Nitrik Oksit
N₂O₂	: Nitrojen Dioksit
O₂	: Oksijen
O₃	: Ozon

PAS	: Periodic Acid-Schiff
PDGF-β	: Platelet-derived Growth Factor
RNA	: Ribonükleik Asit
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
TGF-β	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü
TNF-α	: Tümör Nekrozisfaktör- α
UV	: Ultraviyole
VEGF	: Damarsal Endotelyal Büyüme Faktör

1. ÖZET

Tıbbi ozon (O_3) tedavisi, antioksidan, antienflamatuar ve antimikrobiyal etkileri nedeniyle tedavi amaçlı geniş bir spektrumda kullanılmaktadır. Çalışmalar O_3 tedavisinin apoptozis ve oksidatif stresi azaltarak dokularda hasara karşı koruyucu bir etki sergilediğini göstermiştir. Organik bir çözücü olan karbon tetraklorürün (CCl_4) yapılan çalışmalarda akut veya gecikmiş tipte karaciğer toksikasyonlarına yol açtığı bildirilmiştir. Bu çalışmada CCl_4 'ün oluşturduğu karaciğer hasarına O_3 tedavisinin etkisini araştırmayı amaçladık.

Çalışmada 8-10 haftalık 40 adet Sprague Dawley cinsi erkek sıçan kullanıldı. Sıçanların karaciğer dokularında histolojik olarak H&E, PAS, Masson, Trikom ve TUNEL boyama yöntemleri kullanıldı.

CCl_4 maruziyeti TUNEL apoptotik indekste artışa ve histopatolojik görüntüleme yöntemlerinde hepatosit hasarı oluşturdu. Antioksidan amaçlı verilen O_3 tedavisi kontrol grubuna göre anlamlı değişiklikler oluşturmadi fakat CCl_4 maruziyeti olan gruptaki sıçanların karaciğerinde beklenenin aksine oksidan etkiye yöneldi.

Sonuç olarak; O_3 'nun CCl_4 toksikasyonuna karşı antioksidan kullanımıyla ilgili hem doz konsantrasyon farklılığı hem de sayı başta olmak üzere daha fazla çalışmaya gerek duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: CCl_4 , Ozon, Karaciğer, TUNEL

2. ABSTRACT

WITH CARBONTETRACHLORIDE IN RATS LIVER DAMAGE TO BE CREATED EFFECTS OF OZONE THERAPY APPLIED AGAINST

Medical ozone (O₃) therapy is used in a wide spectrum for therapeutic purposes due to its antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial effects. Studies have shown that O₃ treatment has a protective effect against tissue damage by reducing apoptosis and oxidative stress. It has been reported that carbon tetrachloride (CCl₄), an organic solvent, causes acute or delayed liver toxicity in studies. In this study, we aimed to investigate the effect of O₃ treatment on the liver damage caused by CCl₄.

Forty male Sprague Dawley rats, 8-10 weeks old, were used in the study. Histologically, H&E, PAS, Masson, Trichoma and TUNEL staining methods were used in liver tissues of rats.

CCl₄ exposure caused an increase in TUNEL apoptotic index and hepatocyte damage in histopathological imaging methods. O₃ treatment given for antioxidant purposes did not cause significant changes compared to the control group, but in the liver of the rats in the CCl₄ exposure group, contrary to expectations, it tended to have an oxidant effect.

As a result; More studies are needed on the use of antioxidants against CCl₄ toxicity of O₃, both in dose concentration differences and in numbers.

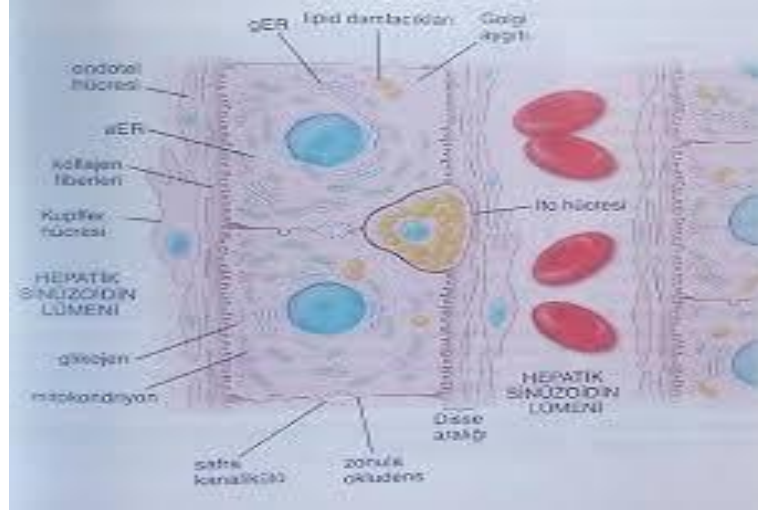
Keywords: CCl₄, Ozone, Liver, TUNEL

3.GİRİŞ

3.1.Karaciğer Genel Yapısı

Karaciğer, vücudumuzun en büyük iç organı ve bezi olup yaklaşık olarak 1,44 kg- 1,66 kg ağırlığında, kauçuk dokulu, kızıl- kahverengi renkli, lastiksi, üçgene benzer şekilde bir organdır. Karın boşluğunda sağ üst bölgede ve diafragmanın altında yer almaktadır. Kaburga kemikleri tarafından korunmaktadır. Büyüklükleri birbirinden farklı olan sol ve sağ olmak üzere iki lobu bulunmaktadır. Karaciğerin bir bölümü tek katlı yassı epitel ve bağ doku içerikli visseral peritonla çevrili iken diğer bölümü ise diyafram ve abdomen duvarına temas halindedir (1). Peritonun alt bölümünde Glisson kapsülü yer alır ve bu kapsül kollajen - elastik liflerce zengin bağ dokusundan oluşmaktadır. Glisson kapsülünden ayrılan ince bağ dokusundaki uzantılar karaciğer organını lob ve lobüllere ayırır. Lobüller karaciğerin fonksiyonel birimleridir ve her lobül milyonlarca hepatositten oluşur (2, 3). Portal alanlar, lobüllerin birleştiği bölümlerde arter, ven ve safra kanallarında bulunur (4, 5, 6).

Karaciğer; parankim, stroma, Disse aralıkları ayrıca sünüzoidlerden oluşur. Parankim ise sinüzoidal kapillerce birbirinden ayrılan hepatosit plaklardan oluşur. Bağ dokusu yapısından oluşan stroma içerisinde sinirler, kan damaları, safra kanalları ve lenfatik damarlar bulunmaktadır. Hepatosit tabakalar arasındaki vasküler kanallar sinüzoidlerdir. Disse aralığı sinüzodial endotel ve hepatosit arasında bulunur (4, 5, 6) (Şekil 1).

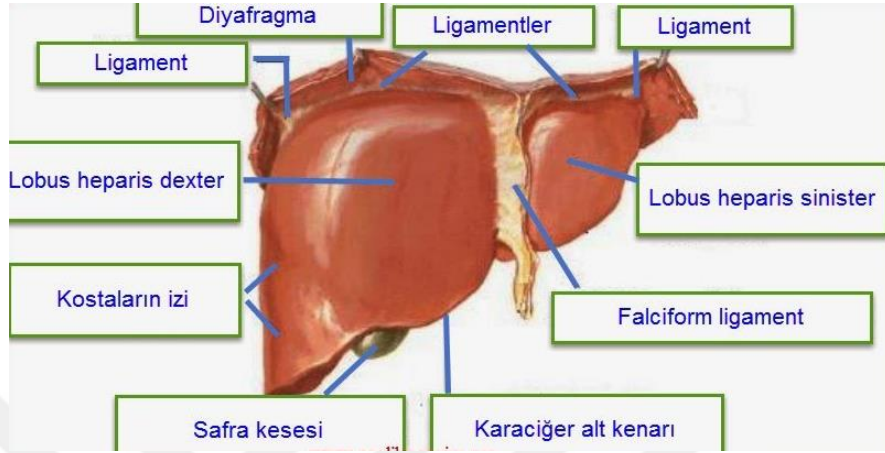


Şekil 1. Karaciğerin genel yapısı (6)

3.1.1. Karaciğerin Anatomisi ve Fizyolojisi

Vücuttaki en büyük bez olan karaciğer; topografik olarak karın boşluğunda regio hypochondriaca dextra'nın tümünü ve regio epigastrica'nın büyük bir kısmını doldurur. Bir miktar da regio hypochondriaca sinistra'ya geçer. Yaklaşık yetişkinlerde 25-30 cm uzunluğundadır. Karaciğer erkek cinsiyette 1400-1800 gr, kadın cinsiyette 1200-1400 gr ağırlığındadır. Fetus'te karaciğerin vücut ağırlığına göre oranı erişkinlerdekinden daha fazladır. Karaciğer kırmızımtırak kahverenginde olup, gevrek ve kolaylıkla parçalanabilen bir yapıya sahip olmasına rağmen sağlam ve elastiktir. Yaralanmalarda çok fazla kanamaya yol açmasının sebebi çok damarlı bir yapıya sahip olmasıdır. Karaciğer iki ana lobdan oluşur. Bunlardan birisi büyük lob olan lobus hepatis dexter, diğeri ise küçük lob olan lobus hepatis sinister'dir. Facies diaphragmatica ve facies visceralis olmak üzere iki yüzü; arka ve alt olmak üzere iki kenarı bulunur.

Hepatik hücrelerden oluşmuştur. Karaciğere, hepatik arter ve hepatik portal ven girer, ve oradan hepatik ven safra kanalına çıkar (1, 7).



Şekil 2. Karaciğer anatomisi (8)

3.1.1.1. Karaciğerin Görevleri

Karaciğer vücut içerisinde önemli görevlere sahiptir. Buna göre karaciğerin görevleri; kan dolaşımı, safra üretimi ve salınımı, protein metabolizması, yağ metabolizması, karbonhidrat metabolizmasındaki faaliyetleri, ilaç metabolizması, hematolojik ve diğer işlevler olmak üzere 8 ana başlıktan oluşmaktadır (7).

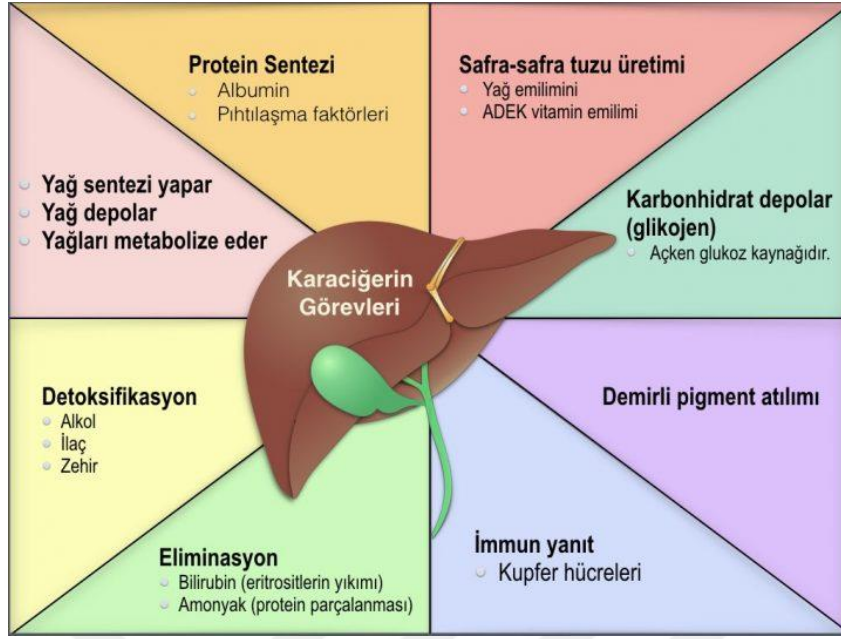
- 1) Kan dolaşımı ile alakalı görevleri; kanın portal dolaşımdan sistemik dolaşıma yönelmesi, kanın depo edilebilmesi, toksik maddelerin yok edilmesi, retiküloendotelial sistem ile bağışıklık mekanizmasının oluşmasıyla ilgilidir.
- 2) Safra üretimi ve salımı ile alakalı görevi; hepatositler tarafından safranin sentezlenmesidir. Sonrasında üretilen bu safra, safra kesesinde depo edilir.

Olası durumda ince barsağa salınır ve yağların sindirimini, ilaçların vücuttan atılımını ve metabolik atıkların dışarıya atılmasını sağlar. Karaciğer gün içerisinde 250-1100 ml arası safra salgılamaktadır.

- 3) Karbonhidrat metabolizmasındaki işlevi; glikojenin depolanmasında ve yapımında amino asitlerin, fruktozun ve galaktozun glikoza dönüşmesinde, glikojenden glikoz açığa çıkmasında, kandaki glikoz miktarının düzenlenmesinde rol almaktır.
- 4) Protein metabolizmasındaki işlevi; amino asitlerin deaminasyonunu, lipidlerin lipoproteinlere dönüşmesinde gerekli lipotropik faktörün sağlanmasını, plazma proteinlerinin ve ürenin yapımını, birçok aminoasitin diğer öğelere veya birbirine dönüşmesini sağlamaktır.
- 5) Yağ metabolizmasındaki işlevi; lipoproteinlerin özümlemesinde, kreps döngüsünde enerji elde etmek için yağ asitlerinin asetoasetik aside oksidasyonu ile asetil COA'ya dönüştürülmesinde, protein ve karbonhidratların yağlara dönüşmesinde ayrıca fosfolipitlerin ve kolesterolün ve safra tuzlarının oluşumunda etkili olmaktır. Safra üretimiyle beraber yağların sindirilebilir hale gelmesini gerçekleştirmektedir.
- 6) Hematolojik olarak; bir tane eritrosit hücresinde ortalama 300 milyon hemoglobin molekülü bulunur ki bu da büyük çoğunluğu demektir. Eritrositlerin ömrü yaklaşık 120 gün civarındadır ve sonucunda hücreler dalak tarafından parçalanır. Ortaya çıkan hemoglobinin protein (globülin) bölümü aminoasitlere ayrışırken hem molekülü de bilirubine

dönüştürülür. Bilirubin suda çözünmediği için albümine bağlanmakta ve dolaşım ile karaciğere taşınmaktadır. Karaciğerde bilirubin transferaz enzim aracılığıyla, UDP glikuronik asitinden glikuronat transfer oluşur, buradan tekrar dolaşım yoluyla safraya taşınır.

- 7) İlaç metabolizmasındaki işlevi; ilaç, hormon ve benzeri metabolik faaliyetler sonucu oluşan bazı toksik maddelerin (amonyok vb.) daha az oranda toksik hale dönüştürülmesini sağlamaktır (üre, ürik asit vb.). Metabolik faaliyetler sonucunda oluşan polar atık maddeler kan dolaşımıyla böbreklere gönderilir ve atılır. Polar olmayan maddeler ise hücre membranlarını geçebildiği için vücuttan uzaklaştırılması zorlaşır. Karaciğer, oksiredüktaz ve transferaz gibi enzimler yardımıyla, bu toksik maddelerin polarizasyonunu yükselterek, idrar ve safra yoluyla vücuttan dışarıya atılmasını hızlandırır.
- 8) Bunların dışındaki işlevlerinden biri, vitamin depolamaktır (A, D, K ve B grubu vitaminleri). β -karotenden retinol oluşması karaciğer aracılığı ile olur. Retinol, yağ asitleri ile esterleşerek karaciğerde depolanmaktadır. Ayrıca minerallerin depolanmasında da görev alır. Koruyuculuk görevini yabancı maddeleri kandan uzaklaştırarak sağlar (detoksifikasyon), kanda barsaktan portal ven yolu ile emilen amonyağın (NH_3) ortamdan uzaklaştırılmasını, ayrıca steroid yapıdaki hormonların dışarıya atılımını sağlar (7).



Şekil 3: Karaciğerin görevleri (9)

3.1.2. Karaciğerin Embriyolojik Gelişimi

Embriyolojik olarak endodermden köken alır. Endoderm ise Foxal 3 ve Sox 17 transkripsiyon faktörleriyle uyarılıp ve gelişmesiyle mezodermle çevrili primitif bağırsak tüpünden oluşur (10, 11). Bağırsak tüpünün anterior-posterior olarak uzama göstermesini, mezodermden salgılanan transkripsiyon faktörleri sağlamaktadır. Bağırsak oluşumunun ardından STM'lerden alınan kemik morfojenetik proteinler (BMP) ve kalpten alınan fibroblast büyüme faktörü (FGF) sinyali ventral ön bağırsaktan salınarak karaciğerin gelişmesini uyarır (12, 13, 14, 15). Bu uyarının hemen arkasından, basit kübik epitelin kalınlığı artarak yalancı çok katlı silindirik epitele dönüşür ve etrafı lamininli bazal membranla çevrelenir.

Karaciğer divertikülü (çıkıntı) olarak adlandırılan yapı 3. haftanın ortasında hızla çoğalan hücrelerden meydana gelmektedir (16). Ve bunun

ardından safra kanallarını oluşturan karaciğer hücreleri, septum içerisine hepatik divertikülle dolarken ön bağırsak arasında bağlantıyı sağlar. Safra kesesi ve sistik kanal, safra kanalından kaynaklanan küçük bir ventral çıkıntıdan meydana gelmektedir. Hepatoblastlar karaciğer tomurcuğunu oluşturmak üzere, gebeliğin 8-10 haftaları arasında göç etmeye başlamaktadırlar. Böylece hepatik morfogenez meydana gelir. Meydana gelen karaciğer tomurcuğu, stellat ve endotelial hücrelere ek olarak hepatoblastları da içermektedir (16, 17). Artarak olgunlaşmanın arkasından hepatoblastlar, hem hepatositlere hem de intrahepatik safra kanallarını oluşturan kolanjiositlere farklılaşmaktadır. Karaciğerin bu aşamaya kadarki değişimi epitel dokuda gerçekleşmektedir.

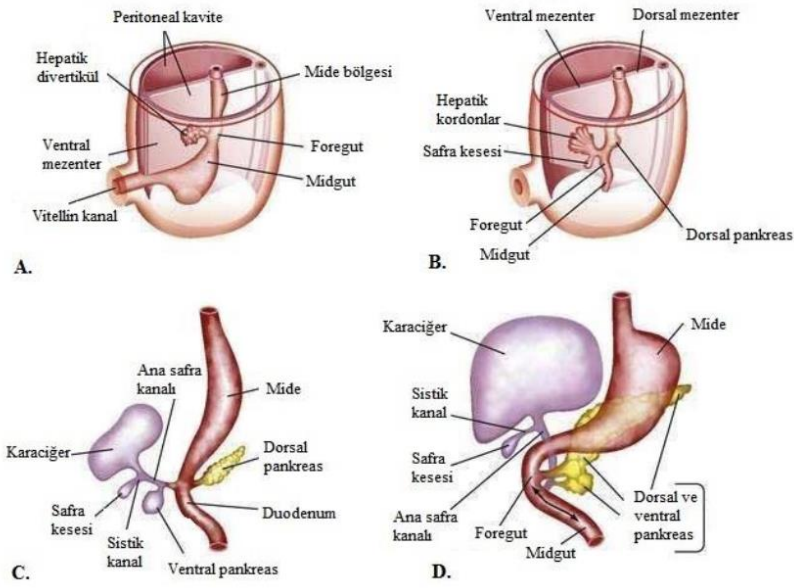
Stellat ve hepatik sinüzoidal endotelial hücreleri, karaciğer sinüzoidlerini oluşturur. Haricinde karaciğerin hepatogenezis sırasında anjiogenezis ile ilk kan damarı oluşur (18, 19). Sinüzoidal farklılaşma gebeliğin 5-12 haftasında meydana gelir. Perisinüzoidal matriksin bazal membran kısımlarını kaybetmeye başlaması gebeliğin 8-10 haftaları arasında gerçekleşir ve bununla beraber tipik stoplazmik fenestrasyon endotelial tabakadan meydana gelir (20). Gebeliğin 7. haftasında karaciğerin hematopoietik görevlerinin başlamasını, sinüzoidal farklılaşmanın ilk aşaması olarak değerlendirebiliriz.

Sinüzoidal endotelial hücre farklılaşmasının ana sebebi perisinüzoidal mezenşimden kaynaklanan faktörler ve hepatositlerin farklılaşmasıdır. Bu farklılaşmada, etkin rolü olan dönüştürücü büyüme faktörü (TGF β) ve damarsal endotelial büyüme faktörü (VEGF) aileleridir (21, 22).

Üç venöz sistem embriyoda 4. hafta sonunda yer alır. Bunlardan kardinal venleri bulunduran intraembriyonik ve diğer ikisi ise umblikal ven ve vitellin veni bulunduran ekstraembriyonik venöz sistemdir (23). Umblikal venler oksijenlenmiş kanı plasentadan kalbe, vitellin venler ise kanı vitellus kesesinden kalbe taşır.

Vitellin ve umblikal sistemlerde büyük değişiklikler 4. haftada karaciğer tomurcuğu oluşumunun hemen ardından meydana gelir. Karaciğer, ilk kan yapıcı organ olarak gebeliğin embriyonik döneminde görevini yapmaya başlar ve hematopoez 6. haftadan itibaren başlar. Portal venler vitellin venlerin farklı segmentlerinden meydana gelmektedir (24).

Kupffer hücreleri ve HSC'ler; perisinüzoidal alanda (Disse aralığı) bulunmaktadır ve bu Disse aralığı hepatositlerin bazolateral yüzeyi ve sinüzoidal endotelial hücrelerin adluminal yüzeyinde yer alır. Gebeliğin 8-10 haftaları arasında oluşan stellat hücreleri, septum transversumunun mezenşimal hücrelerinden gelişmektedir. Kupffer hücreleri; septum transversum mezenşiminden kaynaklanan, hepatik sinüzoidal hücrelerde yer alan, karaciğer organogenezisinde rol alan makrofajlardır.



Şekil 4. Biliyer sistem emriyolojik gelişim aşamaları A: 4. hafta, B ve C: 5. hafta, D: 6. hafta (25)

3.1.3. Karaciğerin Histolojisi

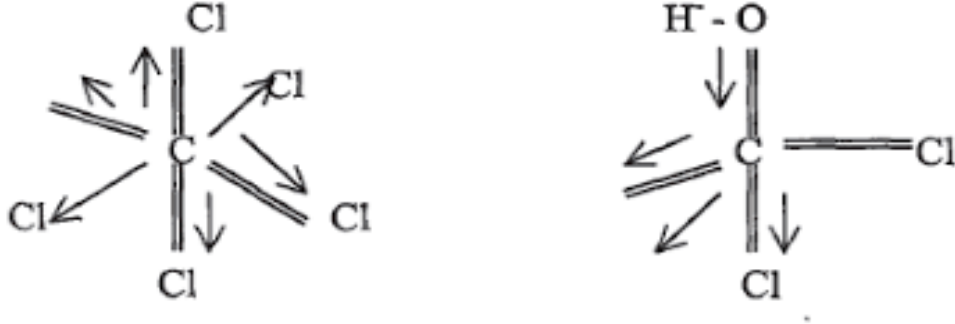
Karaciğer, hilus tarafında kalınlığı artan Glisson kapsülü adı verilen ince bir bağ dokusu ile örtülüdür. Karaciğer hilusundan giren-çıkan yapılar portal ven, hepatik arter, hepatik kanallar ve lenfatiklerdir. Bu vasküler yapılar ve kanallar, karaciğer lobülleri arasında sonlandıkları portal alanlara kadar bağ dokusu ile çevrelenmiştir (26). Karaciğerin ana bileşenleri parankim, interstisyum, vasküler ve duktal elementlerden oluşmaktadır. Karaciğerin yapısal ünitesi karaciğer lobülüdür. Karaciğer lobülü üç boyutlu düzenli bir yapıdır ve bu lobüllerde kan akışı terminal hepatik arteriol ve terminal portal venülden sinüzoidlere ve hepatik venüllere doğrudur (27, 28). Asinüsler oksijenizasyonun gittikçe azaldığı zon 1, 2 ve 3 şeklinde üç zona ayrılır. Terminal vasküler damarlar sindirimle oluşan metabolitleri asinüslere getirir ve aynı asinüsler safra kanallarına safra salgılar

(28). Hepatositler sinüzoidlerle ayrılan, normalde ve yetişkinlerde tek sıralı, santral ve yuvarlak nükleuslu, bir veya iki nükleollü ve bazen binükleasyon gösteren karaciğerin temel yapı elemanıdır. Nükleusun boyutu yetişkinlerde oldukça değişkendir. Stoplazma geniş ve eozinofiliktir ve endoplazmik retikulumu temsil eden ince bazofilik granüllere sahiptir. Stoplazmada glikojen vardır ve bu glikojen Periodic Acid-Schiff (PAS) ile yapılan boyamalarda düzensiz bir dağılım paterni gösterebilir ve bunun tanısal önemi yoktur. Karaciğer nükleusunda da glikojen birikimi sonucu içi boş bir görünüm oluşabilir ve bu daha çok adelösanlarda görülür ve tanısal önemi yoktur (29). Endotel hücreleri hepatositlerden, bir bazal membran ve subendotelyal boşluk olan Disse aralığı ile ayrılmıştır. Bu aralıkta mikrovilluslar bulunur ve böylece kan endotel duvarından kolayca geçmekte ve hepatosit yüzeyi ile temas etmektedir. Bu sayede sinüzoid lümeniyle karaciğer hücreleri arasında makromolekül alışverişi kolayca sağlanır. Sinüzoidler endotel hücrelerine ek olarak, Kupffer hücreleri adı verilen makrofajları da içermektedir. Bu hücreler endotel hücrelerinin lümenine bakan yüzde bulunur ve görevleri yaşlı eritrositleri temizlemek, hemoglobini sindirmek, immün sistemde görev yapan bazı proteinleri salgılamak ve portal dolaşıma geçen bakterileri ortadan kaldırmaktır. Ayrıca Disse aralığında yağ depolayıcı özelliği olan ito hücreleri bulunmaktadır (30).

3.2. Karbon Tetraklorür (CCl₄)

Karbon tetraklorür (CCl₄) organik bir çözücüdür ve apolar molekül yapısına sahiptir. Dört Cl atomu bir karbon molekülüne tetrahedral bir şekilde

bağlanıp, H ve Cl iyonlarının değişme durumuyla triklorometan (CHCl_3) molekülü halini alır (Şekil 5) (31).



Şekil 5. CCl_4 moleküler yapısı (32).

CCl_4 , renksiz, berrak ve hızlı buharlaşabilen bir kimyasal ajan olup sayıca fazla kimyasal tepkimenin ürünü olarak elde edilir. Uzun bir yarılanma ömrü olan CCl_4 , çok yavaş bozulur çünkü kararlı bir kimyasal yapıya sahiptir (33). CCl_4 'ün yutma ve deri yoluyla da alınması mümkündür, ama en fazla soluma yoluyla vücuda girer. İnsanlarda yağ dokusuna yerleşip ve daha sonra akciğerlere doğru ilerler. Metabolize olan CCl_4 'ün bir kısmı hücre içi moleküller ve proteinlerle etkileşime girerken, %4 kadarı solunumla dışarıya atılır. Vücudumuza günlük CCl_4 girişinin ortalama günlük 0,1 μg olduğu tahmin edilmektedir. Hayvan deneylerinden elde edilen bilgilere göre ABD Çevre Koruma Dairesi (EPA), CCl_4 'ü insan için kansere neden olabilen grup B2 sınıfı ajanlara dahil etmiştir (34). CCl_4 'ün endüstriyel alanlarda, pestisit ürünlerinde, petrol ve yağ ürünlerinde organik çözücü olarak kullanılmasından ötürü; ayrıca; tekstil ve kimya fabrikalarında, böcek ilaçlamalarında, atık merkezinde çalışan insanlarda ve de kuru temizleme sektöründe çalışan insanlarda CCl_4 'e maruziyetin arttığı ve büyük risk altında kaldıkları söylenmektedir (33, 35). CCl_4 zehirlenme belirtileri

emilimi takiben hemen ortaya çıkar. Zehirlenme belirtileri doza bağlı bir şekilde merkezi sinir sisteminin baskılanması ve maruz kalınan süreye göre vücutta dengesizlik, uyuşukluk, sersemlik ve baş dönmesi ile kendini gösterir. Şiddeti düşük olan vakalarda bir süre sonra oluşan bulgular ortadan kalkmaktadır. CCl_4 'e akut maruziyet hepatotoksisiteye sebep olabilirken, kronik maruz kalma ise siroza sebep olabilir (36).

3.2.1. CCl_4 Etki Mekanizması

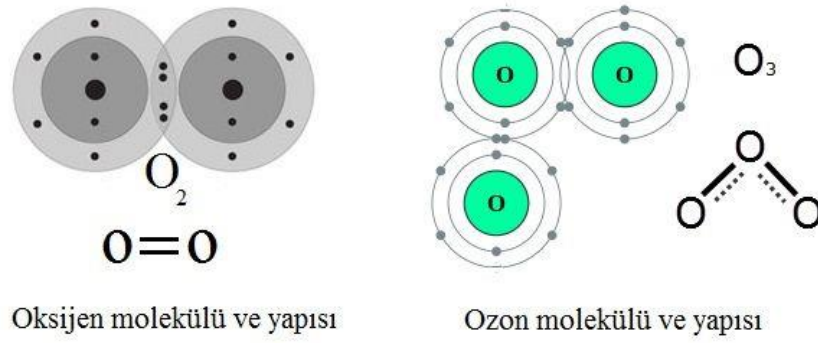
CCl_4 maruziyetinin devamlılığı, serbest radikallerin salınımı aracılığıyla karaciğer dokusunda toksisite oluşturmaktadır. Bu nedenle deney hayvanlarında hepatotoksisite modeli oluşturmak amacıyla kullanılır (37, 38). CCl_4 'ün yıkımı sonucu açığa çıkan reaktif bileşikler; DNA, lipit, protein ve karbonhidrat gibi hedef moleküllere bağlanır ve bu moleküller de primer ya da sekonder ilişki yoluyla lipid peroksidasyon, reaktif oksijen türleri (ROT) oluşumu, GSH/GSSG oranında değişiklikler oluşturup toksisite meydana getirir (39). Karaciğerdeki toksisite sonucunda histopatolojik olarak balonlaşma dejenerasyonu, komşu hepatosit yağ başkalaşımı, hücre iltihabı, santral ven etrafına lokalize lenfosit ve Kupffer hücre infiltrasyonu ve nekroz gözlenir. CCl_4 , sitokrom P450 monoksijenaz enzim sistemi aracılığıyla triklorometil (CCl_3) ve triklorometilperoksil (CCl_3O_2) radikallerine dönüşür. Bu radikaller, CCl_4 'ün sentrilobüler bölgede meydana getirdiği nekrozdan sorumludurlar. CCl_3 radikali oksijenle birleşerek, lipid peroksidasyonunun ana molekülü olan CCl_3O_2 radikalini oluşturur. Lipid peroksidasyonu, lipoprotein sentezinde gerekli olan

yapıları da hasara uğratarak karaciğerde lipidozise katkıda bulunur. Aşırı lipid birikimi karaciğerde işlevsel bozukluğa sebep olur, bu da siroza doğru ilerleyen değişimler ortaya çıkarır (40, 41). CCl₄'ün meydana getirdiği karaciğer dejenerasyonu ve neden olduğu değişiklikler benzer olduğu için, kemirgenlerde deneysel çalışmalarda en fazla uygulanan kimyasal ajandır. CCl₄'ün yol açtığı oksidatif stres karaciğerde toksikasyona neden olur (42). Oluşan oksidatif hasar ile karaciğerde stellat hücreleri ve fibroblastlar uyarılır. Bununla birlikte uyarılan Kupffer hücreleri; proinflamatuvar sitokin, tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) ve interleükin 1h (IL-1h) üretimine neden olur. Ve bu sürecin devamlılığı sonucunda karaciğerde fibrozis ve siroz oluşabilir. Literatürde yer alan çalışmaların çoğunda, artan oksidatif stres ile karaciğer fibrozisi arasındaki ilişki gösterilmiştir (43, 44, 45, 46). CCl₄'ün metabolizasyonu sonrası ortaya çıkan reaktif oksijen türlerinin DNA ile etkileşime girmesiyle oluşan DNA kırıkları, insanlardaki birçok hastalığın oluşumunda önemli bir faktördür (47, 48). CCl₄'e bağlı karaciğer hasarının gelişim basamakları; redüktif dehalojenasyon, radikallerin kovalent bağlanması, protein sentezinin inhibisyonu, yağ birikimi, kalsiyum sekestrasyonunda kayıp, apoptozis ve fibrozis şeklindedir (49).

3.3. Ozon

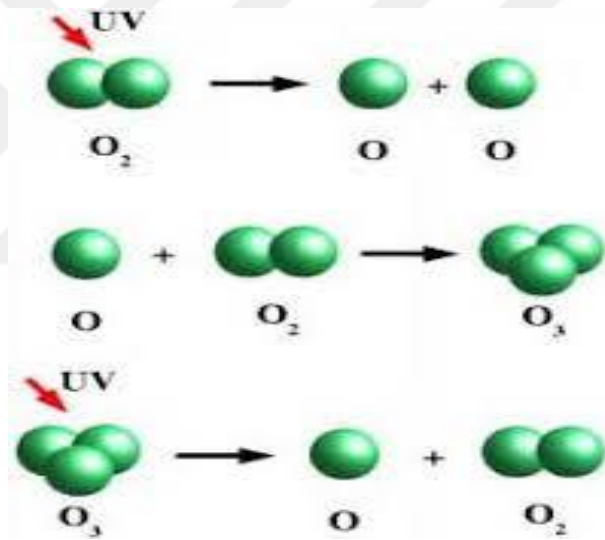
3.3.1. Tanım ve Tarihçe

Ozon (O₃), “ozein” (koku yayan) kelimesinden türetilmiş, gaz halinde bulunan ve üç oksijen atomundan oluşan bir moleküldür (Şekil 6).



Şekil 6. Oksijen ve O₃ molekülünün yapıları

O₃, ultraviyole (UV) ışınları ile veya yapay olarak kuvvetli elektriksel akımla oksijen atomundan elde edilir (Şekil 7).



Şekil 7. UV etkisiyle O₃ oluşumu: UV etkisiyle oksijen iki adet oksijen atomuna ayrılır. Daha sonra serbest oksijen atomlarından bir tanesi oksijenle birleşerek O₃'u oluşturur (50).

O₃, açık mavi tonlarına sahip, ağır kokusu olan ve havadan daha ağır olan bir gaz türüdür. Oksijenden 1.6 kat daha yoğun olan ve suda çözünürlüğü 10 kez daha fazla olan bu gazın parçalanma ömrü 20°C'de 40 dakikadır (51). O₃ gazı yeryüzünden 20-50 km yükseklikte bulunur ve UV dalgalarını (260-280 nm) absorbe eder. Ozonosfer adı verilen bu katman 1 g/m³ yoğunlukta olup yaklaşık

kalınlığı 2-3 mm civarındadır. O₃ yoğunluğu biyolojik denge açısından önemlidir ve ozonosferin tahrip olması güneşin zararlı UV ışınlarına maruziyeti arttırmaktadır (52). 20-40 µg/m³ 'te keskin kokusu fark edilen O₃ gazının, düşük konsantrasyonda inhalasyonu solunum yolları için, 400 µg/m³ ve üzeri konsantrasyonlardaki inhalasyonu ise akciğer ve göz için toksik kabul edilmektedir (52). O₃ kimyasal yapısı itibariyle çok güçlü oksidan bir maddedir. 1980'li yıllar itibariyle tıbbi amaçlı O₃ kullanımıyla ilgili deneysel çalışmalar ve vaka serileri sayıca artış göstermiş ve literatürde yerini almaya başlamıştır. Antibakteriyel etkisi O₃'nun ilk kullanım alanıdır. Virüs ve bakterileri öldürmenin yanında tüm mikroorganizmaları ve toksinlerini de okside eder. Bunun dışında pestisitleri, fenoller, kimyasal atıkları, aromatik bileşikler ve deterjanları da etkili bir şekilde nötralize edebilir (53). O₃ doğal ve atık bırakmayan bir dezenfektandır. O₃'nun 80 ve 100 µg/ml gibi yüksek konsantrasyonlarda dezenfektan görevi gördüğü, 10-40 µg/ml dozlarında ise epitelizasyon ve granülasyonu artırarak yara iyileşmesine katkıda bulunduğu bildirilmiştir (51).

O₃, reaktif triatomik oksijen olup depolanamayan bir gazdır. Bunun sebebi bir süre sonra oksijene dönmesidir. Bu nedenle medikal O₃'nun elde edilebilmesi için O₃ jeneratörleri gereklidir. Medikal O₃, jeneratörlerde saf oksijenin fazla voltaj farkı olan ortamdan geçmesiyle oluşur. Tıbbi O₃ gazında, oksijen miktarı en az %95, O₃ miktarı ise en fazla %5 olmalıdır. O₃ üretiminde karışıma atmosfer havası girişi engellenmelidir. Çünkü atmosfer havası karışırsa toksik etkili nitrojen dioksit (N₂O₂) oluşmaktadır.

O₃'un tarihsel süreci özetlenecek olursa;

1839'da Christian Friedrich Shönbein tarafından keşfedilmiştir.

1860'da Monako şehrinde su arıtma tesisinin dezenfeksiyon işlemlerinde kullanılmaya başlanmıştır.

1896'da Nikola Tesla, ABD'de ilk O₃ jeneratörünün patentini almıştır.

1915'de Dr. Albert Wolff tarafından ilk kez tıpta kullanımı başlatılmıştır.

1935'de Dr. Erwin Payr kendi vakalarından oluşan "Cerrahide Ozon Uygulamaları" başlıklı sunumuyla O₃'un tedavideki yeriyle ilgili ilk önemli bildiri yayınlamıştır.

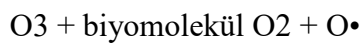
1960'ların sonunda klinikte rutin kullanımına da H. Wolff tarafından başlanmıştır.

1975'de Wolff tarafından otohemoterapi tariflenmiştir.

1981'de Werkmeister kronik yaraların tedavisinde O₃'yu kullanmaya başlamıştır (54).

3.3.2. Medikal Ozonun Etki Mekanizması

Sağlıklı bireyler üzerinde yapılan çalışmalarda O₃'nun doza bağlı olarak TNF- α , IL-2, IFN- γ ve diğer interlökin seviyelerini belirgin şekilde yükseltebildiği gösterilmiştir (55). Plazma, serum, su, lenf ve idrarda çözünebilen O₃, tepkimeye girebilecek bir molekül bulduğunda onu oksitler ve ortama oldukça reaktif etkisi olan oksijen verir. Bu tepkime şu şekilde özetlenebilir:



O₃ sırasıyla ilk olarak çoklu doymamış yağ asidi (ÇDYA) ile ve daha sonra antioksidanlar (ürük asit, askorbik asit vb), –SH grupları içeren tiyol bileşikler (sistein gibi), redükte glutatyon ve albuminle reaksiyona girer. O₃, konsantrasyona bağlı olarak enzimlerle, karbonhidratlarla, DNA ve RNA ile etkileşebilir. Bu bileşikler O₃ karşısında elektron donörü görevi üstlenip oksitlenirler. ÇDYA ile tepkime şu şekilde özetlenebilir:



Örnek tepkimede ÇDYA, O₃ ve su ile etkileşime girdikten sonra lipid oksidasyon ürünleri (LOÜ) ve hidrojen peroksit (H₂O₂) oluşur. Bu tepkimede meydana gelen H₂O₂ başlıca reaktif oksijen türevidir (ROT). O₃'nun yağlarla girdiği tepkimede sürekli karbon atomları arasındaki çift bağların yapısı etkilenirken, proteinlerle girdiği tepkimede çoklu aminoasit bulunduran işlevsel yan zincir bağlarının yapısı etkilenir. Bunun sonucunda da kalsiyum kanalları açılır ve hücre içi enzim aktivasyonuna bağlı tepkimeler oluşur (56).

O₃'nun oksidatif etkisi nedeniyle doz ayarlaması çok önemlidir. Terapötik doz aralığı 10-80 µg/ml olup bu doz aralığındaki uygulamalarda herhangi bir yan etki oluşturmamaktadır. Düşük dozlarda terapötik etki ortaya çıkmazken, doz aşımında ise güçlü bir oksidan olarak toksik etki gösterir (57). Terapötik dozda verildiğinde vücutta oluşturulan şey aslında kontrollü bir oksidatif strestir. Fizyolojik seviyede oksidatif stresin nörohumoral mekanizma ile yaralı olduğu bildirilmektedir.

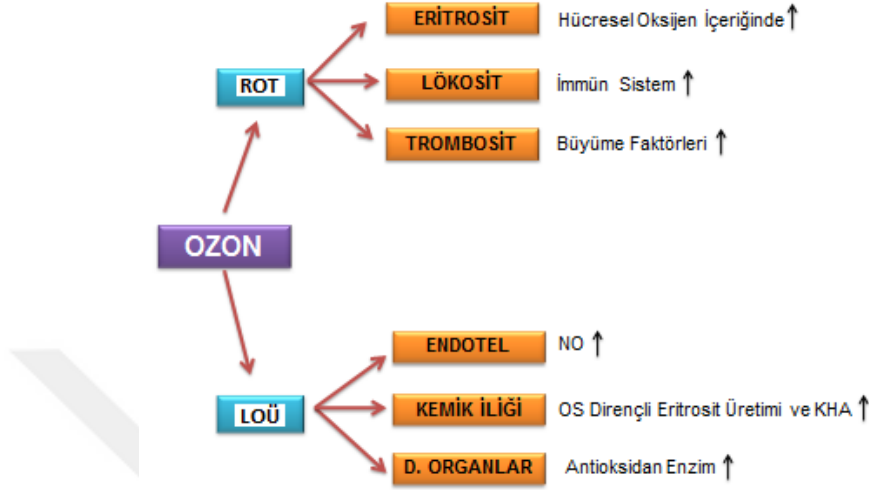
Oksijenli solunum yapan canlılarda antioksidan sistemler gelişmiştir ve bu sistem canlıyı serbest radikallerin toksik etkilerinden korunmaktadır. Bu

sistemlerden non-enzimatik olanlardan başlıcaları askorbik asit, ürik asit, protein olmayan tiyoller, protein (başlıca albumin), vitamin E ve bilirübindir. Enzimatik olanlardan başlıcaları ise süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon transferaz ve glutatyon redüktazdır (54, 58).

O₃'nun hücre seviyesindeki etkileri, ROT ve LOÜ aracılığıyla olmaktadır. O₃ gazı kan yoluyla verildiğinde plazmada hızla erir ve kanda bulunan hücrelerin zarlarının yapısında bulunan doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girerek onları oksitler ve H₂O₂ gibi çok sayıda ROT oluşmaktadır. ROT plazmada çok süratli oluşur ve antioksidan kapasitede %5-25 kadar azalma meydana gelir ve 15-20 dakika içerisinde bu etki geri döner (Rice-Evans ve ark, 1994). H₂O₂'nin plazma yarı ömrü çok kısa olup (2,5 dakika) hızla glutatyon peroksidaz ve katalaz tarafından parçalanır. Bu süreçte bir miktar H₂O₂ hücre içine girerek birçok tepkimeyi tetiklemeye başlar, ardından H₂O₂ hızlıca antioksidanlar tarafından nötralize edilir. ROT'un yarılanma süresi çok kısa olduğu için, henüz kan hastaya geri verilmeden yani ototransfüzyondan önce ortadan kalkarak yerlerini LOÜ'ye bırakır. LOÜ daha kararlıdır, fakat onlar da kana verildiğinde hemen hafiflemeye maruz kalırlar. Bir kısmı idrarla ve safra ile atılırken bir kısmı da GSH-transferaz ve aldehid dehidrogenaz yolağı ile metabolize edilirler. Mikromolar konsantrasyonda geriye kalanlar ise vücutta devam eden oksidatif stresin haberci molekülleri olarak vücuda yayılırlar. Bu yayılım sonucunda vücuttaki GSH-redüktaz, GSH-peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz gibi antioksidan enzim üretiminde artış olur (59). Sonuç olarak O₃'nun dokulardaki etkileri (Şekil 8);

- Eritrositlerde glukoz 6 fosfat dehidrogenaz seviyesinde yükselmeyeyle glikolizde artma ve ATP miktarında artış, ayrıca hücre içi pH'ta düşme ve 2,3 difosfoglisarat miktarında yükselme sonucu oksijen disosiasyon eğrisinin sağa kayması, dolayısıyla dokulara oksijen verilmesinde ve arteryel oksijen basıncında artış (60).
- Endotel hücrelerinden nitrik oksit (NO) ve karbonmonoksit salınımında artış ve vazodilatatör olan prostasiklin indüksiyonuyla vazodilatasyon gelişmesi (57, 61).
- Plateletlerde H_2O_2 artışı nedeniyle agregasyonda ve growth faktör üretiminde artışa ve doz bağımlı bir şekilde trombosit fonksiyonlarının artışına neden olmaktadır. Aktive olan trombositler içlerinde bulunan büyüme faktörlerinin ve diğer inflamatuvar sitokinlerin (PDGF- β , TGF- β , IL-8 ve EGF) salınımı sağlayarak iskemi ve ülserli hastalarda iyileşmeye olumlu katkı sağlar. Parenteral düşük doz fibronolitik ve trombolitik aktivite gösterirken, yüksek doz O_3 ise hiperkoagülasyon etkisi oluşturur (62).
- İmmün sistem hücrelerinde nötrofillerin fagositik aktivitelerinde artış (63), H_2O_2 artışı, tirozin kinaz aktivasyonu ile proinflamatuvar süreci hızlandırır ve sitokin salınımını indükler (64). Yine H_2O_2 artışına bağlı interferonlar, interleokinler, tümör nekroz faktör, transforme edici büyüme faktör, granülosit-makrofaj koloni stimülan faktörü artışı meydana gelir. Retikuloendotelial sistemi stimüle ederek dokuların

tamir mekanizmasını destekler. Özetle immün sistemin lezyon bölgesindeki trofik etkisini destekler (53, 65).



Şekil 8. Medikal O₃ uygulamasından sonra ortaya çıkan temel biyolojik etkiler (OS: Oksidatif stres, KHA: Kök hücre aktivasyonu) (53).

O₃ uygulamasının uyarıldığını hemoksijenaz-1 (HO-1) enzimiyle bildirilmiştir. Artmış oksidatif stres, proinflamatuvar sitokinler ve NO, hem halkasının yıkım yolunda görev alan mikrozomal bir enzim olan HO-1 yapımını uyarabilmektedir. Bu enzimin artışından ROS ve eritrosit hemolizi sorumludur. HO-1 ile son yıllarda yapılan çoğu çalışma, bu enzimin antiinflamatuvar, antioksidan ve antiapoptotik etkilerinin olduğunu göstermiştir. O₃ uygulamasının sonucunda gözlemlenen en etkin HO-1 artışının beraberinde O₃'nun terapotik doz aralığında ortaya çıktığı gösterilmiştir (66).

4.GEREÇ ve YÖNTEM

4.1. Deney Hayvanları ve Beslenmeleri

Bu deneysel çalışma, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu Başkanlığı'nın onayı ve Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (FÜBAP) (Proje No: TF. 11. 79) desteği alındıktan sonra başlatıldı. Bu çalışmada denek olarak kullanılan Sprague Dawley cinsi sıçanlar F.Ü. Deney Hayvanları Merkezi (FÜDAM) biriminden temin edilmiştir. Deney, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Merkezi'nde (FÜDAM) gerçekleştirildi. Bu çalışmada, 8-10 haftalık 40 adet Sprague Dawley cinsi erkek sıçan kullanıldı. Ortam ısı 21°C olan odada, 12 saat aydınlıkta (7:00-19:00) ve 12 saat karanlıkta (19:00-7:00) tutulan sıçanlar her gün temizliği yapılan kafeslerde beslendi. Sıçanlar havalandırma şartlarının uygun olduğu bir mekanda özellikli hazırlanmış kafeslerde (3'lü-4'lü gruplar halinde) barındırıldı. Deney hayvanlarının yem ve suyu özel hazırlanmış çelik içerikli ürünlerde verildi. Denekler Yem Sanayi T.A.Ş. Elazığ Yem Fabrikasında hazırlanan pelet halindeki sıçan yemi ile beslendi. Yemlerin terkibi aşağıdaki tabloda (Tablo 5) gösterilmektedir. Sıçanların deney öncesi ve deney süresince bakımlarına bu şekilde devam edildi.

Tablo 1. Deney hayvanlarına verilen sıçan yeminin terkibi

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 vitamini, 16 mg Nicotin amid, 0,06 mg Se, 3,2 mg Cal. D. Panth. 0,32 mg Folic acid, 0,02 mg D-Biotin, 20 mg Zinc Bacitracin, 32 mg Mn, 16 mg Fe, 50 mg Cholin Chloride, 24 mg Zn, 2 mg Cu, 0,8 mg I, 0,2 mg Co, 4 mg Antioksidan ve 200 mg Ca.

** % 25 kalsiyum , % 18 fosfor, % 0,2 flor'dan oluşur.

4.2. Deney Gruplarının Oluşturulması

Deneyisel çalışma için, 40 adet erkek sıçan her grupta 10 hayvan olacak şekilde rastgele birbirine eş 4 gruba ayrıldı. Grupların dağılımı;

Grup 1 (Negatif Kontrol): Bu gruptaki sıçanlara deney süresince herhangi bir uygulama yapılmadı.

Grup 2 (Pozitif kontrol): Bu gruptaki sıçanlara deney süresince haftada 3 gün ip O₃ tedavisi uygulandı.

Grup 3: Bu gruptaki sıçanlara deney süresince 2 mg/kg dozunda haftada 2 gün ip CCl₄ tedavisi uygulandı.

Grup 4: Bu gruptaki sıçanlara deney süresince CCl₄+O₃ tedavisi uygulandı.

CCl₄ Uygulaması: Ratlar canlı ağırlıkları birbirine yakın olacak şekilde gruplara ayrıldıktan sonra dört hafta boyunca 2 ml/kg dozunda CCl₄ 1:3 oranında zeytinyağı ile intraperitoneal olarak haftada iki kez uygulandı (67, 68).

O₃ tedavisi: Bu gruptaki sıçanlara O₃ (% 95 O₂ + % 5 O₃) uygulaması ip. olarak her seansta 150 mg/kg - 1ml/sıçan dozunda (69) haftada 3 gün (Pazartesi-Çarşamba-Cuma), 4 hafta süresince toplam 12 seans yapıldı.

Deney sonunda 4 grupta yer alan sıçanların hepsi anestezi altında sakrifiye edildi. Histolojik çalışmalar için sıçanların karaciğer dokuları alındı.

4.3. Doku Örneklerinin Alınması

Gruplardaki sıçanların hepsi deney sonunda, ketamin (75 mg/kg) + xylazine (10 mg/kg) ip uygulanarak anestezi altında sakrifiye edilerek çalışma sonlandırıldı. Sonrasında sıçanların karaciğer dokuları hızlı bir şekilde çıkarıldı. Çıkarılan karaciğer dokuları histolojik incelemeler için bouin solüsyonunda tespit edildi.

4.4. Histokimyasal Boyama

Karaciğer dokuları %10'luk formaldehit solüsyonunda tespit edildi ve ardından musluk suyu altında yıkandı. Yıkanan dokular rutin histolojik takip serilerinden (Tablo 6) geçirilerek dehidrate edildi. Dehidratasyondan sonra ksilolde parlatılıp parafine (P3558, Sigma-Aldrich, ABD) gömüldü. Rodajlı ve

polilizinli lamlara, hazırlanan parafin bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Preparatlar Hematoksilen- Eozin (H&E) boyası ile boyandı. Işık mikroskopunda (DM2500 LED, Leica, Almanya) incelenip fotoğraflandı (MC170 HD, Leica, Almanya).

Tablo 2. Histolojik takip serileri

SIRA	İŞLEM	SÜRE
1	% 70 Alkol	2 saat
2	% 80 Alkol	1 saat
3	% 96 Alkol	1 saat
4	% 96 Alkol	1 saat
5	% 100 Alkol	1 saat
6	% 100 Alkol	1 saat
7	Ksilol I	1 saat
8	Ksilol II	1 saat
9	Sert parafin	Gece boyu
10	Gömme	

4.5. TUNEL Metodu

Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler elde edilip polilizinli lamlara alındı. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon, cat no: S7101, USA) kullanıldı ve apoptozise giden hücreler belirlendi. Boyama prosedürü aşağıdaki tabloda ayrıntılı bir şekilde verilmiştir (Tablo 7). Hazırlanan preparatlar araştırma

mikroskopunda (Olympus BH–2) incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı. TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde Harris hematoksilin ile maviye boyanan çekirdekler normal, kahverengi nükleer boyanan hücreler apoptotik olarak değerlendirildi.

Tablo 3. TUNEL boyama protokolü

SIRA	İŞLEM	SÜRE
1	60 °C etüv	Bir gece
2	Ksilol	3x15 dakika
3	Sırasıyla %100, %96, %80, %70 etil alkol	3'er dakika
4	PBS	5 dakika
5	Kesitlerin çevrelerinin sınırlayıcı kalem ile çizilmesi	
6	1:500 dilüsyondaki Proteinaz K solüsyonu	7 dakika
7	PBS	3x5 dakika
8	Endojen peroksit blokajı (%3 H ₂ O ₂)	5 dakika
9	PBS	3x5 dakika
10	Equilibration tampon solüsyonu	6 dakika
11	Çalışma solüsyonu (77 µl Reaction Buffer + 30 µl TdT Enzyme)	60 dakika
12	Stop/Wash Buffer (2 ml) + Distile su (68 ml) oda sıcaklığında	10 dakika
13	Anti-Digoxigenin-Peroxidase	30 dakika
14	PBS	3x5 dakika
15	DAB Dilution Buffer (600 µl) + DAB Substrate (12 µl)	5-10 dakika
16	PBS	3x5 dakika
17	Distile su	5 dakika
18	Harris hematoksilin	1-5 dakika
19	Distile su	5 dakika
20	Su bazlı kapatma solüsyonu ile kapatma	

4.6. İstatistiksel Analiz

Veriler ortalama $\pm$ SEM değerleri olarak sunuldu. $P<0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi. Verilerin normal dağılımının varsayıma uygunluğu Shapiro Wilk testi uygulanarak incelendi ve test sonucunda verilerin normal bir dağılım gösterdiği tespit edildi. Buna istinaden normal dağılım gösteren grupların birbiri ile karşılaştırılarak aralarındaki farklılıkların tespiti için Tek Yönlü Varyans (ANOVA) Analizi uygulandı ve ikili karşılaştırmalar için de post-hoc Duncan testi kullanıldı. Tüm istatiki analizler SPSS (Statistical Package for Social Sciences) versiyon 15.0 paket programı kullanılarak yapıldı.

5.BULGULAR

5.1.Tunel Bulgular

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskobu altında incelenmesi sonucu; TUNEL pozitifliği karaciğer dokusunda hepatositlerde (siyah ok) gözlendi.

TUNEL pozitifliği; Kontrol (Şekil 1), O₃ (Şekil 2) ve CCl₄ (Şekil 3) gruplarında benzerdi. CCl₄ grubuyla kıyaslandığında ise CCl₄+ O₃ (Şekil 4) grubunda TUNEL pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış bulundu (p<0.05). Apoptotik indeks (%) (Tablo 4).

Tablo 4. Apoptotik indeks (%)

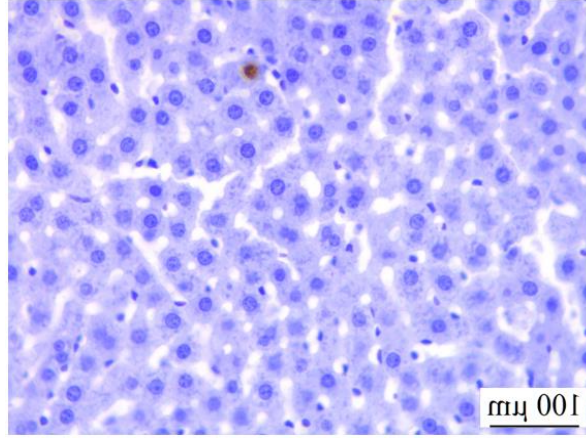
Gruplar	Apoptotik indeks (%)
Negatif kontrol	1,33±0,51
Pozitif kontrol	1,66±51
CCl ₄	2,33±1,21
CCl ₄ + O ₃	6,66±1,75 ^{abc}

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

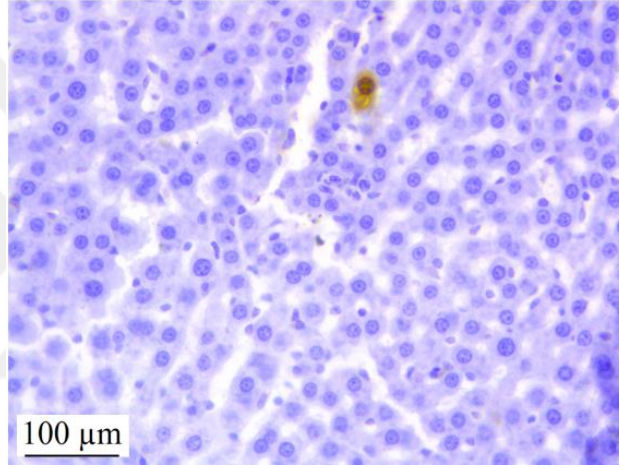
^a Kontrol gruplarına göre karşılaştırıldığında,

^b O₃ grubu ile karşılaştırıldığında,

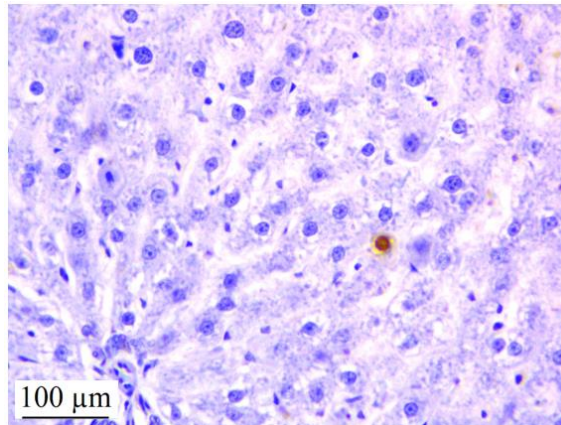
^c CCl₄ grubu ile karşılaştırıldığında, (p<0.05).



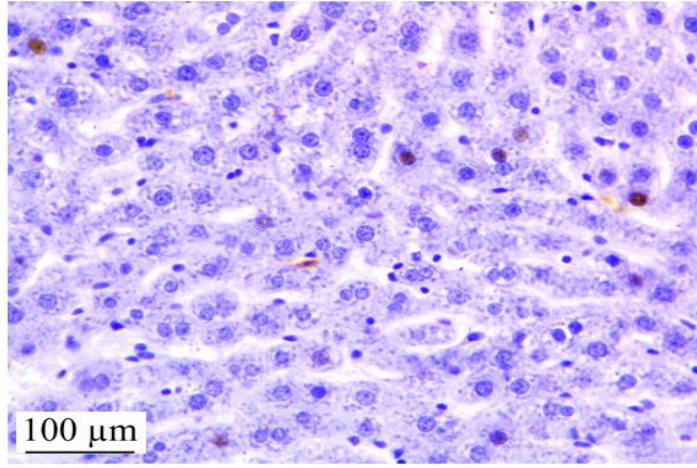
Şekil 1. Negatif kontrol TUNEL boyama



Şekil 2. Pozitif kontrol TUNEL boyama



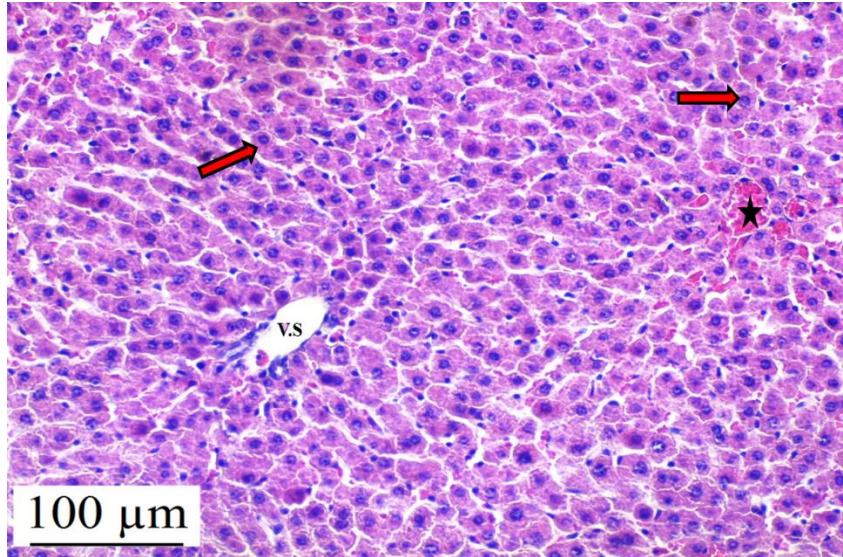
Şekil 3. CCL₄ TUNEL boyama



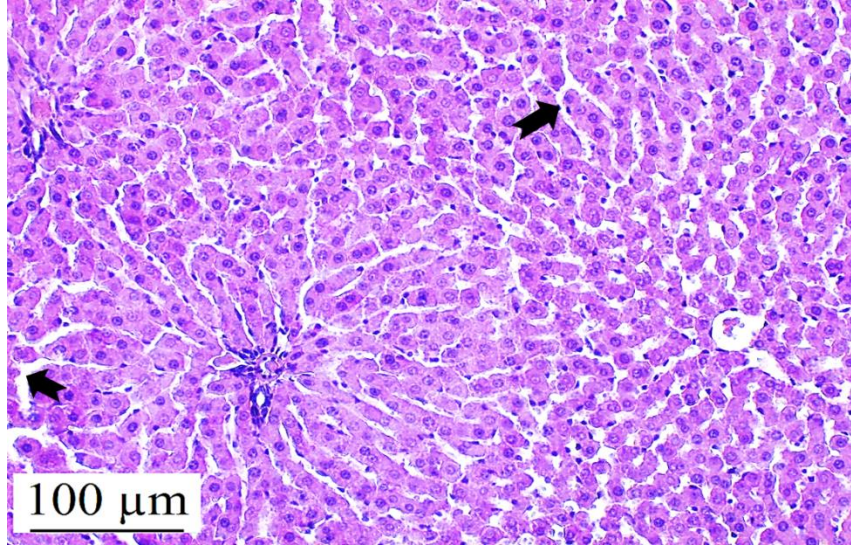
Şekil 4. CCL₄+ O₃ TUNEL boyama

5.2. Histolojik Bulgular

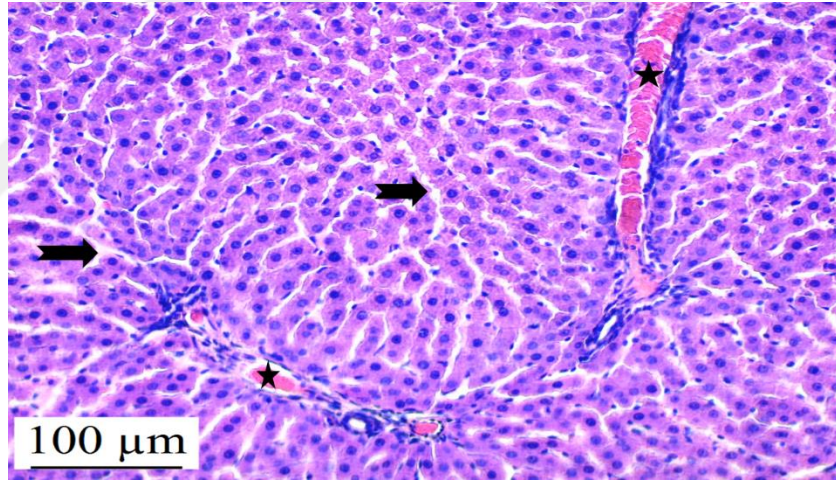
H&E, PAS ve Masson Trikom histolojik boyama metodları uygulandıktan sonra deney hayvanlarının karaciğer dokularından elde edilen histolojik görüntüler şekil 5, şekil 6, şekil 7, şekil 8, şekil 9, şekil 10, şekil 11, şekil 12, ve şekil 13’de sonuçları aşağıda açıklandı.



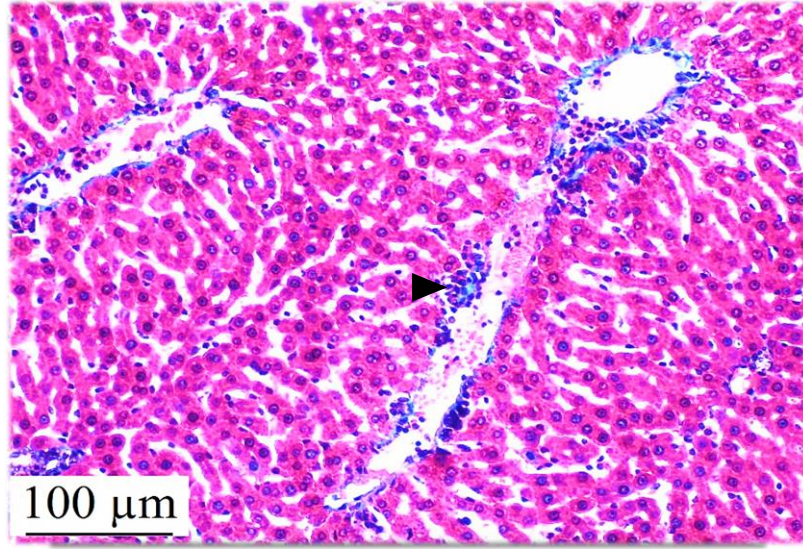
Şekil 5. Negatif kontrol grubuna ait kesit. Normal histolojik görünümlü hepatositler (kırmızı ok) ve Vena sentralis (V.S), hafif vasküler konjesyon (siyah yıldız). H&E x20.



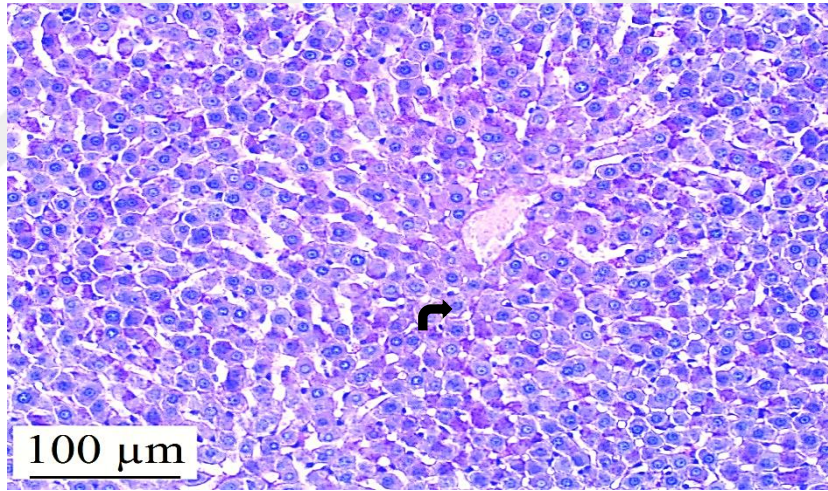
Şekil 6. Pozitif kontrol grubuna ait kesit. Hafif sinüzoidal dilatasyon (çentikli siyah ok).
Pas x20.



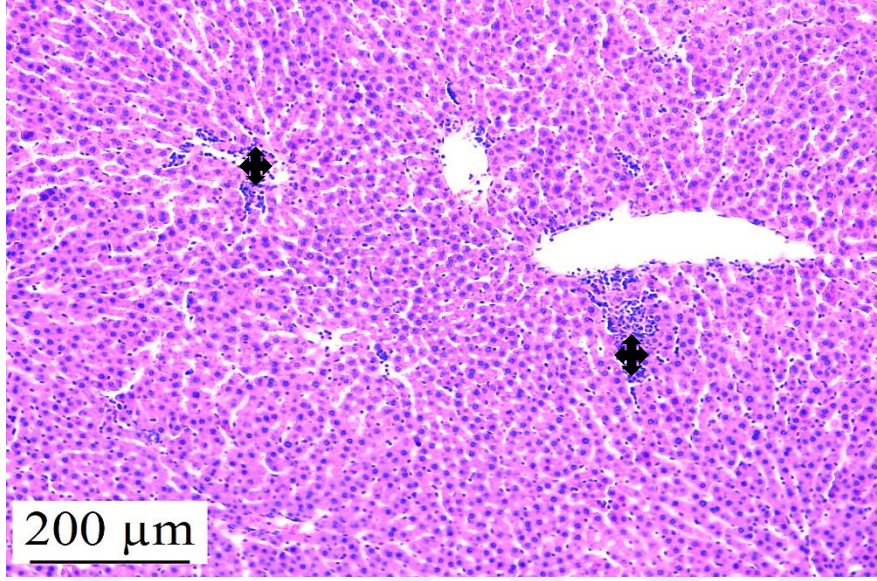
Şekil 7. Pozitif kontrol grubuna ait kesit. Vasküler konjesyon (siyah yıldız), Hafif sinüzoidal dilatasyon (çentikli siyah ok). H&E x20.



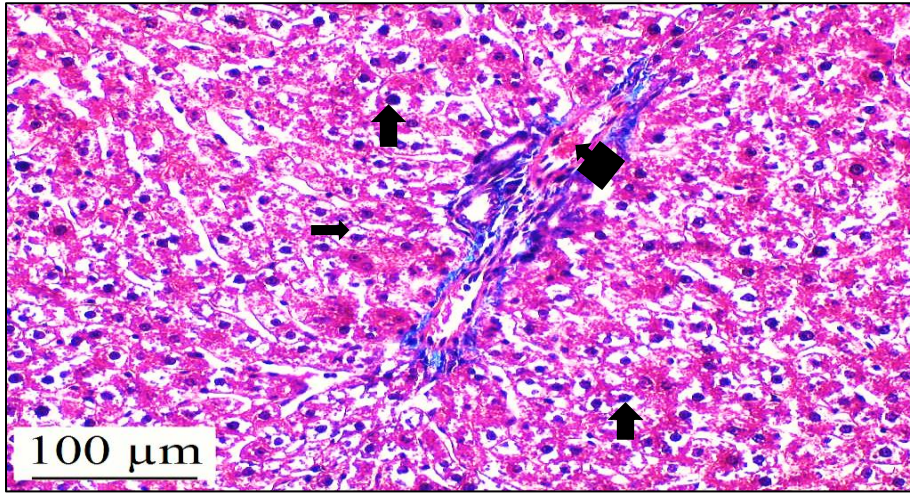
Şekil 8. CCl₄ grubuna ait kesit. Portal alanda mononükleer hücrelerde artış(siyah üçgen).
Masson x20.



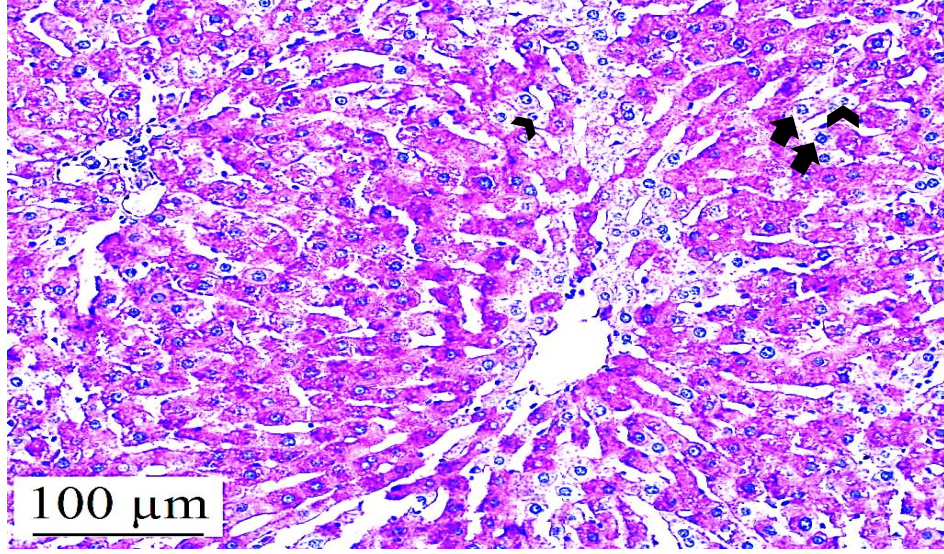
Şekil 9. CCl₄ grubuna ait kesit. Az sayıda hepatositte mikroveziküler yağlanma ve
mononükleer hücre artışı(eğri siyah ok). Pas x20.



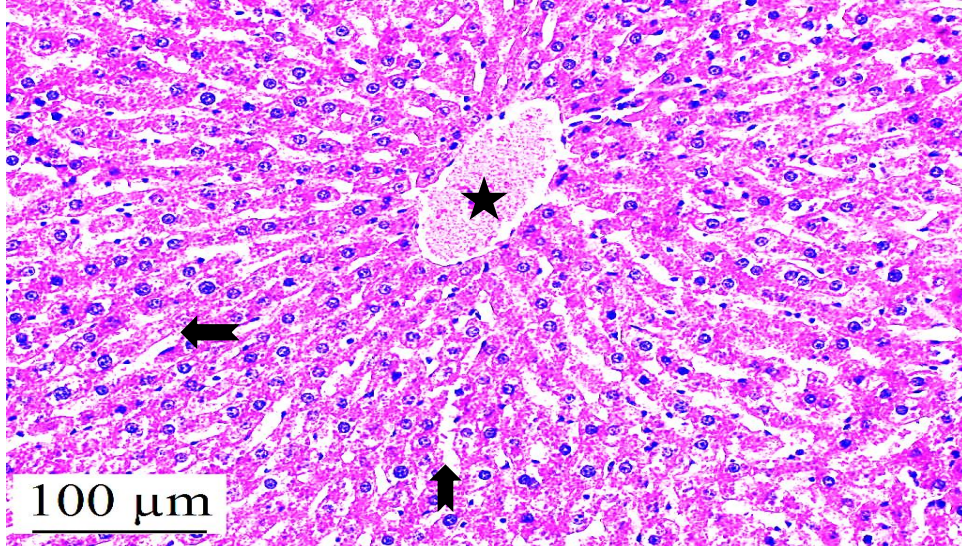
Şekil 10. CCl₄ grubuna ait kesit. V. centralis ve sinüzoidler arasında mononükleer hücre infiltrasyonu (çok yönlü siyah ok). H&E x10.



Şekil 11. CCl₄ + O₃ grubuna ait kesit. Glikojenini kaybetmiş hepatositler (siyah ok), central dizilimde bozulma, damarda konjesyon (kalın siyah ok). Masson x20.



Şekil 12. $\text{CCl}_4 + \text{O}_3$ grubuna ait kesit. Bazı alanlarda glikojen içeriği boşalmış hepatositler (siyah ok). Heterokromatik ve piknotik çekirdekli hepatositler (siyah ok başı). Pas x20



Şekil 13. $\text{CCl}_4 + \text{O}_3$ grubuna ait kesit. Belirgin sinüzoidal dilatasyon (çentikli siyah ok), vasküler konjesyon (siyah yıldız). H&E x20.

6.TARTIŞMA

Karaciğer; gerek sindirim sistemindeki önemi, gerek dolaşım sistemindeki özelliği ve gerekse hayati fonksiyonları nedeniyle birçok etkenden dolayı hasarlanabilmektedir. Karaciğer çeşitli kimyasal ajanları, toksik etkili ürünleri ve farmakolojik maddeleri inhibe eden önemli bir organdır. Bu nedenle çeşitli birçok faktör karaciğerde akut veya kronik bozukluklara neden olur (70).

Karaciğerde akut veya kronik hasarlanmaya neden olan kimyasal meddelerden biri de CCl_4 'tür. CCl_4 ile oluşturulan deneysel karaciğer hasarı modellerinde oluşan basamaklar; redüktif dehalojenasyon, radikallerin kovalent bağlanması, protein sentezi inhibisyonu, yağ birikimi, kalsiyum sekestrasyonunda kayıp, apoptozis ve son olarak fibrozis ile devam etmektedir (71).

Chen ve ark. (72) yaptıkları deneysel çalışmada; CCl_4 ile akut karaciğer hasarı modeli oluşturup, kalikozinin koruyuculuğunu araştırmışlardır. Çalışmada CCl_4 toksikasyonuna bağlı olarak hepatosit dejenerasyonunda ve TUNEL ile boyanan apoptotik hücre sayısında önemli artış olduğunu rapor etmişlerdir. Yaptığımız çalışmada literatürle uyumlu şekilde CCl_4 toksikasyonuna maruz bırakılan sıçanların karaciğer dokusunda TUNEL ile boyanan apoptotik hücre sayısında artış tesbit edildi.

Li ve ark. (73) CCl_4 ile karaciğer toksikasyonu oluşturdukları çalışmada, CCl_4 'e maruz kalan sıçanların karaciğer dokularında dağınık nekroz alanları, belirgin hepatosit ödemi, hücresel sınır kaybı oluştuğunu, hepatik yapının bozulduğunu ve TUNEL boyama sonuçlarında hepatosit apoptozisinde artış

olduğunu bildirmişlerdir. Eidi ve ark. (74) yaptıkları deneysel çalışmada CCl₄ ile tedavi edilen sıçanlardan alınan karaciğer kesitlerinde lobüller boyunca yağ birikimlerinin, hücresel vakuolizasyon ve nekrozun yanı sıra sinüzoidal endotelin fokal bozulması ile Disse boşluklarının genişlemesinin, portal alanda mononükleer inflamatuvar hücre infiltrasyonunun geliştiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada da literatürle benzer şekilde CCl₄'e maruz kalan sıçanların TUNEL pozitifliğinde artış meydana geldiği, bunun yanında mikroveziküler yağlanma, portal alanda, v. centralis ve sinüzoidler arasında mononükleer hücre sayısında artış şeklinde hepatik yapıda bozulmaların olduğu saptandı.

Yapılan deneysel çalışmalarda O₃'nun histolojik olarak apoptotik indekste azalmaya neden olduğu rapor edilmiştir (75, 76, 77). Yaptığımız çalışmada ise sadece O₃ verilen deney hayvanlarının karaciğer dokularında TUNEL pozitifliği kontrol grubuna göre anlamlı farklılık oluşturmadı.

Güvendi ve ark. (78) yaptıkları deneysel çalışmada ip haftada 6 gün O₃'na maruz bırakılan sıçan karaciğerlerini histopatolojik olarak incelemiş ve H&E boyama sonucu minimal hepatosit değişiklikler rapor etmişlerdir. Bu çalışmada da literatürle uyumlu şekilde hafif vasküler konjesyon ve hafif sinüzoidal dilatasyon şeklinde minimal hepatosit değişiklikleri gözlemledik.

Yapılan bu çalışmada CCl₄+O₃ verilen gruptaki sıçanların karaciğer dokularında TUNEL pozitifliğinin anlamlı derece arttığı ve histopatolojik görüntülemelerde diğer boyama yöntemleriyle glikojenini kaybetmiş hepatosit, vasküler konjesyon, central dizilimde bozulma ve belirgin sinüzoidal dilatasyon bulguları elde edildi. Literatürde CCl₄ ve O₃'nun birlikte kullanılarak yapıldığı

deneysel çalışmaya rastlanmamış olup çalışma sonucunda elde edilen bu veriler tartışılmamaktadır.

Sonuç olarak; yapılan deneysel çalışmada tek başına uygulanan O₃ hafif derecede hepatosit değişiklikler yapmakta ve TUNEL pozitifliğinde anlamlı olmayan bir artış yapmakta, bu da uygulanan dozun oksidan değerlerde olmadığını göstermektedir. Tek başına uygulanan CCl₄ TUNEL pozitifliğinde daha fazla artış ve belirgin hepatosit hasarı yapmakta, bu da literatürde olduğu gibi hepatotoksik özelliğini ortaya koymaktadır. Fakat CCl₄+O₃'nun birlikte verilmesi TUNEL pozitifliğini anlamlı derecede arttırmış ve ciddi hepatosit hasarı oluşturmuştur. Bu da bize CCl₄ ve O₃ dozları ve O₃'nun CCl₄'e karşı antioksidan olarak kullanılması ile ilgili daha fazla çalışma yapılması gerektiğini göstermektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Anatomi kitap 1.cilt Kaplan ARINCI Alaitin ELHAN güneş kitabevi ANKARA 2001 265-269.
2. Özel HİSTOLOJİ kitap mukaddes Eşrefoğlu
3. Netter temel histoloji
4. Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Ankara: Palme Yayınevi; 2006. 447-474.
5. Ovalle WK, Nahirney P. Netter Temel Histoloji. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri; 2009. 311-332.
6. Ross MH, Pawlina W. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas. Ankara: Palme Yayınevi; 2013.628-662.
7. Mercanlıgil SM. 2008. Karaciğer, safra kesesi ve pankreas hastalıklarında beslenme. Diyet El Kitabı. Hatipoğlu Yayınları: 116, Yükseköğretim Dizisi: 36, 5. Baskı, s.179-213, Ankara.
8. <https://rozen2016.wordpress.com/anotomi-ve-fizyoloji>
9. <https://www.turkcerrahi.com/makaleler/karaciger/>
10. Shen MM. Nodal Signaling: Developmental Roles and Regulation. Development 2007; 134, 1023–1034.
11. Zorn AM, Wells JM. Molecular Basis of Vertebrate Endoderm Development. International Review of Cytology 2007; 259: 49-111.
12. Duncan SA, Watt AJ. BMPs on the Road to Hepatogenesis. Genes and Development. 2001; 15: 1879-1884.
13. Rossi JM, Dunn NR, Hogan BL, Zaret KS. Distinct Mesodermal Signals, Including BMPs from the Septum Transversum Mesenchyme, are Required in Combination for Hepatogenesis from the Endoderm. Genes & Development. 2001; 15: 1998–2009.
14. Dessimoz J, Opoka R, Kordich JJ, Grapin-Botton A, Wells JM. FGF Signaling is Necessary for Establishing Gut Tube Domains Along the Anterior-Posterior Axis in Vivo. Mechanisms of Development 2006; 123: 42–55.
15. Mcln VA, Rankin SA, Zorn MA. Repression of Wnt/ β -catenin Signaling in the Anterior Endoderm is Essential for Liver and Pancreas Development. Development 2007; 134: 2207-2217.
16. Bort M, Tremblay K, Signore JP, Martinez- Barbera JP, Zaret K. Homeobox Gene Controls the Transition of the Endoderm to a Pseudostratified, Cell Emergent Epithelium for Liver Bud Development. Developmental Biology 2006; 290: 44-56.
17. Shiojiri N, Sugiyama Y. Immunolocalization of Extracellular Matrix Components and Integrins During Mouse Liver Development. Hepatology. 2004; 40(2): 346-355.

18. Collardeau-Frachon S, Scoazec JY. Vascular Development and Differentiation During Human Liver Organogenesis. *Anatomical Record* 2008; 291(6): 614-627.
19. Elvevold K, Simon-Santamaria J, Hasvold H, McCourt P, Smedsrød B, Sørensen KK. Liver Sinusoidal Endothelial Cells Depend on Mannose Receptor-Mediated Recruitment of Lysosomal Enzymes for Normal Degradation Capacity. *Hepatology* 2008; 48(6): 2007-2015.
20. Enzan H, Himeno H, Hiroi M, Kiyoku H, Saibara T, Onishi S. Development of Hepatic Sinusoidal Structure with Special Reference to the ITO Cells. *Microscopy Research and Technique* 1997; 39(4): 336-349.
21. Yamane A, Seetharam L, Yamaguchi S, Gotoh N, Takahashi T, Neufeld G, Shibuya M. A New Communication System Between Hepatocytes and Sinusoidal Endothelial Cells in Liver Through Vascular Endothelial Growth Factor and Flt Tyrosine Kinase Receptor Family (Flt-1 and KDR/Flk-1). *Oncogene* 1994; 9(9): 2683-2690.
22. Yoshida M, Nishikawa Y, Omori Y, Yoshioka T, Tokairin T, McCourt P, Enomoto K. Involvement of Signaling of VEGF and TGF-beta in Differentiation of Sinusoidal Endothelial Cells During Culture of Fetal Rat Liver Cells. *Cell Tissue Research* 2007; 329(2): 273-82.
23. Kiserud T, Acharya G. The Fetal Circulation. *Prenatal Diagnosis* 2004; 24(13): 1049-1059.
24. Dickson AD. The Development of the Ductus Venosus in Man and the Goat. *Journal of Anatomy* 1957; 91(3): 358-368.
25. Ando H. Embryology of the biliary tract. *Dig Surg.* 2010;27(2):87-90.
26. Sherlock S. and Dooley J. Anatomy and Function, In —Diseases of the Liver and Biliary System. Ed. Sherlock S. and Dooley J, 10th Ed, 8-16, Oxford Blackwell Science Ltd, Oxford, 1997.
27. Millward-Sadler GH, Jezequel AM. Normal Histology and Ultrastructure. In: Wright R, Millward-Sadler GH, Alberti KGMM KS, eds. *Liver and Biliary Disease*. 2nd ed. London: Bailliere Tindall; 13-44, 1985.
28. Rappaport AM. The Structural and Functional Unit in the Human Liver (liver acinus). *Anat Rec* 130:673-689, 1988.
29. Ranek L, Keiding N, Jensen ST. A morphometric Study of Normal Human Liver Cell Nuclei. *Acta Pathol Microbiol Scand A* 83:467-476, 1975.
30. Aytakin Y. ve Solakoğlu S. Temel Histoloji. 10. Baskı, 332-344, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2006.
31. Doğan A, 2000. Farmakoloji. Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Ders Kitapları, Kars.
32. Dianzani, MU, 1979. Biological Activity of Methylglyoxal and Related Aldehydes. *Submolecular Biology and Cancer Ciba Foundation Series*, 67: 245-269.
33. National Academies Press, 1995.

34. Thrall KD, Vucelick ME, Gies RA, et al. Comparative Metabolism of 113 Carbon Tetrachloride İi Rats, Mice, and Hamsters Using Gas Uptake and PBPK Modeling. *Journal of Toxicology and Environmental Health A*, 2000; 60: 531-548.
35. Kumar V, Abbas A, Fausto N. *Pathologic Basis of Disease*. 7nd Ed. China: Elsevier Saunders. 2005; 1525.
36. Basu S. Carbon Tetrachloride-induced Lipid Peroxidation: Eiocosanoid Formation and Their Regulation by Antioxidant Nutrients. *Toxicology*, 2003; 1-15.
37. Özoran Y, 1987. Hücre Zedelenmesi ve Adaptasyonu, Patoloji. Robbins and Kumar BasicPathology (Editor: Uluoğlu, O.). Güneş Kitabevi, Aankara. 952.
38. Hernandez-Munoz R, Diaz Munoz M, Lopez V, Lopez-Barrera F, Yanez L, Virdio S. Balance Between Oxidative Damage and Proliferative Potential in an Experimental Rat Model of CCl4 İnduced Cirrhosis, Protective Role of Adonesine Administration. *Hepatology* 1997; 26: 1100-1110.
39. Weber LW, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and Mechanism of Action Ofhaloalkanes: Carbon Tetrachloride as a Toxicological Model. *Critical Reviews in Toxicology* 2003; 33: 105-136.
40. Güven A, Güven A, Gülmez M. The effect of Kefir on the Activities of GSHPx, GST, CAT, GSH and LPO Levels in Carbon Tetrachloride-İnduced Mice Tissues. *Journal of Veterinary Medicine B* 2003; 50: 412-416.
41. Oh WY, Pyo S, Lee KR, et al. Effect of Holotrichia Diomphalia Larvae on Liver Fibrosis and Hepatotoxicity in Rats. *J Ethnopharma* 2003; 87: 175-180.
42. Hong RT, Xu JM, Mei Q. Melatonin Ameliorates Experimental Hepatic Fibrosisinduced by Carbon Tetrachloride in Rats. *World J Gastroenterol* 2009; 15:1452-1458.
43. Ökten, 1998.
44. Parola M, Robino G. Oxidative Stress-Related Molecules and Liver Fibrozis. *JHepatolog* 2001; 35: 297-306.
45. Gochee PA, Johnsson JR, Clouston AD. Steatozis in Chronic Hepatitis C: Association with İncreased Messenger RNA Expression of Collagen I, Tumor Necrosisfactor-alpha and Cytochrome P450 2E1. *J Gastroentology and Hepatology* 2003; 18: 386-392.
46. Wang H, Wei W, Wang NP. Melatonin Ameliorates Carbontetrachloride İnduced Hepatic Fibrogenesis in Rats via İnhibition of Oxidative Stres. *Life Sciences* 2005; 77: 1902-1915.
47. Lavanya G, Sivajyothi R, Manjunath M, Parthasarathy PR. Fate of Biomolecules During Carbon Tetrachloride İnduced Oxidative Stress and Protective Nature of Ammoniac Baccifera Linn. A Natural Antioxidant. *Int J Green Pharma* 2009; 3: 300-305.
48. Kujawska M, Ignatowicz E, Ewertowska M, Oszmianski J, Jodynys-Liebert J. Protective Effect of Chokeberry on Chemical-induced Oxidative Stress in Rat. *Human Exp Toxicol* 2010; 30: 199-208.

49. Boll M, Weber L, Becker E, Stampfl A. Mechanism of Carbon Tetrachloride Induced Hepatotoxicity. Hepatocellular Damage by Reactive Carbon Tetrachloride Metabolites. *Z Naturforsch* 2001; 560: 649-659.
50. Bocci VA, Zanardi I, Travagli V. Oxygen/Ozone as a Medical Gas Mixture. A Critical Evaluation of the Various Methods Clarifies Positive and Negative Aspects. *Med Gas Res.* 2011; 1: 6–6.
51. Beck EG, Wasser G, Viebahn-Hansler R. The Current Status of Ozone Therapy Empirical Developments and Basic Research. *Forsch Komplementarmed* 1989; 5: 61-75.
52. Viebahn-Haensler R. The Use of Ozone in Medicine 5 ed 2007, Iffezheim, Germany: Odrei Publishers. p.14-48. Viebahn-Haensler, 2007
53. Bocci VA. Scientific and Medical Aspects of Ozone Therapy. State of the art. *Arch Med Res.* 2006; 37: 425–435.
54. Özler M, Ş.Ö, Korkmaz A, Ozon Gazının Tıbbi Amaçlı Kullanılması. *TAF Preventive Medicine Bulletin* 2009. 8(1): p. 59-64.
55. Bocci V, Valacchi G, Corradeschi F, et al. Studies on the Biological Effects of Ozone: 7. Generation of Reactive Oxygen Species (ROS) After Exposure of Human Blood to Ozone. *J Biol Regulat Homeost Agents* 1998; 12(3): 67-75.
56. Hernandez FA. To What Extent Does Ozone Therapy Need a Real Biochemical Control System? Assessment and Importance of Oxidative Stress. *Arch Med Res.* 2007; 38(5): 571-8.
57. Travagli V, Zanardi I, Silvietti A, Bocci V. A Physicochemical Investigation on the Effects of Ozone on Blood. *Int J Biol Macromol.* 2007; 41: 5; 504-511.
58. Young IS. and JV Woodside, Antioxidants in Health and Disease. *J Clin Pathol*, 2001; 54(3): p. 176-86.
59. Snyder SH, Baranano DE. Heme Oxygenase: a font of Multiple Messengers. *Neuropsychopharmacology* 2001; 25(3): 294-298.
60. Bocci V, Luzzi E, Conradeschi F, et al. Studies on the Biological Effects of Ozone. 4. Cytokine Production and Glutathion Levels in Erythrocytes. *J Biol Regul Homeost Agents.* 1993(4); 7: 133-8.
61. Gornicki A, GutszeA. In Vitro Effects of Ozone on Human Erythrocyte Membranes: An EPR study. *Acta Biochimica Polonica* 2000; 47: 4.
62. Bocci V, Biological and Clinical Effects of Ozone. Has Ozone Therapy a Future in Medicine ? *Br J Biomed Sci.* 1999; 56: 270-279.
63. Volkhovskaya NB, Tkachenko SB, Belopolsky AA. Modulation of Phagocytic Activity of Blood Polynuclear Leukocytes with Ozonized Physiological Saline. *Bull Exp Biol Med.* 2008; 146(5): p. 559-61.
64. Baeuerle PA, Henkel T. Function and Activation of NF-kappa B in the Immune System. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: p. 141-79.

65. Viebahn-Hänsler R. The Use of Ozone in Medicine: Mechanisms of Action. Munich. 2003; 5; 23-25.
66. Bocci V, et al. Ozonation of Human Blood Induces a Remarkable Upregulation of Heme Oxygenase-1 and Heat Stress Protein-70. *Mediators Inflamm*, 2007; p. 26785.
67. Shaker E, Mahmoud H, Mnaa S. Silymarin, the Antioxidant Component, and Silybum Marianum Extracts Prevent Liver Damage, *Food and Chemical Toxicology* 2010; 48: 803-806.
68. Bahçecioğlu ĞH, Koca SS, Poyrazoğlu OK, Yalnız M, Özeran ĞH, Üstündağ B, Ğahin K, Dağlı AF, Işık A. Hepatoprotective Effect of Infliximab, and Anti-TNF- α Agent, on Carbon Tetrachloride-Induced Hepatic Fibrosis, *Inflammation* 2008; 31: 215-221.
69. Madej P, Plewka A, Madej JA, Plewka D, Mrocza W, Wilk K, Dobrosz Z. Ozone Therapy in Induced Endotoxemic Shock. II. The Effect of Ozone Therapy Upon Selected Histochemical Reactions in Organs of Rats in Endotoxemic Shock. *Inflammation*. 2007; 30: 69-86.
70. Çetinkaya A. Ratlarda N-asetil Sistein ve L-karnitin'in Karbon Tetraklorür ile Oluşturulan Akut Karaciğer Hasarı Üzerine Etkileri (Yan Dal Uzmanlık Tezi). Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bilim Dalı, Kahramanmaraş, Türkiye. 2009.
71. Hong RT, Xu JM, Mei Q. Melatonin Ameliorates Experimental Hepatic Fibrosis induced by Carbon Tetrachloride in Rats. *World J Gastroenterol*, 2009; 15: 1452-1458.
72. Chen X, Meng Q, Wang C, et al. Protective Effects of Calycosin Against CCl₄-Induced Liver Injury with Activation of FXR and STAT3 in Mice. *Pharm Res*. 2015; 32(2): 538-548.
73. Li S, Liu J, Zhang M, Chen Y, Zhu T, Wang J. Protective Effect of Eckol Against Acute Hepatic Injury Induced by Carbon Tetrachloride in Mice. *Mar Drugs*. 2018; 16(9): 300.
74. Eidi A, Mortazavi P, Behzadi K, Rohani AH, Safi S. Hepatoprotective Effect of Manganese Chloride Against CCl₄-induced Liver Injury in Rats. *Biol Trace Elem Res*. 2013; 155(2): 267-275.
75. Alpcan S, Başar H, Aydos TR, Kul O, Kısa Ü, Basar MM. Apoptosis in Testicular Tissue of Rats After Vasectomy: Evaluation of eNOS, iNOS İmmunoreactivities and the Effects of Ozone Therapy. *Turk J Urol*. 2014; 40(4): 199-206.
76. Mete F, Tarhan H, Celik O, et al. Comparison of İntraperitoneal and İntratesticular Ozone Therapy for the Treatment of Testicular İschemia-reperfusion İnjury in Rats. *Asian J Androl*. 2017; 19(1): 43-46.
77. Güçlü A, Erken HA, Erken G, et al. The Effects of Ozone Therapy on Caspase Pathways, TNF- α , And HIF-1 α İn Diabetic Nephropathy. *Int. Urol. Nephrol*. 2016; 48: 441-450.

78. Güvendi GF, Eroğlu HA, Mustafa Makav, Güvendi B, Adalı Y. Selenium or Ozone: Effects on Liver Injury Caused by Experimental Iron Overload. Life Sci. 2020; 262: 118558.

