

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**WISTAR ALBINO SIÇANLARDA D-GALAKTOZAMİN
İLE OLUŞTURULMUŞ AKUT HEPATİT'İN
TEDAVİSİNDE PENTOXIFYLLINE VE CAFFEIC ACID
PHENETHYL ESTER'İN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Elif TAŞLIDERE
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Nigar VARDI**

MALATYA-2012

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**WISTAR ALBINO SIÇANLARDA D-GALAKTOZAMİN
İLE OLUŞTURULMUŞ AKUT HEPATİT'İN
TEDAVİSİNDE PENTOXIFYLLINE VE CAFFEIC ACID
PHENETHYL ESTER'İN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Elif TAŞLIDERE
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Nigar VARDI

Bu tez, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2011/55 proje numarası ile desteklenmiştir.

ONAY

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca, her türlü çalışmamda hiç bir zaman ilgi ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım ve her zaman yanımda olan değerli hocam Prof. Dr. Nigar VARDI'ya, benden desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Ali OTLU, Prof. Dr. Mukaddes EŞREFOĞLU, Doç. Dr. Meltem KURUŞ ve Doç. Dr. Mehmet GÜL'e, çalışma arkadaşlarım Dr. Aslı ÇETİN, Dr. Hülya ELBE, Arş. Grv. Azibe YILDIZ ve Birgül YİĞİTCAN'a ve her zaman yanımda olan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Ayrıca 2011/55 no'lu bu projeyi maddi yönden destekleyen Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Başkanlığı'na katkılarından dolayı teşekkür ederim.

ÖZET

Bu çalışmada, Galaktozamin (GAL) ile hepatit oluşturulan sıçanlarda, karaciğer dokusunda meydana gelen histolojik değişiklikler ve bu değişiklikler üzerine Pentoxifylline (PTX) ve Caffeic acid phenethyl ester (CAPE)'in etkilerinin histolojik ve biyokimyasal yöntemlerle incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarından temin edilen toplam 49 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Denekler 1. Grup: Kontrol grubu 2. Grup: GAL (24) grubu 3. Grup: GAL(dev) grubu 4. Grup: GAL+PTX grubu 5. Grup: GAL+CAPE grubu 6. Grup: PTX grubu 7. Grup: CAPE grubu olarak 7 gruba ayrıldı. 21. Gün sonunda 2. grubun dışında bütün sıçanlar ketamin/ksilazin anestezisi altında kurban edildi ve karaciğerleri çıkarıldı. Karaciğerin sağ lobu biyokimyasal analizlerde, sol lobu histolojik analizlerde kullanıldı. Alınan dokular, rutin doku takip işlemlerinden geçirilerek parafine gömüldü. Parafin bloklardan alınan kesitlere histokimyasal (Mayer's Hemotoksilen-Eozin, PAS, Masson Trikrom, Toluidin mavisi) ve immunohistokimyasal (Ki-67 ve kaspaz-3) boyama yöntemleri uygulandı. Boyanan kesitler ve Leica DFC-280 ışık mikroskopunda incelendi.

Histolojik analizlerde; Galaktozamin uygulanan grupların karaciğer parankimi içerisinde normal histolojik yapıdan farklı olarak izlenen, sınırları düzensiz alanlar izlendi. Bu lokal alanlar inflamatuvar, nekrotik ve apoptotik hücreler içermektedir. Lobülün periferinde yer alan hepatositlerde glikojen kaybı gözlemlendi. Menekşe renginde boyanan granülleri ile mast hücreleri sadece portal alanlarda izlendi. Portal alanlardaki bağ dokusu içerisinde izlenen mast hücre sayısının GAL gruplarında diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı tespit edildi ($p=0.0001$). Ayrıca Ki-67 ve kaspaz-3 boyama metodu uygulanan kesitlerde Ki-67 ve kaspaz-3 (+) boyanan hücre sayılarının kontrol grubuna göre, GAL gruplarında anlamlı derecede arttığı tespit edildi ($p=0.0001$).

Biyokimyasal analizlerde; Galaktozamin uygulanan gruplarda, kontrol grubuna göre MDA ve MPO seviyelerinde artış gözlenirken, GSH ve GPx aktivitelerinde azalma izlendi. Diğer yandan GAL uygulanan sıçanlara PTX ve CAPE verilmesiyle karaciğerde izlenen histolojik ve biyokimyasal hasarın düzeldiği izlendi.

Bu gruplarda karaciğer parankimasında GAL'in neden olduğu inflamatuvar, apoptotik ve nekrotik hücreleri içeren lokal alanların sınırları önemli derecede küçüldü. Ayrıca mast ve kaspaz-3 (+) hücre sayılarının azaldığı, Ki-67 (+) hücre sayısının ise anlamlı derecede arttığı tespit edildi. Biyokimyasal analizlerde ise, GAL grubuna göre MDA, MPO seviyesi azalırken, GSH ve GPx seviyesi anlamlı derecede arttı.

Bu çalışma GAL'in neden olduğu karaciğer hasarı üzerine PTX ve CAPE'nin iyileştirici etkileri olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak karaciğer hastalıklarının tedavisinde PTX ve CAPE gibi antioksidan ve antiinflamatuvar özelliği olan ajanların kullanılmasının, olumlu etkileri olabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Hepatit, Galaktozamin, Pentoxifylline, CAPE

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate histological changes occurred in hepatic tissue and effects of pentoxifylline (PTX) and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on these changes by using histological and biochemical methods in rats, in which hepatitis was established by galactosamine (GAL).

In this study, forty-nine Wistar Albino male rats which were provided from Inonu University Laboratory Animals Research Center were used. Rats were divided into 7 groups as follows: Group 1, control group; Group 2, Gal (24) group; Group 3, GAL (continue) group; Group 4, GAL+ PTX group; Group 5, GAL+ CAPE group; Group 6, PTX group; and Group 7, CAPE group. Rats, other than those in Group 2, were sacrificed under ketamine/xylazine anesthesia and liver of the rats were removed after 21 days. Right lobe of liver was used for biochemical analysis, whereas left one for histological analysis. Removed tissue samples were applied to routine tissue processes and embedded in paraffin. Histological (Mayer's Hematoxylin-eosine, PAS, Masson's trichrome, Toluidine blue) and immunohistochemical (Ki-67 and kaspaz-3) staining methods were applied to sections obtained from paraffin blocks and preparations were examined by using Leica DFC-280 light microscope.

In histological evaluations, irregular areas with discrete appearance than normal histological structure were seen in the liver parenchyma of groups treated to galactosamine. These focal areas were comprised of inflammatory, necrotic and apoptotic cells. Glycogen loss was observed in the hepatocytes localized at the periphery of lobule. Mast cells stained to violet were solely observed in portal areas. It was found that number of mast cells in the connective tissue of portal areas were significantly higher in GAL groups compared to other groups ($p=0.0001$). In addition, number of cells with positive staining by Ki-67 and caspase-3 was significantly increased in GAL groups compared to control group ($p=0.0001$).

In biochemical analyzes, there was an increase in MDA and MPO levels, while a decrease was observed in GSH and GPx activity in groups treated to GAL compared to control group. On the other hand, it was seen that, in the groups treated to GAL, histological and biochemical injuries in the liver were recovered by administration of PTX and CAPE. In these groups, borders of GAL-induced focal areas involving inflammatory, apoptotic and necrotic cells were regressed. Moreover, it was found that numbers of mast cells and caspase-3 positive cells were decreased, while number of Ki-

67 positive cells was significantly increases. In the biochemical analysis, MDA and MPO levels were decreased compared to GAL group, while GSH and GPx levels were significantly increased.

In this study showed that ameliorative effects of PTX and CAPE on GAL-induced liver injury. In conclusion, we think that the treatment of liver diseases the use of agents with antioxidant and anti-inflammatory properties such as PTX and CAPE have beneficial effects.

Key Words: Hepatitis, Galactosamine, Pentoxifylline, CAPE

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	III
TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V-VI
ABSTRACT	VII-VIII
İÇİNDEKİLER	IX-XI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XII-XIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIV
TABLolar DİZİNİ	XV
GRAFİKLER DİZİNİ	XVI
RESİMLER DİZİNİ	XVII-XIX
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Karaciğer Anatomisi.....	2-5
2.2. Karaciğer Embriyolojisi.....	5-6
2.3. Karaciğer Histolojisi.....	7-17
2.4. Karaciğer Fonksiyonları.....	18-19
2.5. Oksidatif Stres ve Serbest Oksijen Radikalleri	19
2.6. Akut Hepatit.....	20
2.7. D-galaktozamin (D-GalN)	20-21
2.8. Pentoxifylline.....	21
2.9. Caffeic Acid Phenthyl Ester.....	22

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
3.1. Deney Hayvanları.....	23
3.2. Deney Grupları	23
3.3.Doku ve kan örneklerinin alınması.....	24
3.4.Histolojik Analizler.....	24
3.4.1.Histokimyasal Boyama Metodları.....	24
3.4.1.1.Hematoksilen Eozin Boyama Metodu.....	24-25
3.4.1.2.Periodik Asit Schiff Boyama Metodu.....	25
3.4.1.3.Masson's Trikrom Boyama Metodu	25-26
3.4.1.4.Toluidin Mavisi Boyama Metodu.....	26
3.4.2. Histolojik Değerlendirme.....	26-27
3.4.3.İmmunhistokimyasal Boyama Metodu.....	27-28
3.4.4.İmmunohistokimyasal Değerlendirme.....	28
3.5.Biyokimyasal Analizler.....	29
3.5.1.Kimyasal Malzemeler.....	29
3.5.2.Dokuların homojenizasyonu.....	29
3.5.3.Protein Tayini.....	29-30
3.5.4.Enzim Aktivite Tayinleri.....	30
3.5.4.1. Doku Se-Bağımlı glutatyon peroksidaz aktivite tayini.....	30
3.5.4.2. Doku Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini.....	30-31
3.5.4.3. Lipit peroksidasyonunun belirlenmesi.....	31
3.5.4.4. Doku Glutatyon miktarı ölçümü.....	32
3.5.4.5. Doku MPO aktivitesinin ölçülmesi.....	32

3.6.Serum AST, ALT tayini.....	32
3.7.İstatistik Analiz.....	32
4. BULGULAR.....	33
4.1. Histopatolojik değerlendirme.....	33
4.1.1 Kontrol Grubu.....	33-37
4.1.2.GAL(24) Grubu.....	38-46
4.1.3.GAL (dev) Grubu	47-51
4.1.4. GAL+ PTX Grubu.....	52-57
4.1.5. GAL+ CAPE Grubu	58-63
4.1.6. PTX ve CAPE Grupları.....	64-71
4.2. Biyokimyasal Değerlendirme.....	72
4.2.1. Karaciğer Fonksiyon Testleri.....	72-73
4.2.2. Karaciğer Dokusunda MDA düzeyi.....	73-74
4.2.3. Karaciğer dokusunda glutatyon düzeyleri	75-76
4.2.4. Karaciğer dokusunda MPO düzeyleri.....	76-77
4.2.5.Karaciğer dokusunda antioksidan enzim düzeyleri.....	78-79
5. TARTIŞMA.....	80-89
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	90
7. KAYNAKLAR.....	91-108
8. EKLER.....	109
8.1.EK1: Etik Kurul Onay Formu.....	109
8.2.EK2: ÖZGEÇMİŞ.....	110

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AST	Aspartat aminotransferaz
ALT	Alanin aminotransferaz
ATP	Adenozin trifosfat
BrdU	Bromodeoxyuridine
CAPE	Caffeic acid phenethyl ester
CAT	Katalaz
Ca	kalsiyum
COX	Siklooksijenaz
CCl ₄	Karbontetraklorür
EDTA	Etilen diamintetraasetik asit
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
GAL	D-Galaktozamin
GPx	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	Redükte glutasyon
GSSG	Okside glutasyon
gr :	Gram
HAV	Hepatit A virüsü
HDV	Hepatit D virüsü
HCV	Hepatit C virüsü
HNF	Hepatosit nükleer transkripsiyon faktörü
HRO ₂	Hidroperoksil
HOCl	Hipoklorik asit
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HNO ₂	Nitröz oksit
HOCl	Hipokloröz asit
HRP	Horse radish peroksidaz
i.p.	İntraperitoneal
İnos	Nitrik oksit sentaz
Kaspaz	Cysteine Aspartate Specific ProteASEs
Lig	ligamentum
LOOH	Lipid hidroperoksit

LOO.	Peroksil radikalleri
L :	Litre
μ :	Mikron
μg :	Mikrogram
μm :	Mikrometre
mg :	Miligram
μmol	Milimol
H-E :	Hematoksilen Eozin
kg :	Kilogram
MPO	Myeloperoksidaz
MDA	Malondialdehit
NADPH	redükte beta nikotinamid adenin dinükleotid
NO	Nitrik oksit
NO ₂	nitrojen dioksit
NF-Kb	Nükleer faktör kapa B
OH-	Hidroksil iyonu
O ₂ -	Süperoksit anyonu
ONOO-	Peroksinitrit
PAS :	Periodik Asit Schiff
PBS	Fosfat tampon solusyonu
PTX	Pentoxifylline
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
RO ₂	peroksil
RONOO	alkil peroksinitrat
SOR	Serbest oksijen radikali
SOD	Süperoksit dismutaz
SF	Serum fizyolojik
SO	superoksit
TBA 2-	tiyobarbitürik asit
TNF- α	Tümör nekrozis faktör alfa
UDP	Uridin difosfat
UTP	Uridin trifosfat

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Karaciğer gelişiminin moleküler düzeni

Şekil 2. Klasik karaciğer lobülü

Şekil 3. Portal lobül

Şekil 4. Karaciğer asinusu

Şekil 5. Karaciğer sinuzoidleri

Şekil 6. Perisinüzoidal aralık (Disse aralığı)

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1:Grupların lokal alan, glikojen kaybı ve mast hücre sayıları bakımından karşılaştırılması

Tablo 2: Ki-67 ile hafif, orta ve kuvvetli derecede boyanan nükleus sayılarının gruplar arası karşılaştırılması

Tablo 3: Kaspaz-3 (+) hücre sayılarının gruplara göre dağılımı

Tablo 4: Grupların serum AST ve ALT seviyelerinin karşılaştırılması

Tablo 5: Gruplara ait ortalama MDA değerleri

Tablo 6: Grupların GSH seviyeleri

Tablo 7: Grupların MPO seviyelerinin karşılaştırılması

Tablo 8: Grupların SOD ve GPx aktivitelerinin karşılaştırılması

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1: Grupların mast hücre sayıları

Grafik 2: Grupların Ki-67(+) hücre sayısı

Grafik 3: Grupların kaspaz (+) hücre sayısı

Grafik 4: Grupların MDA seviyesi

Grafik 5: Grupların GSH seviyesi

Grafik 6: Grupların MPO seviyesi

Grafik 7: Grupların SOD seviyesi

Grafik 8: Grupların GPx seviyesi

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1:Kontrol grubu, karaciğerin normal histolojik görünümü santral ven (ok) ve portal alan (ok başı). Masson's Trikrom; X10.

Resim 2: Kontrol grubu; hepatosit kordonları arasında izlenen sinuzoidal tipte kapillerler (ok). H-E; X20.

Resim 3: Kontrol grubu, portal ven (yıldız), hepatik arter (ok başı) ve safra kanalı (ok). Masson's Trikrom; X40.

Resim 4: Kontrol grubu, hepatositlerin yuvarlak ve ökromatik nukleusları (oklar) ve sinuzoidlerde endotel hücrelerinin yassı ve koyu boyanmış nukleusları (ok başı). H-E; X40.

Resim 5: Kontrol grubu, PAS(+) hepatositlerin genel görünümü. PAS; X10

Resim 6: Kontrol grubu, hepatosit sitoplazması içindeki pembe renkte boyanmış glikojen. PAS; X20.

Resim 7: Kontrol grubu, menekşe renginde boyanan mast hücreleri (oklar). Toluidin mavisi; X40.

Resim 8: Kontrol grubu, Ki-67 ile pozitif reaksiyon gösteren kahverengi hepatosit nukleusları (oklar). Ki-67; X40.

Resim 9: Kontrol grubu, kaspaz 3 (+) hücre izlenmemekte. Kaspaz-3; X20.

Resim 10: GAL(24) grubu, parankim içerisinde normal histolojik yapıdan farklı olarak izlenen, sınırları düzensiz alanlar (oklar). H-E; X10.

Resim 11: GAL (24) grubu, parankim içerisinde izlenen sınırları düzensiz alanlar (oklar). Masson's Trikrom; X10.

Resim 12: GAL(24) grubu, inflamatuvar (yıldız), nekrotik (ok başı) ve apoptotik hücreler (ok) içeren lokal alanlar. H-E; X20.

Resim 13: GAL(24) grubu, etraflarındaki hücrelerden belirgin bir halo ile ayrılan apoptotik hücre (ok). H-E; X40.

Resim 14: GAL (24) grubu, apoptotik hücrelerin görünümü (oklar). H-E; X100.

Resim 15: GAL(24) grubu, pembe renkte boyanmış sitoplazmaları ile eozinofiller (oklar). H-E; X20.

Resim 16: GAL(24) grubu, lokal alanlar içerisinde izlenen pembe renkte boyanmış sitoplazmaları ile eozinofiller (oklar). H-E; X100.

Resim 17: GAL(24) grubu, sağlam hepatositler arasına dağılmış farklı şekillerde izlenen eozinofilik sitoplazmalı ve heterokromatik nukleuslu nekrotik hücreler (oklar). H-E; X40.

Resim 18: GAL(24) grubu, sağlam hepatositler arasına dağılmış nekrotik hücreler (oklar). Masson's Trikrom; X20.

Resim 19: GAL(24) grubu, lobülün periferinde yer alan hepatositlerde glikojen kaybı (yıldız). PAS; X10.

Resim 20: GAL(24) grubu, vena sentralisden uzaklaştıkça izlenen PAS (+) hücrelerin azalması (yıldız). PAS; X20.

Resim 21: GAL(24) grubu, lokal alanlara yakın, sağlam hepatositlerden belirgin bir halo ile ayrılan çok sayıda nukleus içeren PAS (+) dev yapılar (oklar). PAS; X40.

Resim 22: GAL(24) grubu, portal alanda izlenen mast hücreleri (oklar). Toluidin Mavisi; X40.

Resim 23: GAL(24) grubu, Ki-67 ile pozitif reaksiyon gösteren hepatosit nukleuslarının görünümü (oklar) X40.

Resim 24: GAL(24) grubu, portal alana yakın olarak gözlenen kaspaz (+) hücreler (oklar). Kaspaz-3; X40.

Resim 25: GAL(dev) grubu, sayıları azalmış ve sınırları küçülmüş lokal alanlar. H-E; X10.

Resim 26: GAL(dev) grubu, portal alanlar yakın PAS (+) boyanan hepatositlerin azalması (yıldızlar). PAS; X10.

Resim 27: GAL (dev) grubu, portal alanda bulunan mast hücreleri (oklar). Toluidin Mavisi; X40.

Resim 28: GAL(dev) grubu, Ki-67 pozitif reaksiyon gösteren hepatosit nukleusları izlenmekte (oklar). Ki-67; X40.

Resim 29: GAL(dev) grubu, kaspaz-3 (+) boyanan hücreler (oklar). Kaspaz-3; X20.

Resim 30: GAL+PTX grubu, santral ven ve hepatositlerin genel histolojik görünümü H-E; X10.

Resim 31: GAL+PTX grubu, küçük bir inflamasyon alanı dışında, normal histolojik görünüm izlenmekte. Masson's Trikrom; X10.

Resim 32: GAL+PTX grubu, hücrelerde hidropik değişiklikler (oklar). H-E; X20.

Resim 33: GAL+PTX grubu, PAS (+) boyanan hepatositlerin görünümü PAS; X10.

Resim 34: GAL+PTX grubu, portal alan etrafında, bağ doku içerisinde izlenen mast hücreler (ok) Toluidin Mavisi; X40.

Resim 35: GAL+PTX grubu, Ki-67(+) boyanan nükleusların görünümü (oklar); Ki-67; X40.

Resim 36: GAL+PTX grubu, kaspaz-3 (+) boyanan hücreler; X20.

Resim 37: GAL+CAPE grubu, santral ven ve hepatositlerin genel görünümü H-E; X10.

Resim 38: GAL+CAPE grubu, parankima içerisinde seyrek olarak rastlanan inflamatuvar hücreler (oklar) H-E; X20.

Resim 39: GAL+CAPE grubu, PAS (+) boyanan hepatositlerin görünümü PAS; X10.

Resim 40: GAL+CAPE grubu, mast hücreleri (ok) Toluidin Mavisi; X40.

Resim 41: GAL+CAPE grubu, Ki-67(+) boyanan nükleusların görünümü (oklar). Ki-67; X40.

Resim 42: GAL+CAPE grubu, kaspaz (+) boyanan hücrelerin görünümü (oklar); X20.

Resim 43: PTX grubu, portal alan ve hepatositlerin genel görünümü. H-E; X10.

Resim 44: CAPE grubu, portal alan ve hepatositlerin görünümü PTX grubuna benzemekte. H-E; X10.

Resim 45: PTX grubu, glikojen granülleri belirgin olarak izlenmekte (oklar) PAS; X20.

Resim 46: CAPE grubu, PAS (+) hepatositlerin görünümü. PAS;20.

Resim 47: PTX grubu, portal alan içerisindeki bağ dokuda yer alan mast hücrelerinin görünümü (oklar) Toluidin Mavisi; X20.

Resim 48: CAPE grubu, mast hücrelerinin görünümü (ok) Toluidin Mavisi; X20.

Resim 49: PTX grubu, Ki-67(+) boyanan nükleuslar. Ki-67; X40.

Resim 50: CAPE grubu, Ki-67 (+) boyanan nükleusların görünümü. Ki-67; X40.

Resim 51: PTX grubu, kaspaz-3 ile pozitif reaksiyon veren hücre izlenmemekte. Kaspaz-3; X20.

Resim 52: CAPE grubu, kaspaz-3 (+) hücreler izlenmemekte kaspaz-3; X20.

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Akut hepatit; viruslar, toksik ajanlar, ilaçlar, alkol, çeşitli metabolik ve otoimmün hastalıklar gibi değişik nedenlere bağlı olarak meydana gelmektedir (1). Selektif bir hepatotoksin olan D-galaktozaminin (GAL) neden olduğu karaciğer lezyonunun, morfolojik ve patofizyolojik özelliklerinin, insan viral hepatitindekine birçok açıdan benzediği bildirilmiştir (2). GAL, hücresel üridin trifosfat konsantrasyonunu azaltıp, RNA ve protein sentezini inhibe ederek, karaciğer hücre nekrozuna yol açmaktadır (3). GAL ayrıca Kupffer hücrelerini aktive ederek bu hücrelerden tümör nekroz faktör α (TNF- α) gibi sitokinlerin salınmasına neden olur (4). TNF- α üretiminin pek çok çalışmada hepatositlerde apoptozisi uyardığı gösterilmiştir (5, 6). GAL'in uygulanmasıyla oluşan karaciğer hasarının asıl nedeninin, aktive olmuş Kupffer hücrelerinden salınan serbest oksijen radikallerinin olabileceği öne sürülmüştür (7).

Pentoxifylline (PTX), bir TNF α inhibitörüdür (8). Makrofajlardan TNF- α salınımını azaltarak IL-1 ve IL-6 gibi kemotaktik mediatörlerin yapımını azalttığı ve bu yüzden de inflamatuvar reaksiyonları baskıladığına dair veriler vardır (9). Pentoxifyllinin ksantin oksidazı inhibe ederek süperoksit (SO) ve hidroksil (OH) radikalleri oluşumunu engellediği düşünülmektedir (10, 11). Ayrıca fosfolipaz A2'yi inhibe ederek prostosiklin salınımını artırır böylece nötrofillerin infiltrasyon ve aktivasyonunu azaltır (12).

Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) yapıcı flavonoidlere benzeyen, bal arısı propolisinin aktif bir bileşenidir (13). CAPE'nin antioksidan, antiinflamatuvar, antiviral, immünomodülatör, nöroprotektif ve sitostatik etkileri olduğu bilinmektedir (14, 15). Araşidonik asit kaskadını güçlü şekilde modüle ettiğinden diğer propolis bileşenlerine göre antiinflamatuvar etkisi daha belirgindir (13). Ayrıca 10 μ mol/L konsantrasyonda ksantin dehidrogenaz/ksantin oksidaz sistemi tarafından meydana getirilen reaktif oksijen türlerinin hepsini bloke ettiği gösterilmiştir (16).

Bu çalışmada, D-Galaktozamin ile hepatit oluşturulan sıçanların karaciğer dokusundaki histolojik değişiklikler ve bu değişiklikler üzerine PTX ve CAPE'nin iyileştirici etkilerinin histokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle incelenmesi amaçlandı.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Karaciğer anatomisi

Vücuttaki en büyük iç organ ve en büyük bez olan karaciğer; kırmızı kahverenginde, elastik kıvamlı ve kolaylıkla parçalanabilen yapıya sahip bir organdır (17). Yaklaşık 1500 gr ağırlığında olan karaciğerin sağ sol uzunluğu 25-30 cm, sağda ön arka uzunluğu 15-16 cm ve yüksekliği ise 8 cm'dir (18, 19).

Karın boşluğunun sağ üst bölümünde, diyaframın altında, mide ve bağırsakların üstünde yerleşmiştir (20, 21). Karaciğer kostaların arkasında korunmuş konumda olup çok az bir bölümü karın ön duvarı ile doğrudan ilişkidir (22).

Önde; diyafram, sağ ve sol arcus costalis, her iki akciğerin basis pulmonis'leri, processus xiphoideus ve karın ön duvarı ile komşudur.

Arkada; diyafram, sağ böbrek, flexura coli dextra, duodenum, safra kesesi, vena cava inferior, özefagus ve fundus gastricus ile komşudur (23).

2.1.1. Karaciğerin bağları

Karaciğer diyaframın alt yüzüne ve karın ön duvarına 6 bağ aracılığı ile tutunur. Bunlardan beşi (falciforme hepatis, ligamentum coronarium, ligamentum hepatorenale, ligamentum triangulare dextrum ve ligamentum triangulare sinistrum) peritoneum'un oluşturduğu bağlardır. Birisi de (ligamentum teres hepatis) embriyolojik v. umbilicalis'in kapanması ile oluşan bir bağdır. Karaciğer ayrıca peritoneal bir yapı olan omentum minus (ligamentum hepatogastricum ve ligamentum hepatoduodenale) aracılığı ile mide ve duodenum'a bağlanır (24, 25).

Karaciğer, karın ön duvarına lig. falciforme hepatis aracılığı ile tutunur ve diafragma komşu olan küçük bir bölüm hariç karaciğerin neredeyse tamamı visceral periton ile kaplıdır. Peritonun ilave katlantıları karaciğeri mideye (ligamentum hepatogastricum), duodenuma (ligamentum hepatoduodenale) ve diyaframa (ligamentum triangulare dextrum et sinistrum ve ligamentum coronarium) bağlar (26).

2.1.2. Karaciğerin yüzleri

Karaciğer'in facies diafragma ve facies visceralis olmak üzere iki yüzü bulunur (27, 28). Bu iki yüzü keskin bir kenar olan margo inferior ayırır (29).

Facies diaphragmatica:

Facies diaphragmatica yüzeyi düzgündür; kubbe biçimindedir ve diyaframın içbükey olan alt yüzüyle komşudur. Pars anterior, pars superior, pars posterior ve pars dextra olmak üzere bölümleri bulunur (18, 25).

Pars superior: Facies diaphragmatica'nın üst kısmıdır. Bu yüz diafram kubbesi aracılığı ile sağ tarafta pleura ve akciğerle, sol tarafta da perikardium ve kalp ile komşudur. Üst yüzün büyük bölümü periton ile kaplıdır. Sadece arka kısmına yakın bölümünde periton bulunmaz. Diaframa gevşek bağ dokusu aracılığı ile yapışık olan bu saha, area nuda'nın önde kalan küçük bir bölümüdür. Area nuda, lig. coronarium'un sınırladığı peritonsuz sahadır (22, 26, 27).

Pars anterior: Karaciğerin diafragmatik yüzünün ön bölümüdür. Bu bölüm sağ tarafta 6-10. kosta ve kıkırdakları ile sol tarafta ise 7-8. kıkırdak kostalarıyla komşudur. Pars anterior lig. falsiforme hepatis'in bulunduğu yer hariç, tamamen peritonla kaplıdır (21).

Pars posterior: Sağ tarafta geniş ve künt sol tarafta ise dardır. Pars posterior'un büyük kısmı peritonsuzdur. Lig. coronarium'un içinde kalan bu sahaya area nuda denilir. Bu saha gevşek bağ dokusu aracılığı ile diaframa'ya tutunur. Area nuda'nın ön taraftaki küçük bir bölümü pars superior'da bulunur (21).

Pars dextra: Diafragmatik yüzün peritonla örtülü sağ kısmıdır. Bu bölüm diaframa aracılığı ile kostalarla komşudur (21).

Facies visseralis:

Karaciğerin karın organları ile komşu olan konkav alt yüzüne facies visseralis denilir (18). Bu yüz arkaya, aşağıya ve biraz da sol tarafa bakar. Tespit edilerek çıkarılmış karaciğerin visseral yüzünde, komşu olduğu organların izleri bulunur. Bu yüzün ortalarında porta hepatis denilen büyük bir geçit bulunur. Porta hepatis'ten v.porta hepatis ve etrafındaki sinir ağı ile birlikte a. hepatica propria'nın dalları girer, safra kanalları ile lenf damarları da çıkarlar (21).

Porta hepatis

Porta hepatis, karaciğerin facies visceralis'in ortasında bulunan transvers yarık şeklinde bir geçittir. Buradan v.porta hepatis ile a.hepatica'lar karaciğere girer ve ductus hepaticus'lar ile bazı lenf damarları çıkar.

Porta hepatis'den geçen yapılar; v. porta hepatis, a.hepatica, plexus hepaticus, duktus hepaticus dexter ve sinister ve lenf damarları.

2.1.3. Karaciğerin lobları

Karaciğer biri büyük lobus hepaticus dexter, diğeri küçük lobus hepatis sinister olmak üzere iki lobdan oluşur (26). Ön ve üst yüzde bu iki lobu birbirinden lig.falciforme hepatis ayırır. Viseral yüzde lobları birbirinden ayıran yapılar daha belirgindir. Viseral yüzde bulunan H harfi şeklindeki oluklar karaciğerin viseral yüzünü dört loba ayırır. Sulcus sagitalis dextranın sağ tarafında kalan bölüme lobus hepatis dexter, fissura sagitalis sinistra'nın solunda kalan bölüme ise lobus hepatis sinister denilir. Bu iki oluk arasında ve porta hepatisin önünde kalan kısma lobus quadratus, arkasında kalan kısma ise lobus caudatus adı verilir (21, 22, 24, 26).

Lobus hepatis dexter:

Sağ hipokondrium bölgesinde bulunur. Sol lobdan 5-6 defa daha büyüktür ve tüm karaciğerin 5/6 sını oluşturur. Sağ ve sol lobun sınırını diafragmatik yüzde lig. falciforme hepatis, viseral yüzde ise fissura sagitalis sinistra belirler (21, 26, 27).

Lobus quadratus:

Sağ lobun viseral yüzünde ve porta hepatisin ön tarafında bulunur. Bu lobu önden karaciğerin margo inferior'u, arkadan porta hepatis, sağ taraftan fossa vesica biliaris ve sol taraftan da fissura ligamentis teretis sınırlar (21, 26).

Lobus caudatus:

Sağ lobun viseral yüzünde ve porta hepatisin arka tarafında 10-11. göğüs omurları hizasında bulunur. Bu lobu önden porta hepatis, sağdan sulkus vena kava ve soldan da sulkus fissura ligamenti venosi sınırlar (21, 27).

Lobus hepatis sinister:

Sağ lobdan daha küçük ve yassıdır. Epigastrium'da ve kısmen de sol hipogastrium'da bulunur. Biraz konveks olan üst yüzü diafragma ile, konkav olan alt yüzü ise mide ile komşudur (21, 27).

2.1.4. Karaciğerin damarları ve sinirleri

Karaciğerin arterleri

Karaciğeri a.hepatica propria besler. Bu arter, trunkus coeliacus'un bir dalı olan a. hepatica communis'in dalıdır. Lig. hepatoduodenale içinde v. porta hepatis ve duktus choledokus ile birlikte uzanan bu arter, porta hepatis'e gelince r.dexter ve r.sinister olmak üzere iki dala ayrılır. V. porta hepatis'in dalları ile birlikte karaciğere dağılır. A. hepatica propria'nın dalları arasında anastomoz yoktur (21, 22, 27, 29).

Karaciğerin venleri

V. porta hepatis ve v. hepatica olmak üzere iki grup veni vardır. V.portae hepatis, v. mesenterika superior ile v. lienalis'in birleşmesiyle oluşur. A. hepatica propria ile birlikte lig. hepatouodenale içinde uzanarak porta hepatis'e gelir. Karaciğerde a. hepatica proprianın dalları ile birlikte uzanır ve sonunda, beraber seyrettiği arterle birlikte v. sentralis'e açılır. v. centralisler birleşerek v.hepaticaları oluşturur. Bu venler porta hepatisden giren kanları v.kava inferior'a taşırlar. V.hepatikalar karaciğer segmentasyonuna uymazlar (21, 22, 28, 29).

Karaciğerin lenf drenajı

Karaciğerin derinlerinden gelen lenf damarlarının çoğu porta hepatis'e gelerek buradaki nodi lenfatici hepatisite'ye açılırlar. Bunların bir kısmında foramen bursa omentalis çevresindeki lenf nodüllerine açılır. Derin lenf damarlarının bir kısmı v. hepaticaları takip ederek foramen vena kava'ya gelirler. Daha sonra karaciğerin tüm lenfatikleri nodi lenfatiki frenici superiora ulaşırlar. Buralardan çıkan lenf damarları da truncus lenfaticus dekster ve duktus thorasikus'a açılırlar (21).

Karaciğerin sinirleri

Sempatikleri nervus splaniki'den, parasempatikleri ise sağ ve sol nervus vagus'tan gelir. Bu lifler önce plexus koeliakus'u oluştururlar (18). Buradan çıkan lifler arteria hepatica propria ve v portae hepatis etrafında plexus hepaticus adı altında karaciğere gider (21, 22, 30, 31).

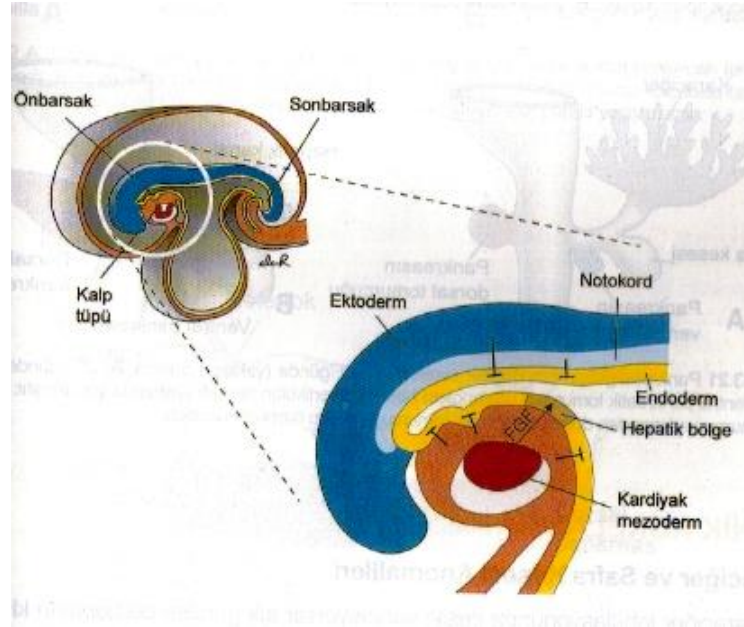
2.2. Karaciğerin Embriyolojisi

2.2.1. Karaciğer gelişimi

Karaciğer, safra kesesi ve safra kanalları ile birlikte dördüncü haftanın başında, ön bağırsağın kaudal parçasından öne doğru bir çıkıntı olarak belirirler (32, 33). Hepatik divertikül veya karaciğer tomurcuğu olarak bilinen bu çıkıntı, perikard boşluğu ve yolk sapı arasındaki mezodermal plağı, yani septum transversumu penetre eden, hızlı proliferasyon gösteren hücrelerden meydana gelir. Karaciğer hücreleri septumun içine girmeye devam ederken, hepatik divertikül ile önbarsak (duodenum) arasındaki bağlantı daralarak safra kanallarını oluşturur. Safra kanalından kaynaklanan küçük bir ventral çıkıntı safra kesesi ve sistik kanal haline gelir. Gelişimin daha sonraki dönemlerinde, epitelyal karaciğer kordonları vitellin ve umblikal venlere karışarak hepatik sinüzoidleri meydana getirir. Karaciğer kordonları parenkime farklanır ve safra kanallarının iç yüzünü döşerler. Hematopoietik hücreler, Kupffer hücreleri ve bağ dokusu hücreleri septum transversum mezoderminden köken alırlar (34).

Karaciğer hızla gelişmesiyle beşinci haftadan onuncu haftaya kadar karın boşluğunun büyük bir kısmını kaplar. Vena umbilikalisten karaciğere akan oksijenli kanın miktarı, karaciğerin gelişimini ve fonksiyonel segmentasyonunu belirler (32). Başlangıçta karaciğerin sağ ve sol loblarının büyüklüğü aynı iken, kısa bir süre sonra sağ lob daha fazla büyür. Altıncı haftada başlayan hematopoezis, karaciğere parlak kırmızı bir renk verir; karaciğerin yedinci ve dokuzuncu haftalar arasındaki büyüklüğünden de bu hematopoetik aktivite sorumludur (34). İntauterin yaşamın 10. haftasında karaciğerin ağırlığı toplam vücut ağırlığının %10'u kadardır (32). Organın ağırlığındaki bu fazlalık, kısmen sinüzoid sayısının yüksekliğine atfedilirse de, bir başka önemli etken de, gördüğü hematopoietik fonksiyonlardır. Hepatik hücrelerle damar duvarları arasında, beyaz ve kırmızı kürelerin üretildiği, proliferasyonla karakterize geniş bir hücre ağı vardır. Hematopoietik aktivite, gebeliğin son iki ayında yavaş yavaş azalır ve doğumda geride ancak birkaç hematopoetik hücre adası kalır. Artık karaciğerin ağırlığı toplam vücut ağırlığının %5'i kadardır (34). Onikinci haftada, karaciğer hücreleri safra yapımına başlar (32, 33).

2.2.2. Karaciğer gelişiminin moleküler düzeni



Şekil 1: Karaciğer gelişiminin moleküler düzeni (33)

Önbarsak endoderminin tümü karaciğere özgü genleri eksprese edebilme ve karaciğer dokusuna dönüşebilme yeteneğine sahiptir. Ancak bu ekspresyon çevredeki ektoderm, non-kardiyak mezoderm ve özellikle notokord gibi dokulardan açığa çıkan

bazı faktörler etkenlerle bloke edilir. Bu inhibitörlerin etkisi de gelecekteki karaciğer bölgesine kardiyak mezoderm tarafından salgılanan fibroblast büyüme faktörleri (FGF) tarafından bloke edilir (Şekil 1). Anlaşılabacağı gibi barsak endoderminden karaciğere özgü genlerin eksprese olması kardiyak mezoderm tarafından salgılanan inhibe edici faktörleri inhibe eden maddeler sayesinde mümkün olur. Kardiyak mezoderminden karaciğer bölgesindeki barsak endodermi hepatositlere ve safra kanalı hücrelerine indükler. Bu süreç kısmen hepatosit nükleer transkripsiyon faktörleriyle de (HNF 3 ve 4) kontrol edilir (34).

2.3. Karaciğer histolojisi

Karaciğer karın boşluğunda diyafram altında, sağ üst kadranda yer alan vücudun en büyük bezi olarak kabul edilen bir organdır (35, 36, 37). Safra kanalları yoluyla salgısını duodenuma boşalttığından ekzokrin, sentezlediği maddeleri kana doğrudan doğruya verdiği için endokrin bir bez niteliğini taşır (38).

2.3.1. Stroma

Karaciğer hilumda kalınlaşan ince bir bağ dokusu kapsülü (Glisson kapsülü) ile örtülüdür (39, 40, 41, 42, 43). Kollajen ve elastik lif içeren bu kapsül periton ile çevrelenmiştir (35).

Hilus bölgesinde Glisson kapsülü içeriye doğru girer ve organı lobüllere ayırır. Dört lobdan oluşan karaciğeri lobüllere ayıran bağ dokusu insanlarda çok az geliştiğinden lobül sınırları kolayca seçilmez. Lobüllerin birbirleriyle birleştiği bölümlerde bağ dokusu artarak, enine kesitlerde üçgen biçiminde seçilen alanlar oluşturur. Arter, ven ve safra duktusu'nu içeren bu bağ dokusu alanlarına portal aralık-Glisson üçgeni ya da Kiernan aralığı denir (38).

Kapsülün peritona bakan yüzünde seröz mezotel, özellikle patojen bakterilerin ve diğer zararlı maddelerin girişine karşı organı korur. Glisson kapsülü, karaciğere dışarıdan destek vermesinin ve organın şeklinin korunmasının yanı sıra, az sayıda küçük kan damarına da sahiptir ve karaciğer parankiminin içine uzantılar gönderme yoluyla, stromaya katkıda bulunur. Kapsülün devamı, porta hepatis bölgesinden içeriye geçerek kan ve lenf damarlarına, safra kanallarına ve sinirlere desteklik sağlar (44).

Karaciğerin çok yönlü fonksiyonlarını gerçekleştiren özel bir damar ve kanallar (safra) sistemi vardır. Makroskobik olarak bu yapı şu şekilde belirtilir: karaciğerin alt yüzünde porta hepatis olarak belirtilen bir bölüm; organın giren damar ve çıkan kanal yapısının bağ dokusu eşliğinde uygun olarak bulunduğu yerdir. Diğer kitle

şeklindeki organlarda olduğu gibi damar ve kanal yapılarının organla bağlantısı olan bu bölgeye hilus denir. Hilusda yer alan yapılar:

1-Karaciğere karın içi organlardan metabolik maddeleri ve oksijenden az yoğun venöz kan taşıyan ven (vena porta)

2-Organın normal kanlanmasını sağlayan arteriyel kan taşıyan (arteriya hepatica)

3-Karaciğerin ekzokrin salgısı safrayı safra kesesine taşıyan bir kanal (kanalis hepaticus)

4- Karaciğerde oluşan lenf sıvısını lenf sistemine taşıyan bir lenf damarı

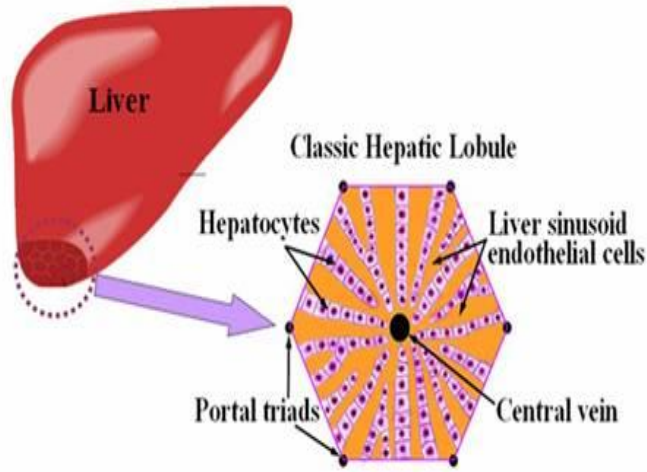
Hilusda belirtilen bu yapılar, karaciğerin bir organ olarak hem sindirim sistemi ile olan ilişkisini hemde vücudun diğer sistemleri ile fonksiyonel bağlantısını açıklamaya yardım eder. Vena porta organ içinde dallanma göstererek lobül çevresine kadar ulaşır. Bu dolaşım sindirim sisteminde absorbe edilen materyalin metabolik aktiviteye katılması için karaciğere getirilmesinde önemlidir. Safra kanalı aracılığıyla karaciğerden çıkan safra bir ekzokrin salgı niteliğindedir ve sindirim kanalına ulaşır. Vena hepatica ise organ parenkimasında oluşturulan birçok maddeyi dolaşım sistemi aracılığıyla hedef dokulara ulaştırır (37).

2.3.2. Karaciğer lobülleri

Karaciğer kendini çevreleyen bağ dokusunun oluşturduğu bölmelerle belirli loblar ve daha ince bağ dokusunun çevrelediği (beşgen) hegzogonal lobüller içerir. Karaciğerin yapısal ve fonksiyonel birimleri karaciğer lobülleridir (36). İşlevsel birim olarak ele alınan lobül; merkezinde ven yapısı olmak üzere onun etrafında ışınsal düzende kordonlar yapan karaciğer hücrelerinden oluşur. Hücreler belirli bir aralık (perisinuzoidal aralık) göstererek sinuzoid tipi kapiller yapıyla (karaciğer sinuzoidleri) birlikte vena sentralisin çevresinde ışınsal düzende yapılanmışlardır (37).

Fonksiyonel olarak üç farklı karaciğer lobülü tanımlanmıştır. Geleneksel olarak en çok kullanılan tanım klasik karaciğer lobülleridir (36) (Şekil 2).

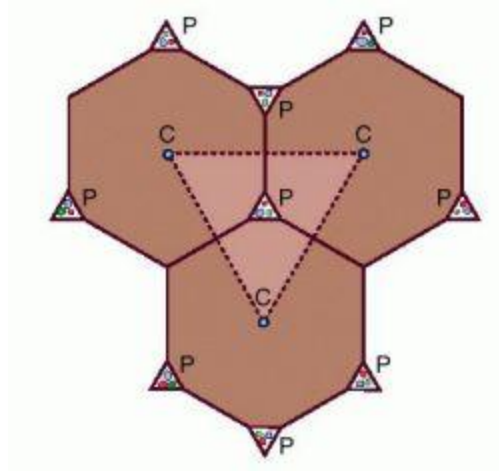
1-Klasik karaciğer lobülü



Şekil 2: Klasik karaciğer lobülü (45)

Merkezi vena sentralis olacak şekilde ışınsal düzen gösteren hücreler ve lobül çevresi bağ dokusundan oluşmuştur (37). Karaciğer lobülleri, ortalama 0,2x2 mm boyutlarında olup en küçük yapısal ve işlevsel biçimleri oluştururlar (46, 47). Silindirik ya da prizmatik biçimlidir. Tam kapsül altındakiler dışında kalan lobüllerin çoğunun apeksi hilusa yöneliktir. Lobüllerin sayısı yaklaşık 1 milyondur. Enine kesitlerde lobül altıgen şeklinde seçilir. Her köşesinde Glisson üçgeni, arkasında vena sentralis denen lobüle giren kanın toplandığı damar bulunur. Vena sentralis çevresinde ışınsal seyirli, birbirleriyle anastomozlaşan dallanan karaciğer hücreleri bir epitelyal ağ oluştururlar. Bu nedenle karaciğer için retiküler bez teriminde kullanılmaktadır. Tek bir hücre kalınlığındaki karaciğer hücre kordonlarına Remark kordonları ya da karaciğer hücre kordonları denir. Karaciğer hücre kordonları arasında bulunan sinüzoid tipi damarlar safra yolları ve retiküler fibrillerde benzeri şekilde retiküler bir düzenleme gösterirler (38). Bazı bölgelerde, lobüller safra kanalları, lenfatikler, sinirler ve kan damarları içeren bağ dokusuyla sınırlanmıştır (43, 48, 49). Portal alanlar adı verilen bu bölgeler, lobüllerin köşelerinde bulunur ve portal triadlar içerir. İnsan karaciğerinde her lobülde 3-6 portal triad bulunur. Her bir portal triadda bir venül (portal venin bir dalı); bir arteriyol (hepatik arterin bir dalı); bir kanal (safra kanalı sisteminin bir parçası) ve lenfatik damarlar bulunur. Hepatositler, karaciğer lobülü içinde ışınsal olarak dizilmişlerdir (48).

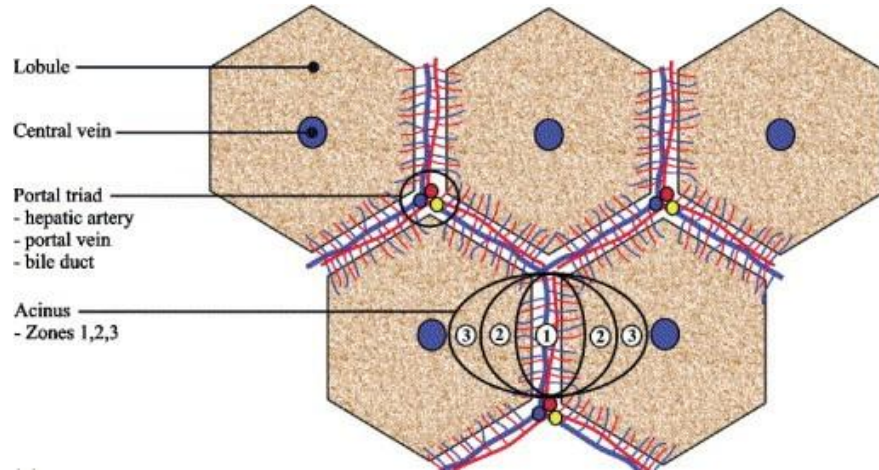
2-Portal lobül



Şekil 3: Portal lobül (50)

Portal lobül üç santral ven arasında yer alan üçgen şekilli alandır (51, 52) (Şekil 3). Ortada portal alan bulunur. Bu lobülün tanımlanması karaciğerin ekzokrin fonksiyonunu vurgulamak için uygundur (53, 36). Bilindiği gibi hepatositlerde üretilen safra, karaciğerin ekzokrin ürünlerinden biridir. Safra kanalikülleri ve safra kanalları aracılığı ile düodenuma atılır. Portal lobüllerde safra klasik lobülün aksine periferden merkeze doğru akar (51).

3-Karaciğer asinusu



Şekil 4:Karaciğer asinus yapısı (54)

Karaciğer asinüsü kısa eksenini iki portal alan arasında, uzun eksenini iki santral ven arasında bulunan baklava şeklinde veya oval şekilli alandır (Şekil 4). Kısa eksene en yakın bölüm 1.zon, en uzak bölüm 3. zon olarak bilinir. İkinci zon karaciğer asinüsünün santral bölgesidir (36).

Periferik zonda kan damarları lobülün periferinden merkezine doğru ilerlediğinden, glikojen, oksijen ve diğer maddelerden en zengin kanla karışan periferik hücreler, sürekli aktivite gösterirler. Kandaki zararlı maddelerden de ilk etkilenen bu hücrelerdir. Glikojen en çok bu hücrelerde depolanır, daha az olarak da iç zonlarda birikir. Açlık durumunda glikojenin yeniden kana verilmesi söz konusu olduğunda ilk önce santral hücreler glikojeni boşaltmaktadır. Bu zonda glikojen tükenene kadar diğer zonlardaki hücrelerden glikojen verilmez (38). Zon I glukoneogenezde daha aktiftir ve diğer bölgelere göre daha fazla alkalen fosfataz ve transaminaz içerir (55).

Ara zon (zon II) da kabaca klasik lobülün orta zon alanına isabet eder (56).

Santral zon (zon III) da vena sentralis çevresindeki dar bir bölgeyi oluşturan dinlenme evresindeki hücrelerdir. Karaciğerde patolojik ve fizyolojik yağ birikimi santral zondaki hücrelerde başlar. Diyet yetersizliği gibi bazı durumlarda ise yağ depolanması periferik zonda daha fazla olur. Neden ortadan kalkınca depo yağda kaybolabilir (38). İskemik olaylardan (sentrilobüler nekroz) en çok zon III deki hepatositler etkilenir. İlaç metabolize edici enzimler yüksek yoğunluktadır ve glikoliz, lipogenez, detoksifikasyon gibi işlevler burada gerçekleşir (36). Asinüsün üç bölgesinin içinden geçen oksijen gradyanı (değişim ölçüsü) metabolik heterojenlik ve enzimlerin farklı dağılımları, iskemi ve toksik maddeler yüzünden olan karaciğer hasarının bölgesel dağılımı açıklar (56).

2.3.3.Karaciğer hücreleri (Hepatositler)

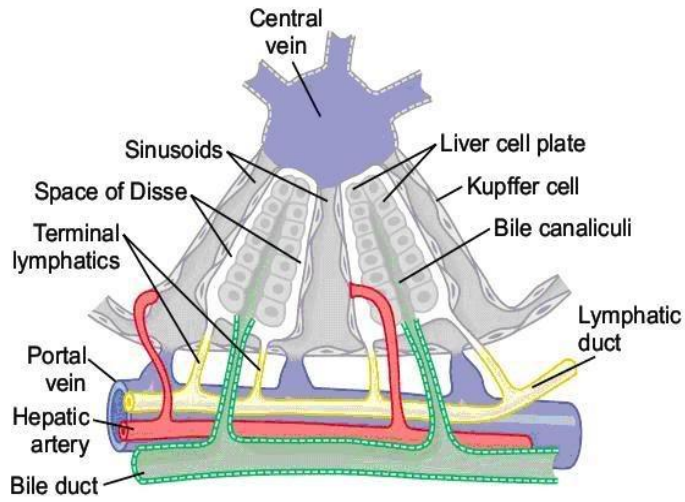
Karaciğerin temel yapısal elemanı olan karaciğer hücresi lobül içinde bulunan fonksiyonel parankim hücreleridir (37). Bu epitelyal hücreler karaciğer sinuzoidleri arasında kordonlar yapar. (37, 48, 57, 49). Karaciğer hücreleri polihedral, 6 ya da daha fazla yüzeyli ve 20-30 µm çapındadır. Işık mikroskopik düzeyde poligonal şekilli hepatositlerin nükleusları yuvarlak ve merkezi duruşludur. Hücrelerin büyük çoğunluğu tek nükleus, bir kısmı çift nükleus içerirler. Nükleus yuvarlaktır, heterokromatin içerir ve belirgin bir veya iki nükleolusa sahiptir (37). Rutin boyanan hücrelerde sitoplazma genellikle asidofil özellik gösterir (48). Sitoplazmada hematoksilin eozin gibi boyalarla az belirgin olan bazı organel ve inklüzyonlar özel boyalarda belirgin olarak gözlenir (37).

Karaciğer hücresi bol miktarda endoplazma retikulumu (hem kaba hem de düz) sahiptir. Kaba endoplazma retikulumu sitoplazma içine saçılmış kümeler oluşturur, bunlar bazofilik cisimler olarak isimlendirilir. Bu yapılardaki poliribozomlarda birkaç tip protein (örn. kan albumini, fibrinojen) sentezi yapılır. Sitoplazma içinde diffüz olarak yayılmış düz endoplazma retikulumunda çeşitli maddelerin vücuttan atılmasından önce inaktivasyonunu ya da detoksifikasyonu için gerekli olan oksidasyon, metilasyon ve konjugasyon gibi önemli olaylar meydana gelir. Karaciğer hücresi glikojen içerir (36, 44) Bu polisakkarit elektron mikroskopunda, kaba ve elektron-yoğun granüller halinde görülür. Karacigerde bulunan glikojenin miktarı günlük ritme uyar. Karaciğer glikojeni glukoz için depolar ve kandaki glukoz düzeyi normalin altına düşerse mobilize olur. Bu şekilde hepatositler, vücut tarafından kullanılan enerjinin ana kaynaklarından biri olan kan glukozu düzeyini sabit tutar. Karaciğer hücresi yaklaşık 2000 mitokondri içerir. Sık görülen diğer bir hücresel yapı da hücre içi organellerin yıkımı ve dönüşümü için önemli olan lizozomlardır. Lizozomların aynı zamanda reseptör aracılı endositozda önemli bir rolü vardır. Bu makromoleküller başlangıçta endozomlara tasınır, bunlar ise daha sonra lizozomlarla kaynaşırlar. Hepatositlerde peroksizomlar ve Golgi kompleksleri (her hücrede yaklaşık 50 tane) çok sayıdadır (36, 44). Her bir Golgi kompleksi yassılaşmış sisternalar, küçük veziküller ve safra kanalikülü yakınında yer alan daha büyük vakuollerden oluşmuştur. Bu organelin fonksiyonları arasında lizozomların oluşturulması ve plazma proteinlerinin (örn. albumin), glikoproteinlerin (örn. transferin) ve lipoproteinlerin (örn. çok düşük dansiteli lipoproteinler –VLDL) salgılanması bulunur (58, 48).

Portal triadlardan farklı uzaklıklarda bulunan hepatositler, yapısal histokimyasal ve biyokimyasal farklılıklar gösterirler (48). Her bir karaciğer hücresinin yüzeyi, diğer hepatositlerin yüzeyi ve Disse aralığı boyunca sinüzoidlerin duvarı ile temas halindedir. İki hepatositin bitişik olduğu her yerde, hücrelerin arasında tübüler bir aralık bulunur ve bu aralık safra kanalikülü olarak isimlendirilir (48, 57, 49). Safra kanal sisteminin ilk kısımları olan kanaliküller, 1-2 µm çapında tübüler boşluklardır. Bu alanlar sadece iki hepatositin plazma membranlarıyla sınırlıdır ve içinde az sayıda mikrovillus bulunur. Bu kanaliküllerin çevresindeki hücre membranları sıkı bağlantılarla sıkıca birleşmişlerdir (48). Safra kanalikülleri karaciğer lobülünün plakları boyunca anastomoz yapan kompleks bir ağ oluştururlar ve portal alanlarda sonlanırlar. Bu nedenle safra kanının ters yönünde, yani klasik lobülün merkezinden periferine doğru ilerler. Periferde safra, Herring kanallarına girer. Bu kanallar açık sitoplazmalı ve az

sayıda organel içeren kübik hücrelerden oluşmuşlardır. Herring kanalları kısa bir mesafe katettikten sonra lobül sınırındaki hepatositleri geçerek portal triadlardaki safra kanallarında sonlanır. Safra kanalları kübik ya da prizmatik epitelle örtülüdür ve belirgin bir bağ dokusu kılıfına sahiptir. Bu kanallar giderek genişleyip birleşerek sağ ve sol hepatik kanalları oluştururlar ve sonunda karaciğeri terk ederler (48, 57, 49). Hepatositin Disse aralığına bakan yüzeyinde bu aralığa doğru uzanan çok sayıda mikrovillus bulunur, ancak bu hücreler ile sinüzoid duvarının hücreleri arasında her zaman bir boşluk vardır (57, 48).

2.3.4.Karaciğer Sinuzoidleri



Şekil 5:Karaciğer sinuzoid yapısı (59)

Karaciğer hücre kordonlarının aralarını dolduran arteriyovenöz kan içeren, özelleşmiş kapillarlere sinüzoid adı verilir (48, 57, 49) (Şekil 5). Ortalama çapları 9-15 mikrometre olan karaciğer sinuzoidleri, kılcal damarlardan daha geniş ve düzensiz bir yapıya sahiptir (36, 44). Sinüzoidler, lobülüs içi kan dolasım ağını oluşturlar. Venula perilobularislerden, vena sentralis yönünde akan kan, sinüzoid duvarı aracılığı ile karaciger metabolizmasına katılır (52, 48, 57, 49, 60).

Sinüzoid içinde hem arter, hem de ven kanı bulunmaktadır. Sinüzoid damarlar birbirleriyle anastomozlaşarak karaciğer hücre kordonlarını birbirinden ayıran bir kan labirenti oluşturduktan sonra klasik lobülün ortasında bulunan vena sentralise açılırlar. V.sentralis duvarı birçok sinüzoidin açılmasından dolayı çok sayıda delik taşır. Bu nedenle; karaciğer hücreleride kesintili bir duvar oluştururlar. V.sentralislerin kanı

vena interkalaris'lere dökülür. V. interkalarislerin birleşmesiyle toplayıcı ven oluşur. Bunlar da vena hepatica'yı yaparak vena kava inferiora açılırlar. Vena interlobularis'lerde kontraksiyonun fazla olması kanın karaciğer lobüllerinde dolaşmasını kolaylaştırır (61).

Sinüzoid duvarında 3 tip hücre bulunur:

Endotel hücreleri

Endotel hücrelerini çok ince retiküler liflerden oluşan bir bazal membran çevreler. Bazal membran bazı bölgelerde kesintili olup, bazı bölgelerde hiç bulunmaz (49). Endotel hücreleri çok yassılaşmış olup, duvarda aralıklar bırakır. Ayrıca pinositoz veziküllerinden zengindir (52). Endotel hücreleri, altlarında bulunan hepatositlerden Disse aralığı adı verilen subendotelyal bir boşlukla ayrılmıştır. Bu aralıkta hepatositlerin mikrovillusları bulunur. Kan sıvısı endotel duvarından kolayca geçer ve hepatosit yüzeyi ile temas eder. Böylece sinüzoid lümeniyle karaciğer hücreleri arasında makromoleküllerin alışverişi kolaylıkla sağlanır. Bu geçiş sadece çok sayıda makromoleküllerin (örn. lipoproteinler, albumin, fibrinojen) hepatositler tarafından kana verilmesi nedeniyle değil, aynı zamanda bu makromoleküllerin çoğunun hepatositlerce alınıp katabolize edilmesi nedeniyle de fizyolojik bir önem taşır. Sinüzoid ince bir retiküler lif kılıfı ile sarılıp desteklenmiştir (48).

Kupffer hücreleri

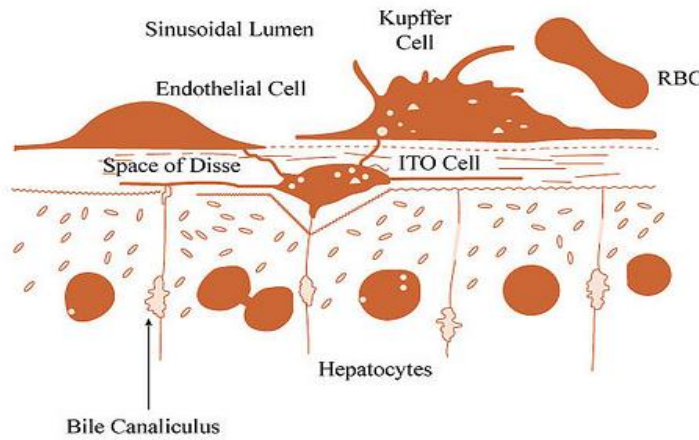
Sinüzoidleri döşeyen endotel hücrelerinin arasında ya da lümene bakan yüzüne tutunmuş olarak bulunan Kupffer hücreleri organizmada yaygın bir dağılım gösteren mononükleer fagositik sistemin üyesidirler (33). Bu hücreler endotel hücrelerinden daha büyüktür, daha büyük nükleusları ve sinüzoidal aralığa uzanabilen çıkıntıları ile daha geniş bir sitoplazmaya sahiptir (49, 62). Kupffer hücreleri ışık mikroskobunda fagositik yeteneklerini belirlemek için yabancı madde verilmesiyle (örneğin tripan mavisi ya da kolloidal gümüş şırıngasından sonra) görülebilirler (48, 63). Kupffer hücreleri sitoplazmalarında fagositoz vakuelleri, kalıntı cisimcikler ve lizozomlar bulunur, ayrıca, alyuvar ve hemoglobinden kaynaklanan demir de inklüzyonlarla birlikte özel demir boyası ile tespit edilebilir. Sinüzoid ile karaciğer hücre plakları arasındaki Disse aralığı, hepatosit ile kan arasında bir bariyer niteliğini taşır (52). Kupffer hücrelerinin başlıca fonksiyonları yaşlı eritrositleri metabolize etmek, hemoglobini sindirmek ve immünolojik olaylarla ilgili proteinleri salgılamaktır.

İto hücreleri

Yağ depolayıcı hücreler (İto hücreleri) Disse aralığına yerleşmiş yıldızsı hücrelerdir. Yağ ve vitamin A depolayabilen İto hücreleri hepatosit büyüme faktörü ve kollajen üreten fibroblastlardan dönüşmüşlerdir (56). Bu hücreler dışarıdan verilen A vitaminini lipid damlaları içinde retinil esterler halinde biriktirme kapasitesine sahiptir (48). Bu hücreler, genellikle büyüme faktörlerini, sitokinleri ve hücre dışı matriks proteinlerini salgılar. Alkolik karaciğer hastalığı gibi bazı patolojik durumlarda, fibrozisin gelişmesine yardım ederler. Disse aralığında biriken aşırı sıvı ve çözeltiler, karaciğerdeki lenf oluşumuna katkıda bulunur (44).

2.3.5.Perisinüzoidal aralık (Disse aralığı)

Perisinüzoidal aralık (Disse aralığı) karaciğer parankim hücreleri ve sinüzoid kapiller arasında yoğun madde geçişinin gerçekleştiği bir aralıktır (Şekil 6). Sinüzoid boyunca kandaki belirli maddeler ve oksijen bu aralıktan geçerek hepatositlere ulaşır. Parankim hücrelerinde sentezlenen maddelerin kana geçmesi yine aynı aralıktan sinüzoid lümenine doğru geçmesiyle gerçekleşir. Bu alanda görülen hücre tipi, yağ depolayan hücreler (İto hücreleri) ve pit hücreleridir (37). Sinüzoid lümenindeki plazma, endotel hücrelerindeki pencereler ve hücreler arasındaki boşluklar yoluyla Disse aralığıyla iletişim kurar. Böylece, hepatositler plazmayla doğrudan temas sağlar. Hepatositlerle kan arasındaki madde değişim oranını ve yüzey alanını artıran mikrovilluslar, Disse aralığına doğru uzanır. Hepatosit stoplazmasında, geniş salgılama ve emilim yüzeyine sahip çok sayıda vezikül ve vakuol vardır. Aynı zamanda ‘yıldızsı hücre’ olarak da bilinen ve dış kaynaklı A vitamini depolayan yağ içeriğine sahip İto hücreleri de, yine disse aralığında bulunur (44).



Şekil 6: Disse aralığı (64)

2.3.6. Safra kanalcıkları

Karaciğerin ekzokrin tipte salgısı safranin hücreler arası iletildiği kanalcıklardır. Karaciğer hücrelerinde sentezlenen safra salgısı giderek genişleyen bir kanalcık sistemi ile karaciğer hücrelerinden ince bağırsağa ulaşır. Lobül içinde komşu konumdaki karaciğer hücrelerinin birbirine bakan yüzlerinde salgılanan safranin ilk yol aldığı kanalcıklar bulunur. Karaciğer hücreleri arasında bir ağ oluştururlar. Kanalcıkların duvarını karaciğer hücreleri oluşturur. Hücreler arasında safra salgısının kanalcık dışına sızmasını önleyen sıkı tipde zonula adherens bağlantı yapıları yer alır. Bu kanalcıklar lobülün kenar kısmında Herring kanalı ile devam ederler (37). Herring kanalı lobül içinden safranin lobül dışına taşınmasını sağlar. Alçak kübik epitelle döşelidir. Bu kanalcık yapısı içinde safra lobülün merkezinden lobülün kenarına doğru akış yönü gösterir. Safra lobülden çıktıktan sonra lobül aralarında yer alan lobüller arası safra kanalları aracılığıyla lobüller arasından toplanarak karaciğerden çıkar. Lobüller arası kanallar kübik epitelle döşelidirler. Karaciğer çıkışına yakın kanal prizmatik epitelle döşelidir. Kanalin duvarında sıkı bağ dokusu ve düz kas yapısı bulunur. Lobüller arası kanallar birleşip loplar arası kanalları oluşturur ve organın çıkışında hepatik kanal, safranin safra kesesine taşınmasını sağlar (37). Karaciğer içi safra kanallarının en küçüklerinin çapları 10 mikrometre kadar olup, bu kanallar tek tabakalı kübik epitele sahiptir. Sıkı bağlantılardan ve dezmozomlar meydana gelen bağlantılı birimleri, lümen yüzeyine yakındır ve hücreleri birbirine bağlar. Kübik epitel hücreleri, olağan organel yapısına ve merkezde yerleşik yuvarlak çekirdeklere sahiptir. Sitoplazmada yer alan çok sayıda tonofilamanlardan bazıları dezmozomlara, bazılarıysa lümen tarafında yer alan terminal ağa tutunmuş şekildedir. Bu yapılar kasılabilir özellikte olup, kanaliküllerdeki peristaltik hareketlere yardım ederler. Kübik epitelin apikal yüzlerinde, lümene doğru uzanan düzenli ve kısa mikrovillusların yanı sıra seyrek olarak yerleşik silyumlar vardır. Epitelin bazal yüzeyi, 20-30 nm kalınlığındaki bir bazal membran üzerine oturur. Safra kanalları genişledikçe kanalı döşeyen hücreler daha prizmatik hale gelir ve çekirdekleri bazale doğru kayar. Daha geniş kanallarda, müköz bezler lümen epiteliyle bağlantılıdır. Yoğun kollajen lif demetlerinden meydana gelen bağ dokusu, kanalları kuşatır (44).

2.4. Karaciğerde Kan Dolaşımı

Bağırsaktan gelen kanın hepsi ilk olarak karaciğerden geçer. Burada besin maddeleri emilir ve daha sonra esas dolaşım sistemine katılır. Karaciğer içerisinde kılcal damarlara benzeyen alanlara (hepatik sinüzoidler) gelen kan, hepatik hücrelerle

doğrudan ilişkiye geçerek besin maddelerini onlara verir. Bu hücreler tarafından besin maddeleri depo edilir, bir süre saklanır ya da diğer moleküllere çevrilir. Karaciğer hücreleri belirli zehirli maddelerin toksik etkilerini parçalamak veya molekül yapısını değiştirmek suretiyle etkisiz hale geçirir ve bunun sonucu olarak ortaya çıkacak yan ürünler safra ile dışarıya salgılanır (60). Karaciğer kanı iki kaynaktan alır, kanın % 80'i abdominal organlardan gelen oksijenden fakir, besinden zengin kanı taşıyan portal venden, % 20'si ise oksijenden zengin kanı sağlayan hepatik arterden gelir (48, 57, 49).

Arteriyel Sistem; hepatik arter defalarca dallanır ve interlobüler arterleri oluşturur. Bu arterlerden bazıları portal yapılara akarken bazıları da portal alanlardan farklı uzaklıklarda, sinüzoidler içine direkt olarak sonlanan arteriyelleri oluşturur. Bu sayede sinüzoidler içinde arteriyel ve portal venöz kan karışır. Arteriyel sistemin başlıca fonksiyonu karaciğer hücrelerine yeterli miktarda oksijen sağlamaktır. Kan klasik hepatik lobülün periferinden merkezine doğru akar. Sonuç olarak oksijen ve metabolitler ile bağırsaklardan emilen diğer bütün toksik olan ve olmayan maddeler önce lobülün periferik daha sonra merkezdeki hücrelerine ulaşır. Bu durum perilobüler hücrelerin sentrilobüler hücrelerden farklı davranmasının nedenini kısmen açıklayabilir (57).

Portal Ven Sistemi; portal ven defalarca dallanarak portal triadlara portal venüller denen küçük venüller gönderir. Bazen interlobüler dallar olarak da isimlendirilen portal venüller dallanarak, lobülün periferini dolaşarak seyreden dağıtıcı venleri oluşturur. Dağıtıcı venlerden çıkan küçük giriş venülleri, sinüzoidlere açılır. Sinüzoidler ışınal olarak seyreder ve lobülün merkezinde sentral ya da sentrilobüler veni oluşturmak üzere birleşirler. Bu damar sadece az sayıda kollajen lifle desteklenmiş endotel hücrelerinden oluşan ince duvarlara sahiptir (48). Sinüzoidlerdeki kan karaciğer lobülünün ortasında yerleşen v. sentralise akar. Sentral venler birleşerek, v. sublobülarisleri, onlarda vena hepaticayı oluşturur. V. hepatica karaciğeri terk edip v. kava inferior aracılığıyla sağ atriüme dökülür (52, 49, 65).

2.5. Karaciğer fonksiyonları

Karaciğer vücudun en büyük metabolik merkezidir. Karbonhidrat, protein ve lipid metabolizmasında önemli görevleri vardır. Metabolik fonksiyonları sentetik, katabolik, detoksifiye, sekretoriktir (46). Karaciğer, vücudun hemen hemen bütün sistemleriyle ilişkili bulunan son derece karmaşık ve önemli fonksiyonları olan bir organdır (48, 57). Bu fonksiyonlar;

Protein Sentezi; Karaciğer hücresi, kendisi için gerekli proteinlere ek olarak, salgılamak üzere çeşitli plazma proteinlerini de (albumin, protrombin, fibrinojen ve lipoproteinler) sentezler (48, 49). Bu proteinlerin sentezi granüllü endoplazma retikulumuna bağlı poliribozomlarda yapılır. Diğer bez hücrelerinde gözlenenin aksine, hepatositler proteinleri sekonder granüller halinde sitoplazmasında depolamaz, sürekli olarak kan dolaşımına verir. Böylece endokrin bir bez gibi fonksiyon görür. Karaciğer tarafından dışarıya verilen proteinin yaklaşık % 5'i Kupffer hücreleri tarafından üretilir, geri kalan bölüm hepatositlerde sentezlenir (48).

Safra Salgılanması; Karaciğer tarafından günde 600-1000 ml dolaylarında safra yapıp bağırsağa salgılanır (60). Safra üretilmesi, hepatositlerin kan komponentlerini alıp, dönüştürerek safra kanalikülleri içine salgılamaları nedeniyle bir anlamda ekzokrin bir fonksiyondur. Safra su ve elektrolitlere ek olarak birkaç ana komponente daha sahiptir; bunlar safra asitleri, fosfolipidler, kolesterol ve bilirubindir (48, 49). Bu maddelerin yaklaşık % 90'ı distal intestinal epitelden emilim yoluyla alınır ve hepatositler aracılığıyla kandan safra kanaliküllerine taşınır (enterohepatik resirkülasyon). Bu bileşiklerin yaklaşık % 10'u hepatositin düz endoplazma retikulumunda kolik asidin (karaciğerde kolesterolden sentezlenir) glisin ya da taurin aminoasitleri ile konjugasyonu yoluyla sentezlenir ve sonuçta glikolik ya da taurokolik asit meydana gelir. Safra asitleri sindirim sisteminde lipidlerin emilisiyon haline getirilmesinde önemli bir fonksiyon görerek bunların lipaz ile sindirilmesini ve ardından emilmesini sağlar (48).

Metabolit Depolanması; Lipidler ve karbonhidratlar, karaciğerde trigliseridler ve glikojen şeklinde depolanır (48). Karaciğerde lipid, komponenti iyi gelişmiş düz endoplazmik retikulum (SER)'da sentezlenir (62). Yağ asitlerinin beta oksidasyonu, lipoprotein sentezi, fosfolipid sentezi yapılır. Kolesterolün yapım ve olasılıkla diğer steroidlere ve ester şekillerine dönüşümü de karaciğerde olur (49, 62). Metabolitleri depolama kapasitesi, vücudun öğünler arasındaki enerji gereksinimini karşıladığı için önemlidir (48). Glikoz, fruktoz ve galaktozu glikojene çevirerek depo eder. Gıda alınmadığı hallerde (ya da kan şekeri düştüğünde), glikojeni parçalayarak enerji gereksinimini karşılamak üzere kan glikozunun normal kalmasını sağlar (49, 62, 63). Karaciğer, vitaminler için de en büyük depolanma yeridir (1). A vitamini basta olmak üzere D ve B12 vitaminlerini, vitamin eksikliğini en az bir yıl önleyecek kadar depo eder (33).

Detoksifikasyon ve inaktivasyon; Çeşitli ilaçlar ve maddeler oksidasyon, metilasyon ve konjugasyonla inaktive edilebilir. Bu olaylara katılan enzimler baslıca kaba endoplazma retikulumunda bulunur. Glukuronik asidi bilirubine konjuge eden bir enzim olan glukronil transferaz, steroidler, barbitüratlar, antihistaminikler ve antikonvülzanlar gibi başka bileşiklerin de konjugasyonunu sağlar (48). Bu işlemleri yapan enzimler düz endoplazmik retikulum (SER)'da mevcuttur (48, 62).

2.6. Oksidatif Stres ve Serbest Oksijen Radikalleri

Serbest radikaller; yörüngelerinde bir veya daha fazla sayıda eşleşmemiş elektronun olduğu atom veya atom gruplarıdır (66). Bu eşleşmemiş elektron nedeni ile serbest radikal molekülü kararsız konumdadır ve kararlı yapı kazanabilmesi için elektronunu başka bir elektronla eşleştirmesi gerekir. Bu nedenle serbest radikalın kimyasal aktivite potansiyeli yüksektir (67). Bu oksidan ürünlerin arttığı durumlarda hedef moleküller olan membran yapısındaki fosfolipidler, glikolipidler, membran proteinleri ve doymamış yağ asitleri oksidatif strese maruz kalırlar (68). Sonuçta metabolik bozukluklar, hücre hasarı ve hatta ölüme yol açarlar (69). Oksidatif stres reaktif oksijen ve nitrojen türleri ile antioksidan sistem arasındaki dengenin oksidan yönde bozulması ile gerçekleşir (70). Oksidatif stres doğal bir süreç olup bu stresi kontrol altında tutan özelleşmiş mekanizmalar mevcuttur. Bu mekanizmaların yetersizliği durumlarında oksidatif hasar oluşur (71). Oksidatif streste etkili olan reaktif oksijen (süperoksit (O_2^-), hidroksil (OH), peroksil (RO_2), hidroperoksil (HRO_2^-) hidrojen peroksit (H_2O_2), hipoklorik asiti (HOCl)) gibi nonradikal türleri sayabiliriz. Reaktif nitrojen türleri ise (nitrik oksit (NO), nitrojen dioksit (NO_2^-) gibi serbest radikaller ve peroksinitrit ($ONOO^-$), nitroz oksit (HNO_2), alkil peroksinitrat ($RONOO$) gibi nonradikallerdir (72).

2.8. Akut hepatit

Akut hepatit; karaciğer hücre nekrozu ve inflamasyon ile giden bir tablodur. Akut hepatit tablosuna sıklıkla virüsler, ilaçlar ve alkol yol açar. Hemodinaminin bozulduğu durumlarda ortaya çıkabilen iskemik hepatit ve otoimmün hepatitte diğer akut hepatit nedenleri arasındadır. Akut hepatite yol açan nedenler arasında en sık karşılaşılanı viral hepatitlerdir (73, 74).

Viral hepatitler tüm dünyada yaygın olarak gözlenen ve ülkemizde yakından ilgilendiren önemli bir sağlık sorunudur. Viral hepatitlerin tarihi insanlık tarihi kadar eski olup kliniğini ilk olarak Hipokrat tarafından tarif edilmiştir. Blumberg'in 1963 yılında Avustralya antijenini (Hepatit B Virüsü) bulmasıyla viral hepatitlerin

tarihinde yeni bir dönem açılmış ve takiben 1973 yılında hepatit A virüsü (HAV), 1977 yılında hepatit D virüsü (HDV), 1989 yılında hepatit C virüsü (HCV) ve 1992 yılında hepatit E virüsü (HEV) bulunmuştur. Halen yeni hepatit etkenlerinin (HGV, TTV) bulunması ve klinik önemleri konusunda çalışmalar olanca hızıyla devam etmektedir (73).

Viral hepatitler tüm dünya için önemli bir sağlık sorunudur. HAV'nün sosyo-ekonomik durumu farklı toplumlarda insanların %70-90'ını infekte ettiği, HBV ile karşılaşma oranının dünyanın değişik yerlerinde %10-90 arasında bulunduğu ve HBV taşıyıcılarının sayısının tüm dünyada 400-500 milyon olduğu göz önüne alınacak olursa insanların büyük bir çoğunluğu yaşamları boyunca değişik hepatit virüsleri ile karşılaşabilmektedir. Bu karşılaşma A ve E tipi viral hepatitlerde nadiren fulminant seyredip, genellikle iyileşip kronikleşmeye yol açmaz iken; B, C ve D tipi viral hepatitler değişik oranlarda kronikleşmeye yol açarak, siroz ve karaciğer kanseri gibi arzu edilmeyen tablolara yol açabilmektedirler (73, 75).

2.9. D-galaktozamin (GAL)

D-Galaktozamin karaciğerde galaktoz yolağı ile metabolize olan bir amino şekerdir. Selektif bir hepatotoksindir (76). GAL'in intraperitoneal (i.p) uygulaması hepatositlerde intrasellüler üridin trifosfat (UTP) havuzunu azaltarak RNA ve protein sentezini engeller (77). İntraperitoneal olarak uygulandığında sıçanlarda serum transaminaz düzeylerinin artışı, hepatik nekroza ve komaya yol açar (78). GAL'in neden olduğu karaciğer lezyonlarının morfolojik ve patofizyolojik özelliklerinin insan viral hepatitine bir çok açıdan benzediği bildirilmiştir (77). GAL'in sitotoksik etkisinde endojen lipidlerin peroksidasyonunun önemli bir faktör olduğu gösterilmiştir (79). GAL'in neden olduğu oksidatif hasarlanma genellikle lipid peroksidasyonunun uyarıcısı ve hücre membranının yıkımının kaynağı olan hidroksil radikali (OH⁻) oluşumu ile ilişkili bulunmuştur (80). GAL verilmesinden sonra karaciğerde serbest oksijen (O₂ .-) radikal reaksiyonlarının medyatörleri olan lipid hidroksiperoksitlerin konsantrasyonu artar (81). Sıçanlardaki GAL hepatitinde; superoksit dismutaz(SOD), Katalaz (CAT) ve Glutasyon Peroksidaz (GPx) gibi antiperoksidatif enzimlerin aktivitelerinin azalmış olduğu bildirilmiştir (82).

D-Galaktozamin uygulanmasının ardından sıçan karaciğerinde apoptozis geliştiği histokimyasal olarak gösterilmiştir (83, 84, 85, 86). GAL verilmesinden 18-24 saat sonra apoptoziste rol alan bir proteaz olan kaspaz-3 aktivitesi artar (85). Kaspaz-3 aktivitesi, GAL verilen sıçanlarda tiyoasetamid (86) veya karbontetraklorür verilen

sıçanlara göre (87) daha yüksektir. GAL intoksikasyonunda apoptozis insidansının yüksek olması, kısmen GAL toksitesinin karaciğer hücrelerinde kaspazları aktive ederek apoptozise yol açan TNF- α aracılığıyla oluşmasıyla açıklanabilir (88, 89). TNF- α enfeksiyon, yetmezlik, inflamasyon patogeneğinde primer rol oynayan bir sitokindir (90).

2.10. Pentoxifylline (PTX)

Pentoxifylline (3,7- dimethy-1-(5oxohxyl)- xanthine) (C₃H₁₈N₄O₃) metilksantin türevi fosfodiesteraz inhibitörü bir ilaçtır. Diğer adı Oksipentifilin olan PTX aynı zamanda güçlü bir periferik vazodilatatördür (91).

PTX'in terapötik etkinliği, kan akımı ve dokuların oksijenasyonunu artırmasına bağlıdır. Bu hemoreolojik etkileri sonucu;

1. Eritrositlerin esnekliğini (deformibilitesini) artırır.
2. Fibrinojen derişimini azaltır.
3. Trombosit agregasyonunu ve trombus oluşumunu azaltır.
4. Kan viskozitesini düşürür, kan akışkanlığını artırır.
5. Lökositlerin endotele adezyonunu azaltır, lökosit aktivasyonu ve bunun neden olduğu endotel hasarını azaltır (92).

PTX alyuvarların fleksibilitesini artırarak, çok küçük çaplı damarlardan geçişini kolaylaştırır. Bu şekilde iskemik dokularda kan akımını hızlandırır. Tedavi edici etkisi esas olarak kan akımını ve dokuların oksijenlenmesini arttırmasına bağlıdır. Bu olay PTX'in cAMP fosfodiesterazı inhibe ederek eritrositlerin içinde cAMP düzeyini arttırmasına bağlıdır. Düşük dozlarda eritrositlerin agregasyonunu önler, kan fibrinojen konsantrasyonunu düşürür (93).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda fosfodiesteraz inhibitörü olan PTX'in özellikle Tümör Nekrozis Faktör alfa'yı (TNF- α) azaltarak IL-1 ve IL-6 gibi kemotaktik mediatörlerin yapımını azalttığı ve bu yüzden de inflamatuvar reaksiyonları baskıladığına dair yayınlar vardır (94, 95). Ayrıca yapılan birçok çalışmada; PTX'in ksantin oksidazı inhibe ederek, süperoksit (SO) ve hidroksil (OH) radikalleri oluşumunu engellediği bildirilmiştir (10, 11, 96, 97).

2.11. Caffeic acid Phenethyl Ester (CAPE)

CAPE, bal arılarının ürettiği propoliste bulunan, flavonoid benzer yapıda antiinflamatuar, immünomodülatör, antioksidan ve apoptozu düzenleyici özelliklere sahip olan aktif bir komponenttir (98). Propolisin yapısında 180'den fazla madde saptanmıştır (99). Bu saptanan komponentlerin içerisinde flavanoidler, kafeik asit ve esterleri en yoğun olarak bulunan ve aktif kısmı oluşturan maddelerdir (100,101). CAPE ayrıca kafeik asit ve fenetil alkolün asitle esterifikasyonu sonucu kimyasal olarak sentezlenebilir (102).

CAPE'nin 5-alfa redüktaz, proteaz gibi enzimleri inhibe etme özelliği mevcuttur (103,104). Ayrıca nükleer faktör kappa-B'nin (nükleer transkripsiyon faktörü) aktivasyonunu güçlü bir şekilde inhibe eder (105). Nükleer faktör kappa-B (NF-kB) bağışıklık sistemi, inflamatuvar yolak ve apoptozda önemli rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür (106, 107). Reaktif oksijen radikalleri (peroksil, hidroksil radikal, süperoksit anyon) organizmada temel olarak araşidonik asit yolu, ksantin oksidaz sistemi ve aktive nötrofillerden üretilir. Yaklaşık olarak 10 mikromol/L'lik konsantrasyonda in vitro ortamda nötrofiller veya ksantin-ksantin oksidaz sistemi tarafından oluşturulan reaktif oksijen radikallerini inhibe eder (99). Ksantin oksidaz (XO) pürin yıkımının son basamağını oluşturan enzim olup en önemli serbest radikal kaynaklarından biridir (108).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.DENEY HAYVANLARI

Çalışmamızda kullanılan 200–250 g olan 3 aylık 49 adet Wistar albino erkek sıçanlar, İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkez'inden temin edildi. Çalışmamız için İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulundan onay alındı (Etik kurul no:2010/71). Sıçanlar oda sıcaklığı 24-27 ° C arasında, havalandırma şartları sağlanmış, aydınlatılması 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olacak şekilde ayarlanan odalarda barındırıldı. Sıçanlar çalışma boyunca *ad libitum* standart pellet yemle beslendi. Rasgele seçilen denekler 7 farklı gruba ayrıldı.

3.2.DENEY GRUPLARI

1-Kontrol grubu: Bu gruptaki sıçanlara 20 gün süreyle 0.75 cc SF intraperitoneal olarak uygulandı.

2-Galaktozamin(24 saat) grubu: Bu gruptaki her sıçana tek doz 500 mg/kg/gün D-GAL (D-Galactosamine hydrochloride, BioChemica, Germany) intraperitoneal (ip) yolla uygulandı. D-GAL uygulanan sıçanlar 24 saat sonra sakrifiye edildi.

3-Galaktozamin (Devam) grubu: Bu gruptaki her sıçana tek doz 500 mg/kg/gün D-GAL ip yolla uygulandı. D-GAL uygulanan sıçanlar deney sonunda sakrifiye edildi.

4-Galaktozamin+ Pentoxifylline grubu: Bu gruptaki sıçanlara tek doz 500 mg/kg/gün D-GAL intraperitoneal yolla uygulamasından 24 saat sonra 20 gün süreyle pentoxifylline (Trental ampul) 50 mg/gün 1.p olarak uygulandı.

5-Galaktozamin+CAPE grubu: Bu gruptaki sıçanlara tek doz 500 mg/kg/gün D-GAL intraperitoneal yolla uygulanmasından 24 saat sonra 20 gün süreyle 10 µmol/kg CAPE (Caffeic acid phenethyl ester, Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) etanolde çözülerek 1.p yolla uygulandı.

6-Pentoxifylline grubu: Bu gruptaki sıçanlara 20 gün süreyle pentoxifylline 50 mg/gün 1.p olarak uygulandı.

7-CAPE grubu: Bu gruptaki sıçanlara 20 gün süreyle 10 µmol/kg CAPE etanolde çözülerek 1.p yolla uygulandı.

3.3. DOKU VE KAN ÖRNEKLERİNİN ALINMASI

Çalışmanın 21. gününde 5 mg/kg xylazine ile 50 mg/kg ketamin i.p uygulanarak genel anestezi altında orta hat insizyonu ile batinları açıldı. Kalpten kan örnekleri alındı. Alınan kan örnekleri aynı gün 3000Xg'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen serum tüplere alınarak AST ve ALT ölçümleri için kullanıldı. Histolojik ve biyokimyasal incelemeler için karaciğerden doku örnekleri alındı. Histolojik analizler için karaciğerin sağ lobu alınarak %10'luk formaldehit içerisinde tespit edildi. Biyokimyasal çalışmalar için ise karaciğerin sol lobu -80 °C'lik derin dondurucuda muhafaza edildi.

3.4. HİSTOLOJİK ANALİZLER

%10'luk formaldehit içerisine alınan dokular 3-4 mm'lik daha küçük parçalara ayrılıp (trimlenerek) plastik doku takip kasetlerine konuldu. Fiksasyon işleminin bitmesini takiben parçalar 24 saat boyunca akan çeşme suyuyla yıkandılar. Daha sonra dereceli alkollerde dehidrate edilerek, ksilende şeffaflaştırılıp parafine gömüldüler. Parafin bloklardan Leica RM2145 marka mikrotom yardımıyla 5'er mikron'luk kesitler alındı. Kesitlere genel histolojik yapıyı gözlemlemek amacıyla Hematoksilen ve eozin, glikoproteinleri incelemek amacıyla Periyodik Asid Schiff (PAS), bağ dokusu bileşenlerini gözlemlemek amacıyla Masson trikrom üçlü boyama ve mast hücrelerini ayırt etmek için Toluidin mavisi boyama yöntemleri uygulandı. Preparatlar Leica DFC280 ışık mikroskobu ve Leica Q (Leica Micros Imaging solution Ltd, Cambridge, UK) görüntü analiz sistemi kullanılarak incelendi, skorlandı, ve fotoğrafları çekildi.

3.4.1. Histokimyasal Boyama Metodları

3.4.1.1 Hematoksilen-Eozin Boyama Metodu (109)

Ksilen----- 5 dk.+ 5 dk. + 5 dk.

Absolü Alkol-----3 dk.

Alkol 96 °-----3 dk.

Alkol 80 °-----3 dk.

Alkol 70 ° -----3 dk.

Distile su -----5-10 sn çalkalanır

Hematoksilen ----- 12-13dk.

Çeşme suyu ----- 25 dk.

Eozin -----2 dk.
Alkol 96 ° ----- 3 dk. + 3 dk.
Absolü Alkol -----3 dk. + 3 dk. + 3 dk
Ksilen ----- 5 dk. + 5 dk. + 5 dk.
Kanada balsamı ile kapatıldı.

3.4.1.2. PAS Boyama Metodu (110)

Kesitler deparafinize ve hidrate edildikten sonra,
Çeşme suyu----- 2 dk.
Distile su -----2 dk.
Periyodik ----- 5 dk.
Distile su -----2 dk.
Schiff -----15 dk.
Çeşme suyu -----10 dk.
Alkol 96 ° ----- 3 dk. + 3 dk.
Absolü Alkol ----- 3 dk. + 3 dk. + 3 dk
Ksilen ----- 5 dk. + 5 dk. + 5 dk.
Kanada balsamı ile kapatıldı.

3.4.1.3. Masson's Trikrom Boyama Metodu (109)

Kesitler deparafinize ve hidrate edildikten sonra,
Weigent Hematoksilen ----- 12 dk.
Çeşme suyu----- 4 dk.
Metil karbonat----- 1,5 dk.
Çeşme suyu----- 5 dk
Distile su----- 2,5 dk. + 2,5 dk.
Asit Fuksin-----15 saniye
Distile su----- 2 dk. + 2 dk. + 2 dk. + 2 dk.
Fosfotungistik Asit-----6 dk.
Distile su----- 6 dk.
Light Green----- 4 dk.
Distile su----- 2 dk. + 2 dk. + 2 dk. + 2 dk.
Asetik asit----- 2 dk.
Distile su-----5 dk.

Alkol 96 ° -----3 dk. + 3 dk
Absolü Alkol -----3 dk. + 3 dk. + 3 dk
Ksilen-----5 dk. + 5 dk. + 5 dk.
Kanada balsamı ile kapatıldı.

3.4.1.4.Toluidin Mavisi Boyama Metodu (110)

Kesitler deparafinize ve hidrate edildikten sonra,
Toluidin mavisi -----4 dakika
Suda yıkama -----5 dakika
96° lik alkol -----1 dakika
Absolü alkol -----1 dakika
Ksilen -----5 dk. + 5 dk. + 5 dk
Kanada balsamı ile kapatıldı.

3.4.2. Histolojik Değerlendirme

Karaciğer hasarı; parankimada bulunan nekrotik, apoptotik ve inflamatuvar hücreleri içeren etkilenmiş lokal alanların sayısına ve hepatositlerin sitoplazmasındaki glikojen kaybının derecesine göre belirlendi.

Lokal alanların değerlendirilmesi için her kesitten 10 alan incelendi. X20 lik objektif büyütmesinde ayırt edilen lokal alanların sayısına göre:

0= etkilenmiş alan yok

1= 1 etkilenmiş alan

2=2 etkilenmiş alan

3=3 etkilenmiş alan olarak skorlandı.

Glikojen kaybının değerlendirilmesi için her kesitten X20'lik büyütmede 10 alan incelendi. Kaybın derecesine göre;

0=Değişiklik yok

1=Hafif

2=Orta

3=Ağır olarak skorlandı.

3.4.3. İmmünohistokimyasal Boyama Metodu

Işık mikroskopisi için hazırlanan parafin bloklardan 5-6 µm kalınlığındaki kesitler polizlinli lamlara alındı. Alınan kesitler 1 saat 54°C'de etüvde bekletildi. Karaciğer doku örneklerindeki hücrelerdeki proliferasyonu belirlemek için Ki-67 (Lab Vision, ABD) ve apoptotik hücreleri göstermek üzere primer rabbit poliklonal kaspaz-3 primer antikoru (Neomarker ABD) kullanıldı.

1. Üç defa beşer dakika ksilende bekletildi.
2. On dakika %100'lük alkolde bekletildi.
3. On dakika %96'lık alkolde bekletildi.
4. Üç dakika distile suya alındı.
5. Pappen ile etüvden çıkınca çizildi.
6. Fosfat tampon solüsyonu (PBS)'te yıkandı.
10. İstenmeyen zemin boyamalarını engellemek amacıyla Peroxide Block damlatılarak 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
11. Beş dakika PBS te yıkandı.
12. Nonspesifik boyamaları engellemek amacıyla Super Block (UV block) damlatılarak 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
13. Yıkama işlemi yapıldıktan sonra primer antikorun epitopuna bağlanması amacıyla, primer antikorlar dokunun tamamını örtecek şekilde damlatıldı.
14. Beş dakika PBS te yıkandı.
15. Primer antikordan sonra oluşan bağlanmayı reaksiyonu devam ettirmek, HRP aşamasından önce uygun bağlanma ortamını hazırlama amacıyla, Sekonder antikor olarak Biotinylated Goat Antipolyvalent Antibody dokular üzerine damlatılarak 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

16. Beş dakika PBS te yıkandı.

17. Epitop bağlanmalarının tamamlanması, kromojen için uygun ortam oluşturması amacıyla Horse Radish Peroksidaz (HRP) enzimi ile 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

18. Beş dakika PBS te yıkandı.

19. Antikor- epitop bağlanması renklendirilerek görünür hale getirmek amacıyla AEC kromojen dokularının üzerine damlatılarak 15 dakika inkübe edildi.

20. Üç dakika distile suya kondu.

21. Mayer hematoksilen ile 1 dakika zıt boyama yapıldı.

22. Beş dakika distile su ile yıkandı.

23. Lamel ile kapatıldı.

3.4.4. İmmunohistokimyasal değerlendirme

Ki-67 ile nükleusları kahverenginde boyanan hücreler boyanma yoğunluğuna göre zayıf (+), orta (++) ve güçlü (+++) olarak sınıflandırıldı. Kaspaz-3 ile sitoplazmaları kahverengi boyanan hücreler kaspaz-3(+) kabul edildi. Boyanan tüm hücreler Leica Q Win görüntü analiz sistemi kullanılarak x40 büyütme ile her sıçan karaciğerinden 10 alan sayılarak yapıldı.

3.5. BİYOKİMYASAL ANALİZLER

3.5.1. Kimyasal Malzemeler

Bu çalışmada, sitokrom-c, ksantin, ksantin oksidaz, redükte glutatyon (GSH), sığır serum albumin (BSA), glutatyon redüktaz (GSSG), süperoksit dismutaz (SOD), etilen diamintetraasetik asid (EDTA), folin fenol reagent, melatonin (Sigma), redükte β -nikotinamid adenin dinükleotid (NADPH), sodyum azid (NaN_3), Na_2CO_3 , CuSO_4 , Na, K-tartarat, NaOH, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , H_2O_2 , HCl, NaCl, 2-tiyobarbütirik asid (TBA), trikloroasetik asid (TCA) (Merck) kullanılmıştır.

3.5.2. Dokuların homojenizasyonu

Enzim aktivitesi yapılacak doku tartıldı, 1/5 w/v oranında PBS tamponu (pH: 7,4) eklenerek buz izolasyonu altında PCV, Kinematica, Status homojenizatörü ile tüm doku parçalanıncaya kadar homojenize edildi. Elde edilen homojenatlar, VWR Branson scientific sonifikatörde 30 saniyelik aralıklarla 3 defa 30 saniye sonifiye edildi. Homojenizasyon ve sonifiye işlemlerinin ardından 12.000 g' de +4 °C' de 15 dakika Ole Dich 157.MP mikrosantrifüj aletiyle santrifüj işlemi yapıldı. Böylece enzim aktiviteleri ve protein tayinin yapılacağı süpernatant elde edildi. Süpernatant örnekleri ölçüm işlemleri yapılınca kadar – 70 °C 'de derin dondurucuda saklandı.

Lipid peroksidasyonunu belirlenecek dokunun homojenizasyonu işleminde %1,15'lik KCl 1/10 w/v oranında eklendi. Homojenat analiz yapılınca kadar yine – 70 °C' de derin dondurucuda saklandı.

3.5.3. Protein Tayini

Doku örneklerinin protein seviyeleri Bradford (111) yöntemine göre ölçüldü. Değerler UV-VIS spektrofotometre kullanılarak 595 nm de alındı. Protein standardı olarak da sığır serum albumini kullanıldı.

3.5.4. Enzim Aktivite Tayinleri

3.5.4.1.Doku Se-Bağımlı glutatyon peroksidaz aktivite tayini

Se-bağımlı GSH-Px enziminin aktivite tayini için Lawrance ve Burk (112) yöntemi kullanıldı.

Gerekli çözeltiler:

Tampon Çözelti: 50 mM KH_2PO_4 + K_2HPO_4 + 5 mM EDTA içeren pH:7 olan çözelti tampon çözelti olarak kullanıldı.

NaN_3 (Sodyum azid)	: 1 mM
H_2O_2	: 0.25 mM

NADPH	: 0.2 mM
GSH (Redükte glutatyon)	: 2 mM
GSSG Redüktaz	: 1.2U/mL

Yöntem:

Yukarıdaki derişimlerde hazırlanan çözeltilerle önce kör ardından da örnek deneyleri yapıldı. Kör için 1 mL tampon, 10 µL NADPH, 10 µL GSH, 10 µL NaN₃ ve 2 µL GSSG redüktaz çözeltileri spektrofotometre küvetine kondu. 37°C de 5 dakika süre ile inkübasyona tabii tutulan çözelti karışımına 10 µL H₂O₂ ilave edildi ve Shimadzu UV- 1601-UV visible spektrofotometrede 340 nm deki absorbans değışimi (1 dk.) gözlemlendi. Numune deneyleri için ise belirli miktarlarda süpernatan ilave ettikten sonra 37°C de 5 dakika süre ile inkübasyona tabii tutulup kör denemede olduğu gibi 340 nm deki absorbans değışimi okunarak enzim aktivite tayini aşğıdaki formülle hesaplandı.

3.5.4.2.Doku Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini

Süperoksit radikallerinin dismutasyonunda görev alan SOD enziminin aktivite tayini McCord J.M, Fridovich I [113] yöntemine göre yapılmış olup yöntemin esası ksantin- ksantin oksidaz sisteminde üretilen süperoksit radikallerinin sitokrom-C'yi indirgememesinin SOD tarafından inhibisyonu temeline dayanır.

Süperoksit dismutaz çeşitli yollarla ortaya çıkan süperoksit (O₂⁻) radikalının hidrojen peroksit (H₂O₂) dismutasyonu reaksiyonunu katalizler. SOD enzim aktivitesi ksantin – ksantin oksidaz (XO) sistemi ile üretilen O₂⁻ radikallerinin sitokrom c okside etmesi sonucu oluşan renk değışimi 550 nm'de takip edilerek belirlendi. Bu reaksiyona dayanan optik dansitedeki azalmadan yararlanarak SOD tarafından reaksiyonun % inhibisyonu belirlendi. Bu reaksiyonu % 50 inhibe eden örneklerdeki SOD miktarı 1 Unite (U) olarak kabul edildi ve sonuçlar U/mg protein olarak verildi.

$$\text{Enzimin \% inhibisyonu} = (\text{Abskörv} - \text{Absnum}) / \text{Abs körv} \times 100.$$

Gerekli çözeltiler:

A çözeltisi:

5 µmol ksantin 0.001 N NaOH' daki çözeltisi: 10 hacim

2 µmol sitokrom-C'nin 50 mM pH 7,8 ve 0,1 mM EDTA içeren fosfat tamponundaki çözeltisi: 100 hacim

A çözeltisi belirtilen hacim oranlarında karıştırılarak hazırlanır. Bu çözelti +4°C ' de 3 gün kararlıdır.

B Çözeltisi:

Ksantin oksidazın 0,1 mM EDTA'daki çözeltisi 0.2U/mL

B çözeltisi deneyden önce taze olarak hazırlanır.

Yöntem :

- 1) 3 mL'lik spektrofotometre küvetine 2,9 mL **A** çözeltisi eklendi.
- 2) 50 µL örnek ilave edildi.
- 3) Tepkime 50 µL **B** çözeltisinin eklenmesiyle başlatıldı.
- 4) Daha sonra Shimadzu 1601-UV visible spektrofotometrede 550 nm deki absorbans değişimi (1dk.) okundu.
- 5) Kör okuması yapılırken örnek yerine 50µL distile su eklendi.
- 6) Örneklerin % inhibisyon değerleri hesaplandı.

3.5.4.3.Lipit peroksidasyonunun belirlenmesi

Serbest radikal saldırıları sonucu hücre membranında bulunan lipitlerin peroksidasyonu, son ürün olan malondialdehit (MDA) miktarının Beuge (114) yöntemine göre belirlenmesiyle bulundu.

Gerekli çözeltiler:

- % 15 'lik TCA çözeltisi : 1 hacim
% 0.375 'lik TBA çözeltisi : 1 hacim
0.25 N 'lik HCl çözeltisi : 1 hacim

Yukarıdaki üç çözeltinin hassas bir şekilde hazırlanıp belirtilen hacim oranlarında karıştırılmasıyla bir solüsyon hazırlandı.

Yöntem:

- 1- 10 mL' lik santifüj tüpleri alındı ve bütün tüplere hazırlanan solüsyondan 4 mL kondu.
 - 2- Kör tüpleri hariç tutularak örnek tüplerine 1 mL homojenat kondu.
 - 3- Bir kez şiddetli bir şekilde karıştırıldı.
 - 4- Kaynar suda (95- 100 °C 'de) 15 dakika bekletildi.
 - 5- Daha sonra tüpler soğutuldu ve 3500 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi.
 - 6- Elde edilen süpernatanın 535 nm'deki absorbansı Shimadzu UV-1601-UV visible spektrofotometresinde okundu.
- Malondialdehit miktarı aşağıdaki fomülle hesaplandı.
- MDA-TBA kompleksi için molar absorbans katsayısı: $\epsilon : 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

3.5.4.4.Doku Glutasyon miktarı ölçümü

GSH miktarı, 5,5'-Ditiyo-bis (2-Nitrobenzoik Asit) (DTNB) , NADPH ve GR varlığında enzimatik döngü yöntemiyle ölçüldü. Reaksiyon karışımı 50 mM sodyum fosfat, 1 mM EDTA, 0.5 mM DTNB, 0.2 mM NADPH ve 0.5 U/ml glutasyon redüktaz içermektedir. GSH ile DTNB arasındaki reaksiyon sonrası meydana gelen sarı renkli 2-nitro-5-tiyobenzoik asitin miktarı 412 nm'de spektrofometrik olarak ölçüldü. Daha sonra elde edilen absorbans değerleri ile standart GSH grafiği karşılaştırılıp örnekteki total GSH miktarları nmol/mg protein olarak hesaplandı (115).

3.5.4.5.Doku MPO aktivitesinin ölçülmesi

Nötrofil infiltrasyonun bir göstergesi olarak doku MPO düzeyleri, hidrojen peroksidin doku tarafından oksitlenerek o-dianozidini indirgemesi ve indirgenmiş o-dianozidinin ölçülmesi temeline dayanan yöntem ile ölçülmüştür (116).

3.6. Serumda AST, ALT Tayini

Plazma AST, ALT analizleri İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Merkez laboratuvarında Abbott Aeroset Otoanalizör sistemlerinde aynı markanın kitleriyle yapıldı.

3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

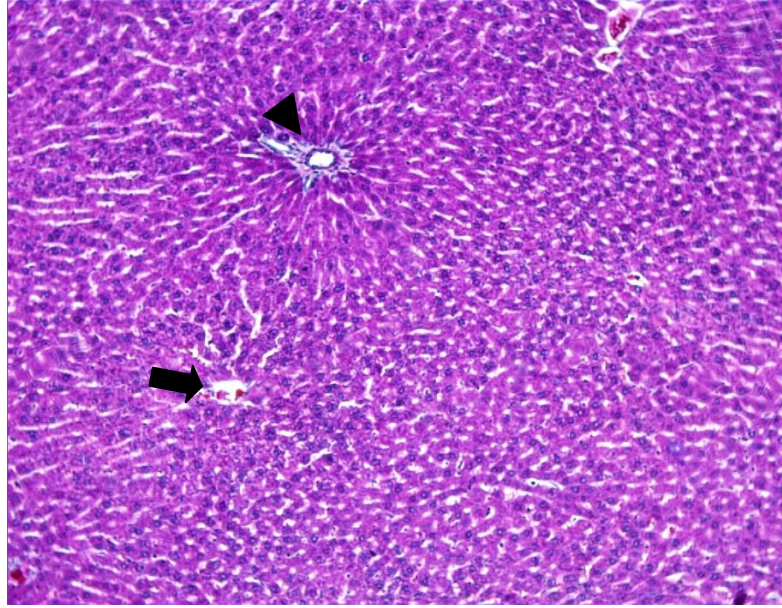
İstatistiksel analizler SPSS programı (SPSS for Windows version 13) ve MedCalc (2007,Belçika) istatistiksel yazılım programları ile yapıldı. Tüm sonuçlar aritmetik ortalama $\pm$ standart hata ($X \pm SE$) olarak ifade edildi. Tüm gruplardaki ölçülebilir değişkenlerin (MDA, MPO, SOD, GSH-Px, GSH,) Shapiro Wilk normallik testine göre normal dağılım göstermediği saptandı ($p > 0.05$). Bu nedenle istatistiksel değerlendirmede parametrik olmayan testlerden Kruskal Wallis varyans analizi tüm değişkenler yönünden grupların genel karşılaştırılmasında kullanılırken grupların ikili karşılaştırılmasında ise Connover testi kullanıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

4.1.Histolojik Değerlendirme

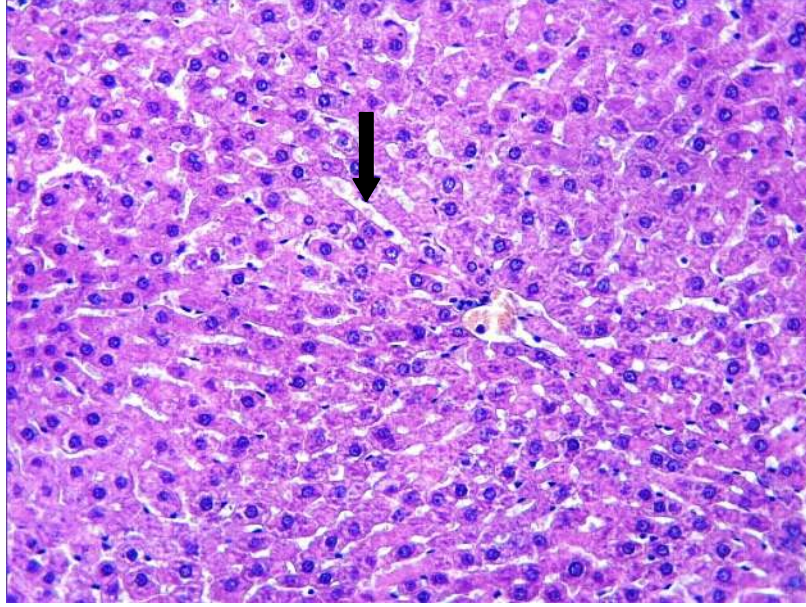
4.1.1.Kontrol Grubu

Hematoksilin-eozin ve Masson's trikrom boyama metodu uygulanmış kesitlerde karaciğerin; klasik altıgen yapıda, merkezinde santral ven ve köşelerinde portal alanların yer aldığı lobüllerden oluştuğu gözlemlendi (Resim1).



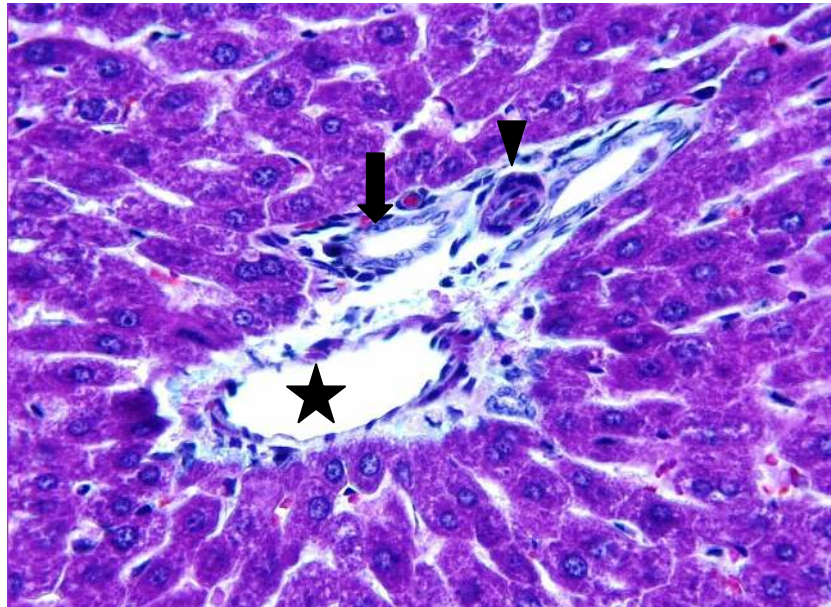
Resim 1:Kontrol grubu, karaciğerde izlenen santral ven (ok) ve portal alan (ok başı). Masson's Trikrom; X10.

Santral venden lobülün periferine doğru ışınal olarak uzanan hepatosit kordonları ve bu kordonlar arasında sinuzoidal tipde kapillerler izlendi (Resim 2).



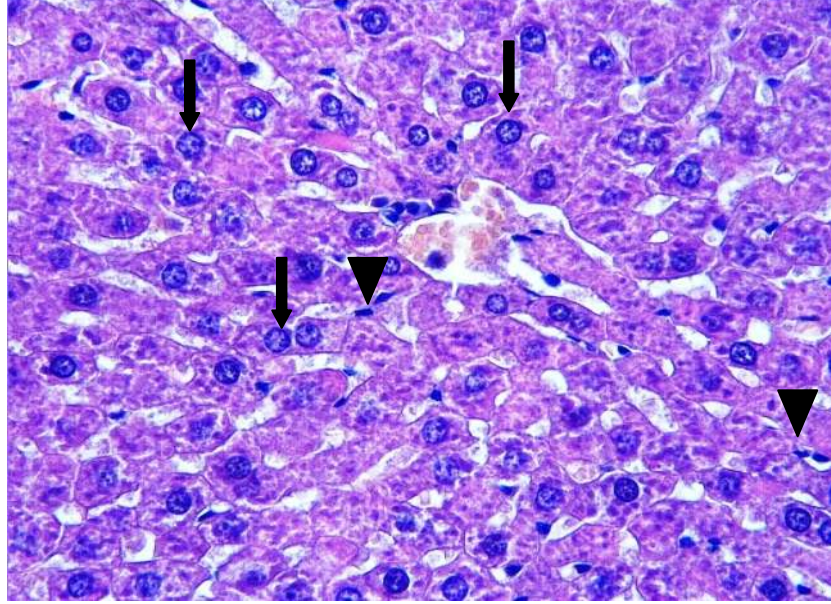
Resim 2: Kontrol grubu, hepatosit kordonları arasında izlenen sinuzoidal tipte kapillerler (ok). H-E; X20.

Herbir lobülün köşesinde portal ve hepatik arterin dallarıyla birlikte safra kanallarını içeren portal alanlar görüldü (Resim 3).



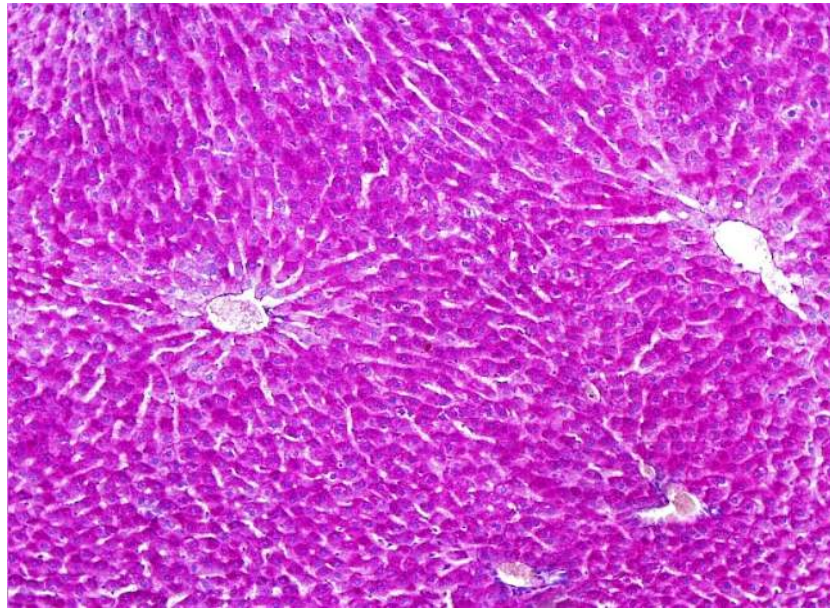
Resim 3: Kontrol grubu, portal ven (yıldız), hepatik arter (ok başı) ve safra kanalı (ok). Masson's Trikom; X40.

Hepatositlerin nukleusları yuvarlak, ökromatik olarak izlendi. Sitoplazma eozinofilik boyanmıştı. Sinüzoidlerde endotel hücrelerinin nukleusları ise yassı ve koyu boyanmış olarak gözlemlendi (Resim 4).

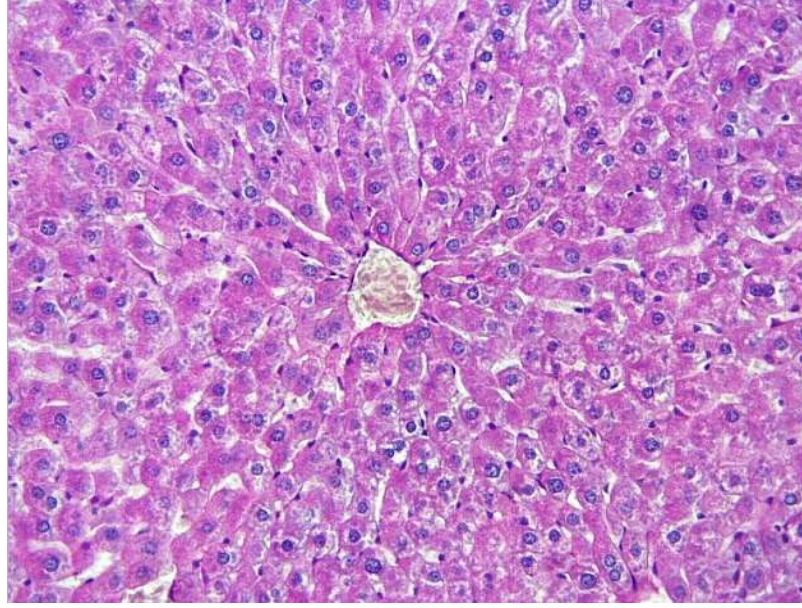


Resim 4: Kontrol grubu, hepatositlerin yuvarlak ve ökromatik nukleusları (oklar) ve sinüzoidlerde endotel hücrelerinin yassı ve koyu boyanmış nukleusları (ok başı). H-E; X40.

PAS boyama metodu uygulanan kesitlerde, hepatosit sitoplazması içindeki glikojen pembe renkte boyanmış olarak izlendi (Resim 5, 6).

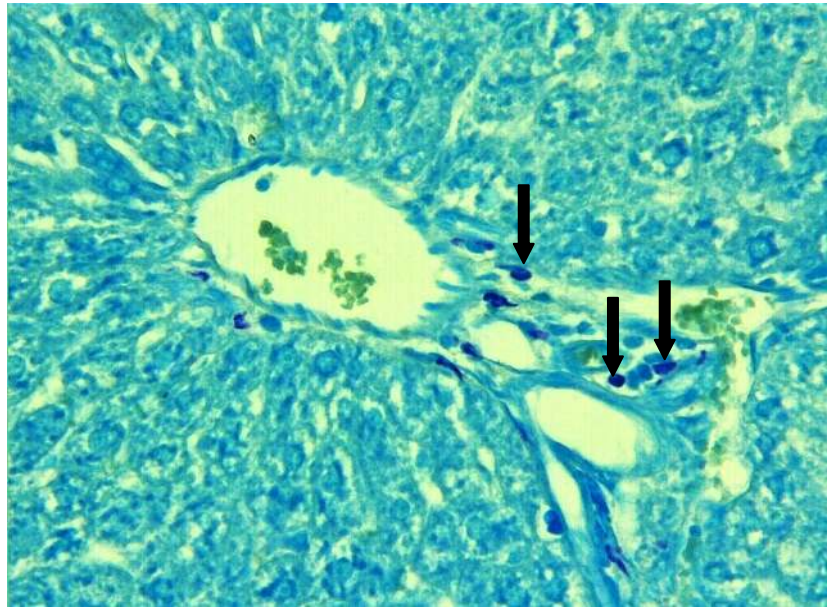


Resim 5: Kontrol grubu, PAS (+) hepatositlerin genel görünümü. PAS; X10



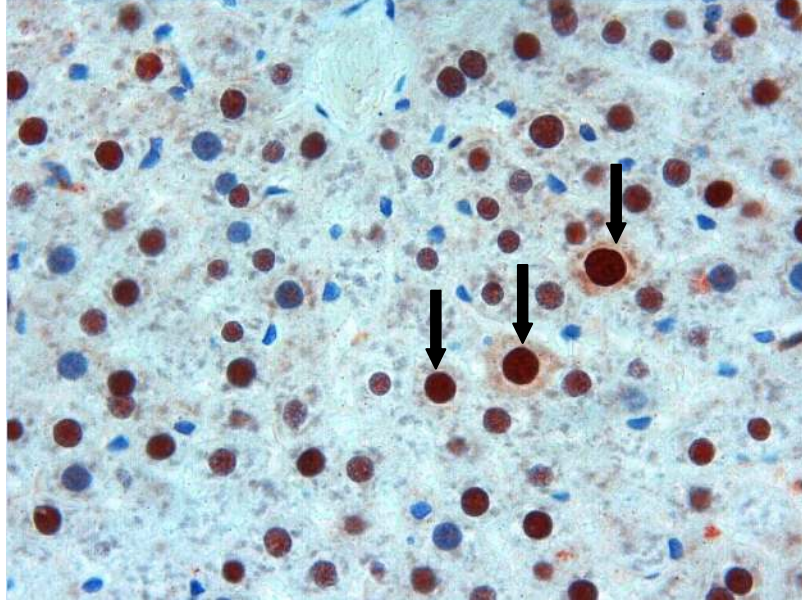
Resim 6: Kontrol grubu, hepatosit sitoplazması içindeki pembe renkte boyanmış glikojen. PAS; X20.

Toluidin mavisi boyama metodu uygulanan kesitlerde, mast hücreleri menekşe renginde boyanan granülleri ile ayırt edildi. Mast hücrelerinin portal alanlar çevresinde yerleştiği görüldü. Bu grupta ortalama mast hücre sayısı 4.20 ± 2.77 olarak tespit edildi (Resim 7).



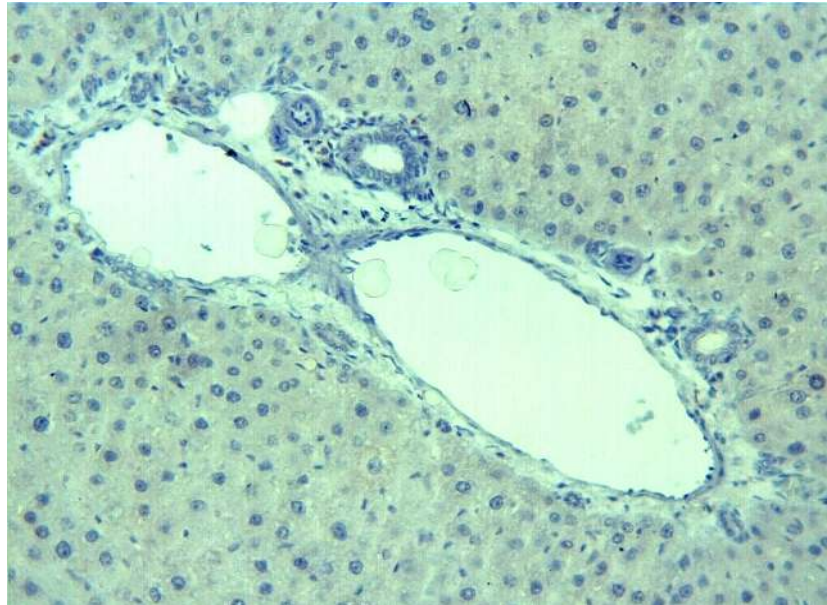
Resim 7: Kontrol grubu, menekşe renginde boyanan mast hücreleri (oklar). Toluidin mavisi; X40.

Ki-67 immün boyama yöntemi ile pozitif reaksiyon gösteren hepatosit nukleusları kahverengi tonlarında boyandılar (Resim 8). Boyanma yoğunluğuna göre, hafif derecede boyanan hücre sayısı 10.38 ± 2.64 , orta derecede boyanan hücre sayısı 5.36 ± 2.68 ve kuvvetli derecede boyanan ortalama hücre sayısı 2.05 ± 1.79 olarak tespit edildi. Bu grupta boyanan toplam hücre sayısı ise 5.93 ± 4.04 olarak bulundu.



Resim 8: Kontrol grubu, Ki-67 ile pozitif reaksiyon gösteren kahverengi hepatosit nukleusları (oklar). Ki-67; X40.

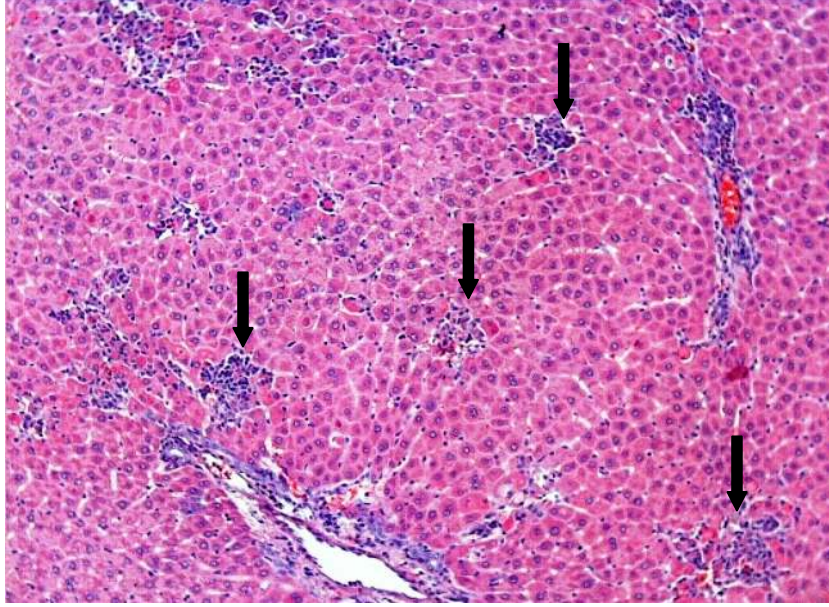
Kaspaz 3 immün boyama yöntemi uygulanan kesitlerde pozitif reaksiyon gösteren hücrelere rastlanmadı (Resim 9).



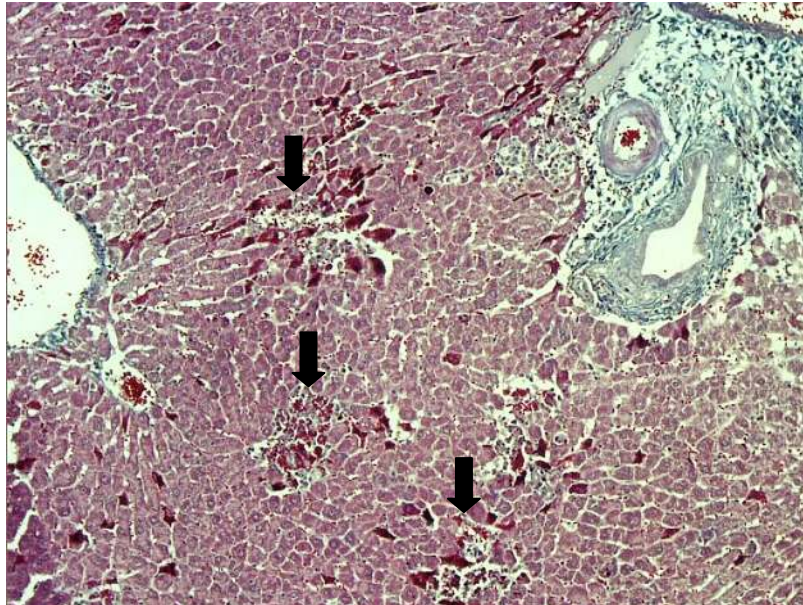
Resim 9: Kontrol grubu, kaspaz 3 (+) hücre izlenmemekte. Kaspaz-3; X20.

4.1.2. GAL (24) Grubu

Hematoksilen-eozin ve Masson's trikrom boyama metodu uygulanmış kesitlerde, parankim içerisinde normal histolojik yapıdan farklı olarak izlenen, sınırları düzensiz alanlar görüldü (Resim 10, 11).

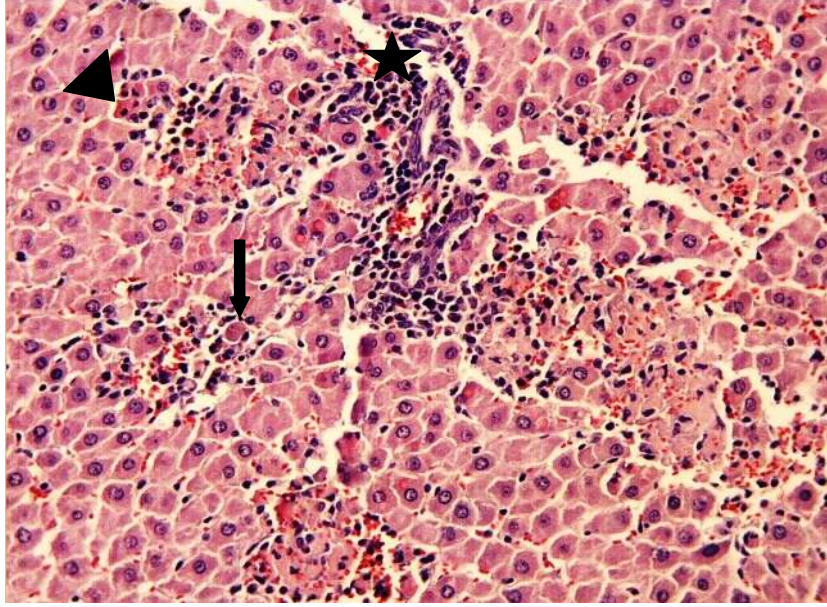


Resim 10: GAL(24) grubu, parankim içerisinde normal histolojik yapıdan farklı olarak izlenen, sınırları düzensiz alanlar (oklar). H-E; X10.



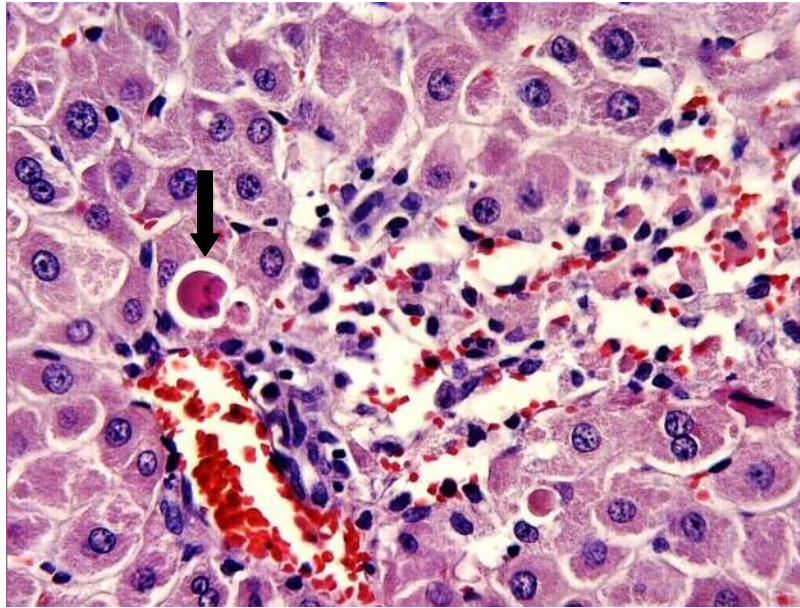
Resim 11: GAL (24) grubu, parankim içerisinde izlenen sınırları düzensiz alanlar (oklar). Masson's Trikrom; X10.

Bu lokal alanlar inflamatuvar, nekrotik ve apoptotik hücreler içermektedir (Resim 12)



Resim 12: GAL(24) grubu, inflamatuvar (yıldız), nekrotik (ok başı) ve apoptotik hücreler (ok) içeren lokal alanlar. H-E; X20.

Apoptotik hücreler, etraflarındaki hücrelerden belirgin bir halo ile ayrılan eozinofilik sitoplazması ve piknotik nükleusu ile ayırt edildi (Resim 13, 14).

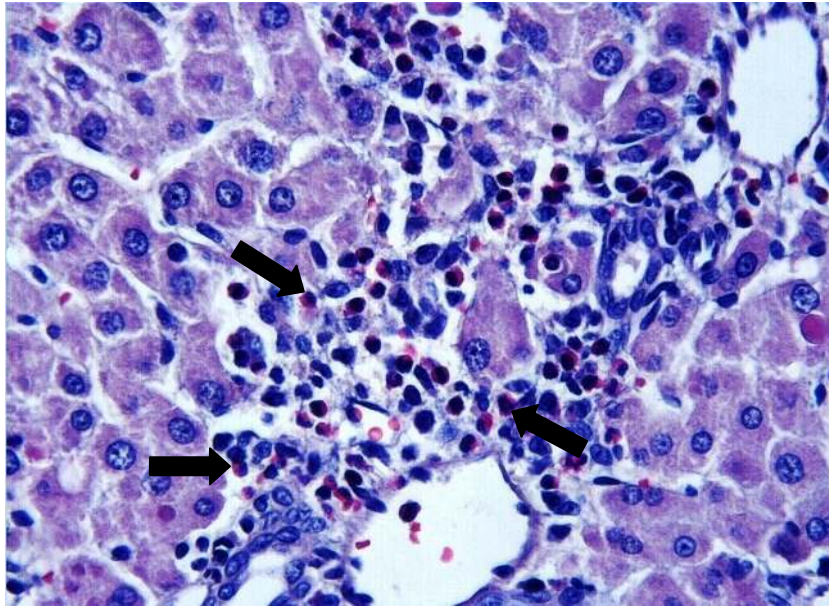


Resim 13: GAL(24) grubu, etraflarındaki hücrelerden belirgin bir halo ile ayrılan apoptotik hücre (ok). H-E; X40.

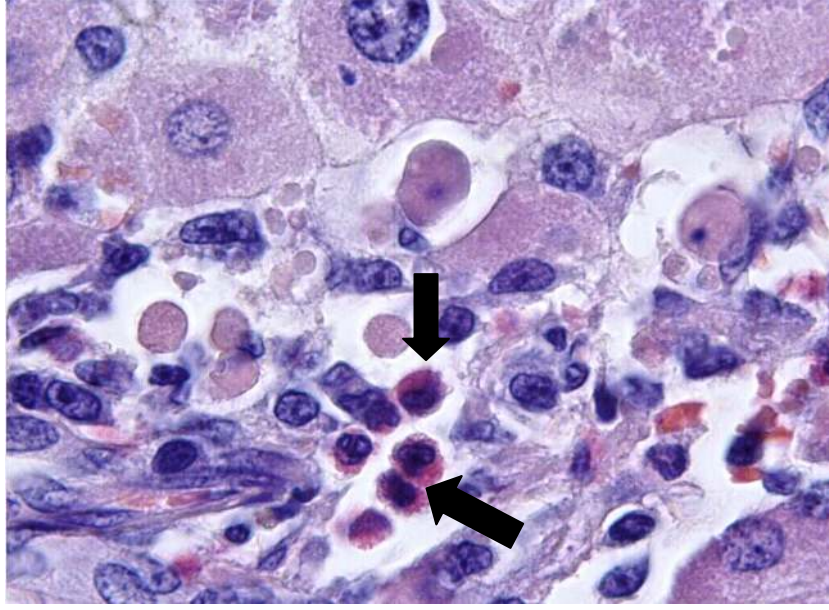


Resim 14: GAL (24) grubu, apoptotik hücrelerin görünümü (oklar). H-E; X100.

Ayrıca bu bölgelerde pembe renkte boyanmış sitoplazmaları ile çok sayıda eozinofil dikkat çekti (Resim 15, 16).

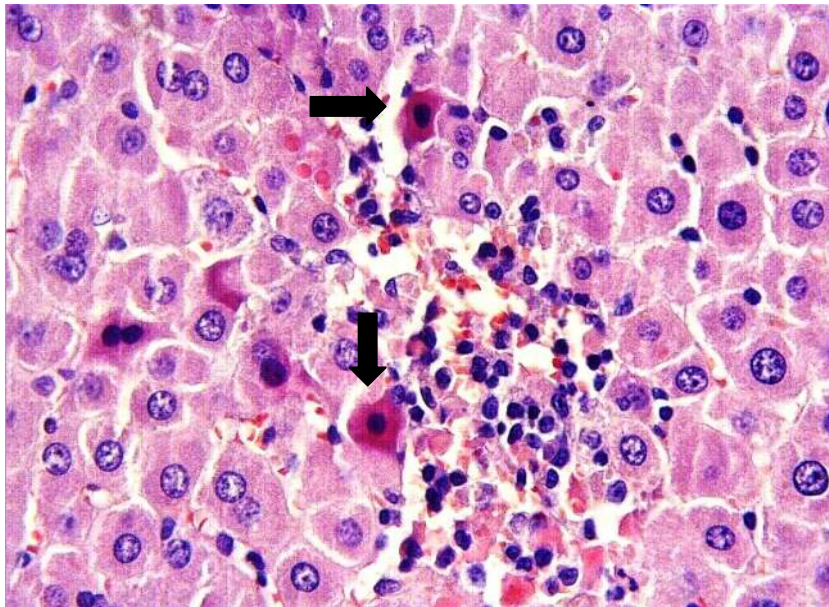


Resim 15: GAL(24) grubu, pembe renkte boyanmış sitoplazmaları ile eozinofiller (oklar). H-E; X20.



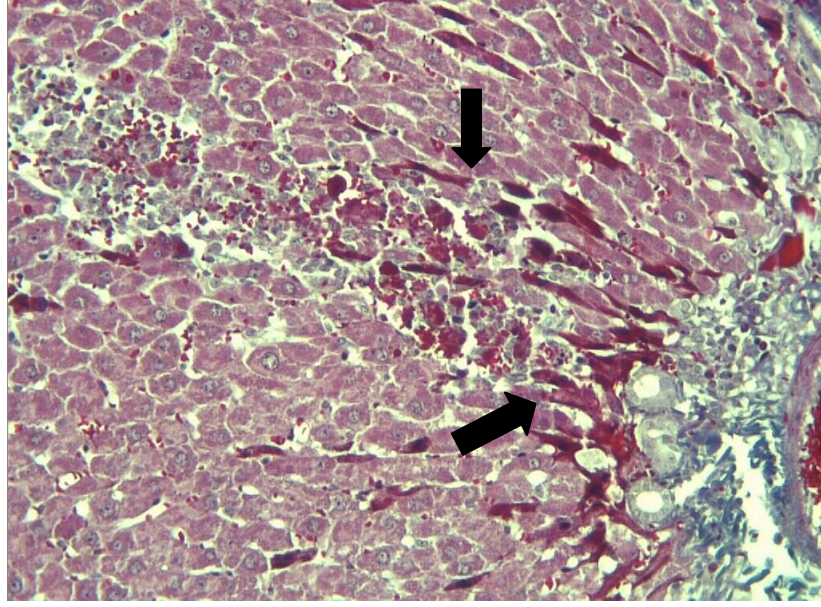
Resim 16: GAL(24) grubu, lokal alanlar içerisinde izlenen pembe renkte boyanmış sitoplazmaları ile eozinofiller (oklar). H-E; X100.

Diğer dikkat çeken bir bulgu ise, sağlam hepatositler arasına dağılmış farklı şekillerde eozinofilik sitoplazmalı ve heterokromatik nükleuslu nekrotik hücrelerdi. (Resim 17).



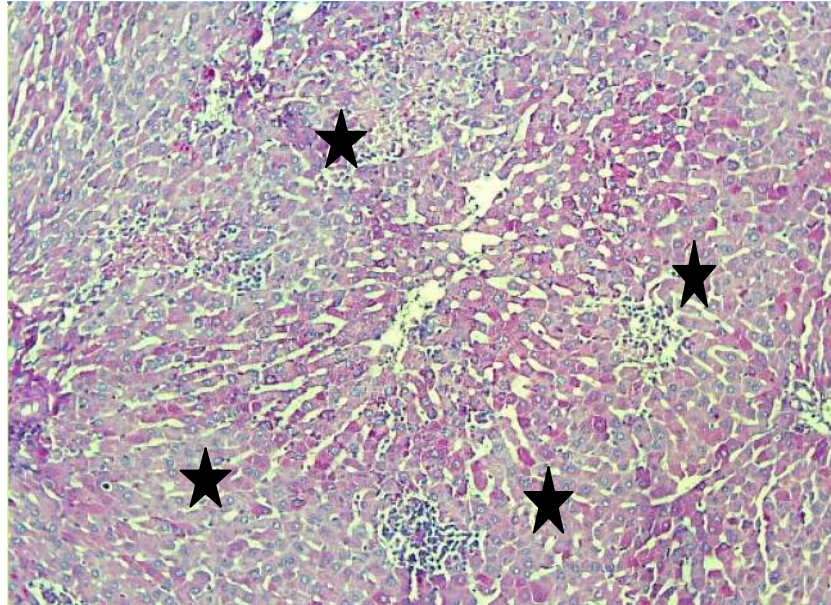
Resim 17: GAL(24) grubu, sağlam hepatositler arasına dağılmış farklı şekillerde izlenen eozinofilik sitoplazmalı ve heterokromatik nükleuslu nekrotik hücreler (oklar). H-E; X40.

Bu hücreler Masson trikrom ile boyanmış kesitlerde daha belirgin olarak gözlendi (Resim 18). Bu grupta etkilenmiş lokal alanların sayısı 2.25 ± 1.51 olarak tespit edildi.



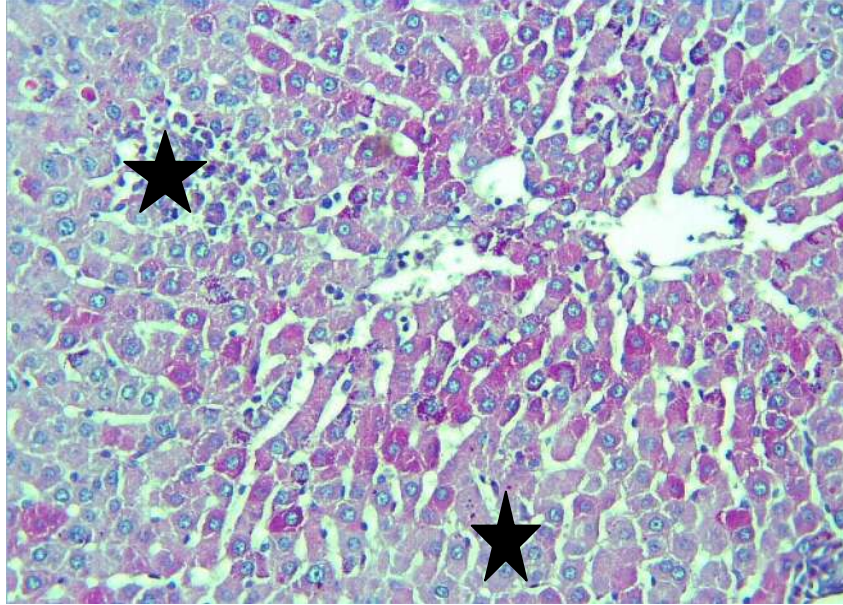
Resim 18: GAL(24) grubu, sağlam hepatositler arasına dağılmış nekrotik hücreler (oklar). Masson's Trikom; X20.

PAS boyama metodu uygulanan kesitlerde, lobülün periferinde yer alan hepatositlerde glikojen kaybının belirgin derecede arttığı izlendi (Resim 19).



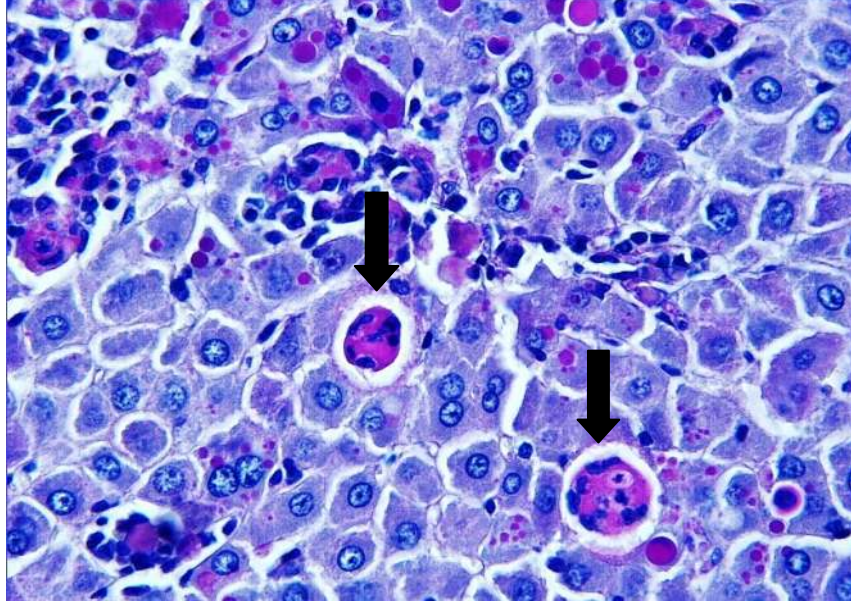
Resim 19: GAL(24) grubu, lobülün periferinde yer alan hepatositlerde glikojen kaybı (yıldız). PAS; X10.

Santral ven etrafındaki hepatositler PAS(+) boyanmış olarak izlenirken, vena sentralisden uzaklaştıkça hepatositlerdeki PAS(+) boyanma yoğunluğunun belirgin derecede azaldığı gözlemlendi (Resim 20).



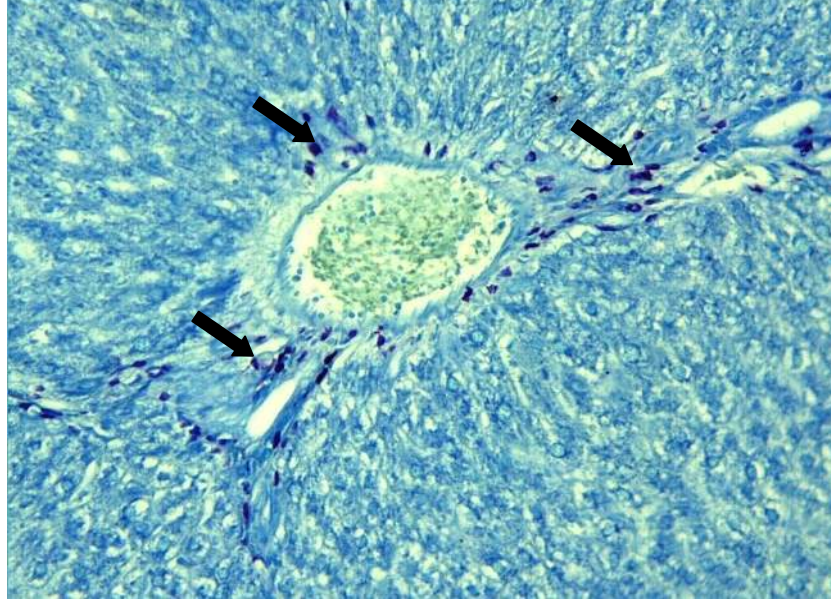
Resim 20: GAL(24) grubu, vena sentralisden uzaklaştıkça izlenen PAS (+) hücrelerin azalması (yıldız). PAS; X20.

Kontrol grubu (0.27 ± 0.44) ile karşılaştırıldığında GAL (24) (1.94 ± 0.79) grubunda glikojen kaybının istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı gözlemlendi ($p=0.0001$). Bu boyama metoduyla, lokal alanlara yakın, apoptotik hücrelere benzer şekilde etraflarındaki sağlam hepatositlerden belirgin bir halo ile ayrılan çok sayıda nükleus içeren PAS (+) dev yapılar göze çarptı (Resim 21).



Resim 21: GAL(24) grubu, lokal alanlara yakın, sağlam hepatositlerden belirgin bir halo ile ayrılan çok sayıda nükleus içeren PAS (+) dev yapılar (oklar). PAS; X40.

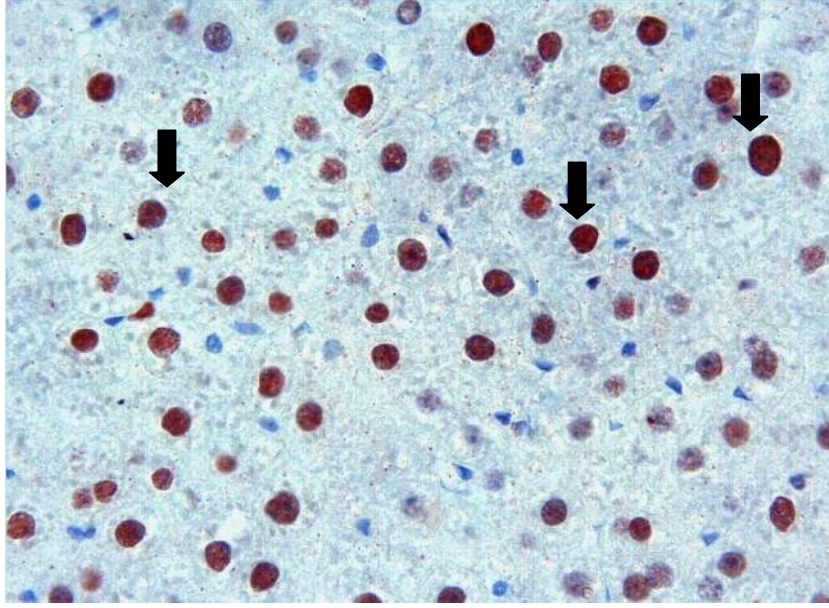
Toluidin mavisi boyama metodu uygulanan kesitlerde, mast hücre granülleri menekşe renginde boyandılar. Bu hücreler sadece portal alanda izlendi. Karaciğer parankima içerisinde mast hücrelerine rastlanmadı (Resim 22).



Resim 22: GAL(24) grubu, portal alanda izlenen mast hücreleri (oklar). Toluidin Mavisi; X40.

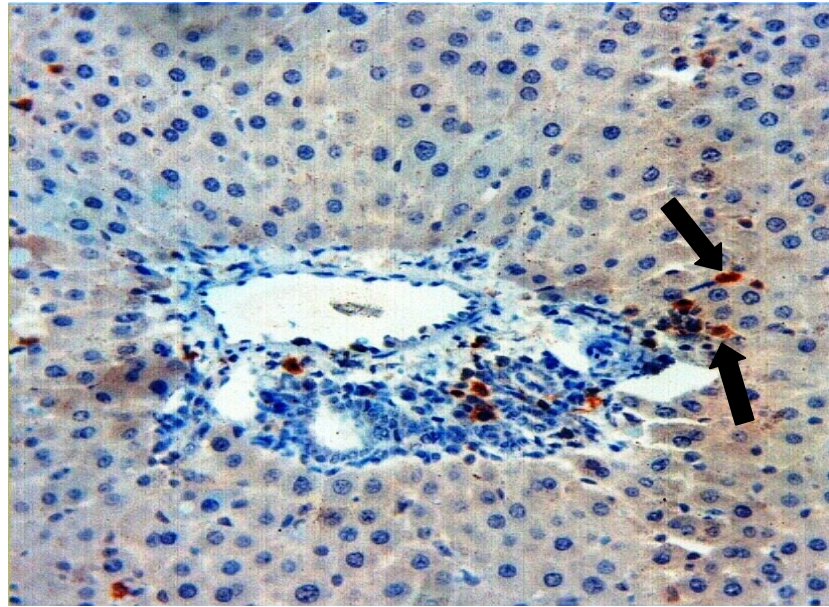
Portal alanlarda bulunan ortalama mast hücre sayısı 130.2 ± 35.42 olarak tespit edildi. Bu grupta diğer tüm gruplar ile karşılaştırıldığında mast hücre sayısı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir artışın olduğu gözlemlendi ($p=0.0001$).

Ki-67 immün boyama yöntemi ile pozitif reaksiyon gösteren hepatosit nükleuslarının toplam sayısı 6.86 ± 4.61 olarak bulundu. Boyanma yoğunluğuna göre hafif derecede boyanan hücre sayısı $11,63 \pm 3,44$, orta derecede boyanan hücre sayısı $6,56 \pm 3.93$ ve kuvvetli derecede boyanan ortalama hücre sayısı 2.41 ± 2.61 olarak tespit edildi. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında bu grupta hafif ve orta derecede boyanan hepatositlerin istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı görüldü ($p=0,0001$) (Resim 23).



Resim 23: GAL(24) grubu, Ki-67 ile pozitif reaksiyon gösteren hepatosit nükleuslarının görünümü (oklar) X40.

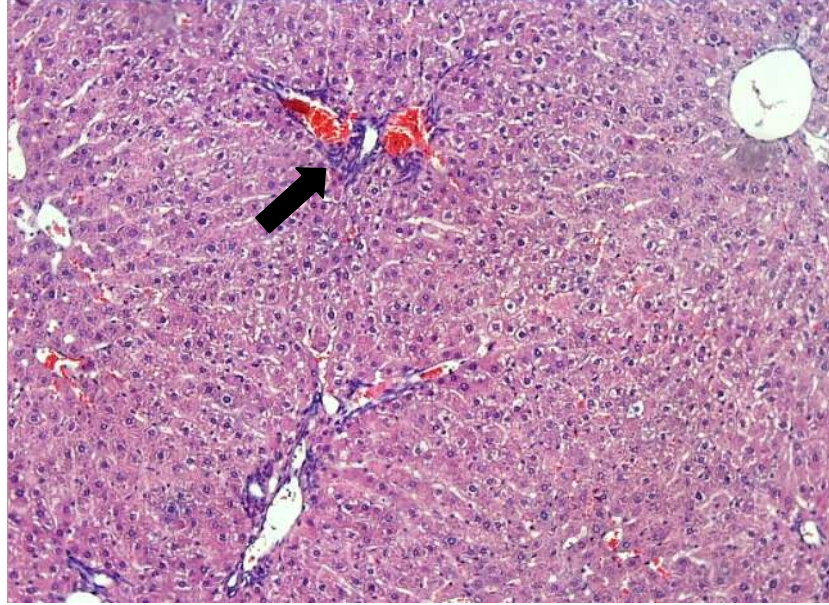
Kaspaz-3 immün boyama yöntemi ile pozitif reaksiyon gösteren hücreler, kahverengi tonlarında boyandılar. GAL (24) grubunda kaspaz-3 (+) hücre sayısı 101.9 ± 22.43 olarak tespit edildi (Resim 24).



Resim 24: GAL(24) grubu, portal alana yakın olarak gözlenen kaspaz-3 (+) hücreler (oklar). Kaspaz-3; X40.

4.1.3. (GAL-Dev) Grubu:

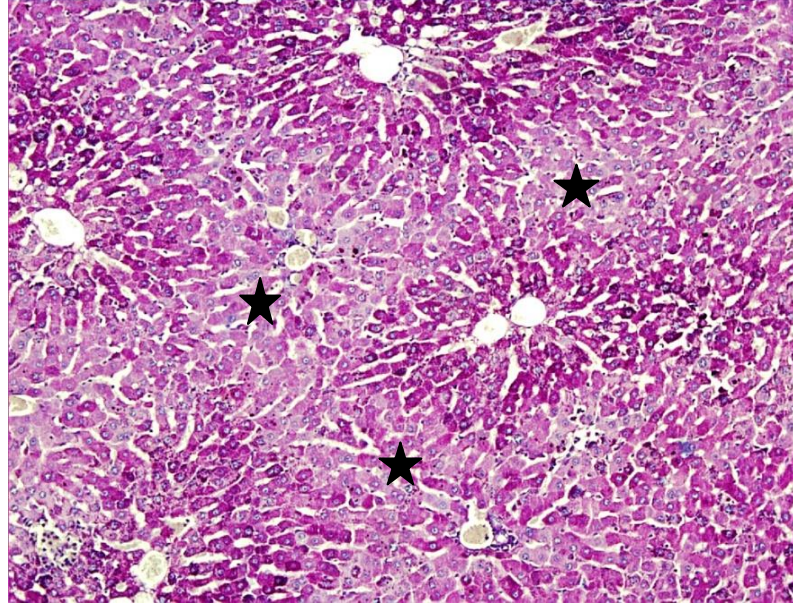
Hematoksilen-eozin ve Masson's trikrom boyama metodu uygulanmış kesitlerde GAL(24) grubunda izlenen inflamatuvar, apoptotik ve nekrotik hücre içeren lokal alanlar bu grupta da görüldü. Ancak bu alanların sayısı GAL(24) grubuna göre istatistiksel olarak önemli derecede azalmış ve sınırları küçülmüştü (Resim 25).



Resim 25: GAL(dev) grubu, sayıları azalmış ve sınırları küçülmüş lokal alanlar. H-E;X10.

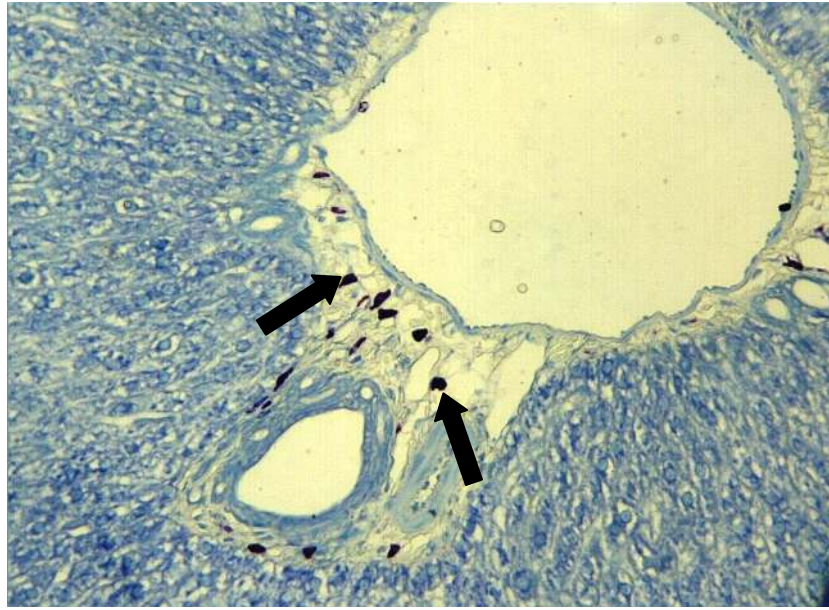
Diğer yandan kontrol (0.07 ± 0.025) grubu ile karşılaştırıldığında GAL(dev) (0.47 ± 1.54) grubunda etkilenmiş lokal alanların sayısı istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekti ($p=0.0001$).

PAS boyama metodu uygulanmış kesitlerde, GAL(24) grubuna benzer şekilde lobülün periferinde yer alan hepatositlerde, glikojen kaybı belirgin olarak artmıştı (Resim 26). Kontrol grubu (0.27 ± 0.44) ile karşılaştırıldığında GAL(dev) grubunda (1.25 ± 0.75) glikojen kaybının istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı gözlemlendi ($p=0.0001$).



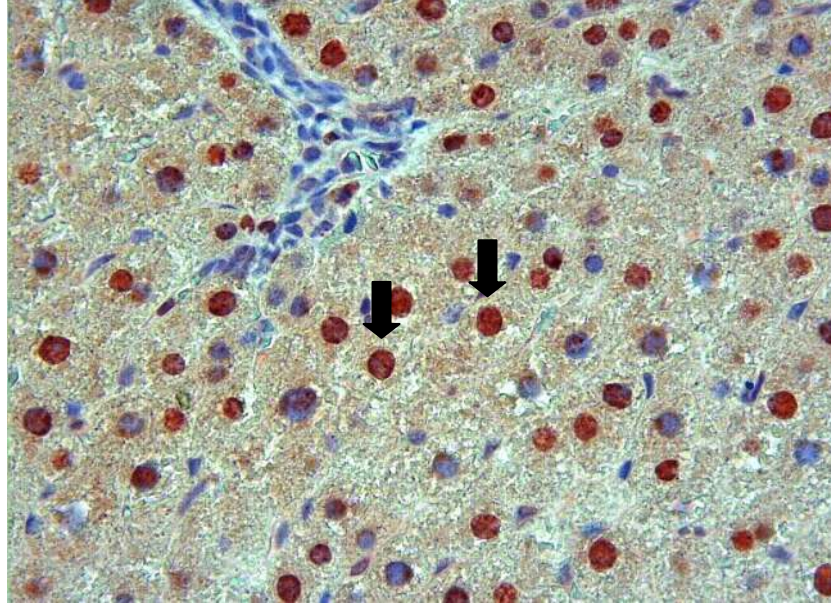
Resim 26: GAL(dev) grubu, portal alanlara yakın PAS (+) boyanan hepatositlerin azalması (yıldızlar). PAS; X10.

Toluidin mavisi boya metodu uygulanmış kesitlerde, portal alanda mor-menekşe renginde boyanmış mast hücrelerine rastlandı (Resim 27). Portal alanlarda bulunan ortalama mast hücre sayısı 108.5 ± 33.01 olarak tespit edildi. Kontrol grubu (4.20 ± 2.77) ile karşılaştırıldığında GAL(dev) grubunda (108.5 ± 33.01) mast hücre sayısının istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı gözlemlendi ($p=0.0001$).



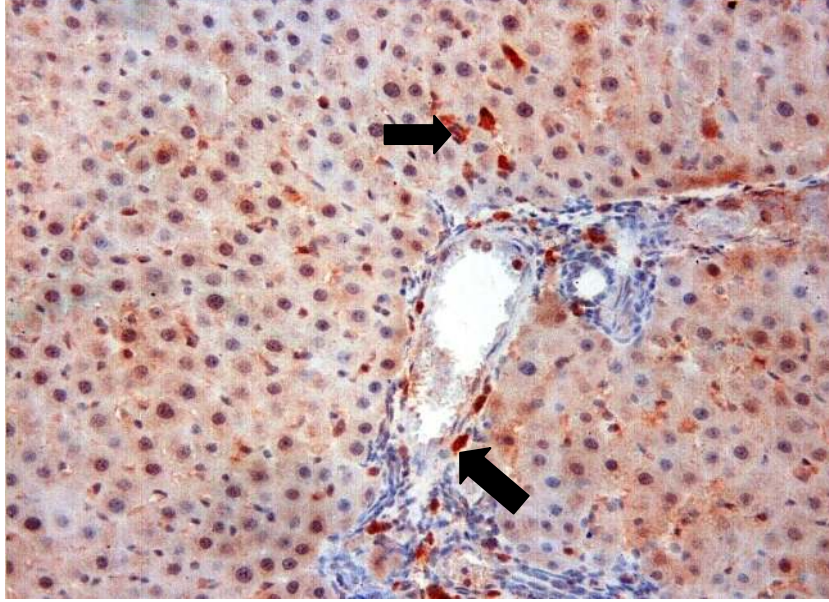
Resim 27: GAL (dev) grubu, portal alanda bulunan mast hücreleri (oklar). Toluidin Mavisi; X40.

Ki 67 immün boyama yöntemi ile pozitif reaksiyon gösteren hepatosit nukleuslarının toplam sayısı 6.51 ± 5.22 olarak bulundu. Boyanma yoğunluğuna göre hafif derecede boyanan hücre sayısı 11.95 ± 3.87 , orta derecede boyanan hücre sayısı 6.05 ± 4.84 ve kuvvetli derecede boyanan ortalama hücre sayısı 1.53 ± 2.22 olarak tespit edildi. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında bu grupta hafif, orta ve kuvvetli boyanan hücre sayılarında istatistiksel olarak anlamlı bir artışın olduğu görüldü ($p=0,0001$). GAL (24) grubu ile karşılaştırıldığında ise bu grupta sadece kuvvetli derecede boyanan hücrelerin istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edildi ($p=0,0001$). Hafif ve orta derecede boyanan hücre sayısı bakımından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($P>0.05$) (Resim 28).



Resim 28: GAL(dev) grubu, Ki-67 pozitif reaksiyon gösteren hepatosit nukleusları izlenmekte (oklar). Ki-67; X40.

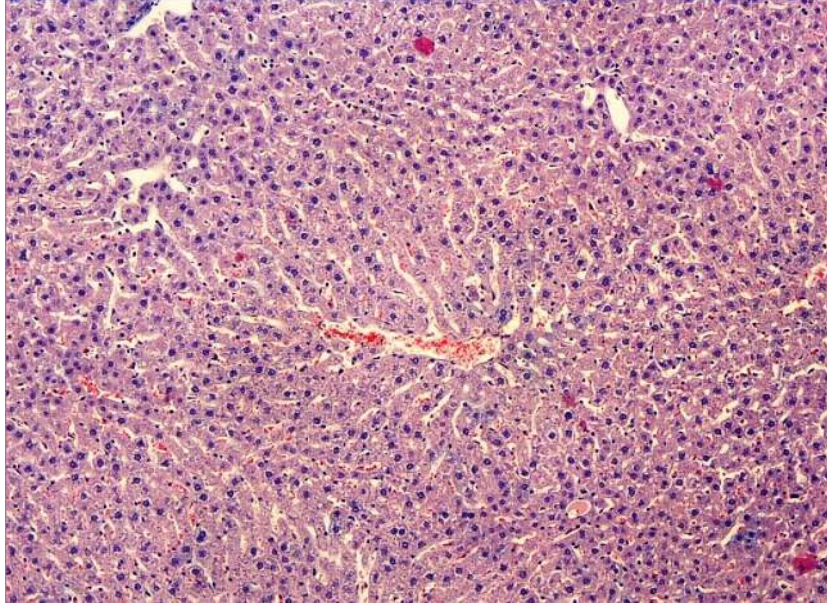
Kaspaz-3 immün boyama yöntemi ile pozitif reaksiyon gösteren hücrelerin sayısı 38.66 ± 12.01 olarak tespit edildi. GAL(24) grubu ile karşılaştırıldığında bu grupta kaspaz (+) hücre sayısının istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı görüldü ($p=0,0001$) (Resim 29).



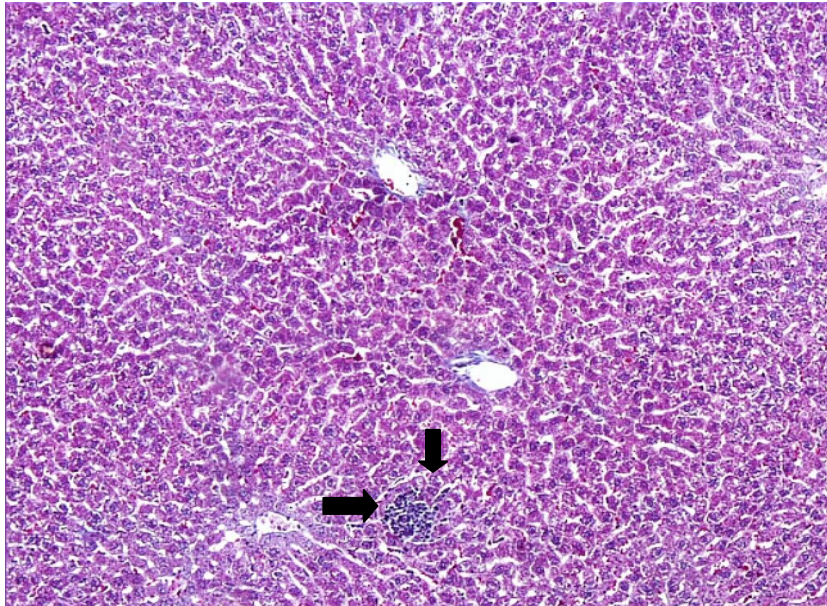
Resim 29: GAL(dev) grubu, kaspaz-3 (+) boyanan hücreler (oklar). Kaspaz-3; X20.

4.1.4.GAL+PTX Grubu

Hematoksilen-eozin ve Masson Trikrom boyama metodu uygulanan kesitlerde; inflamatuvar, nekrotik ve apoptotik hücreleri içeren lokal alanların sayısı 0.14 ± 0.35 olarak tespit edildi. Sadece GAL uygulanan gruplarla karşılaştırıldığında, GAL+PTX grubunda lokal alanların sayısı istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştı ($p=0.0001$) (Resim 30,31).

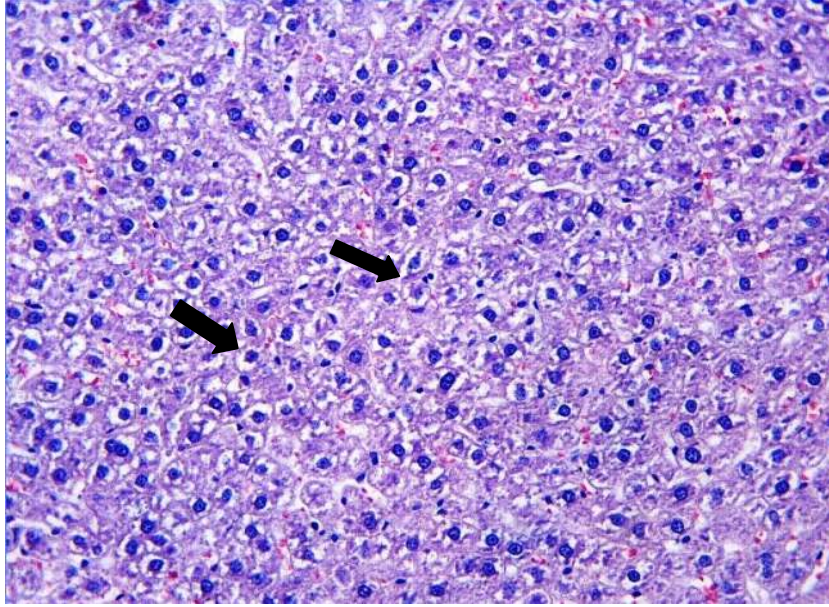


Resim 30: GAL+PTX grubu, santral ven ve hepatositlerin genel histolojik görünümü H-E; X10.



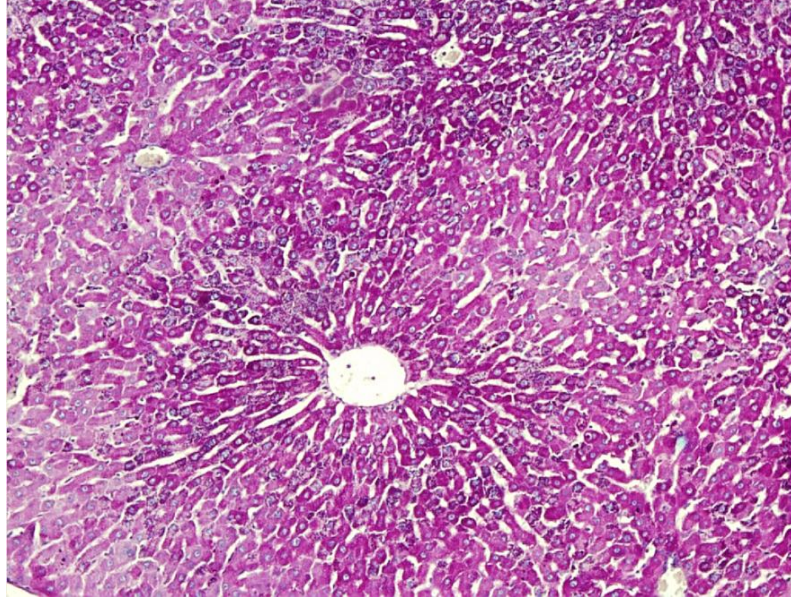
Resim 31: GAL+PTX grubu, küçük bir inflamasyon alanı dışında, normal histolojik görünüm izlenmekte. Masson's Trikrom; X10.

Bazı hepatositlerde izlenen hidropik değişiklikler dışında hepatosit ve sinuzoidlerin histolojik görünümü kontrol grubuna benzer şekildeydi (Resim 32).



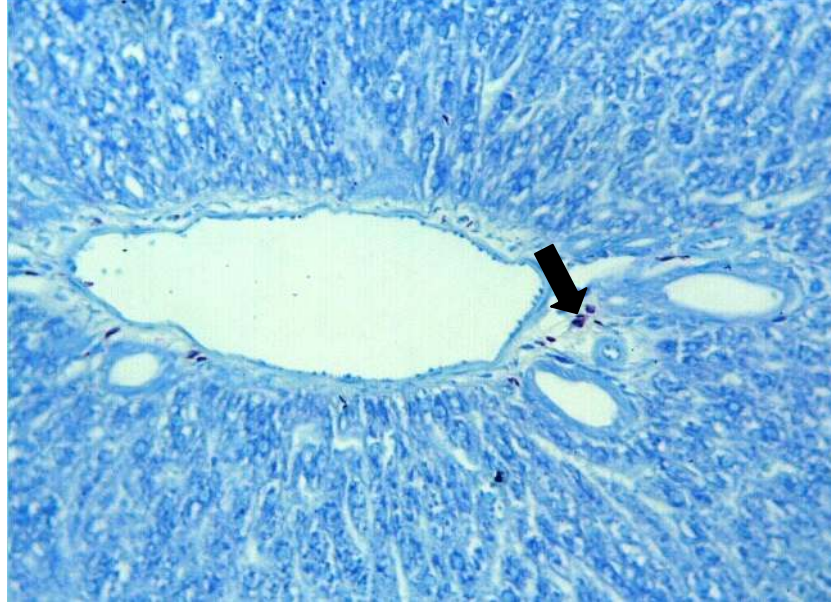
Resim 32:GAL+PTX grubu, hücrelerde hidropik değişiklikler (oklar). H-E; X20.

PAS boyama metodu uygulanmış kesitlerde, glikojen kaybı 1.27 ± 0.47 olarak tespit edildi. GAL(dev) (1.25 ± 0.75) grubu ile karşılaştırıldığında glikojen kaybı bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Resim 33).



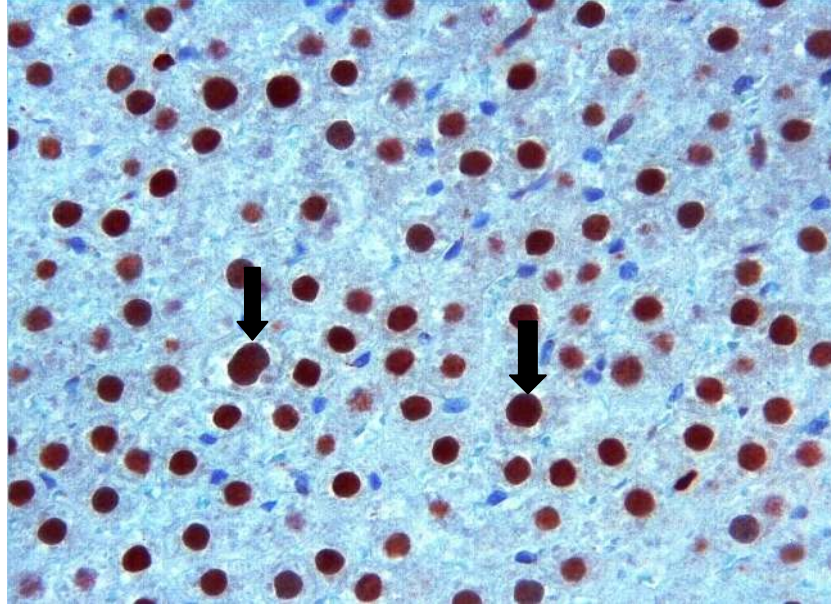
Resim 33: GAL+PTX grubu, PAS (+) boyanan hepatositlerin görünümü PAS; X10.

Toluidin mavisi boya metodu uygulanmış kesitlerde, portal alanlarda bulunan ortalama mast hücre sayısı 53.42 ± 13.08 olarak tespit edildi. GAL (dev) (108.5 ± 33.01) grubu ile karşılaştırıldığında bu grupta mast hücre sayısı istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştı ($p=0.0001$). Ancak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu grupta mast hücre sayısı halen yüksekti ($p=0.0001$) (Resim 34).



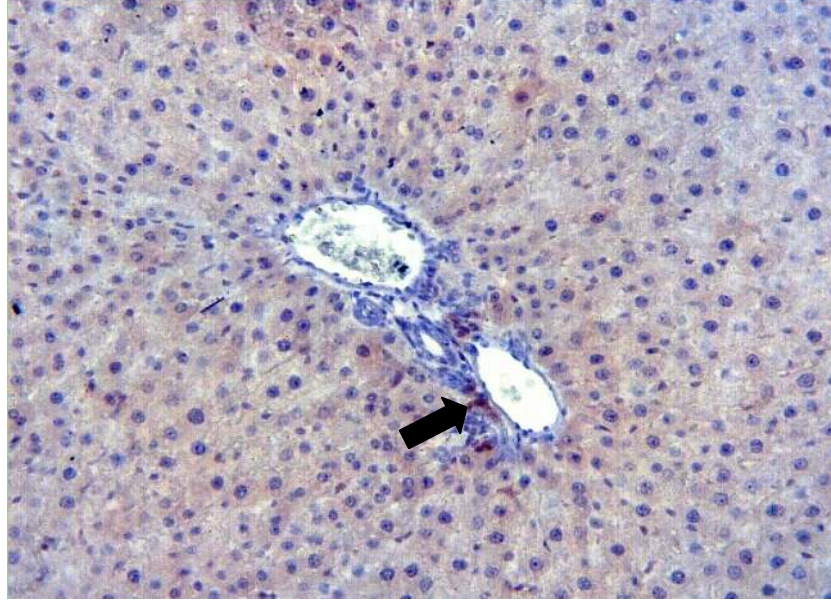
Resim 34: GAL+PTX grubu, portal alan etrafında, bağ doku içerisinde izlenen mast hücreler (ok) Toluidin Mavisi; X40.

Ki 67 immün boyama yöntemi ile pozitif reaksiyon gösteren hepatosit nukleuslarının toplam değeri 9.65 ± 6.16 olarak bulundu. Boyanma yoğunluğuna göre hafif 15.35 ± 2.37 , orta 10.50 ± 1.98 ve kuvvetli derecede boyanan hücre sayısı 3.10 ± 2.13 olarak tespit edildi. GAL(dev) grubuyla karşılaştırıldığında bu grupta; hafif, orta ve kuvvetli boyanan nukleus sayılarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış izlendi ($p=0,0001$) (Resim 35).



Resim 35: GAL+PTX grubu, Ki-67(+) boyanan nukleusların görünümü (oklar). Ki-67; X40.

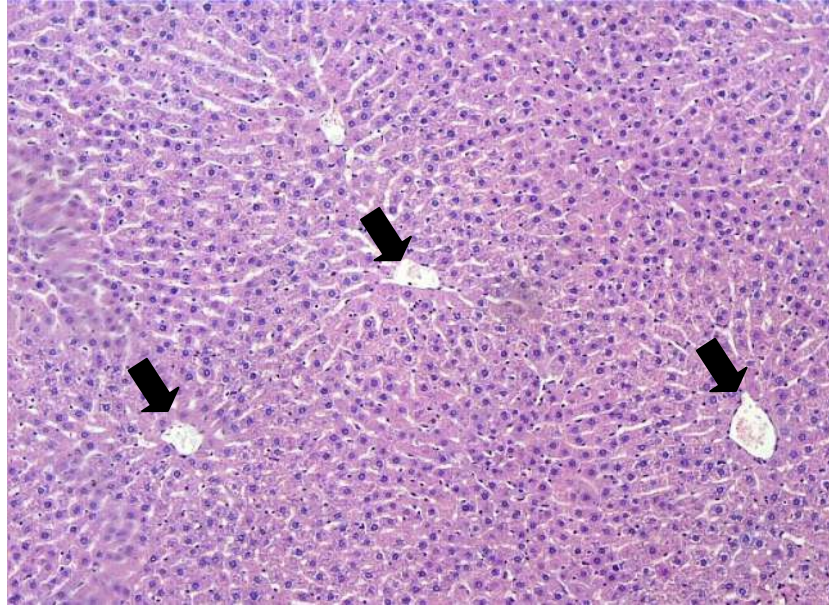
Kaspaz-3 immün boyama yöntemi ile pozitif reaksiyon gösteren hücre sayısı 2.42 ± 1.90 olarak tespit edildi. GAL(dev) grubuyla kar ıla tırıldı ında bu grupta kaspaz-3 (+) hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmanın olduğu görüldü ($p=0,0001$) (Resim 36).



Resim 36: GAL+PTX grubu, kaspaz-3 (+) boyanan hücreler. Kaspaz-3; X20.

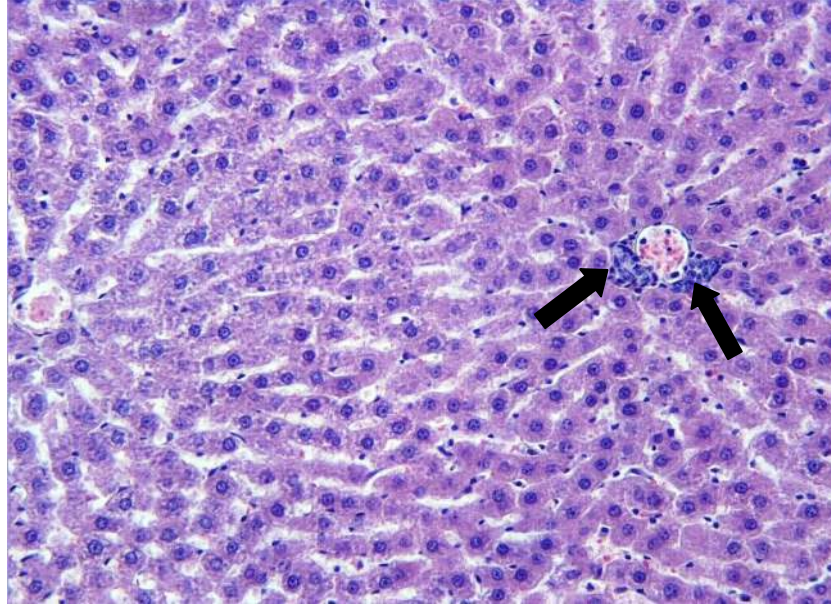
4.1.5.GAL+CAPE Grubu:

Hematoksilen-eozin ve Masson Trikrom boyama metodu uygulanan kesitlerde lobüllerin ve hepatositlerin görünümü kontrol grubuna benzerdi (Resim 37).



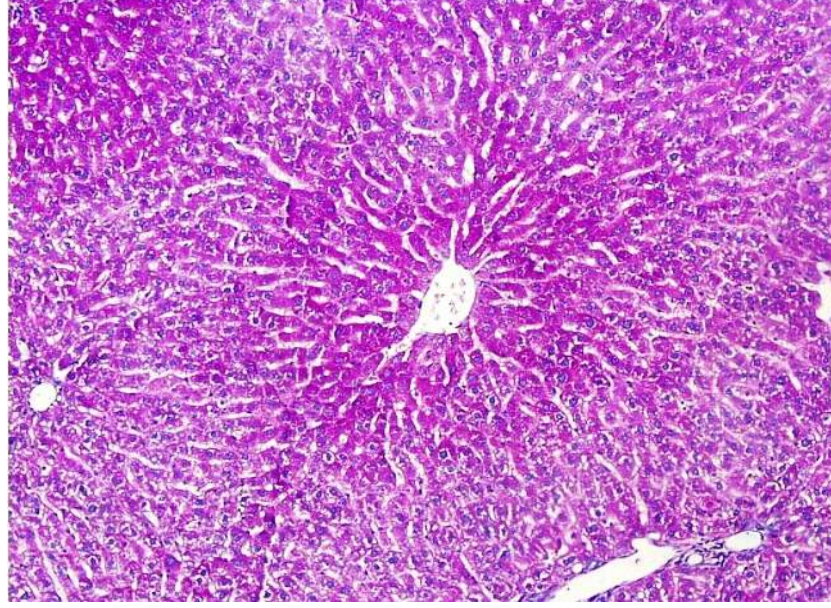
Resim 37: GAL+CAPE grubu, santral ven (oklar) ve hepatositlerin genel görünümü H-E; X10.

İnflamatuvar, nekrotik ve apoptotik hücreleri içeren lokal alanların sayısı GAL(24) ve GAL(dev) grupları ile karşılaştırıldığında GAL+CAPE grubunda (0.21 ± 0.41) istatistik olarak önemli derecede azalmıştı ($p=0.0001$). Bu grupta etkilenmiş alanlara kesitlerde seyrek olarak rastlandı (Resim 38). GAL+PTX grubu ile karşılaştırıldığında lokal alanların sayısı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.005$).



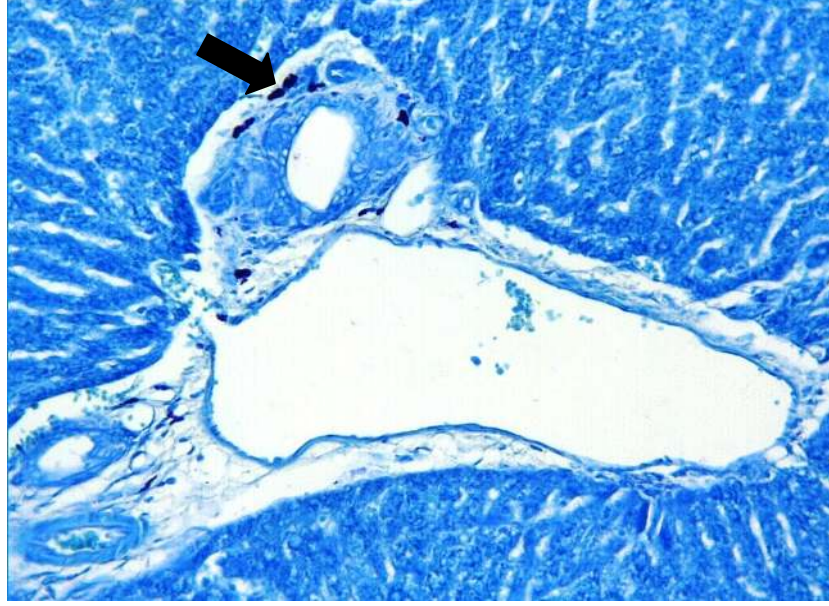
Resim 38: GAL+CAPE grubu, parankima içerisinde seyrek olarak rastlanan inflamatuvar hücreler (oklar) H-E; X20.

GAL+CAPE grubunda (0.98 ± 0.67) GAL (dev) (1.54 ± 0.50) ve GAL+PTX grupları ile karşılaştırıldığında glikojen kaybının istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi ($P=0.0001$) (Resim 39).



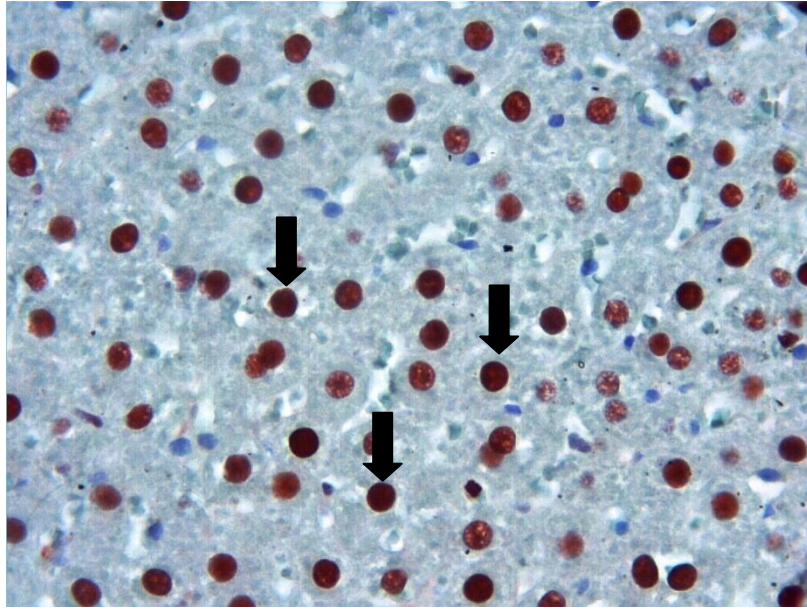
Resim 39: GAL+CAPE grubu, PAS (+) boyanan hepatositlerin görünümü PAS; X10.

Toluidin mavisi ile boyanmış karaciğer kesitlerinde portal alanlarda bulunan mast hücre sayısı 35.42 ± 20.39 olarak tespit edildi. Mast hücre sayısının GAL (dev) (108.5 ± 33.01) ve GAL+PTX grupları ile karşılaştırıldığında bu grupta istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi ($p=0.0001$) (Resim 40).



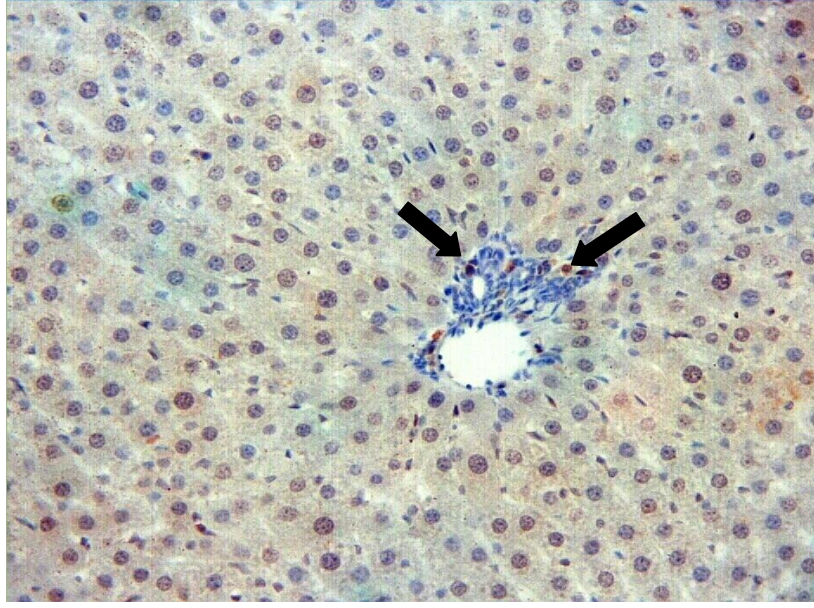
Resim 40: GAL+CAPE grubu, mast hücreleri (ok) Toluidin Mavisi; X40.

Ki 67 immün boyama yöntemi ile pozitif reaksiyon gösteren hepatosit nukleuslarının toplam sayısı 10.89 ± 6.12 olarak bulundu. Boyanma yoğunluğuna göre hafif derecede boyanan hücre sayısı 16.77 ± 4.44 , orta derecede boyanan hücre sayısı 11.37 ± 4.90 ve kuvvetli derecede boyanan ortalama hücre sayısı 4.55 ± 4.50 olarak tespit edildi. GAL(dev) grubuyla karşılaştırıldığında bu grupta hafif, orta ve kuvvetli derecede boyanan hücre sayılarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış izlendi ($p=0,0001$). GAL+PTX grubu ile karşılaştırıldığında ise boyama yoğunluğuna göre hücre sayısı bakımından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($P>0.05$) (Resim 41).



Resim 41: GAL+CAPE grubu, Ki-67(+) boyanan nükleusların görünümü (oklar). Ki-67; X40.

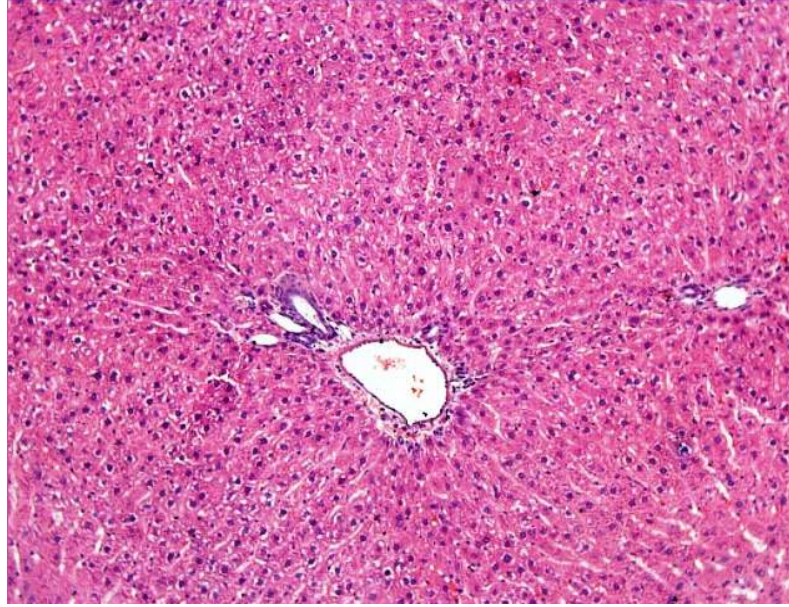
Kaspaz-3 immün boyama yöntemi ile pozitif reaksiyon gösteren hücre sayısı 1.71 ± 2.21 olarak tespit edildi. GAL (dev) grubuyla kar ıla tırıldı ında bu grupta kaspaz-3 (+) hücre sayısında istatiks l olarak anlamlı bir azalmanın olduğu görüldü (p=0,0001). GAL+PTX grubuyla kar ıla tırıldı ında ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p>0.05) (Resim 42).



Resim42: GAL+CAPE grubu, kaspaz (+) boyanan hücrelerin görünümü (oklar). Kaspaz; X20.

4.1.6.PTX ve CAPE Grupları

Hematoksilin-eozin ve Masson Trikrom boya metodu uygulanmış kesitler incelendiğinde her iki grupta da karaciğer parankimi ve portal alanlar normal histolojik yapıda izlendi (Resim 43,44).

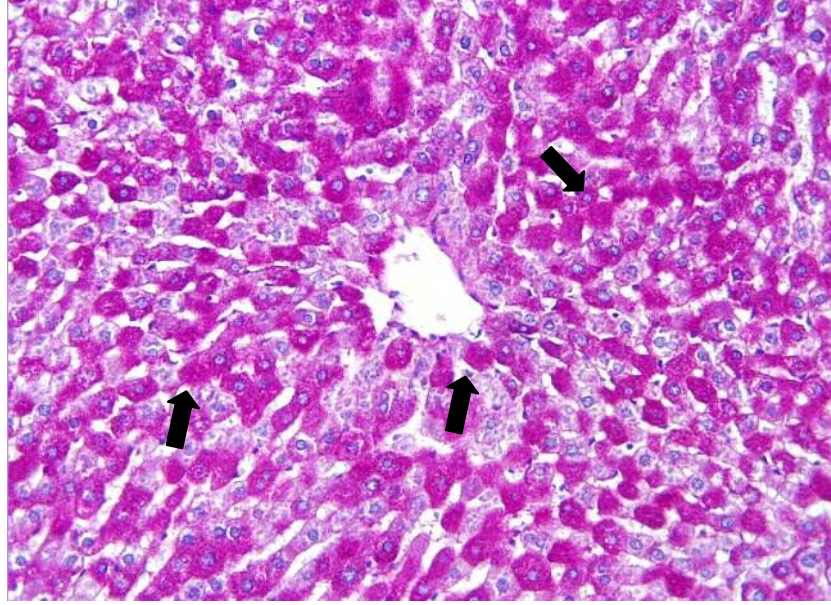


Resim 43: PTX grubu, portal alan ve hepatositlerin genel görünümü. H-E; X10.

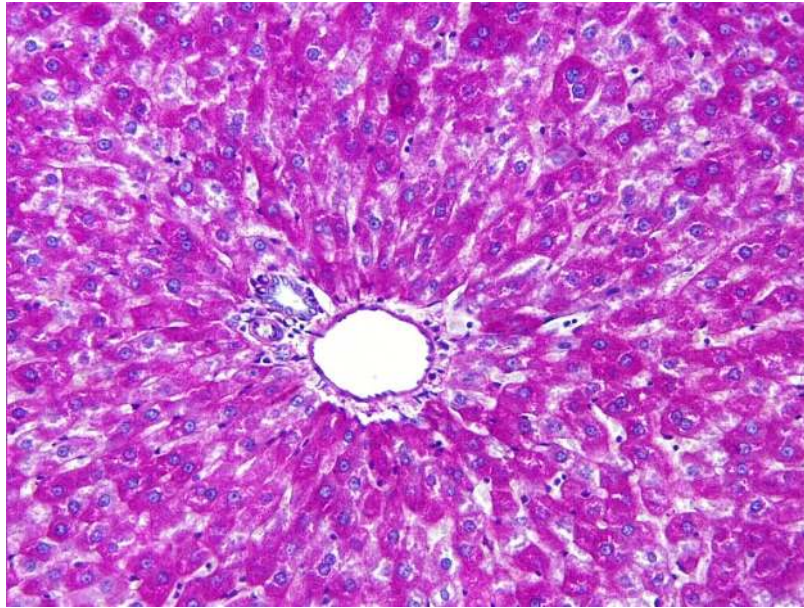


Resim 44: CAPE grubu, portal alan ve hepatositlerin görünümü PTX grubuna benzemekte. H-E; X10.

PAS boyama metodu uygulanan kesitlerde, her iki grupta da hepatosit sitoplazmasında pembe renkte boyanan glikojen granülleri yaygın olarak gözlemlendi (Resim 45,46).



Resim 45: PTX grubu, glikojen granülleri belirgin olarak izlenmekte (oklar) PAS; X20.

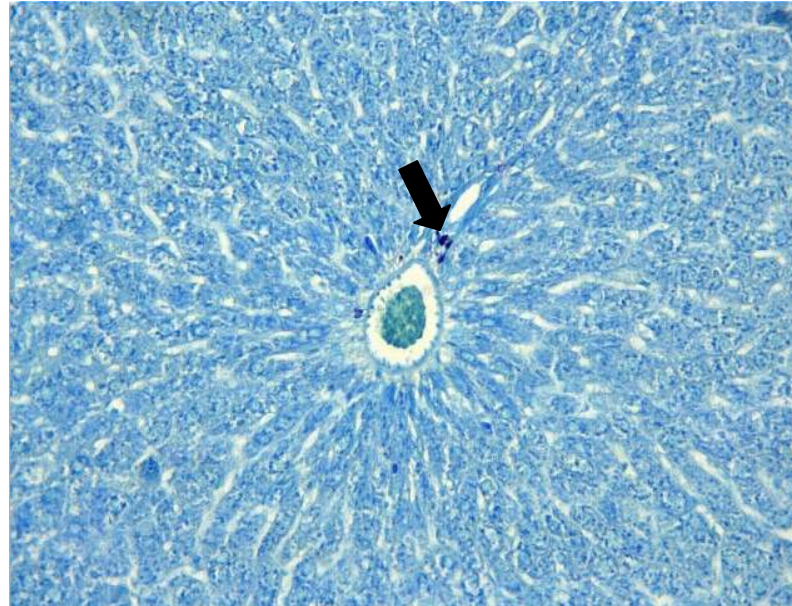


Resim 46: CAPE grubu, PAS (+) hepatositlerin görünümü. PAS;20.

Toluidin mavisi boya metodu uygulanmış kesitlerde her iki grupta da birkaç portal alan dışında menekşe renginde boyanmış mast hücrelerine rastlanmadı. PTX grubunda ortalama mast hücre sayısı 5.57 ± 4.03 iken, CAPE grubunda bu sayı 6.00 ± 5.68 olarak bulundu (Resim 47,48).

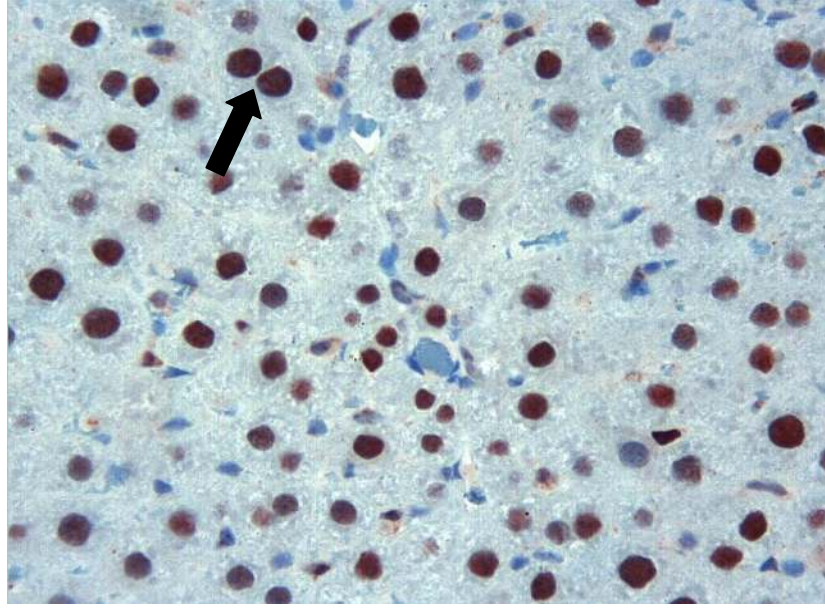


Resim 47: PTX grubu, portal alan içerisindeki bağ dokuda yer alan mast hücrelerinin görünümü (oklar) Toluidin Mavisi; X20.

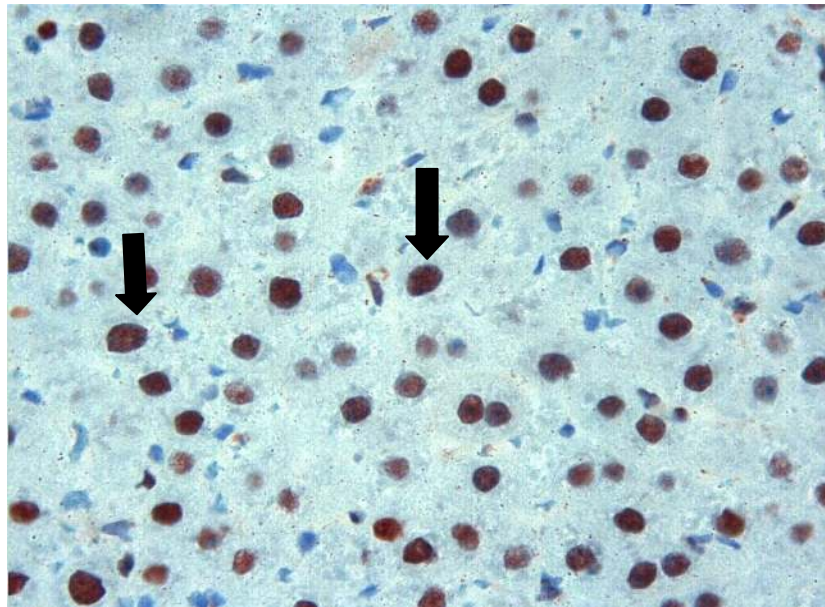


Resim 48: CAPE grubu, mast hücrelerinin görünümü (ok) Toluidin Mavisi; X20.

Ki-67 immün boyama yöntemi ile pozitif reaksiyon gösteren hepatosit nükleuslarının toplam sayısı PTX grubunda 8.11 ± 4.81 , CAPE grubunda 7.62 ± 4.95 olarak bulundu. Boyanma yoğunluğuna göre hücre sayıları kontrol grubuna benzerdi. (Resim 49, 50).



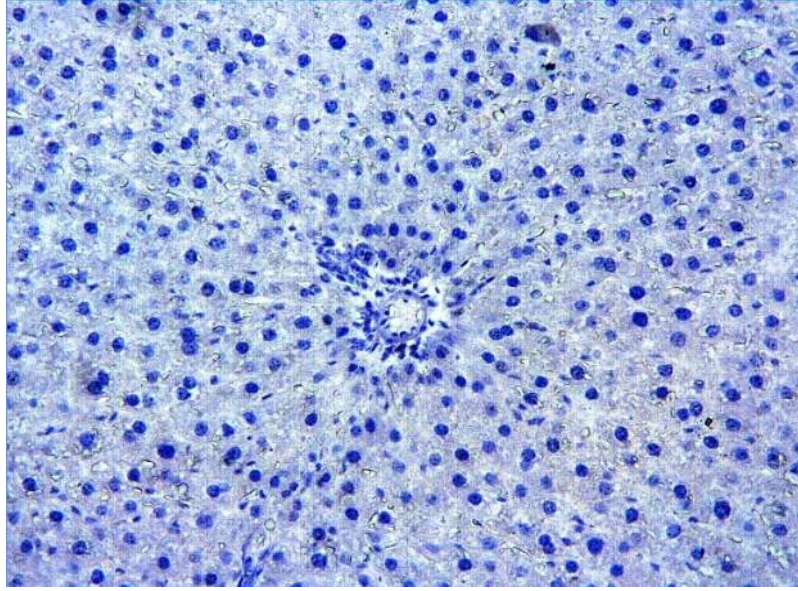
Resim 49: PTX grubu, Ki-67(+) boyanan nükleuslar. Ki-67; X40.



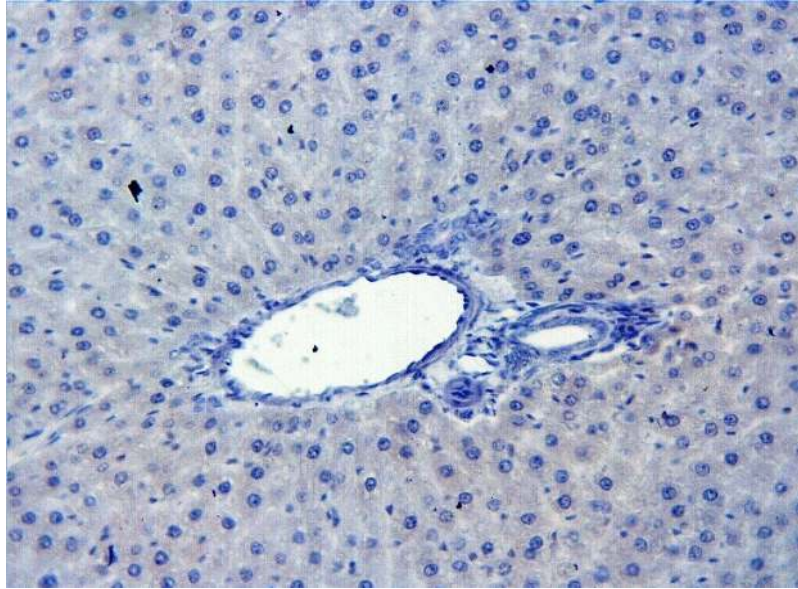
Resim 50: CAPE grubu, Ki-67 (+) boyanan nükleuların görünümü. Ki-67;

X40.

Bu gruplarda Kaspaz- 3 immun boyama yöntemi uygulanan kesitlerde pozitif reaksiyon gösteren hücrelere rastlanmadı (Resim 51,52).



Resim 51: PTX grubu, kaspaz-3 ile pozitif reaksiyon veren hücre izlenmemekte. Kaspaz-3; X20.



Resim 52: CAPE grubu, kaspaz-3 (+) hücreler izlenmemekte. Kaspaz-3; X20.

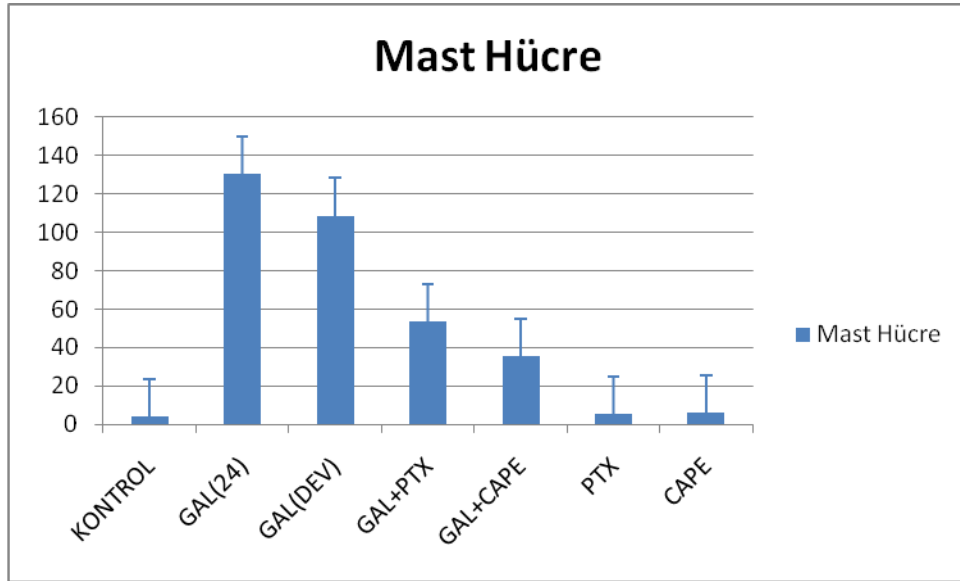
Tüm grupların lokal alan, glikojen kaybı ve mast hücre sayısı Tablo 1, Ki-67 (+) hücre sayısı Tablo 2 ve kaspaz-3 (+) hücre sayısı Tablo 3’ de verildi. Ayrıca grupların ortalama mast hücre sayıları Grafik 1’de, Ki-67 (+) hücre sayıları Grafik 2’de ve kaspaz-3 (+) hücre sayıları Grafik 3’de gösterildi.

Tablo 1: Grupların lokal alan, glikojen kaybı ve mast hücre sayıları bakımından karşılaştırılması

Gruplar	Lokal alan	Glikojen kaybı	Mast hücre
1-Kontrol	0.07±0.025	0.27±0.44	4.20±2.77
2-GAL (24 saat) grubu:	2.25±1.51	1.94±0.79	130.2±35.42
3-GAL (Devam) grubu	0.47±1.54	1.25±0.75	108.5±33.01
4-GAL+ PTX grubu	0.14±0.35	1.27±0.47	53.42±13.08
5-GAL+CAPE grubu	0.21±0.41	0.98±0.67	35.42±20.39
6-PTX grubu	0.02±0.16	0.25±0.44	5.57±4.03
7-CAPE grubu	0.04±0.20	0.18±0.39	6.00±5.68

P=0.0001

1-2,3,5	1-2,3,4,5	1-2,3,4,5
2-1,3,4,5	2-1,3,5,6	2-1,4,5
3-1,2,4,5	3-1,2,5	3-1,4,5
4-2,3	4-1,2,5,6	4-1,2,3,5
5-1,2,3	5-1,2,3,4	5-1,2,3,4



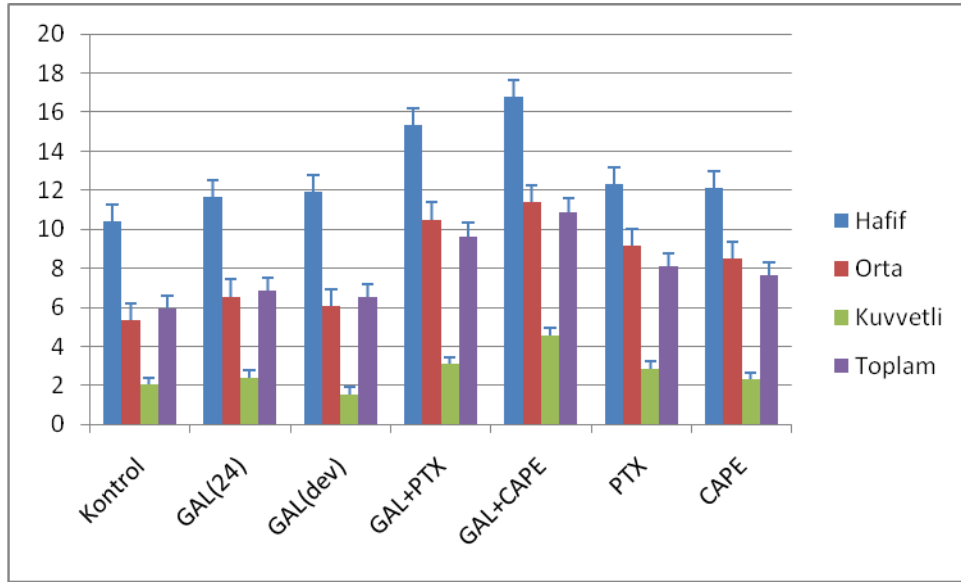
Grafik 1: Grupların mast hücre sayıları

Tablo 2: Ki-67 ile hafif, orta ve kuvvetli derecede boyanan nükleus sayılarının gruplar arası karşılaştırılması

GRUPLAR	HAFİF	ORTA	KUVVETLİ	TOPLAM
Kontrol	10,38±2,64	5,36±2,68	2.05±1,79	5,93±4.04
GAL(24) grubu:	11.63±3.44	6.56±3.93	2.41±2.61	6.86±4.61
GAL(Dev) grubu	11.95±3.87	6.05±4.84	1.53±2.22	6.51±5.22
GAL+PTX grubu	15.35±2.37	10.50±1.98	3.10±2.13	9.65±6.16
GAL+CAPE grubu	16.77±4.44	11.37±4.90	4.55±4.50	10.89±6.12
PTX grubu	12.31±2.04	9.17±1.62	2.85±2.00	8.11±4.81
CAPE grubu	12.10±2.04	8.48±2.21	2.30±2.20	7.62±4.30

P=0.0001

1-2,3,4,5	1-2,3,4,5	1-4,5,6	1-2,3,4,5
2-1,4,5	2-1,4,5	2-3,4,5	2-1,4,5
3-1,4,5	3-1,4,5	3-2,4,5	3-1,4,5
4-1,2,3	4-1,2,3	4-1,2,3	4-1,2,3
5-1,2,3	5-1,2,3	5-1,2,3	5-1,2,3



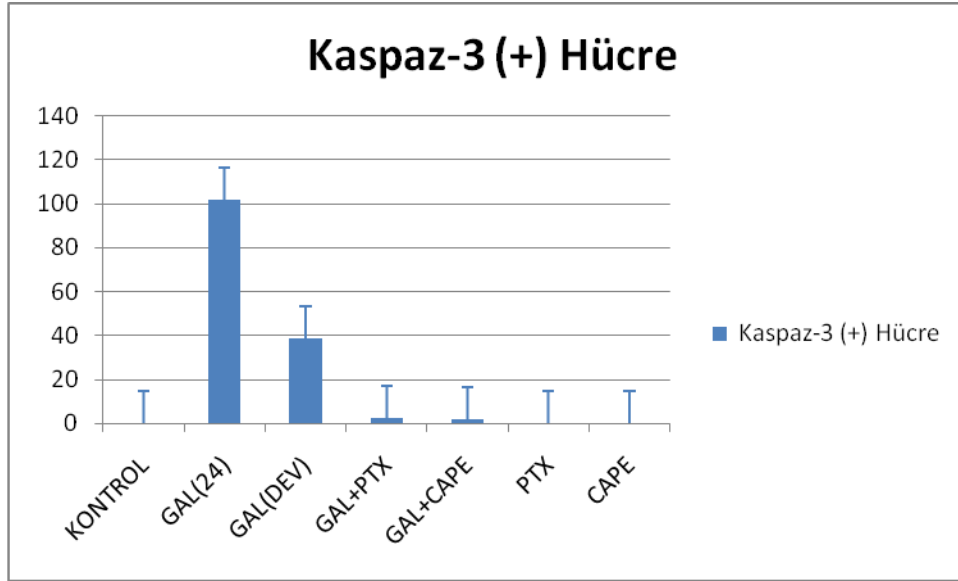
Grafik 2: Grupların Ki-67(+) hücre sayısı

Tablo 3: Kaspaz-3 (+) hücre sayılarının gruplara göre dağılımı

GRUPLAR	KASPAZ-3 (+) HÜCRE
1-Kontrol	0.00±0.00
2-GAL (24 saat) grubu	101.9±22.43
3-GAL (Devam) grubu	38.66±12.01
4-GAL+ PTX grubu	2.42±1.90
5-GAL+CAPE grubu	1.71±2.21
6-PTX grubu	0.00±0.00
7-CAPE grubu	0.00±0.00

P=0.0001

1-2,3,4
2-1,3,4,5
3-1,2,4,5
4-1,2,3
5-2,3,4



Grafik 3: Grupların kaspaz (+) hücre sayısı

4.2.Biyokimyasal Değerlendirme

4.2.1. Karaciğer fonksiyon testleri

Serum AST seviyesi kontrol grubunda $79,2 \pm 6,5$, GAL(24) grubunda $1854,7 \pm 76$, GAL(dev) grubunda $102,66 \pm 19$, GAL+PTX grubunda $82,6 \pm 12,3$ ve GAL+CAPE grubunda $80,6 \pm 9,11$ olarak ölçüldü (Tablo 4). GAL(24) ve GAL(dev) grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu gruplarda serum AST seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı tespit edildi ($p=0.0001$). Ayrıca GAL (24) ile GAL (dev) grupları arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0.0001$). Buna karşılık, GAL+PTX ve GAL+CAPE grupları ile GAL (dev) grubu karşılaştırıldığında serum AST seviyesinin tedavi gruplarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalma gözlemlendi. Diğer yandan GAL+PTX ve GAL+CAPE grupları ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak bulunmadı ($p>0.05$).

Serum ALT seviyesi kontrol grubunda $48,4 \pm 8,5$, GAL(24) grubunda $1936,6 \pm 83$, ve GAL (dev) grubunda $54,3 \pm 6,71$ olarak ölçüldü (Tablo 4). GAL(24) ve GAL(dev) grupları ile kontrol grubu karşılaştırıldığında bu gruplarda serum ALT seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı tespit edildi. GAL+PTX ($43,5 \pm 6,1$) ve GAL+CAPE ($39,1 \pm 6,5$) grupları GAL(dev) grubu ile karşılaştırıldığında ise serum ALT seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı gözlemlendi ($p=0.0001$).

Tablo 4: Grupların serum AST ve ALT seviyelerinin karşılaştırılması

GRUPLAR	AST (U/L)	ALT(U/L)
1-KONTROL	79,2±6.5	48,4±8,5
2-GAL (24)	1854,7±76	1936,6±83
3-GAL(dev)	102.66±19	54.3±6.71
4-GAL+PTX	82,6±12,3	43,5±6,1
5-GAL+CAPE	80,6±9,11	39,1±6,5
6-PTX	83,2±7,3	46,4±9,7
7-CAPE	81,3±32,3	48,6±19,5

P=0.0001

1-2,3	1-2,3,5
2-1,3,4,5	2-1,3,4,5
3-1,2,4,5	3-1,2,4,5
4-2,3	4-2,3
5-2,3	5-1,2,3

4.2.2.Karaciğer dokusunda MDA düzeyleri

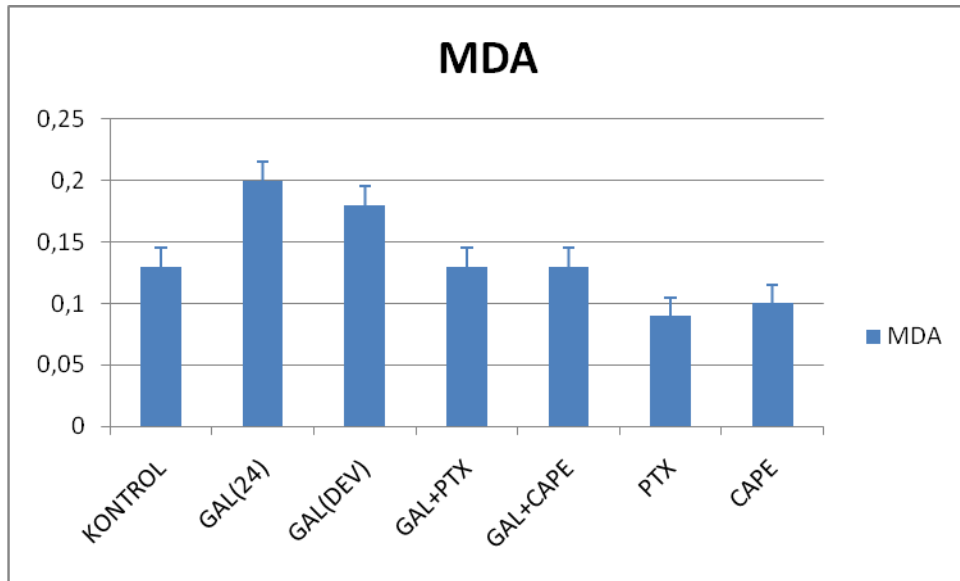
MDA seviyesi kontrol grubunda $0,13 \pm 0,02$, GAL(24) grubunda $0,20 \pm 0,04$, GAL(dev) grubunda $0,18 \pm 0,05$, GAL+PTX grubunda $0,13 \pm 0,03$ ve GAL+CAPE grubunda $0,13 \pm 0,01$ olarak tespit edildi. GAL(24) ve GAL(dev) grupları ile kontrol grubu karşılaştırıldığında bu gruplarda MDA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışın olduğu gözlemlendi ($p=0.0001$). GAL+PTX ve GAL+CAPE grupları ile GAL(dev) grubu karşılaştırıldığında ise bu gruplarda MDA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş olduğu tespit edildi ($p=0.0001$). Diğer yandan GAL+PTX ve GAL+CAPE grupları ile kontrol grubu arasındaki fark anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Gruplara ait ortalama doku MDA seviyeleri ve istatistiksel p değerleri Tablo 5 ve Grafik 4’ de verildi.

Tablo 5: Gruplara ait ortalama MDA değerleri

GRUPLAR	MDA (mg/g protein)
1-KONTROL	0,13±0,02
2-GAL (24)	0,20±0,04
3-GAL(dev)	0.18±0.05
4-GAL+PTX	0,13±0,03
5-GAL+CAPE	0,13±0,01
6-PTX	0,09±0,03
7-CAPE	0,10±0,02

P=0.0002

	1-2,3
	2-1,4,5,6,7
	3-1,4,5,6,7
	4-2,3
	5-2,3

**Grafik 4: Grupların MDA seviyesi**

4.2.3.Karaciğer dokusunda glutatyon düzeyleri

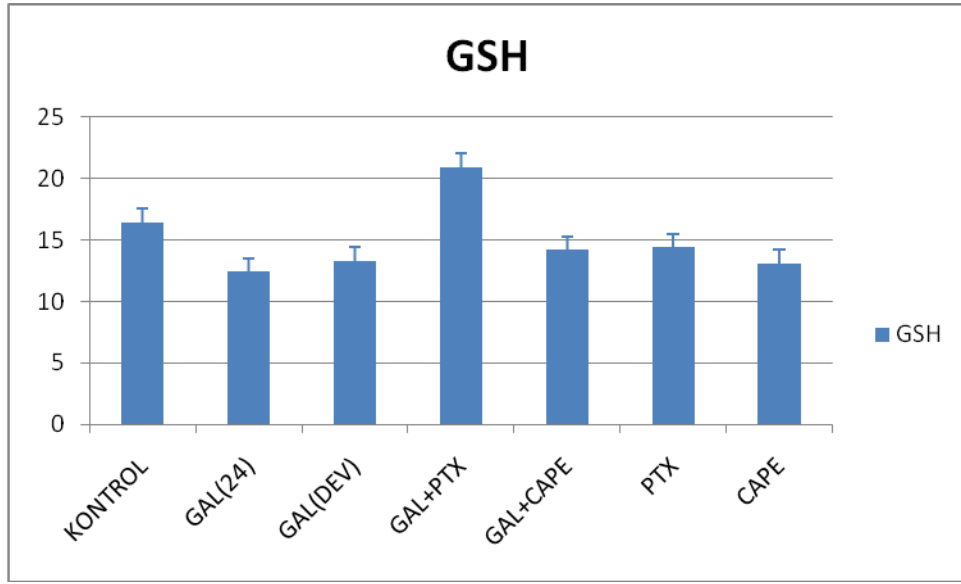
Glutatyon seviyesi kontrol grubunda 16.44 ± 2.85 , GAL(24) grubunda 12.40 ± 2.73 , GAL(dev) grubunda 13.28 ± 2.99 , GAL+PTX grubunda 20.89 ± 2.49 ve GAL+CAPE grubunda 14.17 ± 2.08 olarak tespit edildi. GAL(24) ve GAL(dev) grupları ile kontrol grubu karşılaştırıldığında bu gruplarda glutatyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalmanın olduğu gözlemlendi ($p=0.0001$). GAL+PTX ve GAL+CAPE grupları ile GAL(dev) grubu karşılaştırıldığında ise bu gruplarda glutatyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışın olduğu tespit edildi ($p=0.0001$). Diğer yandan GAL+PTX ve GAL+CAPE grupları ile kontrol grubu arasındaki fark anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Gruplara ait ortalama doku GSH seviyeleri ve istatistiksel p değerleri Tablo 6 ve Grafik 5’ de verildi.

Tablo 6: Grupların GSH seviyeleri

GRUPLAR	GSH (mmol/mg protein)
1-KONTROL	16.44 ± 2.85
2-GAL (24)	12.40 ± 2.73
3-GAL (dev)	13.28 ± 2.99
4-GAL+PTX	20.89 ± 2.49
5-GAL+CAPE	14.17 ± 2.08
6-PTX	14.40 ± 3.83
7-CAPE	13.07 ± 1.43

P=0.0003

1-2,3,4
2-1,4
3-1,4
4-1,2,3,5
5-1,2



Grafik 5: Grupların GSH seviyesi

4.2.4.Karaciğer dokusunda MPO düzeyleri

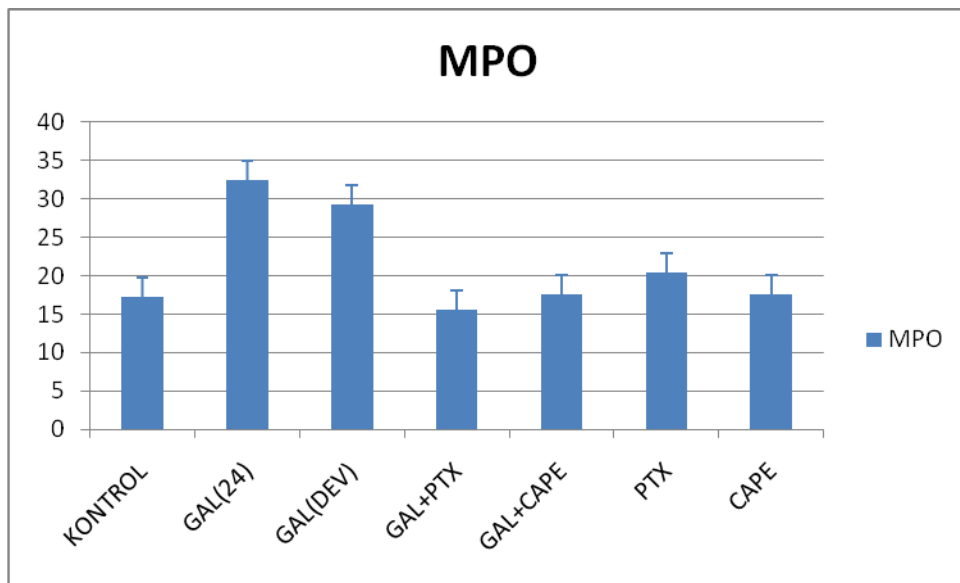
MPO seviyesi kontrol grubunda $17,17 \pm 2,36$, GAL(24) grubunda $32,43 \pm 6,46$, GAL(dev) grubunda $29,30 \pm 7,6$, GAL+Pentox grubunda $15,61 \pm 2,68$ ve GAL+CAPE grubunda $17,58 \pm 2,95$ olarak ölçüldü. GAL(24) ve GAL(dev) grupları ile kontrol grubu karşılaştırıldığında bu gruplarda MPO seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışın olduğu gözlemlendi ($p=0.0001$). GAL+PTX ve GAL+CAPE grupları ile GAL(dev) grubu karşılaştırıldığında ise bu gruplarda MPO seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalmanın olduğu tespit edildi ($p=0.0001$). Diğer yandan GAL+PTX ve GAL+CAPE grupları ile kontrol grubu arasındaki fark anlamlı bulunmadı. Gruplara ait ortalama doku MDA seviyeleri ve istatistiksel p değerleri Tablo 7 ve Grafik 6' da verildi.

Tablo 7: Grupların MPO seviyelerinin karşılaştırılması

GRUPLAR	MPO (ng/mg protein)
1-KONTROL	17,17±2,36
2-GAL (24)	32,43±6,46
3-GAL (dev)	29,30±7,6
4-GAL+PTX	15,61±2,68
5-GAL+CAPE	17,58±2,95
6-PTX	20,42±4,24
7-CAPE	17,52±2,06

P=0.0001

1-2,3
2-1,4,5
3-1,4,5
4-2,3
5-2,3

**Grafik 6: Grupların MPO seviyesi**

4.2.5.Karaciğer dokusunda antioksidan enzim düzeyleri

SOD aktivitesi kontrol grubunda $8,45 \pm 3,2$, GAL(24) grubunda $8,48 \pm 1,1$, GAL(dev) grubunda $7,28 \pm 1,8$, GAL+PTX grubunda $9,32 \pm 0,99$ ve GAL+CAPE grubunda $8,54 \pm 1,9$ olarak tespit edildi. SOD aktivitesi açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0,05$).

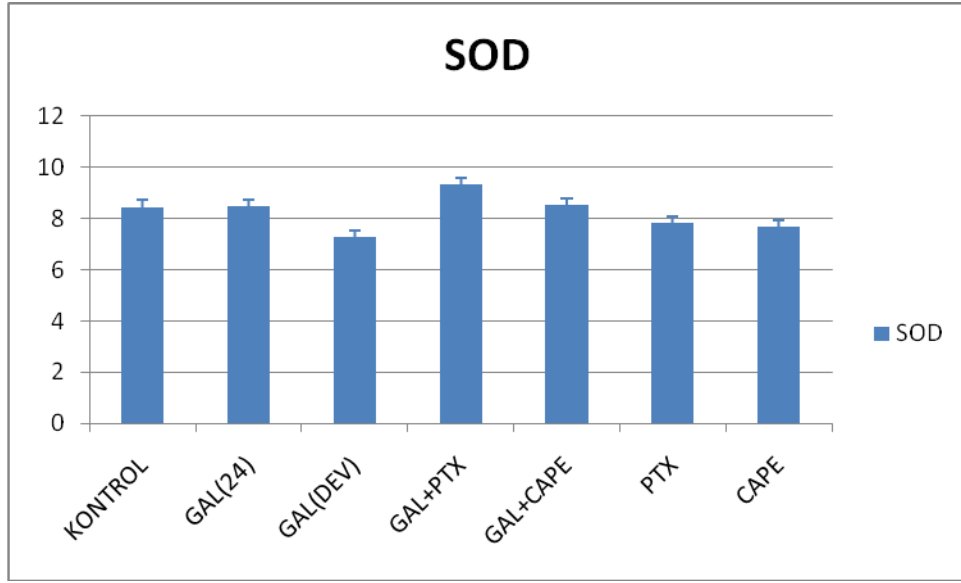
GPx seviyesi kontrol grubunda $28,19 \pm 8,80$, GAL(24) grubunda $26,44 \pm 4,97$, GAL(dev) grubunda $22,36 \pm 5,77$, GAL+Pentox grubunda $34,64 \pm 3,65$ ve GAL+CAPE grubunda $31,43 \pm 6,69$ olarak tespit edildi. GAL(dev) grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında bu grupta GPx seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalmanın olduğu gözlemlendi ($p = 0,0001$). GAL+PTX ve GAL+CAPE grupları ile GAL(dev) grubu karşılaştırıldığında ise bu gruplarda GPx seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışın olduğu tespit edildi ($p = 0,0001$). Gruplara ait ortalama SOD ve GPx seviyeleri ve istatistiksel p değerleri Tablo 8’de verildi. Ayrıca grupların ortalama SOD seviyeleri Grafik 7’de, GPx değerleri Grafik 8’de gösterildi.

Tablo 8: Grupların SOD ve GPx aktivitelerinin karşılaştırılması

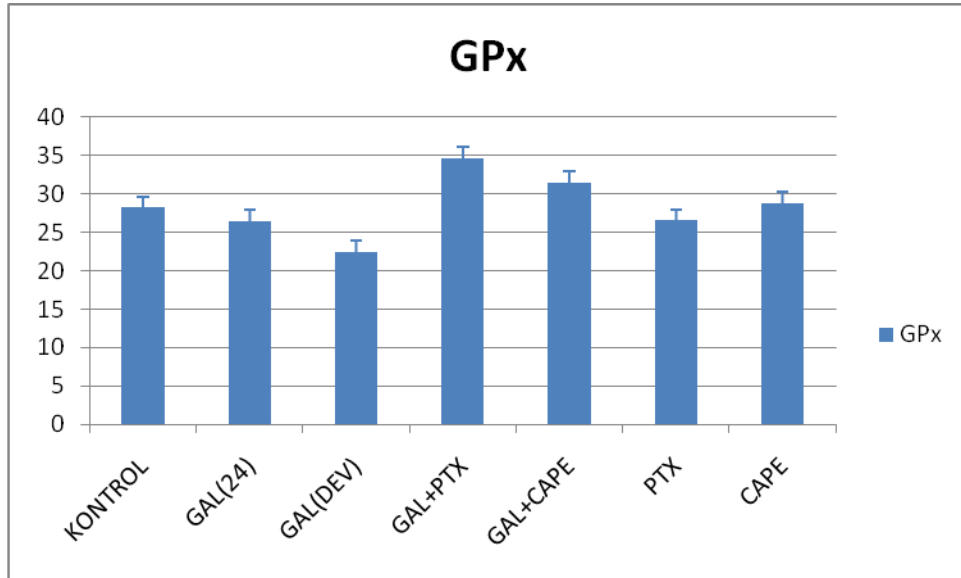
GRUPLAR	SOD(U/g protein)	GPx (U/g protein)
1-KONTROL	$8,45 \pm 3,2$	$28,19 \pm 8,87$
2-GAL (24)	$8,48 \pm 1,1$	$26,44 \pm 4,97$
3-GAL (dev)	$7,28 \pm 1,8$	$22,36 \pm 5,77$
4-GAL+PTX	$9,32 \pm 0,99$	$34,64 \pm 3,65$
5-GAL+CAPE	$8,54 \pm 1,9$	$31,43 \pm 6,69$
6-PTX	$7,83 \pm 1,9$	$26,52 \pm 3,51$
7-CAPE	$7,68 \pm 1,4$	$28,79 \pm 6,10$

P=0.0001

	1-3,4,5
	2-3,4,5
	3-1,2,4,5
	4-1,2,3
	5-1,2,3



Grafik 7: Grupların SOD seviyesi



Grafik 8: Grupların GPx seviyesi

5.TARTIŞMA

Dünyada ve ülkemizde görülen en yaygın infeksiyonlardan biri akut viral hepatitdir. Uzun süre iş ve güç kaybına neden olması ve bazen de ölümle sonlanması nedeniyle hepatit halen en önemli sağlık sorunlarından biri olarak görülmektedir. Bu çalışma D-Galaktozamin ile oluşturulan deneysel akut hepatit modelinde, pentoxifylline ve caffeic acid phenethyl ester'in tedavi edici etkilerinin araştırılması için planlandı.

Akut hepatit; viruslar, toksik ajanlar, ilaçlar, çeşitli metabolik ve otoimmün hastalıklar gibi nedenlere bağlı olarak meydana gelmektedir (1, 117). İnsanlardaki viral hepatitin morfolojik ve patofizyolojik özelliklerine benzeyen çeşitli hayvan modelleri geliştirilmektedir. Bu modelleri oluşturmak için en yaygın kullanılan ajan D-Galaktozamindir (118, 119, 120, 121, 122). Sıçanlara GAL verilmesi hepatosit ölümü ve nekroza yol açarak, karaciğerde parankimal akut hasara neden olmaktadır (123). Galaktozaminin yaptığı karaciğer nekrozu ile ilgili birbirini takip eden belli fizyopatolojik aşamalar olduğu düşünülmektedir (124). Birinci basamak GAL'ın hepatositler tarafından metabolize edilmesi sonucu, hücre içinde UDP-GAL (Uridin difosfat-GAL) birikimi ile başlar. UDP-GAL'ın artışı üridin nükleotidlerde ve UDP-heksozlarda azalmayla sonuçlanır. İkinci basamakta bu metabolik anormallikler hepatositlerin plazma membranında değişikliklere neden olarak hücre içine kalsiyum girişini artırır. Artmış kalsiyum içeriği, hücre ölümüyle sonuçlanan mekanizmalara aracılık eder (125). 'Kalsiyum hipotezi' olarak da bilinen intraselüler kalsiyum konsantrasyonundaki bu bozukluk, GAL'in yol açtığı hücre ölümünün en önemli nedenlerinden biri olarak gösterilmektedir (126). Deneysel çalışmalarda, hepatit oluşturmak için Galaktozamin 300-1000 mg/kg doz aralığında intraperitoneal olarak ve tek enjeksiyon şeklinde uygulanmaktadır (127, 128, 129). Birçok araştırmacı yaptıkları çalışmada akut karaciğer hasarı oluşturmak için GAL 500 mg/kg dozunda kullanmışlardır (127, 130, 131). Biz de çalışmamızda literatürle uyumlu olarak sıçanlara Galaktozamini 500 mg/kg tek doz şeklinde uyguladık.

Sıçanlara GAL verilmesinin ardından karaciğerde hepatosellüler hasar geliştiği birçok yazar tarafından gösterilmiştir (125, 128, 132, 133, 134). Biz de çalışmamızda; GAL uygulamasının ardından karaciğer parankimi içerisinde normal histolojik yapıdan farklı olarak izlenen inflamatuvar, nekrotik ve apoptotik hücreleri içeren fokal alanlar tespit ettik. Hirohisa Takano, Ashraf Taye ve ark. GAL ile

yaptıkları çalışmalarda, karaciğerde histolojik olarak konjesyon, hücre infiltrasyonu ve nekroz alanları gözlediklerini bildirmişlerdir (135, 136).

Çalışmamızda, hepatosit sitoplazmasındaki glikojen içeriği PAS boyama metodu ile değerlendirildi. Bu yöntemle GAL uygulanan gruplarda lobulun periferinde belirgin derecede glikojen kaybı izlendi. Hepatositlerin ana enerji kaynağı olan glikojen aynı zamanda karaciğer hasarını gösteren önemli bir parametredir. Hücre içerisinde glikojen depolarının azalmasında, enerji metabolizmasında oluşan bozulma sonucu hücrenin glikoza bağımlı hale gelmesinin rolü olduğu düşünülmektedir (137). Mangeney ve ark. GAL'nin hepatositlerde enerji metabolizmasını inhibe ettiğini bildirmişlerdir (138). Ayrıca sıçanlara GAL verilmesi ile karaciğerde artan TNF alfa gibi bazı sitokinlerin insülin direnci oluşturarak glikojen sentazı inhibe ettiği ve glukoz alımını engellediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (139, 140).

Çalışmamızda sağlam hepatositlerden belirgin bir halo ile ayrılan çok sayıda nükleus içeren PAS (+) dev yapılar izledik. Tseng ve ark. Sprague Dawley sıçanlara iv enjeksiyonla nanoseria verilmesinin ardından, etrafı mononükleer hücrelerle çevrili aktif Kupffer hücrelerinden oluşan, granulatöz lezyonlara rastladıklarını bildirmişlerdir. Bu inflamatuvar ve granulatöz oluşumların sinuzoidal kaynaklı olduğu düşünülmektedir (141). Kaufmann ve Ohtoma ve ark. fagosit edilen yabancı materyallerin, bu granulatöz yapılarda hapsedip sınırlayarak, sağlam dokunun inflamasyon ve hasardan korunduğunu rapor etmişlerdir (142, 143).

Çalışmamızda gözlemlediğimiz diğer bir bulgu, GAL verilmesiyle izlenen mast hücre sayısındaki değişikliklerdi. GAL uygulanan gruplarda, portal alanlardaki mast hücre sayısının belirgin olarak arttığını tespit ettik. Kemik iliğinden köken alan mast hücreleri, allerjik ve immunolojik reaksiyonların yanı sıra inflamatuvar reaksiyonlarda da rol oynayan hücrelerdir. Mast hücreleri inflamatuvar reaksiyonlar sırasında nörotransmitterler ve sitokinler aracılığıyla aktive olarak granül içeriklerini ekstrasellüler alana verirler (144). Liehr H ve ark. GAL'in mast hücrelerini direkt olarak aktive ederek histamin salınmasına yol açtığını bildirmiştir (145). Histamin aynı zamanda gastrointestinal sistem permeabilitesini arttırarak kana bakteriyel ürünlerin geçmesine neden olur (146). Kana geçen bakteriyel ürünler Kupffer hücrelerinden TNF alfa salınmasına yol açar. TNF alfa seviyesinin GAL uygulamasından sonra yükseldiği bir çok çalışmada rapor edilmiştir (134, 147, 148, 149). GAL'in TNF alfa ile ilgili hücre ölümüne neden olan sinyalleri aktiveleştirip ve böylece hepatositlerin duyarlılığını arttırarak mRNA ve protein sentezini inhibe ettiği bildirilmiştir. Bu süreç inflamatuvar

hücrelerin karaciğer parankimasına girerek nekrotik alanlar oluşturmalarıyla sonuçlanır (132). Biz de çalışmamızda karaciğer parankimasında gözlemlediğimiz nekrotik alanların mast hücreleriyle ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz.

İn vitro ve in vivo çalışmalar GAL'in hepatositlerde apoptozise neden olduğunu göstermiştir (127, 150, 151, 152, 153). GAL'in hepatositlerde intrasellüler üridin nükleotidlerinin miktarını azaltarak, hücre için hayati öneme sahip olan proteinlerin sentezini inhibe ettiği ve bu şekilde hücreyi apoptozise götürdüğü rapor edilmiştir (127). Diğer yandan Sun F ve ark. GAL uygulanan sıçanların karaciğerinde, ROR üretiminin artması sonucu Kupffer hücrelerinin belirgin derecede aktive olduğunu bildirmişlerdir (129). Aktive olan Kupffer hücreleri, hücre ölümüne yol açan TNF alfa gibi sitokinleri salgılar. Hücre dışından apoptozisi etkileyen en önemli faktörlerden biri olan TNF alfa, hücre içinde prokaspas 8'i aktifleştirir. Aktifleşen kaspaz 8; kaspaz 3, kaspaz 6 ve kaspaz 7'yi etkileyerek zincir bir reaksiyon oluşturur. Böylece kaspazlar hücredeki tüm makromolekülleri parçalayarak apoptozise yol açarlar (154). Aynı zamanda kaspaz 8 mitokondriden sitokrom c ve kalsiyumun serbestleşmesine yol açar. Böylece apoptotik sürecin mitokondriyal yolunu da aktifleştirir. Yapılan deneysel bir çalışmada GAL enjeksiyonundan 18 saat sonra karaciğerde apoptotik hücrelerin ortaya çıktığı gösterilmiştir (129). Muntane (83), Stachlewitz (132) ve ark. GAL uygulamasının karaciğerde apoptotik hücrelerin oluşmasına neden olduğunu, Çatal ve ark da GAL uygulaması ile kaspaz-3 ile boyanan hücre sayısının istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığını bildirmişlerdir (155). Biz de çalışmamızda GAL verilen grupta H&E boyama metoduyla karaciğerde portal alan ve parankima içerisinde çok sayıda apoptotik hücrelere rastladık. Ayrıca karaciğer dokusundaki apoptotik hücreleri kaspaz-3 immunboyama yöntemi ile de doğruladık. Bu yöntem ile kaspaz-3 (+) hücre sayısının GAL (24) ve GAL(dev) grubunda kontrol ve diğer gruplara göre anlamlı şekilde arttığını tespit ettik. Karaciğerde kaspaz-3 ile boyanan hücre sayısındaki artış, GAL'nin kaspaz aktivasyonu yolu ile apoptozise neden olduğunu düşündürmektedir.

Bu çalışmada karaciğerde mitotik sürece giren hepatositleri belirlemek için Ki-67 immunboyama yöntemi kullanıldı. Ki-67 antikoru siklusun G1, S, G2 ve M fazlarındaki hücrelerin çekirdeğinde yer alan bir antijen olan Ki-67 epitopu ile reaksiyona girer (156, 157). G0 evresi, hücrenin stabil ve DNA/RNA sentezinin olmadığı evredir. DNA sentezi, G1 evresiyle birlikte başlar, S ve M evresine kadar sürer (158, 159). İlk kez 1983'de Gerdes ve ark. tarafından hücre çekirdeğinde bulunan Ki-67 antijeni ve buna karşı oluşan monoklonal antikor tanımlanmıştır (158). Hücre

siklusu ilerledikçe antijen içeriği artar. G2-M evresinde maksimal seviyeye erişir. Hepatik rejenerasyon başka yöntemlerle de araştırılmıştır. Örneğin Kawakita ve ark. akut ve kronik hepatitdeki rejeneratif aktiviteyi PCNA kullanarak belirlemişlerdir (160). Botelli ve ark benzer çalışmayı BrdU kullanarak yapmışlardır (161). Ancak her iki yönteminde dezavantajları olduğunu düşünmekteyiz. Örneğin PCNA hem proliferen olan hücrelerde hem de proliferen olmayan hücrelerde boyanmaktadır. Bravo ve ark PCNA'nın diffüz ve granüler olmak üzere iki boyanma paterni olduğunu bildirmişlerdir. Granüler boyanmanın proliferasyonla ilgili olduğunu ancak diffüz boyanmanın proliferasyonu göstermediğini rapor etmişlerdir (162). Bu nedenle PCNA immunreaktivitesini değerlendirmek bizim kullandığımız yöntemle göre daha zor görünmektedir. Aynı şekilde BrdU boyama yöntemi zaman alıcı ve teknik olarak kompleks bir yöntemdir. Kaita ve ark. karaciğer hastalıklarında hepatositlerdeki mitotik aktiviteyi belirlemede en uygun yolun Ki-67 immunboyama yöntemi olduğunu bildirmişlerdir (163). Bu yöntem, hücre proliferasyonunu gösteren diğer yöntemlerden, sadece S evresini değil, mitotik siklusun tüm evrelerini sınıflandırılabilmesi açısından farklıdır (164, 165, 166). Biz de karaciğerdeki hepatosit nükleer proliferasyonun gösterilmesinde Ki-67 boyama yönteminin kullanılmasının daha kolay ve etkili olduğunu düşünmekteyiz. Ayman EL-Meghawry ve ark monosodyum verilen sıçanlarda Ki-67 (+) ile boyanan hepatosit sayısının kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığını rapor etmişlerdir (167). Kaita ve ark karaciğer hastalıklarında Ki-67 boyanan hücre sayılarını karşılaştırmıştır. Buna göre inaktif siroz, hafif inflamasyonlu hepatit ve sağlam karaciğer dokusunda Ki-67 ile boyanan hücre sayısının kronik hepatit ve hepatocelüler karsinomaya göre daha az olduğunu tespit etmişlerdir (163). Bizim çalışmamızda da hepatosit proliferasyonunu belirlemek için Ki-67 kullanıldı. Bu boyama yöntemi ile sadece GAL uygulanan gruplarda Ki-67 (+) hücre sayısının kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığını tespit ettik.

Çalışmamızda biyokimyasal olarak karaciğer hasarını belirlemek için serum AST, ALT enzim seviyeleri kullanıldı. AST ve ALT karaciğer hasarını ve karaciğer hücre nekrozunu belirlemede en sık kullanılan enzimlerdir (168, 169). Bu enzimler normal olarak sitoplazmada bulunmasına rağmen, hücre hasarı sonrası kana verilirler (170). Uzun süreli ve yüksek dozlarda GAL uygulanması karaciğer hasarını şiddetlendirir ve AST, ALT gibi hücre içi maddelerin serbest kan dolaşımına geçmesine yol açar (125, 171, 172) GAL ile oluşturulan karaciğer hasarında serum AST, ALT seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı bildirilmiştir (173).

Çalışmalarda GAL'nin i.p olarak verilmesinin ardından ALT'de belirgin artmanın 18. saatte başladığı ve 24. saatte en yüksek seviyeye ulaştığını tespit etmişlerdir (129). Biz de çalışmamızda literatürle uyumlu olarak en yüksek AST, ALT seviyesini GAL uygulandıktan 24 saat sonra sakrifiye edilen sıçanlarda tespit ettik.

Çalışmamızda lipid peroksidasyonunu MDA, inflamasyon şiddetini MPO, antioksidan sistemi SOD, GPx (enzimatik) ve GSH (nonenzimatik) aktiviteleri ile değerlendirdik.

GAL ile yapılan daha önceki çalışmalarda lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (174, 175, 176). Serbest oksijen radikalleri hücre membranlarındaki yağ asitlerinin metilen gruplarından bir H atomunun koparılması ile başlayan oksidasyon reaksiyonlarını başlatır. Daha sonra bu gruplara moleküler oksijenin bağlanmasıyla lipid peroksidleri meydana gelir. Lipid peroksidasyonunun erken basamağında oluşan lipid peroksidlerinin yıkımı ile malondialdehit gibi biyoaktif aldehitler oluşur. Bu nedenle malondialdehit, lipid peroksidasyonunun ve dolayısıyla oksidatif stresin en önemli göstergelerinden biri olarak kabul edilmektedir. Tao Wen ve Ashraf Taye ve ark. yaptıkları D-galaktozaminle indüklenmiş hepatotoksite çalışmasında, GAL verilen grubun serum MDA seviyesinin kontrol ve diğer gruplara göre anlamlı şekilde arttığını rapor etmişler (134, 136). Biz de çalışmamızda GAL uygulanan gruplarda MDA seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığını tespit ettik. Yoshikawa T, Shiratori Y ve ark. lipid peroksidasyonu yoluyla hücre membran bütünlüğü ve geçirgenliğinin bozulmasının, GAL'in hepatositler üzerinde yaptığı en önemli hasar olduğunu bildirmişlerdir (175, 177). Bu bulgular GAL'ne bağlı hepatitin patogenezinde lipid peroksidasyon ürünlerindeki artışında etkili olduğu görüşünü desteklemektedir.

Çalışmamızda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında GAL(24) ve GAL(dev) gruplarında MPO düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı tespit edildi. Bizim bulgulara benzer şekilde, Koji ito ve ark. da GAL verilen sıçanlarda, karaciğerde MPO aktivitesinin belirgin şekilde yükseldiğini bildirmişlerdir (178). GAL'in verilmesiyle oluşan reaktif hidroksil radikalleri hem dokuya zarar vermekte hem de lökositlerin hasarlı dokuda toplanmasını sağlamaktadırlar. Diğer yandan dokuya gelen lökositler myeloperoksidaz ve NADPH oksidaz yoluyla serbest radikal üretimini daha da artırır. Nitekim Myeloperoksidazın hidrojen peroksit (H₂O₂) varlığında klorür, iyodür ve bromürün oksidasyonunu katalizleyerek güçlü oksidan bileşikler oluşturduğu bilinmektedir (179). Bu çalışmada gözlemlediğimiz MPO aktivitesindeki yükselme

GAL'in karaciğer dokusunda oluşturduğu inflamasyonun şiddetini belirgin olarak göstermektedir.

Çalışmamızda biyokimyasal analizler sonucunda; GAL(24) grubunda, GPx ve SOD enzim aktivitesi değişmezken, GSH seviyesinde kontrollere göre istatistik olarak anlamlı derecede bir düşüş tespit edildi. Diğer yandan GAL verilip deneyin sonuna kadar devam eden grupta GPx enzim aktivitesi ve GSH seviyesini azalırken, SOD enzim aktivitesi değişmedi.

Hücrede ROR'un kontrolü non-enzimatik (GSH) ve enzimatik (SOD, GPx) antioksidanlardan oluşan antioksidan savunma sistemi tarafından düzenlenmektedir (180). Glutasyon peroksidaz, hidrojen peroksit ve hidroperoksitlerin indirgenmesini sağlayan önemli bir antioksidan enzimdir. GPx aktivitesindeki azalma hidrojen peroksit birikmesine ve hücre hasarına yol açmaktadır. Ayrıca bu enzimin hepatik nekrozda koruyucu bir role sahip olduğu bildirilmiştir (181). Vilwanathan ve ark Galaktozamin ile oluşturdukları deneysel hepatit modelinde karaciğer GPx aktivitesinin anlamlı derecede azaldığını rapor etmişlerdir (182). Ancak biz bu çalışmada GAL(dev) grubunda GPx seviyesinde önemli bir azalma gözlerken, GAL verilmesinden 24 saat sonra herhangi bir değişiklik izlemedik. Bu bulgu bize GAL verilmesinin ardından belli bir süre geçtikten sonra GPx seviyesinin etkilendiğini düşündürmektedir.

SOD enzimi, superoksit radikalini dismutasyona uğratarak H₂O₂ ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlar (183). Taye ve Yanling ve ark. GAL ile yaptıkları çalışmada SOD aktivitesinde azalma gözlemişlerdir (136, 184). Ugan ve ark. da GAL ile oluşturdukları hepatitte SOD seviyesinin GAL grubunda kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığını rapor etmişlerdir (185). Diğer yandan Baştürk ve ark ise GAL çalışmalarında GAL grubu ile kontrol grubu arasında SOD aktivitesi bakımından anlamlı bir fark olmadığını bildirmişlerdir (186). Bizim çalışmamızda da SOD aktivitesi bakımından gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı.

Glutasyon serbest radikal temizleyicisi ve GSH redoks döngüsünde bir substrat olarak normal hücreleri oksidatif hasardan koruyan en önemli intrasellüler mekanizmalardan biridir (187). Karaciğerde yoğun konsantrasyonlarda bulunan, karaciğer için özgül nitelikte olan bir antioksidandır. Glutasyon hücrelerde bulunan ve protein yapısında olmayan, düşük molekül ağırlıklı redükte thiollerin % 90 nından fazlasını oluşturur. GSH vucutta bir çok biyolojik işlemde önemli roller oynar ve immün fonksiyonların ve inflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde görev aldıkları gösterilmiştir(188, 189). Proteinlerin yapısındaki sülfidril gruplarını indirgeyerek pek

çok enzim ve proteinin aktivasyonunu sağlayan GSH, serbest radikallerlede reaksiyona girip hücreleri oksidatif strese karşı korur (190). Oksidatif stres süresince GSH seviyesinin azaldığı bildirilmektedir (182). Yanling Shi, Wills PJ ve ark tarafından GAL ile oluşturulan deneysel hepatotoksiste modelinde karaciğer GSH seviyesinin kontrollere göre anlamlı derecede düştüğü rapor edilmiştir (184, 191). Bizim çalışmamızda da tespit ettiğimiz GSH seviyesindeki azalmanın, GAL'in neden olduğu oksidatif strese bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızda GAL verilmesiyle karaciğerde izlenen histolojik ve biyokimyasal hasarın PTX ve CAPE tedavisiyle düzeldiği izlendi. Karaciğer parankimasında GAL'in neden olduğu inflamatuvar, apoptotik ve nekrotik hücreleri içeren lokal alanların sınırları PTX ve CAPE uygulanan gruplarda önemli derecede küçülmüştü. PTX'in karaciğeri tedavi edici etkisinde kan akımını hızlandırarak dokuları oksijenlendirmesinin önemli olduğu düşünülmektedir (136). PTX'in mikrovasküler perfüzyon üzerine iyileştirici etkileri, vasküler bütünlüğü koruyarak, inflamasyonun en önemli basamağı olarak düşünülen postkapiller venül endoteli boyunca lökosit yapışmasını engellemesine bağlanmaktadır (137). Ayrıca PTX, bir tümör nekroz faktör α (TNF α) inhibitörü olması nedeniyle makrofajlardan TNF- α salınımını inhibe ederek IL-1 ve IL-6 gibi kemotaktik mediatörlerin yapımını azaltır (192). Bu şekilde inflamatuvar reaksiyonları baskıladığına dair literatürde bilgiler bulunmaktadır (193). Novick WC ve ark. TNF alfa tarafından aktive olan polimorfonükleer lökositler TNF alfadan önce ve sonra PTX'e maruz bırakılmasıyla bloke olduğunu bildirmişlerdir (194). Karaciğerin farklı toksiste modellerinde pentoksifilinin hepatoprotektif etkinliği olduğu gösterilmiştir (195). Farelerde karbontetraklorür ile indüklenmiş karaciğer hasarına karşı pentoksifilinin iyileştirici etkilerinin incelendiği çalışmada karaciğerde görülen vakuolizasyon, nekroz ve apoptoz bulgularının PTX uygulanan grupta azaldığı rapor edilmiş (196). Ayrıca PTX'in Kupffer hücrelerinden apoptozisi indüklediği bilinen TNF alfa salınımını inhibe ettiği bilinmektedir (197). Usta ve ark. sıçanlarda adriyaminle oluşturdukları böbrek hasarına karşı PTX'in etkilerini inceledikleri çalışmalarında, PTX uygulaması ile apoptozisin azaldığını rapor etmişlerdir (198). Biz de çalışmamız da literatürle uyumlu olarak PTX uyguladığımız grupta kaspaz-3 hücre sayısının sadece GAL uygulanan gruplara göre önemli derecede azaldığını tespit ettik.

GAL+CAPE grubunda izlediğimiz GAL grubuna göre azalan inflamatuvar alanlar CAPE'nin antiinflamatuvar özelliğine bağlanabilir. Nitekim CAPE'nin özgül

olarak Nükleer faktör kapa B (NF-kB)'yi ve oksijen radikallerini inhibe ederek inflamatuvar yolağın işlemlerini önlediği bilinmektedir. Nükleer faktör kappa-B (NF-kB) indüklenbilir nitrik oksit sentaz (iNOS), siklooksijenaz 2 (COX-2) gibi oksidatif strese yanıt olarak eyleme geçen ve birçok genin ekspresyonunda ve inflamatuvar genlerin üretiminden sorumlu olan redoks-duyarlı transkripsiyon faktörüdür (106). GAL uygulamasının NF-kB seviyesini anlamlı derecede artırdığı CAPE'nin de NF-kB'nin özgül inhibitörü olduğu saptanmıştır (199, 200).

CAPE'nin antiinflamatuvar etkinliği birçok çalışmada gösterilmiştir. Koltuksuz ve ark. (201) intestinal iskemi ve reperfüzyon hasarında, Vardı ve ark (202) gentamisin, Parlakpınar ve ark (203) amikasinin neden olduğu böbrek hasarında ve Lee KJ ve ark (204) Karbontetraklorürle indüklenmiş karaciğer hasarında CAPE'nin inflamatuvar hücre infiltrasyonunu belirgin derecede azalttığını bildirmişlerdir.

CAPE'nin apoptozis üzerine etkisi ile ilgili yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. İnsan kolon ve prostat kanser hücre kültürlerindeki çalışmalarda CAPE'nin apoptozisi uyardığı gösterilmiştir (205, 206). Öte yandan, CAPE'nin antiapoptotik olabileceğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Örneğin, sıçan nöron kültüründe deneysel olarak uyarılan apoptozis modelinde, CAPE'nin antioksidan ve kaspaz inhibisyonu ile antiapoptotik özellikleri saptanmıştır (207). Ayrıca Çağlı ve arkadaşları, iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturulan sıçan miyokardında, CAPE'nin apoptozisi inhibe ederek, hücresel yıkımı azalttığını rapor etmişlerdir (208). Üstelik CAPE'nin, glukokortikoid reseptör yolağından bağımsız olarak inflamatuvar hücrelerde apoptozisi önlediği ve kaspaz-3 aktivasyonunu engelleyerek apoptotik hücre ölümüne karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir (209). Bizde çalışmamızda CAPE uyguladığımız grupta kaspaz-3 (+) hücre sayısının GAL gruplarına göre anlamlı derecede azaldığını tespit ettik.

Çalışmamızda GAL+PTX ve GAL+CAPE gruplarında Kİ-67 (+) hücre sayısının GAL gruplarına göre anlamlı şekilde arttığını tespit ettik. Martino ve ark pentoksifilinin TGF-Betal'i azaltarak rejenerasyonu sağladığını bildirmişlerdir (210). TGF-Beta hepatosit büyüme faktörünü inhibe eden en önemli rejenerasyon inhibitörüdür (211). CAPE'nin hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi ise bütün propolis ürünlerinde fazlaca bulunan ve bir aminoasit olan arjininden ileri gelmektedir. Arjinin dekarboksilasyonla argamata dönüşür. Argamat ise mitoz ve protein sentezini artırarak doku rejenerasyonunu hızlandırır (212).

Deneysel karaciğer hasarı oluşturulan farklı deneysel modeller üzerinde PTX ve CAPE'nin karaciğer enzimleri üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Raethsch C ve ark. safra kanalı ligasyonu uyguladıkları sıçanlarda PTX uygulamasının ne kolastazın göstergesi olan serum ALP seviyesini ne de karaciğerde inflamasyonun göstergesi olan AST ve ALT seviyelerini etkilemediğini bildirmişlerdir (213). Buna karşılık concanavalin A ile oluşturulan hepatit modelinde PTX'nin doza bağımlı olarak serum AST, ALT seviyelerini önemli derecede düşürdüğü gösterilmiştir (214). Karbontetraklorür ile yapılan çalışmalarda meydana gelen karaciğer hasarına karşı PTX'in (215) serum AST, CAPE'nin ise (216, 217) AST, ALT ve ALP seviyelerini önemli derecede düşürdüğü rapor edilmiştir.

Biz de çalışmamızda PTX ve CAPE'nin verilmesinin, GAL'in neden olduğu karaciğer enzimlerindeki artışı engellediğini gözledik.

Bu çalışmada GAL'in neden olduğu oksidatif hasarın göstergelerinden olan lipid peroksidasyonu, glutatyon ve GPx aktivite kaybı, PTX ve CAPE tedavisi ile düzeltildi. Pentox (218) ve CAPE'nin (219) en önemli özelliklerinden biri in vitro ortamda aktive olan nötrofillerden hidrojen peroksit ve superoksit anyon üretimini azaltarak dokuyu serbest radikallerden korumasıdır. CCl₄ ile karaciğer hasarı oluşturulan çalışmalarda, artan lipid peroksidasyonunun PTX (220) ve CAPE (221) verilmesiyle azaldığı bildirilmektedir. GAL'nin neden olduğu hepatik lezyonlar üzerine antioksidan özelliği bilinen ajanların kullanılmasıyla antioksidan savunma sistemini oluşturan glutatyon seviyesinin arttığı çalışmalarda gösterilmiştir (222). Ganesan ve ark GAL hepatitinde, antiinflamatuvar ve antioksidan özelliği bilinen bir flavanoid olan chrysin'nin GAL uygulamasıyla azalmış glutatyon seviyesini anlamlı derecede yükseldiğini bildirmişlerdir (223). Zaitone ve ark. sıçanlarda oluşturdukları deneysel non-alkolik yağlı karaciğer hastalığında azalmış glutatyon seviyesinin PTX ile anlamlı derecede arttığını rapor etmişlerdir. (224) Sisplatin verilen diğer bir çalışmada da, karaciğer dokusunda azalan glutatyon miktarının CAPE ile düzeltildiği rapor edilmiştir (225). 10 µmol/L konsantrasyonda CAPE'nin ksantin dehidrogenaz/ksantin oksidaz sistemi tarafından meydana getirilen reaktif oksijen türlerinin tamamını bloke ettiği bildirilmiştir (98). Ayrıca CAPE linoleik asit ve araşidonik asitin 5'-lipooksijenaz enzimi tarafından oluşturulan oksijenasyonunu inhibe etmektedir (227). Hidrojen peroksiti metabolize eden enzimlerden biri olan GPx aktivitesi GAL+PTX ve GAL+CAPE gruplarında GAL grubuna göre önemli derecede yükselmişti. Çatal ve ark. sıçanlarda GAL' in neden olduğu böbrek hasarı üzerine Beta karoten, askorbik asit, alfa

tokoferol ve sodyum selenat'tan oluşan antioksidan kombinasyonu verilmesiyle GPx aktivitesini arttığını rapor etmişlerdir (228). Bize göre bu çalışmada belirgin olarak izlediğimiz PTX ve CAPE'nin oksidatif stres parametreleri üzerindeki olumlu etkileri onların antioksidan özelliklerine atfedilebilir.

GAL'in neden olduğu hasarı artıran oksidan kaynaklardan biri de nötrofillerden sentezlenen superoksit ve hidrojen peroksit radikalleridir. PTX (229) ve CAPE' nin (230, 227) nötrofiller üzerine güçlü inhibitör etkileri olduğu rapor edilmiştir. Nötrofiller lizozomal enzimler ve reaktif oksijen radikalleri gibi zararlı maddeler açığa çıkarırlar. Çeşitli sitümölanlarla nötrofiller aktive olduğu zaman hücrelerden dokuya zarar veren diğer maddelerle birlikte MPO'da salınır. MPO oksidan üretiminde temel role sahiptir. Nötrofiller romatoid artrit, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, reperfüzyon hasarı gibi inflamatuvar hastalıklarda görülen doku hasarında rol oynayan en önemli hücre olarak düşünülmektedir (231). Bu çalışmada PTX ve CAPE uygulanması, GAL ile yükselen MPO aktivitesini kontrol seviyesine düşürdü. Bu sonuçlar bize GAL ile oluşturulan hepatit modelinde inflamasyonun antiinflamatuvar etkiye sahip PTX ve CAPE gibi ajanlarla hafifleyebileceğini göstermektedir.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmanın sonucunda, GAL uygulamasının ardından karaciğer parankimi içerisinde normal histolojik yapıdan farklı olarak izlenen, inflamatuvar, nekrotik ve apoptotik hücreleri içeren fokal alanlar oluştuğu gözlemlendi. Ayrıca hepatosit sitoplazmasındaki glikojen içeriği değerlendirildiğinde, GAL uygulanan gruplarda lobülün periferinde belirgin derecede glikojen kaybı izlendi. Çalışmamızda gözlemlediğimiz diğer bir bulgu, sadece GAL verilen gruplardaki mast hücre, Ki-67 ve kaspaz-3 (+) hücre sayılarındaki artışı. Biyokimyasal analizlerde ise GAL gruplarında, kontrol grubuna göre MDA ve MPO seviyelerinde artış gözlenirken, GSH ve GPx aktivitelerinde anlamlı derecede azalma tespit edildi.

Diğer yandan GAL uygulanan sıçanlara PTX ve CAPE verilmesiyle karaciğerde izlenen histolojik ve biyokimyasal hasarın hafiflediği görüldü. Karaciğer parankimasında GAL'in neden olduğu inflamatuvar, apoptotik ve nekrotik hücreleri içeren lokal alanların sınırları PTX ve CAPE uygulanan gruplarda önemli derecede küçüldü. Bu gruplarda mast ve kaspaz 3 (+) hücre sayılarının azaldığı, Ki-67 (+) hücre sayısının ise anlamlı derecede arttığı tespit edildi. Ayrıca biyokimyasal analizlerde PTX ve CAPE uygulanması ile MDA, MPO seviyesi azalırken, GSH ve GPx seviyesinin anlamlı derecede arttığı izlendi.

Bu çalışma GAL'in neden olduğu karaciğer hasarı üzerine PTX ve CAPE'nin iyileştirici etkileri olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak karaciğer hastalıklarının tedavisinde PTX ve CAPE gibi antioksidan ve antiinflamatuvar özelliği olan ajanların kullanılmasının, olumlu etkileri olabileceğini düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

- 1- Guicciardi ME and G J Gores. Apoptosis: A Mechanism of Acute and Chronic Liver Injury. *Gut* 2005;54;1024-33.
- 2- Keppler D, Lesch R, Reutter W, Decker K. Experimental Hepatitis Induced by D-Galactosamine. *Exp Mol Pathol* 1968; 9: 279–290.
- 3- Decker K, Keppler D, Pausch J. The Regulation of Pyrimidine Nucleotide Level and its Role in Experimental Hepatitis. *Adv Enzyme Regul* 1973; 11: 205–230.
- 4- Kasravi FB, Wang L, Wang X, Molin G, Bengmark S, Jeppsson B. Bacterial Translocation in Acute Liver Injury Induced by D-galactosamine. *Hepatology* 1996; 23:97-103.
- 5- Keppler D, Decker K. Studies on the Mechanism of Galactosamine Hepatitis: Accumulation of Galactosamine-1-phosphate and its Inhibition of UDP-glucose Pyrophosphorylase. *Eur J Biochem* 1969; 10:219-225.
- 6- Leist M, Gantner F, Bohlinger I, Germann PG, Tiegs G, Wendel A. Murine Hepatocyte Apoptosis Induced in vitro and in vivo by TNF- α Requires Transcriptional Arrest. *J Immunol* 1994; 153:1778-88.
- 7- Sakaguchi S, Yokota K. Role of Ca²⁺ on Endotoxin-Sensitivity by Galactosamine Challenge: Lipid Peroxide Formation and Hepatotoxicity in Zymosan-Primed Mice. *Pharmacol Toxicol* 1995; 77(2): 81-6.
- 8- Sztrymf B, Rabiller A, Nunes H, Savale L. et. al. Prevention of Hepatopulmonary Syndrome and Hyperdynamic State by Pentoxifylline in Cirrhotic Rats. *Eur Respir J* 2004; 23 (5) :752-8.
- 9- Ward A, Clissold S. Pentoxifylline: A Review of its Pharmacodynamics and Pharmacokinetic Properties, and its Therapeutic Efficacy. *Drugs* 1987; 34: 50–97.
- 10- Ersoy Y. E. Sıçanlarda Sol Kolon Anastomozunda, Anastomoz İyileşmesi ve Klamp Hattı Perfüzyonuna Pentoksifilin ve Papaverinin Etkileri (Uzmanlık tezi).
- 11-Stoop MJ, Dirksen R, Hendriks T. Advanced Age Alone Does Not Suppress Anastomotic Healing in Intestine. *Surgery* 1996; 119:15.
- 12-Hamermann C, Goldschmidt, Caplan MS. Amelioration of Ischemia-Reperfusion Injury in Rat Intestine by Pentoxifylline- Mediated Inhibition of Xanthine Oxidase. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999; 29(1): 69-74.
- 13- Borrelli F, Maffia P, Pinto L, Ianaro A, Russo A, Capasso F, Ialenti A. Phytochemical Compounds Involved in the Anti-inflammatory Effect of Propolis Extract. *Fitoterapia*. 2002; 73: 53-63.

- 14- Castaldo S, Capasso F. Propolis, an Old Remedy Used in Modern Medicine. *Fitoterapia* 2002;73: 1-6.
- 15- Dobrowolski JW, Vohora SB, Sharma K, Shah SA, Naqvi SA, Dandiya PC. Antibacterial, Antifungal, Antiamoebic, Antiinflammatory and Antipyretic Studies on Propolis Bee Products. *J Ethnopharmacol* 1991; 35(1): 77-82.
- 16- Sud'ina GF, Mirzoeva OK, Pushkareva MA, Korshunova GA, Sumbatyan NV, Varfolomeev SD. Caffeic Acid Phenethyl Ester as a Lipoxygenase Inhibitor with Antioxidant Properties. *FEBS Lett* 1993; 23: 329.
- 17- Gövsa Gökmen F. Sistemik anatomi. 1. Baskı. İzmir: Güneş Kitapevi. 2003.
- 18- Moore KL, Agur AMR. Temel Klinik Anatomi, Elban A (çeviri editörü), 2. Baskı, Ankara: Güneş Kitapevi. 2006.
- 19-Çimen A, Anatomi, Bursa: Uludağ Üniversitesi basım evi. 1997.
- 20- Arıncı K, Elhan A. Anatomi 3. Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi. 2001.
- 21- Drake RL, Vogl W, Mitchell AW. Gray's Anatomy for Student. Yıldırım M (çeviri editörü), Ankara: Güneş Kitapevi. 2007.
- 22-Snell RS, Tıp Fakültesi Öğrencileri İçin Klinik Anatomi, Yıldırım M (çev. Ed) 5.baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri&yüce yayım. 1995.
- 23- Ozan H. Ozan Anatomi. 1. Baskı Nobel kitabevleri Ankara 2004.
- 24- Suzen B. İnsan Anatomisine Giriş. Akademi Basın ve Yayıncılık, Birinci Baskı, ISBN. 2006.
- 25- Cumhuriyet M. Temel Anatomi, Ankara: ODTÜ Yayıncılık-METU basım. 2001.
- 26-Yıldırım M. Topografik Anatomi. İstanbul: Nobel Kitabevleri. 2000.
- 27-Sancak B, Cumhuriyet M, Fonksiyonel Anatomi; Ankara: METU basım, 1999.
- 28-Arıncı K, Elhan A. Anatomi. 2. Baskı, Ankara: Güneş Matbaacılık. 1997.
- 29-Unur E, Ülger H, Ekinci N. Anatomi. 1.Baskı, Kayseri: Ufuk Yayıncılık. 2002.
- 30-Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Temel Histoloji. In: Aytekin Y, Solakoğlu S, Ahışhalı B, e d. 8. Baskı, İstanbul: Barış Kitabevi. 1998.
- 31-Erbengi T. Histoloji. 2. Baskı, Ankara: Güneş Kitabevi. 1990.
- 32-Moore KL, Persaud TVN. İnsan Embriyolojisi (Çev: Prof. Dr Hakkı Dalçık - Prof Dr. Mehmet Yıldırım). Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri 2008.
- 33-Sadler T.W. Langman's Medikal Embriyoloji. 9. baskı Ankara: Palme Yayıncılık.2005.
- 34- Seftalioglu A. Genel ve Özel Embriyoloji. 4. Baskı, Ankara: Tıp Teknik Yayıncılık. 2003.

- 35- Abraham L. Kierszenbaum, (Çeviri Editörü: Ramazan Demir). Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Patolojiye giriş. Ankara: Palme Yayıncılık. 2006.
- 36- Ross MH, Powlina W. Histology Text and Atlas. Philadelphia, Lippincott-Williams&Wilkins. 2006.
- 37- Tekelioğlu M. Özel Histoloji: İnce Yapı ve Gelişme. Ankara: Antıp AŞ Tıp Kitapları ve Bilimsel Yayınları. 2002.
- 38- Kalaycı G. Histoloji. 1.Baskı, Bursa: Uludağ Üniversitesi Basımevi. 1986.
- 39- Kayalı H. Özel Histoloji. İstanbul: Cerrahpasa Tıp Fakültesi Yayınları. 1992.
- 40- Birvar K, Dergün Ç, Topoğrafik Anatomi, 1. Baskı. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları. 1989.
- 41- Erkoçak A. Özel Histoloji. Ankara: A.Ü. Tıp Fakültesi Basımevi. 1982.
- 42- Gartner LP, Hiatt JL. Color Textbook of Histology, First Edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 1997.
- 43- Junqueira LC, Carneiro J. (Çeviri Editörü: Aytekin Y., Solakoğlu S.). Temel Histoloji. Ankara: Nobel Tıp Katabevleri. 2009.
- 44- Ovalle WK, Nahirney PC. Netter Temel Histoloji. İstanbul: Güneş Tıp Kitabevleri. 2009.
- 45- Ho CT, Lin RZ, Chang WY, Chang HY, Liu CH. Rapid Heterogeneous Liver-Cell On-Chip Patterning Via the Enhanced Field-Induced Dielectrophoresis Trap. Lab Chip 6(6):724-34.
- 46- Milli, HÜ. Hazıroğlu R. Veteriner Patoloji. 1. Cilt. Tamer Matbaacılık Yayınları, Ankara: 1997.
- 47-Fawcett DW, Ronald, JP.Concise Histology. Second Edition, Newyork: Oxford University Press. 2002.
- 48- Jungueria, CL, Carneiro J. Kelley RO. Basic Histology. Çeviri : Aytekin Y, Solakoglu S. Ahıskalı B. İstanbul: Barış Kitabevi. 1998.
- 49- Karagöz, E. Özel Histoloji. Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi Yayınları. 2001.
- 50- <http://www.medical-dictionary.thefreedictionary.com>
- 51- Eşrefoğlu M. Özel Histoloji. Malatya: Medipres Matbaacılık Ltd. 2009.
- 52- Erbeni T. Histoloji. 1 Baskı, İstanbul: Beta Basım Yayın A.S 1985.
- 53- Henrikson RC, Kaye GI. Key Facts in Histology. Einburgh: Churchill Livingstone. 1986: 277-84.

- 54- Coppel JA, Brown SA, Perry DJ. Veno-Occlusive Disease: Cytokines, Genetics, and Haemostasis. Blood Rev. 2003.
- 55-Conmark. Essential Histology. Second Edition. Lippincott- Raven Publishers New York. 1993.
- 56-Mills SE. Histology for Pathologists. 3rd Edition, Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2007.
- 57- Solomon, EP. İnsan Anatomisi ve Fizyolojisine Giriş. Çeviri: Süzen, L. B., Birol Basın Yayın Dağıtım ve Ticaret Ltd. Sti. 2. Baskı, İstanbul.1999.
- 58- Fawcett DW, Ronald JP. Concise Histology. Second Edition, Newyork. 2002.
- 59- Guyton AC, Taylor AE, Granger HJ. Circulatory Physiology. Vol2: Dynamics and Control of the Body Fluids. Philadelphia. 1975.
- 60- Demirsoy, A., Yasamın Temel Kuralları. Genel Biyoloji. 7. Baskı. Ankara. 1996.
- 61- Menteş NK. Klinik Gastroenteroloji. 4. Baskı, İzmir: Ege üniversitesi Matbbası. 1983.
- 62- Petorak İ. Medikal Embriyoloji. İstanbul: Osman Aykaç Matbaası. 1984.
- 63- Welsch U. Sobotta/ Histoloji. Renkli Mikroskopik Anatomi Atlası. Editör: Tekelioglu, M. İstanbul: Beta Basım A.S.1999.
- 64- <http://www.flickrriver.com>
- 65- Hatiboglu TM, Anatomi ve Fizyoloji. Ankara: Hatiboglu Yayınları.1989.
- 66- Maher P, Schubert D. Signaling by Reactive Oxygen Species in the Nervous System. Cell Mol Life Sci 2000; 57:1287-305.
- 67- Gutteridge JMC, Halliwell B. Free Radicals in Biology and Medicine. 2nd Ed, Oxford: Clarendon Press. 1991.
- 68- Gilbert DL, Colton CA. Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Interdisciplinary Approach. New York: Kluwer Academic Publishers. 2002.
- 69- Boyunaga H, Çelik C. Serbest Radikaller ve Hücrel Denge. Bilim Teknik Dergisi. 1996.
- 70- Sies H. Oxidative Stress: From Basic Research to Clinical Application. Am J Med 1991; 91:31-38.
- 71- Floyd RA. DNA Damage and Repair in Oxidative Damage and Repair. Davies KJA. Ed. Pergamon Press 1992; 175-180.
- 72-Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ, Ergul A. Oxidative Stress and the Use of Antioxidants in Diabetes: Linking Basic Science to Clinical Practice. Cardiovasc Diabetol 2005; 29;4(1):5.

- 73-Tabak F. Akut Hepatitler. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Hepato-Bilier Sistem ve Pankreas Hastalıkları Sempozyum Dizisi 2002; 28:43-55.
- 74-Karsen H, Çalışır C, Duygu F ve ark. Zayıflama Çayı Kullanımına Bağlı Gelişen Akut Hepatit: Bir Olgu Sunumu. Van Tıp Dergisi: 18 (2):110-112, 2011.
- 75-Shad JA, Chinn CG, Brann OS. Acute Hepatitis After Ingestion of Herbs. South Med J 1999; 92: 1095-1097.
- 76-Martinez OM, Krams SM, Sterneck M, Villanueva JC, Falco DA, Ferrell LD, Lake J, Roberts JP, Ascher NL. Intra-graft cytokine profile during human liver allograft rejection. Transplantation 1992; 53(2):449-56.
- 77- Ryan CJ, Anilkumar T, Ben-Hamida AJ, Khorsandi SE, Aslam M, Pusey CD, et. al. Multisorbent Plasma Perfusion in Fulminant Hepatic Failure: Effects of Duration and Frequency of Treatment in Rats with Grade III Hepatic Coma. Artif Organs 2001; 25(2):109-18.
- 78- Sun F, Hamagawa E, Tsutsui C, Sakaguchi N, Kakuta Y, Tokumaru S, Kojo S. Evaluation of Oxidative Stress During Apoptosis and Necrosis Caused by D-galactosamine in Rat Liver. Biochem Pharmacol 2003; 65(1):101-7.
- 79- Yamaguchi M, Miyashita Y, Kumagai Y, Kojo S. Change in Liver and Plasma Ceramides During D-Galactosamine-Induced Acute Hepatic Injury by LC-MS/MS. Bioorg Med Chem Lett. 2004; 2;14(15):4061-4.
- 80- Öztürk F. Apoptoz. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2002; 9: 143-148.
- 81- Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of Apoptosis by Cancer Chemotherapy. Experimental Cell Research 2000; 256: 42-49.
- 82- Fadeel B, Orrelius S. Apoptosis: a Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Human Disease. J Intern Med 2005; 258:479-517.
- 83-Muntané J, Montero JL, Marchal T, Perez-Seoane C, Lozano JM, Fraga E, et al. Effect of PGE1 on TNF-alpha Status and Hepatic D-Galactosamine-Induced Apoptosis in Rats. J Gastroenterol Hepatol 1998;13(2):197-207.
- 84-Tsutsui S, Hirasawa K, Takeda M, Itagaki S, Kawamura S, Maeda K, Mikami T, Doi K. Apoptosis of Murine Hepatocytes Induced by High Doses of Galactosamine. J Vet Med Sci 1997;59(9):785-90.
- 85- Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. CPP32, a Novel Human Apoptotic Protein with Homology to Caenorhabditis Elegans Cell Death Protein Ced-3 and

- Mammalian Interleukin-1 Beta-Converting Enzyme. *J Biol Chem.* 1994; 269(49):30761-4.
- 86- Hayami S, Ikeda K, Sun F, Tanaka K, Kojo S. Increase of Caspase-3 Activity in Rat Liver and Plasma by Thioacetamide. *Biochem Pharmacol* 1999;58(12):1941-3.
- 87- Sun F, Hamagawa E, Tsutsui C, Ono Y, Ogiri Y, Kojo S. Evaluation of Oxidative Stress During Apoptosis and Necrosis Caused by Carbon Tetrachloride in Rat Liver. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1535(2):186-91.
- 88- Streetz KL, Wüstefeld T, Klein C, Manns MP, Trautwein C. Mediators of Inflammation and Acute Phase Response in the Liver. *Cell Mol Biol* 2001;47(4):661-73.
- 89-Jaeschke H, Fisher MA, Lawson JA, Simmons CA, Farhood A, Jones DA. Activation of Caspase 3 (CPP32)-Like Proteases is Essential for TNF-Alpha-Induced Hepatic Parenchymal Cell Apoptosis and Neutrophil-Mediated Necrosis in a Murine Endotoxin Shock Model. *J Immunol* 1998;160(7):3480-6.
- 90-Beutler B, Milsark IW, Cerami AC. Passive Immunization Against Cachectin/Tumor Necrosis Factor Protects Mice From Lethal Effect of Endotoxin. *Science* 1985;229(4716):869-71.
- 91-Ward A, Clissold S. Pentoxifylline: A Review of its Pharmacodynamics and Pharmacokinetic Properties, and its Therapeutic efficacy. *Drugs* 34: 50–97, 1987.
- 92- Flynn WJ, Cryer HG, Garrison RN. Pentoxifylline Restores Intestinal Microvascular Blood Flow During Resuscitated Hemorrhagic Shock. *Surgery* 1991; 110(2):350-6.
- 93-Adams J, Dhar A, Shukla S, et. al. Effect of Pentoxifylline on Tissue Injury and Platelet-Activating Factor Production During Ischemia-Reperfusion Injury. *J Vasc Surg* 1995; 21: 742.
- 94-Kozaki K, Matsuno N, Kozaki M. Beneficial Effects of Pentoxifylline and Propentofylline on Preservation-Reperfusion Injury in Rat Liver Transplantation. *Transplant Proc* 1996;28(1):333-4.
- 95- Kozaki K, Egawa H, Bermudez L, Keefe EB, So SK, Esquivel CO. Effects of Pentoxifylline Pretreatment on Kupffer Cells in Rat Liver Transplantation. *Hepatology* 1995 Apr;21(4):1079-82.
- 96- Bessler H, Gilgal R, Djaldetti M, Zahavi I. Effect of Pentoxifylline on the Phagocytic Activity, cAMP Levels, and Superoxide Anion Production by Monocytes and Polymorphonuclear Cells. *J Leukoc Biol* 1986;40(6):747-54.

- 97- Zhu H, Jia Z, Misra H, Li YR. Oxidative Stress and Redox Signaling Mechanisms of Alcoholic Liver Disease: Updated Experimental and Clinical Evidence. *J Dig Dis* 2012; 13(3):133-42.
- 98-Yılmaz HR, Uz E, Yucel N, Altuntaş I, Ozcelik N. Protective Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) on Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes in Diabetic Rat Liver. *J Biochem Mol Toxicol* 2004; 18:234-38.
- 99- Dobrowolski JW, Vohora SB, Sharma K, Shah SA, Naqvi SA, Dandiya PC. Antibacterial, Antifungal, Antiamoebic, Antiinflammatory and Antipyretic Studies on Propolis Bee Products. *J Ethnopharmacol* 1991; 35(1):77-82.
- 100- Russo A, Longo R, Vanella A. Antioxidant activity of propolis: Rol of Caffeic Acid Phenethyl Ester and Galangin. *Fitoterapia* 2002; 73:21-29.
- 101- Havsteen BH. The Biochemistry and Medical Significance of the Flovonoids. *Pharmacol Ther* 2002; 96:66-207.
- 102- Son S, Lobkowsky EB, Lewis BA. Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE): Synthesis and X-Ray Crystallographic Analysis. *Chem Pharm Bull* 2001; 49: 236-38.
- 103- Fesen MR, Pommier Y, Leteurtre E, Hirogguchi S, Yung J, Kohn KW. Inhibition of HIV-1 Integrase by Flavones, Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) Related Compounds. *Biochem Pharmacol* 1994; 48:595-608.
- 104- Lin MW, Yang SR, Huang MH, Wu SN. Stimulatory Actions of Caffeic Acid Phenethyl Ester, a Known Inhibitor of NF-kappaB Activation, on Ca²⁺-Activated K⁺ Current in Pituitary GH3 cells. *J Biol Chem* 2004; 279:26885-26892.
- 105-Natarajan K, Singh S, Burke TR JR, Grunberger D, Aggarwal BB. Caffeic Acid Phenethyl Ester is a Potent and Specific Inhibitor of Activation of Nuclear Transcription Factor NF-Kappa B. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 9090-95.
- 106- Watabe M, Hishika K, Takayanagi A, Shimizu N, Nakaki T. Caffeic Acid Phenethyl Ester Induces Apoptosis by Inhibition of NfkappaB and Activation of Fas in Human Breast Cancer MCF-7 Cells. *J Biol Chem* 2004; 279:6017-26.
- 107-Fitzpatrick LR, Wang J, Le T. Caffeic Acid Phenethyl Ester, an Inhibitor of Nuclear Factor-KappaB, Attenuates Bacterial Peptidoglycan Polysaccharide-Induced Colitis in Rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;299(3):915-20.
- 108-Parks DA, Granger DN. Xanthine Oxidase: Biochemistry, Distribution and Physiology. *Acta Physiol Scand* 1986; 548:87-99.

- 109-Prophet EB, Mills B, Arrington JB and Bobin LH (eds) Armed Forces Institute of Pathology (AFIP) Laboratory Methods in Histotechnology. Washington: Armed Forces Institute of Pathology 1992.
- 110-Bancroft JD, Stevens A. Theory and Practice of Histological Techniques, fourth edition. Churchill Livingstone Medical Division of Pearson Professional Limited. 1996.
- 111-Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
- 112-Lawrence RA, Burk RF. Glutathione Peroxidase Activity in Selenium-Deficient Rat Liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 71: 952-8.
- 113-McCord JM, Fridovich I: Superoxide Dismutase. An Enzymic Function for Erythrocyte (Hemoglobin). *J Biol Chem* 1969; 244: 6049-55.
- 114-Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978; 12: 302-310.
- 115-Theodorou P, Akerboom M, Sies H. Assay of Glutathione, Glutathione Disulfide and Glutathione Mixed Disulfides in Biological Samples. *Methods Enzymol* 77, 373-83.
- 116-Hillegas L.M., Griswold D.E., Brickson B., Albrington-Winslow C.: Assessment of Myeloperoxidase Activity in Whole Rat Kidney. *J. Pharmacol Methods* 1990; 24: 285-295.
- 117-Hwang JM, Wang CJ, Chou FP, Tseng TH, Hsieh YS, Hsu JD, Chu CY. Protective Effect of Baicalin on Tert-Butyl Hydroperoxide-Induced Rat Hepatotoxicity *Arch Toxicol* 2005 ; 79(2): 102-9.
- 118-Medline A, Schaffner F, Popper H. Ultrastructural Features in Galactosamine-Induced Hepatitis. *Exp Mol Pathol* 1970; 12(2): 201-11.
- 119-Gu CH, Cao R, Wang GX. Protective Effect of Prostaglandin E on Hepatocytes and its Value of Early Treatment of Severe Viral Hepatitis. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 1991; 30(1): 17-20.
- 120-Choi JH, Kang JW, Kim DW, Sung YK, Lee SM. Protective Effects of Mg-CUD Against D-Galactosamine-Induced Hepatotoxicity in Rats. *Eur J Pharmacol* 2011; 657(1-3): 138-43.
- 121-Jonker AM, Dijkhuis FW, Kroese FG, Hardonk MJ, Grond J. Immunopathology of Acute Galactosamine Hepatitis in Rats. *Hepatology* 1990; 11(4): 622-7.

- 122-Sugiyama K, He P, Wada S, Tamaki F, Saeki S. Green Tea Suppresses D-Galactosamine-Induced Liver Injury in Rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 1998;62(3):609-11.
- 123-Farber JL, Gill G, Konishi Y. Prevention of Galactosamine-Induced Liver Cell Necrosis by Uridine. *Am J Pathol* 1973;72(1):53-62.
- 124-Decker K, Keppler D. Galactosamine Induced Liver Injury. *Prog Liver Dis* 1972;4:183-99.
- 125-Tsutsui S, Itagaki S, Kawamura S, Harada K, Karaki H, Doi K, Yoshikawa Y. D-Galactosamine Induced Hepatocyte Apoptosis is Inhibited in vivo and in Cell Culture by a Calcium Calmodulin Antagonist, Chlorpromazine, and a Calcium Channel Blocker, Verapamil. *Exp Anim* 2003;52(1):43-52.
- 126-Thomas CE, Reed DJ. Current Status of Calcium in Hepatocellular Injury. *Hepatology* 1989;10(3):375-84.
- 127-Gujral JS, Farhood A, Jaeschke H. Oncotic Necrosis and Caspase-Dependent Apoptosis During Galactosamine-Induced Liver Injury in Rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003;190(1):37-46.
- 128-Najmi AK, Pillai KK, Pal SN, Aqil M, Sayeed A. Hepatoprotective and Behavioral Effects of Jigrine in Galactosamine-Induced Hepatopathy in Rats. *Pharm Biol* 2010;48(7):764-9.
- 129-Sun F, Hamagawa E, Tsutsui C, Sakaguchi N, Kakuta Y, Tokumaru S, Kojo S. Evaluation of Oxidative Stress During Apoptosis and Necrosis Caused by D-galactosamine in Rat liver. *Biochem Pharmacol.* 2003 Jan 1;65(1):101-7.
- 130-Ohta Y, Matura T, Kitagawa A, Tokunaga K, Yamada K. Xanthine Oxidase-Derived Reactive Oxygen Species Contribute to the Development of D-Galactosamine-Induced Liver Injury in Rats. *Free Radic Res* 2007;41(2):135-44.
- 131-Shanmugarajan TS, Sivaraman D, Somasundaram I, Arunsundar M, Krishnakumar E, Balaji R, Ravichandiran V. Influence of Alpha Lipoic Acid on Antioxidant Status in D-Galactosamine-Induced Hepatic Injury. *Toxicol Ind Health* 2008;24(10):635-42.
- 132-Stachlewitz RF, Seabra V, Bradford B, Bradham CA, Rusyn I, Germolec D, Thurman RG. Glycine and Uridine Prevent D-galactosamine Hepatotoxicity in the Rat: Role of Kupffer Cells. *Hepatology* 1999;29(3):737-45.
- 133-Sugiyama A, Sato A, Shimizu H, Ando K, Takeuchi T. PEGylated Lactoferrin Enhances its Hepatoprotective Effects on Acute Liver Injury Induced by D-Galactosamine and Lipopolysaccharide in Rats. *J Vet Med Sci* 2010;72(2):173-80.

- 134-Wen T, Wu ZM, Liu Y, Tan YF, Ren F, Wu H. Upregulation of Heme Oxygenase-1 With Hemin Prevents D-Galactosamine and Lipopolysaccharide-Induced Acute Hepatic Injury in Rats. *Toxicology* 2007; 31;237(1-3):184-93.
- 135-Takano H, Inoue K, Shimada A, Sato H, Yanagisawa R, Yoshikawa T. Urinary trypsin inhibitor protects against liver injury and coagulation pathway dysregulation induced by lipopolysaccharide/D-galactosamine in mice. *Lab Invest.* 2009 Jul;89(7):833-9. Epub 2009 Apr 27.
- 136-Taye A, El-Moselhy MA, Hassan MK, Ibrahim HM, Mohammed AF. Hepatoprotective Effect of Pentoxifylline Against D-galactosamine-Induced Hepatotoxicity in Rats. *Ann Hepatol* 2009;8(4):364-70.
- 137- Abdel Salam OM, Baiuomy AR, El-Shenawy SM, Hassan NS. Effect of Pentoxifylline on Hepatic Injury Caused in the Rat by the Administration of Carbon Tetrachloride or Acetaminophen. *Pharmacol Rep* 2005;57(5):596-603.
- 138-Mangeney M, Sire O, Montagne J, Nordmann J. Effect of D-Galactosamine in Vitro on [U-14C] Palmitate Oxidation, Triacylglycerol Synthesis and Secretion in Isolated Hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 1985;9;833(1):119-27.
- 139-Peraldi P, Hotamisligil GS, Buurman WA, White MF, Spiegelman BM. Tumor Necrosis Factor (TNF)-Alpha Inhibits Insulin Signaling Through Stimulation of the p55 TNF Receptor and Activation of Sphingomyelinase. *J Biol Chem* 1996;271(22):13018-22.
- 140-Schwabe RF, Brenner DA. Mechanisms of Liver Injury. TNF-Alpha-Induced Liver Injury: Role of IKK, JNK, and ROS Pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006 ;290(4):G583-9.
- 141-Tseng MT, Lu X, Duan X, Hardas SS, Sultana R, Wu P, Unrine JM, Graham U, Butterfield DA, Grulke EA, Yokel RA. Alteration of Hepatic Structure and Oxidative Stress Induced by Intravenous Nanoceria. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012;260(2):173-82.
- 142-Kaufmann SH, Kalemkerian GP, Jasti R, Mabry M. Effect of V-rasH on Sensitivity of NCI-H82 Human Small Cell Lung Cancer Cells to Cisplatin, Etoposide, and Camptothecin. *Biochem Pharmacol* 1995;50(12):1987-93.
- 143-Ohtomo K, Wang S, Masunaga A, Aikichi, Iwamoto, Sugawara I. Secondary Infections of AIDS Autopsy Cases in Japan With Special Emphasis on Mycobacterium Avium-Intracellulare Complex Infection. *Tohoku J Exp Med* 2000;192(2):99-109.
- 144- Dvorak AM, Tepper RI, Weller PF, Morgan ES, Estrella P, Monahan-Earley RA, Galli SJ Piecemeal Degranulation of Mast Cells in the Inflammatory Eyelid Lesions of

Interleukin-4 Transgenic Mice, Evidence of Mast Cell Histamine Release in Vivo by Diamine Oxidase-gold Enzyme Affinity Ultrastructural Cytochemistry, *Blood* 1994;83: (12) 3600-12.

145- Liehr H, Grün M, Seelig HP, Seelig R, Reutter W, Heine WD. On the Pathogenesis of Galactosamine Hepatitis. Indications of Extrahepatocellular Mechanisms Responsible for Liver Cell Death. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1978;26(4):331-44.

146- Kasravi FB, Adawi D, Hägerstrand I, Molin G, Bengmark S, Jeppsson B. The Effect of Pretreatment With Endotoxin and Lactobacillus on Bacterial Translocation in Acute liver Injury. *Eur J Surg* 1996;162(7):537-44.

147- Shito M, Balis UJ, Tompkins RG, Yarmush ML, Toner M. A Fulminant Hepatic Failure Model in the Rat: Involvement of Interleukin-1Beta and Tumor Necrosis Factor-Alpha. *Dig Dis Sci* 2001;46(8):1700-8.

148-Komano T, Yokoyama Funakoshi R, Egashira Y, Sanada H. Mechanism of the Suppression Against D-Galactosamine-Induced Hepatic Injury by Dietary Amino Acids in Rats. *Amino Acids* 2009;37(2):239-47.

149-Kitazawa T, Tsujimoto T, Kawaratani H, Fukui H. Salvage Effect of E5564, Toll-Like Receptor 4 Antagonist on D-Galactosamine and Lipopolysaccharide-Induced Acute Liver Failure in Rats. *J Gastroenterol Hepatol* 2010;25(5):1009-12.

150-Fortes Aiub CA, Bortolini R, Arrieira Azambuja A, Alves Filho JC, Bordignon Nunes F, Rodrigues de Oliveira J. Alterations in the indexes of Apoptosis and Necrosis Induced by Galactosamine in the Liver of Wistar Rats Treated with Fructose-1,6-bisphosphate. *Hepatol Res* 2003;25(1):83-91.

151- Cheng CC, Etoh J, Tanimura T, Egashira Y, Ohta T, Sanada H. Effects of Dietary Gluten on the Hepatotoxic Action of Galactosamine and/or Endotoxin in Rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 1996;60(3):439-43.

152-Tran-Thi TA, Phillips J, Falk H, Decker K. Toxicity of D-Galactosamine for Rat Hepatocytes in Monolayer Culture. *Exp Mol Pathol* 1985;42(1):89-116.

153- Siendones E, Fouad D, Abou-Ellella AM, Quintero A, Barrera P, Muntané J. Role of Nitric Oxide in D-Galactosamine-Induced Cell Death and its Protection by PGE1 in Cultured Hepatocytes. *Nitric Oxide* 2003;8(2):133-43.

154- Elmore S. Apoptosis: a Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 2007;35(4):495-516.

- 155- Catal T, Bolkent S. Combination of Selenium and Three Naturally Occurring Antioxidants Administration Protects D-Galactosamine-Induced Liver Injury in Rats. *Biol Trace Elem Res* 2008;122(2):127-36.
- 156-Arıcı S, Kıvanç F, Özer H, Eğilmez R, Elagöz Ş. Mide Adenokarsinomlarında CD44 ve Ki 67 Ekspresyonu. *Türk Patoloji Dergisi* 2006;22:26-31.
- 157-Tosun M, Tosun E, Avunduk MC. Hücre Çoğalma Belirleyicilerinin Önemi ve Kullanım Alanları. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi* 2001; 3:235-44.
- 158- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell Cycle Analysis of a Cell Proliferation-Associated Human Nuclear Antigen Defined by the Monoclonal Antibody Ki-67. *J Immunol* 1984;133(4):1710-5.
- 159- Şaylı BS. Medikal Genetik. Sodeman's Pathologic Physiology. Turkce 1. Baskı. *Türkiye Klinikleri Yayınevi*. 1991:73-77.
- 160-Kawakita N, Seki S, Yanai A, Sakaguchi H, Kuroki T, Mizoguchi Y, Kobayashi K, Monna T. Immunocytochemical Identification of Proliferative Hepatocytes Using Monoclonal Antibody to Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA/cyclin). Comparison with Immunocytochemical Staining for DNA Polymerase-Alpha. *Am J Clin Pathol* 1992;97(5 Suppl 1):S14-20.
- 161-Botelli R, Veronese S, Iamoni G, et. al. S Bromodeoxyuridine proliferation index and long term prognosis in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1993; 18:181.
- 162- Bravo R, Celis JE. Changes in the Nuclear Distribution of Cyclin (PCNA) During S-phase are not Triggered by Post-Translational Modifications that are Expected to Moderately Affect its Charge. *FEBS Lett* 1985;182(2):435-40.
- 163-Kaita KD, Pettigrew N, Minuk GY. Hepatic Regeneration in Humans with Various Liver Disease as Assessed by Ki-67 Staining of Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Liver Tissue. *Liver*. 1997;17(1):13-6.
- 164-Kamel OW, Franklin WA, Ringus JC, Meyer JS. Thymidine Labeling Index and Ki-67 Growth Fraction in Lesions of the Breast. *Am J Pathol* 1989;134(1):107-13.
- 165-Hopf NJ, Bremm J, Bohl J, Perneczky A. Image Analysis of Proliferating Cells in Tumors of the Human Nervous System: an Immunohistological Study with the Monoclonal Antibody Ki-67. *Neurosurgery*. 1994;35(5):917-23.
- 166-Wintzer HO, Zipfel I, Schulte-Mönting J, Hellerich U, von Kleist S. Ki-67 Immunostaining in Human Breast Tumors and its Relationship to Prognosis. *Cancer* 1991 15;67(2):421-8.

- 167- El-Meghawry El-Kenawy A, Osman HE, Daghestani MH. The Effect of Vitamin C Administration on Monosodium Induced Liver Injury. An experimental study. *Exp Toxicol Pathol*.2012.
- 168-Rosalki SB, Foo AY. Two New Methods for Separating and Quantifying Bone and Liver Alkaline Phosphatase Isoenzymes in Plasma. *Clin Chem* 1984;30(7):1182–86.
- 169- The Liver in Systemic Disease N McIntyre *Gut* 1994; 35(3): 432.
- 170- Recknagel RO, Glende EA Jr, Dolak JA, Waller RL. Mechanisms of Carbon Tetrachloride Toxicity. *Pharmacol Ther* 1989;43(1):139-54.
- 171- Aristatile B, Al-Numair KS, Veeramani C, Pugalendi KV. Effect of Carvacrol on Hepatic Marker Enzymes and Antioxidant Status in D-Galactosamine-Induced Hepatotoxicity in Rats. *Fundam Clin Pharmacol* 2009 ;23(6):757-65.
- 172-Aristatile B, Al-Numair KS, Veeramani C, Pugalendi KV. Antihyperlipidemic Effect of Carvacrol on D-Galactosamine Induced Hepatotoxic Rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2009;20(1):15-27.
- 173-Yamaguchi M, Miyashita Y, Kumagai Y, Kojo S. Change in Liver and Plasma Ceramides During D-Galactosamine-Induced Acute Hepatic Injury by LC-MS/MS. *Bioorg Med Chem Lett* 2004;14(15):4061-4.
- 174-Sakaguchi S, Furusawa S, Yokota K, Takayanagi M, Takayanagi Y. Modification of Tumor Necrosis Factor-Induced Acute Toxicity D-Galactosamine Challenge by Polymyxin B, an Anti-Endotoxin. *J Immunopharmacol* 2000;22(11):935-42.
- 175-Yoshikawa T, Furukawa Y, Murakami M, Takemura S, Kondo M. Effects of Vitamin E on D-galactosamine-Induced or Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity. *Digestion* 1982;25(4):222-9.
- 176-Mourelle M, Meza MA. Colchicine Prevents D-Galactosamine-Induced Hepatitis. *J Hepatol* 1989;8(2):165-72.
- 177-Shiratori Y, Hai K, Takada H, Kiriyaama H, Nagura T, Matsumoto K, Kamii K, Okano K, Tanaka M. Mechanism of Accumulation of Macrophages in Galactosamine-Induced Liver Injury: Effect of Lipoxigenase Inhibitors on Chemotaxis of Spleen Cells. *Pathobiology*. 1992;60(6):316-21.
- 178-Ito K, Ozasa H, Noda Y, Arai S, Horikawa S. Effects of Free Radical Scavenger on Acute Liver Injury Induced by D-Galactosamine and Lipopolysaccharide in Rats. *Hepatol Res* 2008;38(2):194-201.

- 179-Wan JY, Gong X, Zhang L, Li HZ, Zhou YF, Zhou QX. Protective Effect of Baicalin Against Lipopolysaccharide/D-Galactosamine-Induced Liver Injury in Mice by Up-Regulation of Heme Oxygenase-1. *Eur J Pharmacol* 2008;587(1-3):302-8.
- 180-Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB 3rd. Effects of Alpha-Lipoic Acid on Biomarkers of Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J Nutr Biochem* 2003 ;14(5):288-94.
- 181-Mitchell JR, Snodgrass WR, Gillette JR. The Role of Biotransformation in Chemical-Induced Liver Injury. *Environ Health Perspect* 1976;15:27-38.
- 182- Ravikumar V, Shivashangari KS, Devaki T. Effect of Tridax Procumbens on Liver Antioxidant Defense System During Lipopolysaccharide-Induced Hepatitis in D-Galactosamine Sensitized Rats. *Mol Cell Biochem* 2005;269(1-2):131-6.
- 183-Gürdöl F, Genç S, Oner-Iyidogan Y, Süzme R. Coadministration of Melatonin and Estradiol in Rats: Effects on Oxidant Status. *Horm Metab Res* 2001;33(10):608-11.
- 184- Shi Y, Sun J, He H, Guo H, Zhang S. Hepatoprotective Effects of Ganoderma Lucidum Peptides Against D-Galactosamine-Induced Liver Injury in Mice. *J Ethnopharmacol* 2008;117(3):415-9.
- 185- Ugan Y. Sıçanlarda D-Galaktozamin ile Oluşturulan Hepatitte Kefir'in Koruyucu Etkisi. Tez (Tıpta Uzmanlık) - Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, 2008.
- 186-Baştürk A. Sıçanlarda D-Galaktozamin ile Oluşturulan Hepatitte Caffeic Acid Phenetyl Ester'in Koruyucu Etkisi. Tez (Tıpta Uzmanlık) - Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, 2008.
- 187-Bounous G, Molson JH. The Antioxidant System. *Anticancer Res.* 2003 Mar-Apr;23(2B):1411-5.
- 188-Victor VM, Rocha M, De la Fuente M.N-Acetylcysteine Protects Mice From Lethal Endotoxemia by Regulating the Redox State of Immune Cells. *Free Radic Res* 2003 ;37(9):919-29.
- 189- Meydani SN, Wu D, Santos MS, Hayek MG. Antioxidants and Immune Response in Aged Persons: Overview of Present Evidence. *Am J Clin Nutr* 1995;62:1462-1476.
- 190- Kaya H, Sezik M, Ozkaya O, Dittrich R, Siebzehrubl E, Wildt L. Lipid Peroxidation at Various Estradiol Concentrations in Human Circulation During Ovarian Stimulation with Exogenous Gonadotropins. *Horm Metab Res* 2004;36(10):693-5.

- 191- Wills PJ, Asha VV. Protective Effect of *Lygodium Flexuosum* (L.) Sw. (Lygodiaceae) Against D-Galactosamine Induced Liver Injury in Rats. *J Ethnopharmacol* 2006;108(1):116-23.
- 192- Sztrymf B, Rabiller A, Nunes H, Savale L, Lebrech D, Le Pape A, de Montpreville V, Mazmanian M, Humbert M, Hervé P. Prevention of Hepatopulmonary Syndrome and Hyperdynamic State by Pentoxifylline in Cirrhotic Rats. *Eur Respir J* 2004; 23(5):752-8.
- 193- Doherty GM, Jensen JC, Alexander HR, Buresh CM, Norton JA. Pentoxifylline Suppression of Tumor Necrosis Factor Gene Transcription. *Surgery* 1991; 110: 192-8.
- 194- Novick WJ, Sullivan G, Mandell G: New Pharmacological Studies with Pentoxifylline. *Biorheolog* 1990; 27: 449–54.
- 195- Sneed RA, Buchweitz JP, Jean PA, Ganey PE. Pentoxifylline Attenuates Bacterial Lipopolysaccharide-Induced Enhancement of Allyl Alcohol Hepatotoxicity. *Toxicol Sci* 2000;56(1):203-10.
- 196-Noyan T, Onem O, Ramazan Sekeroglu M, Koseoglu B, Dulger H, Bayram I, et. al. Effects of Erythropoietin and Pentoxifylline on the Oxidant and Antioxidant Systems in the Experimental Short Bowel Syndrome. *Cell Biochem Funct* 2003;21(1):49–54.
- 197- El-Ghoneimi A, Cursio R, Schmid-Alliana A, Tovey M, Lasfar A, Michiels JF, Rossi B, Gugenheim J. Inhibition of Tumor Necrosis Factor Alpha Gene Transcription by Pentoxifylline Reduces Normothermic Liver Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *Transplant Proc* 2007;39(6):1761-4.
- 198-Usta Y, Ismailoglu UB, Bakkaloglu A, Orhan D, Besbas N, Sahin-Erdemli I, Ozen S. Effects of Pentoxifylline in Adriamycin-Induced Renal Disease in Rats. *Pediatr Nephrol* 2004;19(8):840-3.
- 199- Watabe M, Hishikawa K, Takayanagi A, Shizu N, Nakaki T. Caffeic Acid Phenethyl Ester Induces Apoptosis by Inhibition of NfκB and Activation of Fas in Human Breast Cancer MCF-7 Cells. *J Biol Chem* 2004; 279:6017-26.
- 200- Das J, Ghosh J, Roy A, Sil PC. Mangiferin Exerts Hepatoprotective Activity Against D-Galactosamine Induced Acute Toxicity and Oxidative/nitrosative Stress Via Nrf2-NFκB Pathways. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012;260(1):35-47.
- 201-Koltuksuz U, Ozen S, Uz E, Aydinç M, Karaman A, Gültek A, Akyol O, Gürsoy MH, Aydın E. Caffeic Acid Phenethyl Ester Prevents Intestinal Reperfusion Injury in Rats. *J Pediatr Surg* 1999 ;34(10):1458-62.

- 202-Vardi N, Parlakpınar H, Oztürk F, Acet A. Gentamicin-Induced Nephrotoxicity and Protective Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester in Rats. *Fundam Clin Pharmacol* 2005;19(2):173-7.
- 203- Parlakpınar H, Ozer MK, Ucar M, Gaffaroglu M, Vardi N, Koc M, Acet A. Protective Effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) on Amikacin-Induced Nephrotoxicity in Rats. *Cell Biochem Funct* 2006;24(4):363-7.
- 204-Lee KJ, Choi JH, Khanal T, Hwang YP, Chung YC, Jeong HG. Protective Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester Against Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity in Mice. *Toxicology* 2008;248(1):18-24.
- 205- Wang D, Xiang DB, He YJ, Li PZ, Wu XH, Mou JH, Xiao HL, Zhang QH. Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester on Proliferation and Apoptosis of Colorectal Cancer Cells in Vitro. *World J Gastroenterol* 2005; 26:4008-12.
- 206- McEleny K, Coffey R, Morrissey C, Fitzpatrick JM, Watson RWG. Caffeic Acid Phenethyl Ester-Induced PC-3 Cell Apoptosis is Caspase Dependent and Mediated Through the Loss of Inhibitors of Apoptosis Proteins. *BJU Int* 2004; 94:402-6.
- 207-Amodio R, De Ruvo C, Dimatteo V, Poggi A, Disanto A, Martelli N, Dimatteo V, Lorenzet R. Caffeic Acid Phenethyl Ester Blocks Apoptosis Induced by Low Potassium in Cerebellar Granule Cells. *Int J Dev Neurosci* 2003; 2:379-89.
- 208-Cagli K, Bağcı C, Gulec M, Cengiz B, Akyol O, Sari I, Cavdar S, Pence S, Dinçkan H. In Vivo Effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester on Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury and Apoptotic Changes in Rats. *Ann Clin Lab Sci* 2005;35(4):440-8.
- 209-Wei X, Zhao L, Ma Z, Holtzman DM, Yan C, Dodel RC, Hampel H, Oertel W, Farlow MR, Du Y. Caffeic Acid Phenethyl Ester Prevents Neonatal Hypoxic-Ischaemic Brain Injury. *Brain* 2004;127(Pt 12):2629-35.
- 210-Martino RB, Coelho AM, Kubrusly MS, Leitão R, Sampietre SN, Machado MC, Bacchella T, D'Albuquerque LA. Pentoxifylline Improves Liver Regeneration Through Down-Regulation of TNF- α Synthesis and TGF- β 1 Gene Expression. *World J Gastrointest Surg* 2012;4(6):146-51.
- 211- Michalopoulos GK, De Frances MC. Liver Regeneration. *Science* 1997;276:60-66.
- 212-Gabrys J, Konecki J, Krol W, Scheller S, Shani J. Free Amino Acids in Bee Hive Products (Propolis) as Identified and Quantified by Gas-Liquid Chromatography. *Pharmacol Res Comm* 1986; 18(6): 513-18.

- 213- Raetsch C, Jia JD, Boigk G, Bauer M, Hahn EG, Riecken EO, Schuppan D. Pentoxifylline Downregulates Profibrogenic Cytokines and Procollagen I Expression in rat Secondary Biliary Fibrosis. *Gut* 2002;50(2):241-7.
- 214-Shirin H, Bruck R, Aeed H, Frenkel D, Kenet G, Zaidel L, Avni Y, Halpern Z, HersHKoviz R. Pentoxifylline Prevents Concanavalin A-Induced Hepatitis by Reducing Tumor Necrosis Factor Alpha Levels and Inhibiting Adhesion of T Lymphocytes to Extracellular Matrix. *J Hepatol* 1998;29(1):60-7.
- 215- Lee KS, Cottam HB, Houghlum K, Wasson DB, Carson D, Chojkier M. Pentoxifylline Blocks Hepatic Stellate Cell Activation Independently of Phosphodiesterase Inhibitory Activity. *Am J Physiol* 1997;273: 1094-100.
- 216-Ozen S, Oral H, Ozbek H. Hepatoprotective Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) on Carbon Tetrachloride (CCI4) Induced Acute Hepatotoxicity in Rats. *Eur J Basic Med Sci* 2011;1(1):7-12.
- 217-Kus I, Colakoglu N, Pekmez H, Seckin D, Ogeturk M, Sarsilmaz M. Protective Effects of Caffeic Acid Phenethylester (CAPE) on Carbontetrachloride-Induced Hepatotoxicity in Rats. *Acta Histochemica* 106;(4) 289–297.
- 218-McDonald RJ. Pentoxifylline Reduces Injury to Isolated Lungs Perfused With Human Neutrophils. *Am Rev Respir Dis* 1991 ;144(6):1347-50.
- 219- Michaluart P, Masferrer JL, Carothers AM, Subbaramaiah K, Zweifel BS, Koboldt C, Mestre JR, Grunberger D, Sacks PG, Tanabe T, Dannenberg AJ. Inhibitory Effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester on the Activity and Expression of Cyclooxygenase-2 in Human Oral Epithelial Cells and in a Rat Model of Inflammation. *Cancer Res* 1999;59(10):2347-52.
- 220-Montosi G, Garuti C, Iannone A, Pietrangelo A. Spatial and Temporal Dynamics of Hepatic Stellate Cell Activation During Oxidant-Stress-Induced Fibrogenesis. *Am J Pathol* 1998;152(5):1319-26.
- 221-Ozen S, Akyol O, Iraz M, Söğüt S, Ozuğurlu F, Ozyurt H, Odaci E, Yildirim Z. Role of Caffeic Acid Phenethyl Ester, an Active Component of Propolis, Against Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Rats. *J Appl Toxicol* 2004;24(1):27-35.
- 222- Shanmugarajan TS, Sivaraman D, Somasundaram I, Arunsundar M, Krishnakumar E, Balaji R, Ravichandiran V. Influence of Alpha Lipoic Acid on Antioxidant Status in D-galactosamine-induced Hepatic Injury. *Toxicol Ind Health* 2008 ;24(10):635-42.
- 223- Ganesan Pushpavalli, Panneerselvam Kalaiarasi, Chinnadurai Veeramani, Kodukkur Viswanathan Pugalendi. Effect of Chrysin on Hepatoprotective and

Antioxidant Status in D-Galactosamine-Induced Hepatitis in Rats. *European Journal of Pharmacology*. 2010; 631(1-3): 36–41.

224- Zaitone S, Hassan N, El-Orabi N, El-Awady el-S. Pentoxifylline and Melatonin in Combination with Pioglitazone Ameliorate Experimental Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Eur J Pharmacol* 2011;662(1-3):70-7.

225- Kart A, Cigremis Y, Karaman M, Ozen H. Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) Ameliorates Cisplatin-Induced Hepatotoxicity in Rabbit. *Exp Toxicol Pathol*. 2010;62(1):45-52. Epub 2009 Mar 5.

226-Yılmaz HR, Uz E, Yucel N, Altuntaş I, Özçelik N. Protective Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) on Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes in Diabetic Rat Liver. *J Biochem Mol Toxicol* 2004; 18:234-38.

227-Borrelli F, Izzo AA, Di Carlo G, Maffia P, Russo A, Maiello FM, Capasso F, Mascolo N.

Effect of a Propolis Extract and Caffeic Acid Phenethyl Ester on Formation of Aberrant Crypt Foci and Tumors in the Rat Colon. *Fitoterapia* 2002; 73:38-43.

228- Catal T, Sacan O, Yanardag R, Bolkent S. Protective Effects of Antioxidant Combination Against D-Galactosamine-Induced Kidney Injury in Rats. *Cell Biochem Funct* 2010;28(2):107-13.

229-Schoenberg MH, Muhl E, Sellin D, Younes M, Schildberg FW, Haglund U. Posthypotensive Generation of Superoxide Free Radicals--Possible Role in the Pathogenesis of the Intestinal Mucosal Damage. *Acta Chir Scand* 1984;150(4):301-9.

230-Scapagnini G, Foresti R, Calabrese V, Giuffrida Stella AM, Green CJ, Motterlini R. Caffeic Acid Phenethyl Ester and Curcumin: A Novel Class of Heme Oxygenase-1 Inducers. *Mol Pharmacol* 2002; 61(3):554-61.

231-Sener G, Akgün U, Satiroğlu H, Topaloğlu U, Keyer-Uysal M. The Effect of Pentoxifylline on Intestinal Ischemia/Reperfusion Injury. *Fundam Clin Pharmacol* 2001;15(1):19-22.

EKLER

EK 1. Etik Kurul Onay Formu



İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 03-12-2010
Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya
Araştırma Protokol no.su : 2010/71
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Türü : sıçan
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Soyü : Wistar albino
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti : ☐ E ☐ D ☒ Farketmez
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 64 adet
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı : 150-180 g Yetişkin

Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerinden Prof. Dr. Mukaddes EŞREFOĞLU'nun yürütücüsü olduğu
"Wistar albino sıçanlarda D-Galaktozamin ile oluşturulan akut hepatit tedavisinde
pentoxifylline ve caffeic acid phenethyl ester'in etkilerinin incelenmesi" isimli 2010/71
Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp
Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve
sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi bir etik sakınca
bulunmadığına oy birliği ile karar verildi.

 Prof.Dr.Yusuf TÜRKÖZ Başkan	 Doç.Dr. Abdurrahman KARAMAN Başkan Yard.	 Yrd.Doç.Dr. Mustafa KARAKAPLAN Raportör
 Prof.Dr. Ahmet KIZILAY Üye	 Prof.Dr. Selim DOĞANAY Üye	 Yrd.Doç.Dr. M.Arif ALADAĞ Üye
 Vet.İlek.M.Zafer BOZDAĞ Üye	 Salih AVCI Sivil Üye	

EK 2. ÖZGEÇMİŞ

1. GENEL

SOYADI, ADI: TAŞLIDERE ELİF		DOĞUM TARİHİ 20/04/1978
YAZIŞMA ADRESİ İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji ABD		
TELEFON 5056680494	FAKS	E-MAIL elif.taslidere@inonu.edu. tr

2. EĞİTİM

ÖĞRENİM DÖNEMİ	DERECE (*)	ÜNİVERSİTE	ÖĞRENİM ALANI
2004		İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ	TIP FAKÜLTESİ

3. MESLEKTE DENEYİM

GÖREV DÖNEMİ	GÖREV TÜRÜ	KURULUŞ
2009-	Arş. Grv .Dr.	İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ABD /MALATYA
2007-2008	Kurum Hekimliği	MALATYA E TİPİ KAPALI CEZAEVİ/MALATYA
2005-2007	Pratisyen Hekim	KEPEZ SAĞLIK OCAĞI/MALATYA