

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**KARBON TETRAKLORÜR İLE KARACİĞER HASARI
OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA ELLAGİK ASİTİN BAZI
APOPTOTİK PROTEİNLERİN İFADESİNE ETKİSİ**

Özlem GÖK

Yüksek Lisans Tezi

**Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Orhan ERMAN**

KASIM-2017

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KARBON TETRAKLORÜR İLE KARACİĞER HASARI OLUŞTURULMUŞ
SIÇANLARDA ELLAGİK ASİTİN BAZI APOPTOTİK PROTEİNLERİN İFADESİNE
ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Özlem GÖK

(142110101)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 7 Kasım 2017

Tezin Savunulduğu Tarih: 23 Kasım 2017

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Orhan ERMAN (F.Ü.)
Diğer Jüri Üyeleri: Doç. Dr. Abdullah ASLAN (F.Ü.)
Yrd. Doç. Dr. Can Ali AĞCA (B.Ü.)

KASIM-2017

ÖNSÖZ

Bu yüksek lisans tezinde, sıçanlarda karbon tetraklorür ile karaciğer hasarı oluşturulmuş ve ellagik asit verilerek bu ekstraktın sıçanlar üzerinde deneysel olarak etkileri incelenmiştir.

Tez çalışmasının oluşumunda bana her zaman yol gösteren, gerek lisans, gerekse yüksek lisans öğrenimim süresince desteğini ve yardımlarını hiçbir zaman benden esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım tez danışmanım ve değerli hocam Sayın Prof. Dr. Orhan ERMAN'a; tez çalışmamın planlanması, yürütülmesi ve sonuçlandırılmasında bana her türlü desteği sağlayan, laboratuvar olanaklarını sunan, büyük bir sabırla ve çabayla çalışmamla ilgilenen, bilgi ve deneyimlerini bana aktaran Sayın Doç. Dr. Abdullah ASLAN hocama en içten teşekkür ve saygılarımı sunarım. Çalışmamıza değerli katkılarından dolayı Sayın Yrd. Doç. Dr. Tuncay KULOĞLU ve çalışma ekibine; bu çalışmaya maddi destek sağlayan Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi'ne (FÜBAP, F.F. 16.42); çalışmamızın deney hayvanları aşamasını yürüttüğümüz FÜDAM'ın değerli çalışanlarına ve Fırat Üniversitesi Biyoloji Bölümü'ndeki değerli hocalarıma teşekkür ediyorum.

Eğitimim boyunca bana her zaman ve her konuda destek olan, aileme de sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bu çalışmayı FF.16.42- FÜBAP nolu proje ile destekleyen Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimine teşekkür ederiz.

Özlem GÖK

Elazığ- 2017

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER	III
ÖZET.....	V
SUMMARY	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	VII
TABLolar LİSTESİ.....	VIII
SEMBOLLER VE KISALTMALAR.....	IX
1. GİRİŞ	1
1.1. Karaciğerin Histolojik ve Fizyolojik Özellikleri	2
1.2. Karbon Tetraklorürün Genel Özellikleri ve Etki Mekanizması.....	6
1.3. Ellagik Asit ve Antioksidan Özellikleri	8
1.4. Apoptozis	11
1.5. Apoptotik Markerlar (Kaspaz-3 ve Bcl-2).....	14
1.6. Katalaz	16
1.7. Lipit Peroksidasyonu	18
2. MATERYAL ve METOD	19
2.1. Materyal	19
2.1.1. Kimyasal Maddeler ve Ellagik Asit	19
2.2. Metod	19
2.2.1. Hayvan Materyali ve Araştırma Grupları	19
2.2.2. Karbon Tetraklorür Hazırlanması ve Uygulanması	20
2.2.3. Ellagik Asit Hazırlanması ve Uygulanması	20
2.2.4. Karaciğer Dokusu MDA Ölçümleri.....	20
2.2.5. Plazma MDA Ölçümleri	21
2.2.6. MDA Ölçümleri için Standart Eğri Çizimi	21
2.2.7. Western Blotlama Çalışması için Doku Homojenizasyonu	21
2.2.8. SDS-PAGE ve Western Blotlama Tekniği ile Proteinlerin Analizi.....	22
2.2.8.1. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrophorezi (SDS-PAGE) ..	22
2.2.8.2. Western Blotlama ile Protein Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi ..	23
2.2.9. Katalaz Aktivite Tayini	25

2.2.10.	Kaspaz-3 ve Bcl-2 Proteinlerinin Analizi	25
2.2.11.	TUNEL Metoduyla Apoptozis Miktarının Tespiti	25
2.2.12.	İstatistiksel Analizler	27
3.	BULGULAR.....	28
3.1.	Canlı Ağırlık Değişimi.....	28
3.2.	MDA Ölçüm Sonuçları	29
3.3.	Katalaz Ölçüm Sonuçları	31
3.4.	TUNEL Metoduyla Belirlenen Histolojik Sonuçlar	32
3.5.	Kaspaz-3 ve Bcl-2 Proteinlerinin Ekspresyon Düzeyleri (Apoptotik Markerlar)	35
4.	SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	37
	KAYNAKLAR	46
	EKLER.....	62
	ÖZGEÇMİŞ.....	63

ÖZET

Ellagik asit (EA); özellikle karaciğer üzerinde koruyucu etkileri olan güçlü bir antioksidandır. Karbon tetraklorür (CCl₄) ile sıçanlarda oluşturulan karaciğer hasarına karşı, EA'nın koruyucu bir rolünün olup olmadığının araştırıldığı bu tez çalışmasında, 36 adet Wistar albino (n=36, 8 haftalık) sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar 4 gruba ayrılmış ve her grupta 9 sıçan yer almıştır. Gruplar: (i) Kontrol Grubu: Standart diyet; (ii) EA Grubu: Standart diyet + EA verilen grup; (iii) CCl₄ Grubu: Standart diyet + CCl₄ verilen grup; (iv) CCl₄ + EA Grubu: Standart diyet + CCl₄ + EA verilen grup. Hayvanlar 8 hafta sonra dekapite edilerek karaciğer dokuları incelenmiştir. Karaciğer dokusunda kaspaz-3 ve bcl-2 ekspresyon düzeyleri Western blotlama tekniğiyle, lipid peroksidasyonu MDA (malondialdehit) analizleri ve katalaz düzeyi spektrofotometre ile belirlenmiştir. EA uygulamasının, CCl₄ + EA grubunda, CCl₄ grubuna göre kaspaz-3 ve bcl-2 ekspresyonları bakımından anlamlı bir fark oluşturduğu bulunmuştur (p<0.05). EA uygulamasıyla kaspaz-3 ekspresyon düzeyleri artış, bcl-2 ekspresyon düzeyleri azalış göstermiştir. TUNEL metodu incelemelerinde, CCl₄ + EA grubunda CCl₄ grubuna göre apoptotik indeks oranının daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar, EA'nın Wistar albino sıçanlarda karaciğer hasar oranını azalttığını ve EA uygulamasının insanlarda da karaciğer hasarını önleyici etkisinin olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Ellagik Asit, Karaciğer, Apoptozis, Kaspaz-3, Bcl-2.

SUMMARY

The Effect of Ellagic Acid on Some Apoptotic Proteins Expression in Liver of Rats Experimentally to Made up Damage with Carbon Tetrachloride

Ellagic acid (EA) is a strong antioxidant matter having protecting effect particularly on the liver. The aim of this study was to examine whether EA plays a protective role against the damage in the liver by administering carbon tetrachloride (CCl₄) to rats. In study, 36 male Wistar albino (n=36, 8 weeks old) rats have been used. Animals were divided into four groups, and 9 rats involved in each group. The groups were: (i) Control Group: Standard diet; (ii) EA Group: Standard diet + EA; (iii) CCl₄ Group: Standard diet + CCl₄; (iv) CCl₄ + EA Group: Standard diet + CCl₄ + EA. After 8 weeks, the rats were decapitated and the liver tissue were examined. Hepatic tissue caspase-3 and bcl-2 expression levels were determined by Western blotting techniques, lipid peroxidation by MDA analysis and catalase level by spectrophotometer method. EA application, in CCl₄ + EA group, compared to CCl₄ group, caspase-3 and bcl-2 expression creates a significant difference ($p < 0.05$). Caspase-3 expression level increased, but bcl-2 expression level was decreased through the application of EA. The rate of apoptotic index was observed decrease in CCl₄ + EA group than CCl₄ group at TUNEL assay examinations. These results shows that EA reduce the rate of liver damage at Wistar albino rats and these findings will be guiding in research of inhibitory effect of liver damage of humans like rats.

Key Words: Ellagic Acid, Liver, Apoptosis, Caspase-3, Bcl-2.

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.1. Karaciğerin segmenter anatomisi	3
Şekil 1.2. Karaciğerin şematik gösterimi	5
Şekil 1.3. CCl ₄ 'ün CCl ₃ O ₂ radikaline dönüşümü	7
Şekil 1.4. Ellagik asitin kimyasal yapısı (C ₁₄ H ₆ O ₈).....	8
Şekil 1.5. Ürolithinlerin yapısal formülleri.....	9
Şekil 1.6. Apoptozis geçiren bir hücre	12
Şekil 1.7. Apoptozise uğrayan hücrede görülen değişimler	13
Şekil 3.1. Çalışma gruplarının bakım odası	28
Şekil 3.2. Gruplarda görülen bitiş canlı ağırlık oranları	29
Şekil 3.3. MDA standart eğrisi	30
Şekil 3.4. Gruplarda plazma MDA düzeyleri ve karşılaştırılması	30
Şekil 3.5. Gruplarda karaciğer dokusu MDA düzeyleri ve karşılaştırılması	31
Şekil 3.6. BSA standart eğrisi	31
Şekil 3.7. Gruplarda katalaz aktivitesi	32
Şekil 3.8. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu sinüzoidal hücrelerde TUNEL pozitif hücreler (→) Skala bar: 5µm.....	32
Şekil 3.9. EA grubuna ait karaciğer dokusu sinüzoidal hücrelerde TUNEL pozitif hücreler (→).	33
Şekil 3.10. CCl ₄ grubuna ait karaciğer dokusu sinüzoidal hücrelerde TUNEL pozitif hücreler	33
Şekil 3.11. CCl ₄ grubuna ait karaciğer dokusu hepatositlerde TUNEL pozitif hücreler.....	34
Şekil 3.12. CCl ₄ + EA grubuna ait karaciğer dokusu sinüzoidal hücrelerde TUNEL pozitif hücreler (→).	34
Şekil 3.13. Gruplarda kaspaz-3 ekspresyon düzeyleri	35
Şekil 3.14. Gruplarda bcl-2 ekspresyon düzeyleri	36

TABLÖLAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Araştırma grupları (n=9)	19
Tablo 2.2. TUNEL boyama prosedürü	26
Tablo 3.1. Gruplarda başlangıç ve bitiş canlı ağırlıkları	28
Tablo 3.2. Çalışma gruplarında elde edilen plazma ve karaciğer doku MDA düzeyleri	29
Tablo 3.3. Katalaz aktivite sonuçları	31
Tablo 3.4. TUNEL metoduyla belirlenen apoptotik indeks (%)	35

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

Apaf-1	: Apoptozla İlgili Faktör-1
CA	: Canlı Ağırlık
CCl₃	: Triklorometil Radikali
CCl₃O₂	: Proxy Triklorometil Radikali
CCl₄	: Karbon Tetraklorür
ConA	: Concanavalin
DAB	: 3,3'-Diaminobenzidin Tablet
DEN	: Dietilnitrosamin
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DT	: Domates Tozu
EA	: Ellagik Asit
ET	: Ellagitanin
FFO	: Taze Balık Yağı
FÜDAM	: Fırat Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi
GCIR	: Global Serebral İskemi
GEN	: Gentamisin
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HUVECs	: İnsan Umbilikal Ven Endotel Hücreleri
MDA	: Malondialdehit
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa B
OFO	: Okside Balık Yağı
oxLDL	: Okside Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SAB	: Örnek Uygulama Tamponu
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Ploiakrilamid Jel Elektroforezi
TBA	: Tiyoarbitürik Asit
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktörü-α
TUNEL	: Terminal Deoksinükleotidil Transferaz dUTP Çentik Uç Etiketleme
UA	: Ürolithin A

UB : Ürolithin B
UC : Ürolithin C
UD : Ürolithin D



1. GİRİŞ

Karın boşluğunun en büyük ve vücudumuzun da en önemli organlarından biri karaciğerdir (Arıncı ve Elhan, 2006). Karaciğerin detoksifikasyon, protein sentezi ve sindirim için gerekli kimyasalların üretimi gibi birden fazla işlevi vardır. Ayrıca, karaciğer vücudun toksik kimyasal maddelere duyarlı en savunmasız organıdır (Yoshioka vd., 2016). Karaciğer toksik maddelere detoks yapabilir ve yararlı olanları sentezleyebilir. Hepatotoksik ajanlar karaciğeri esas işlevlerinden yoksun bıraktıklarından çok ciddi hasarlara neden olabilirler (Al-Dbass vd., 2012). Bu hasarların başlıca nedeni farklı çevre kirleticilerine, parasetamol, karbon tetraklorür, tiyoasetamid ve alkol gibi ksenobiyotiklere maruz kalmasından kaynaklanmaktadır. Bu ksenobiyotik bileşikler, esas olarak kovalent bağlanma ve lipid peroksidasyonu ile reaktif oksijen türlerini (ROS) üreterek karaciğer hasarına neden olmaktadır (Sreelatha vd., 2009; Lien vd., 2017). Bu kimyasal hepatotoksinlerin arasında CCl_4 ; insan siroz gelişimine benzerliğinden dolayı sıçan karaciğerinde, toksisite oluşturmada yaygın olarak kullanılmaktadır (Niu vd., 2016; Lien vd., 2017). CCl_4 ; metilize olduğunda reaktif serbest radikaller olan triklorometil radikali (CCl_3) ve bir proxy triklorometil radikali (CCl_3O_2) üretmektedir (Lien vd., 2017). CCl_4 , oluşturduğu bu serbest radikallerle lipid peroksidasyonunun tespit edilmesinde ayrıca olarak kullanılan MDA seviyesinde artışa yol açmaktadır (Al-Dbass vd., 2012; Can, 2014; Boydak, 2015).

Modern tıpta yapılan muazzam ilerlemelere rağmen, karaciğer fonksiyonlarını uyaran, karaciğerde hasarın korunmasını sağlayan veya hepatositlerin yenilenmesine yardımcı olan çok az ilaç bulunmaktadır. Bu yüzden bitkisel ilaçlar son zamanlarda güvenilirlik, etkililik ve maliyet düşüklüğü nedeniyle önem ve popülerlik kazanmıştır (Arora vd., 2015). Geleneksel tedaviler yerine doğal antioksidan kullanımı, hepatotoksisite için etkili ve güvenli alternatif tedavi olarak düşünülmektedir (Ranawat vd., 2010; Garcia-Nino ve Zazueta, 2015). Son yıllarda yapılan çalışmalar da karaciğer toksisitesi ve hastalığına karşı göstermiş olduğu farmakolojik özellikleri sebebiyle EA dikkat çekmektedir. Özellikle sıçanlar ile yapılan araştırmalarda karaciğerin fonksiyonunu bozan çeşitli maddelere karşı EA'nın koruyucu etkileri görülmüştür (Garcia-Nino ve Zazueta, 2015). Ayrıca, yapılan çalışmalarda EA'nın kanser, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar da dâhil olmak üzere birçok oksidatif hasara bağlı kronik hastalıklara karşı da faydalı etkileri olduğu belirlenmiştir (Dalvi vd., 2017).

Bu yüksek lisans tezinde, sıçanlar üzerinde karaciğer hasarı oluşturulup, meydana gelen bu hasara karşı EA'in koruyucu etkisi araştırılmış, karaciğer dokusunda meydana gelen değişiklikler moleküler, biyokimyasal ve histolojik olarak değerlendirilmiştir.

1.1. Karaciğerin Histolojik ve Fizyolojik Özellikleri

Karaciğer vücudun en büyük iç organıdır. Erişkinlerde vücut ağırlığının yaklaşık % 2'si kadardır. Kadınlarda yaklaşık 1400 gr, erkeklerde 1800 gr'dır (Garcia-Nino ve Zazueta, 2015). Vücudun sağ tarafında, karın boşluğunun üst tarafında, diyaframın altında yer almaktadır (Yıldırım, 2004; Başaran, 2010). Karaciğerin sağ bölümünün büyük bir bölümü, kaburgalar tarafından örtülmektedir. Karaciğeri, arka tarafta mide ve bağırsaklar örtmekte, üstte ise akciğere komşu olarak yer almaktadır. Karın zarındaki bağlar hariç, karın içi basıncı sayesinde ise yerinde tutulmaktadır (Danjolli, 2015).

Darbelerde dalaktan sonra ikinci sırada yırtılabilirlik özelliği olan karaciğerin, kırmızı-kahverengi bir görüntüsü vardır (Yıldırım, 2004; Arıncı ve Elhan, 2006; Kuloğlu, 2013; Danjolli, 2015). Safra salgılaması, vitamin depolaması, lipit metabolizması, glikoliz ve ilaçların detoksifikasyonu gibi hayati fizyolojik işlevlerin düzenlenmesi gibi birçok fonksiyonu bulunmaktadır (Arora vd., 2015; Al-Dbass vd., 2012).

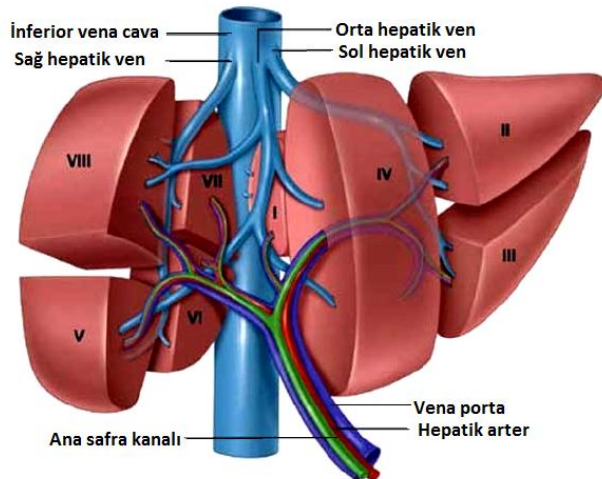
Karaciğerin iki kenarı ve iki yüzü bulunmaktadır. Karaciğer dokusunun dış tarafı bağ dokudan oluşmuş ince bir zarla sarıdır. Bu zara glisson kapsülü denilmektedir. Karaciğerin üst yüzü kubbe şeklinde ve diyaframa yapışıktır. Diyaframa yapışık ve konveks olan bu yüzüne facies diafragmatica denilmektedir. Facies diafragmatica peritonla örtülüdür. Az bir kısmı periton ile örtülü olmayıp diyaframa gevşek bağ dokusu ile bağlanmaktadır. Bu alana area nuda denilmektedir. Karaciğerin alt yüzü karın organlarının üstüne oturmuştur. Karaciğerin karın boşluğu ile komşu olan, organlara bakan alt yüzüne facies visceralis adı verilmektedir. Bu yüz kolon, sağ böbrek, sağ böbrek üstü bezi, 12 parmak bağırsağı ve mide ile komşuluk etmektedir. Bu yüzün ortalarında porta hepatis denilen büyük bir geçit bulunmaktadır. Porta hepatisin her iki yanında, arka kenardan ön kenara doğru sagittal yönde uzanan H harfi seklinde oluklar bulunmaktadır. Sağ taraftaki oluk daha geniş ve sulcus sagittalis dexter, sol taraftaki oluk ise bir yarık seklinde olup fissura sagittalis sinister adını almaktadır. Karaciğerin ön kenarı ince, arka kenarı ise kalın ve künттür. Facies diafragmatica ile facies visceralis arasında arka tarafta oluşan kenara margo posterior, facies diafragmatica

ile facies visceralis arasında ön tarafta oluşan kenara ise margo inferior denilmektedir (Arıncı ve Elhan, 2006; Kuloğlu, 2013; URL-1, 2017).

Karaciğer biri büyük (Lobus hepatis dexter) ve diğeri küçük (Lobus hepatis sinister) olmak üzere başlıca iki lobdan oluşmaktadır. Ön ve üst yüzde bu iki lobu birbirinden ligament falciforme hepatis ayırır. Facies visceralis de bulunan H harfi şeklindeki oluklar karaciğeri 4 loba ayırır. Sulcus sagittalis dextra'nın sağ tarafında kalan bölüme lobus hepatis dexter, fissura sagittalis sinistra'nın solunda kalan bölümüne ise lobus hepatis sinister denir. Bu iki oluk arasında ve porta hepatis'in önünde kalan kısma lobus quadratus, arkasında kalan kısma ise lobus caudatus adı verilir (Arıncı ve Elhan, 2006; Kuloğlu, 2013).

- **Lobus Hepatis Dexter:** Sol lobdan 6 defa daha büyüktür ve tüm karaciğerin 5/6'sını oluşturur. Sağ ve sol lobun sınırını diyaframatik yüzde ligament falciforme hepatis, visseral yüzde ise fissura sagittalis sinistra belirler.
- **Lobus Hepatis Sinister:** Sağ lobdan daha küçük ve yassıdır. Tüm karaciğerin 1/6'sını oluşturur. Biraz konveks olan üst yüzü diyafram ile konkav olan alt yüzü ise mide ile komşudur.
- **Lobus Quadratus:** Sağ lobun visseral yüzünde ve porta hepatis'in ön tarafında bulunur.
- **Lobus Caudatus:** Sağ lobun visseral yüzünde ve porta hepatis'in arka tarafında göğüs omurları hizasında bulunur (Arıncı ve Elhan, 2006).

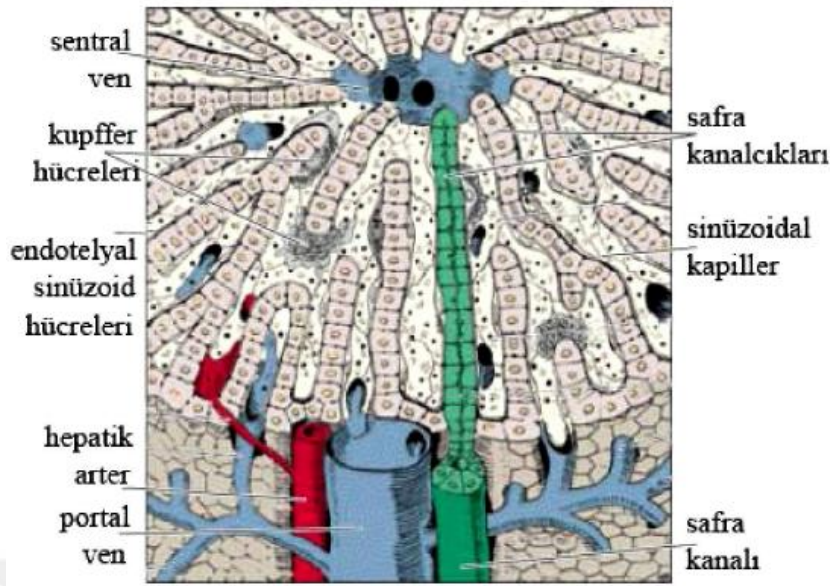
Karaciğer sağda ve solda da 4'er segmente ayrılmıştır (Şekil 1.1). Karaciğerin segmental anatomisi rezeksiyonu açısından ve fonksiyonel olarak birbirinden bağımsız olup, sağ lobda sırası ile 5., 6., 7. ve 8. segmentler, sol lobda ise 1., 2., 3. ve 4. segmentler yer almaktadır (Altıntaş, 2012; Bıçakcıoğlu, 2014; Yavuz, 2016).



Şekil 1.1. Karaciğerin segmenter anatomisi (Bıçakcıoğlu, 2014; Şayan, 2014).

Karaciğer dokusunda 5 tip hücre bulunmaktadır. Bunlar hepatositler, endotel hücreleri, kupffer hücreleri, stellat hücreleri ve safra kanalı epitel hücreleridir (Tür, 2008). Tüm hücre türlerinin % 80'ini hepatositler oluşturmaktadır. Hepatositler, karaciğerin en küçük hücreleridir. Polihedral, 6 veya daha fazla yüzeyli, 20-30 µm çapında, çok sayıda mitokondri ve bir miktarda granülsüz endoplazmik retikulum bulunan ve eozinofilik boyanan hücrelerdir. Yaşam süreleri yaklaşık olarak 150 gündür. Çoğunluğu bir nükleuslu olmasına rağmen % 25'lik kısmı iki nükleus taşımaktadırlar. Granüllü ve granülsüz endoplazmik retikulumlar açısından oldukça zengindirler. Karaciğerin sahip olduğu fonksiyonların büyük kısmı hepatositler tarafından yerine getirilmektedir. Sindirim kanalından emilen besinlerin işlenmesi, depolanması, zararlı olanların detoksifiye edilerek dolaşıma katılması hepatositler tarafından gerçekleştirilmektedir. Hepatositler, karaciğer lobülü içerisinde ışınsal tarzda dizilmişlerdir. Plaklarının arasındaki boşlukta kapillerler bulunmakta ve bu kapillerlere karaciğerin sinüzoidleri denilmektedir. Sinüzoidler lobülün periferinde görülmeye başlanmaktadır. Sinüzoid ve hepatositlerin bazolateral bölgeleri arasında bulunan disse aralığı, hepatositler ve kan arasında bir alışverişe imkân sağlamaktadır. Hepatositin emme görevi disse aralığına dek uzanan mikrovilluslarla arttırılmaktadır. Bu alanda kollajen lifler bulunmaktadır (Kierszenbaum, 2006; Tür, 2008; Kuloğlu, 2013; Şahin 2015; Danjolli, 2015; Yavuz, 2016).

Karaciğerde bulunan ve endotelial sistemin bir bölümünü oluşturan kupffer hücreleri özelleşmiş makrofajlardır. Değişime uğramış olan bir fagositik hücre olup, monositlerden köken almaktadır. Peroksidaz reaksiyonu göstermeleri sebebiyle endotel hücrelerinden kolayca ayırt edilebilmektedirler. Fagosit edilen mikroorganizmaları ve yabancı cisimleri yok eden lizozom içermektedirler. Antijen hücre olarak görev yapmaktadırlar. Sinüzoidal lümen içerisinde yer almaktadırlar. Endotelial duvarın geniş alanını kaplamaktadırlar (Tür, 2008; Kuloğlu, 2013). Hepatositler arasında bulunan, disse aralığına yerleşmiş yıldızlı hücreler olan ito hücrelerine 'yağ depolayıcı hücreler' veya 'stellat hücreler' denilmektedir. Bu hücreler mezenşimal kaynaklı olup, yağ içerirler ve vitamin A'nın metabolizması ve depolanmasında rol oynamaktadırlar (Şekil 1.2). Endotel karaciğer sinüzoidini çevrelemektedir. Endotel hücrelerinin, süreklilik göstermeyen bir bazal lamina ile ilişkili olan pencereci bir sitoplazması vardır (Kierszenbaum, 2006; Kuloğlu, 2013; Can, 2014; Yavuz, 2016).



Şekil 1.2. Karaciğerin şematik gösterimi (Bilgiç, 2011).

Karaciğere kan, iki kan damar vasıtasıyla gelmektedir. Birincisi portal ven (gelen kan hacminin % 75 ile % 80'i), sindirim yolu, dalak ve pankreastan gelen kanı taşımaktadır. İkincisi ise hepatik arter, oksijenlenmiş kanın % 20 ile % 25'ini portal alana ulaşmadan önce karaciğere ulaştırır. Portal ven ve hepatik arterin dallarından gelen kan, karaciğer lopçuklarının sinüzoidlerinde birbirlerine karışmaktadırlar. Sinüzoid içerisindeki kan, karaciğer lopçuğunun merkezi venülünde toplanır. Merkezi venüller birleşerek sublobüler venleri oluştururken kan, toplayıcı venlerin ve hepatik venlerin yolunu izleyerek inferior vena cava'ya geri döner. Sağ ve sol hepatik safra kanalları karaciğerden çıkarlar. Daha sonra bunlar birleşerek hepatik kanalı oluştururlar. Hepatik kanal ortak safra kanalını oluşturmasının hemen ardından, safra kanalını safra kesesine bağlayan ince bir tüp niteliğindeki sistik kanalı oluşturur (Kierszenbaum, 2006).

Karaciğer, kana emilen besin maddelerinin bir bölümünü değiştirerek depo eder ve sonra kullanılmasını sağlar. Örneğin; karaciğer glikozu glikojen halinde depo ederek, gerektiğinde tekrar glikoz halinde kana vermektedir. Karaciğer vücut için zararlı olan cinsel hormonların fazlasını yok etmektedir. Gama globülinlerin bir bölümü dışında hemen bütün plazma proteinleri, karaciğer hücrelerinde yapılırlar. Bu plazma proteinlerinin % 90'ıdır. Geri kalan gama globülinler antikorlardır ve başlıca lenfatik dokulardaki plazma hücrelerinde yapılırlar. Kanın pıhtılaşmasında rol oynayan proteinlerin çoğu kanın damarlarda dolaşırken pıhtılaşmasını önleyen heparin ile kanın damardan çıktıktan sonra

pihtılaşmasını gerçekleştiren protrombin maddelerini karaciğer üretmektedir. Karaciğer A, D, E, K ve B₁₂ vitaminlerinin ana deposudur (Başaran, 2010; Yılmaz, 2010).

Karaciğerde sentezi yapılan kolesterolün yaklaşık % 80'i safra tuzlarına çevrilerek safraya salgılanır. Geri kalanı lipoproteinler içinde kanla vücudun tüm doku hücrelerine taşınır. Fosfolipitler de karaciğerde aynı şekilde sentez edilerek başlıca lipoproteinler içinde taşınırlar. Kolesterol ve fosfolipitler hücrelerde zarların, hücre içi yapıların oluşumunda ve hücre işlevleri için önemli olan kimyasal maddelerin yapımında kullanılır. Vücutta karbonhidrat ve proteinlerden yağ sentezi büyük ölçüde karaciğerde gerçekleşir. Karaciğerde sentezi yapılan yağ, lipoproteinler içinde taşınarak yağ dokusunda depo edilir. Karaciğer üre oluşumuyla vücut sıvılarından amonyağı uzaklaştırır. Karaciğerin üre yapımı ile ilgili işlevi bozulduğunda, plazma amonyak konsantrasyonu hızla bir şekilde yükselir ve hepatik koma ile ölüm görülür. Karaciğer kan akımı hızla azaldığında çok miktarda amonyak kanda birikerek toksik bir durum yaratır (Guyton ve Hall, 2013).

1.2. Karbon Tetraklorürün Genel Özellikleri ve Etki Mekanizması

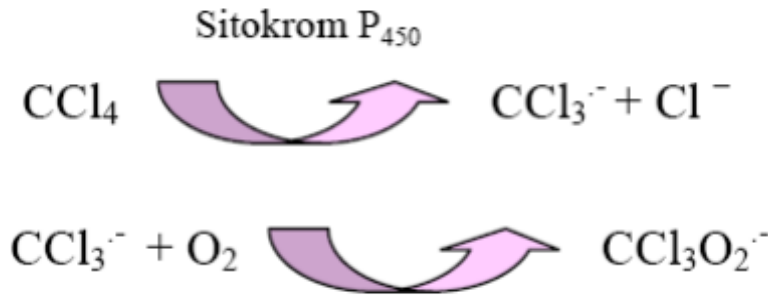
CCl₄, serbest radikaller üreten ve akut hepatik hasar oluşturmak üzere yaygın olarak deneysel hayvan modellerinde kullanılan güçlü hepatoksik kimyasaldır (Çetin vd., 2016). Deneysel çalışmalarda birçok etken ile birlikte karaciğer hasarı meydana getirilebilmesine ek olarak, insandaki siroz gelişim aşamasına benzerliğinden dolayı en sık tercih edileni ve kullanılanıdır (Can, 2014). Deneysel olarak indüklenmiş karaciğer hasarı, karaciğer fibrozu ve karaciğer yetmezliği oluşturmak için hayvan modellerinde kapsamlı bir şekilde uygulanmaktadır (Niknahad vd., 2016). Ayrıca böbrek, testis, kalp, akciğer, beyin ve diğer dokularda da toksik etkisinin olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (Emek, 2014).

CCl₄ yoğun, renksiz ve yanıcı olmayan bir sıvıdır. Düzgün tetrahedron molekül yapısına sahiptir. Suda çözünmez, alkol gibi apolar çözücülerde çözünür. İçme suyu dezenfektanı olarak kullanılan klorun bir kirleticisidir. Yangın söndürücülerin önemli bir bileşenidir (Can, 2014; Boydak, 2015; Sun vd., 2017; URL-2, 2017).

CCl₄, solunum, yutma veya deri yolu ile vücuda kolayca alınabilmekte ve mide-barsak kanalından hızlı bir şekilde emilmektedir. CCl₄'ün yaklaşık olarak % 4'ü nefesle dışarı verilmektedir. Diğer kısmı da protein ve hücre içi moleküllerle etkileşime girmektedir (Tanrıverdi, 2005; Göksu, 2012; Aslan ve Can, 2014; Boydak, 2015). Düşük dozda alınması karaciğerin yanı sıra merkezi sinir sistemi, böbrek ve diğer dokularda akut hasara neden

olurken, yüksek dozda alınması ise bilinç kaybına ve hatta ölüme neden olmaktadır (Sun vd., 2017).

CCl_4 'ün toksik etkilerinden karaciğerin biyotransformasyonu sonucu oluşan triklorometil radikali sorumludur (Çetin ve Çetin, 2011). CCl_4 , önce endoplazmik retikulumdaki sitokrom P-450'nin enzimatik indirgemesi ile $\text{CCl}_3\cdot$ 'e metabolize edilir ve daha sonra oksijen varlığında $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$ 'ye dönüştürülür (Şekil 1.3). CCl_4 'ün bu reaktif serbest radikal ürünleri, çoklu doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girebilir. Ayrıca, antioksidan enzimlerin aktivitelerini azaltarak biyolojik membranda lipid peroksidasyonunu tetikleyen reaktif oksijen türlerinin üretimine de neden olabilir (Karaman vd., 2017; Hamid vd., 2017). Dolayısıyla, CCl_4 kalsiyum iyonunun plazma membranında geçirgenliğini de artırarak kalsiyum homeostazında ciddi bozulmalara ve sonuçta nekrotik hücre ölümüne de sebep olabilir (Al-Asmari vd., 2015).



Şekil 1.3. CCl_4 'ün CCl_3O_2 radikaline dönüşümü (Emek, 2014).

Karbon tetraklorürün toksisitesi biyokimyasal ve hücre organelleri düzeyinde etkisini göstermektedir. Endoplazmik retikulum, plazma membranı, mitokondri ve golgi aygıtı gibi organeller CCl_4 uygulaması sonucu etkilenen hepatositlere ait hücresel yapılardır (Baran, 2014).

CCl_4 sentrilobüler nekroz (bir karaciğer nekrozu) ile karakterize edilen hepatosit hasarına neden olmaktadır (Al-Asmari vd., 2015; Lien vd., 2017). Güçlü bir hepatotoksindir ve karaciğer hastalıklarını iyileştirici ilaçların karakterizasyonu için kullanılmaktadır. CCl_4 'ün hepatotoksisitesi, karaciğer hasar belirleyici enzimlerin (AST, ALT, APT ve bilirubin) yükselmesi, dokulardaki myeloperoksidaz (MPO) aktivitesinde artış, vücut ağırlığındaki azalma ve histopatolojik anomaliler ile ortaya çıkmaktadır (Al-Asmari vd., 2015; Singh vd., 2017).

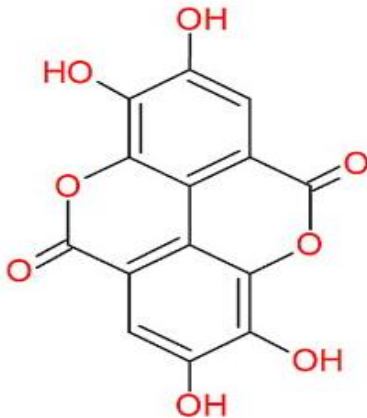
Nükleer faktör kappa B'nin (NF- κ B) ve tümör nekroz faktörü- α (TNF- α)'nın ekspresyonunu artırır. Buna ek olarak, CCl_4 transformasyon büyüme faktörü- β 1'in (TGF-

β 1) düzeyini arttırarak stellat hücrelerin aktivasyonu yoluyla hücre dışı matris proteinlerinin çökmesini sağlar. Bunu takiben fibroblastlar üretilir ve hepatik fibrozise veya hepatoselüler karsinomaya neden olur. Sonuçta ise karaciğer yetmezliği ortaya çıkar (Singh vd., 2017).

Sperm hareketliliği ve konsantrasyonunda azalmaya, anormal sperm sayısında artışa, sperm sayısında azalmaya, germinal hücrelerde hasara ve spermatogenik hücrelerde dejenerasyona da sebep olmaktadır (Emek vd., 2017). Tüm doku ve organlara dağılarak karaciğerin mikrozomal enzimlerinde değişime neden olmaktadır. Böylece aminoasit salınımının bozulmasını sağlayarak, protein sentezini azaltmaktadır. Yapılan çalışmalarda, CCl_4 'ün karaciğer hasarı oluşturmak için mükemmel bir model oluşturduğu görülmüştür (Uzun, 2014).

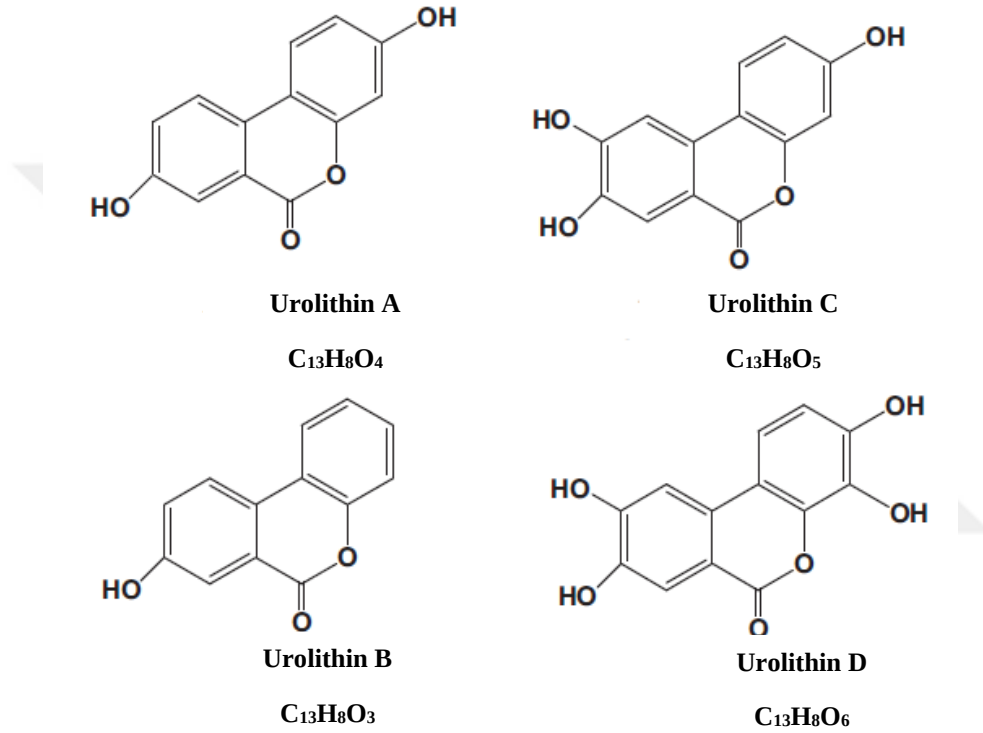
1.3. Ellagik Asit ve Antioksidan Özellikleri

EA; çilek, ahududu, nar, siyah kuş üzümü, ceviz gibi birçok meyvede ellagitanin (ET) adı verilen, hidrolize edilebilir tanen formda bulunan, doğal olarak meydana gelen bir polifenolik bileşimdir (Garcia-Nino ve Zazueta, 2015; Liang vd., 2016). EA, gallik asitin bir dimerik formudur. Dört hidroksil grup, bir hidrofilik parça ile temsil edilen iki lakton halkası ile kaynaşmış dört halka yapısı ihtiva etmektedir (Şekil 1.4) (Montes vd., 2016; Bulani vd., 2016). Hidroksil grubunun, lipid peroksidasyonunda antioksidan aktiviteyi arttırdığı ve hücreleri oksidatif hasardan koruduğu bilinmektedir (Hussein ve Khalifa, 2014).



Şekil 1.4. Ellagik asitin kimyasal yapısı ($\text{C}_{14}\text{H}_6\text{O}_8$) (Garcia-Nino ve Zazueta, 2015).

EA, ürolithin halinde bağırsak mikrobiyotası tarafından metabolize edilmektedir. EA ve ürolithin karışımı insan kolon epitelyumu ve çevresinde yüksek μM (mikromolar) konsantrasyonlara ulaşabilmektedir. Bu metabolitlerin nitel varlığı bağırsak mikrobiyolojisi metabolik aktivitesine bağlı olarak değişmektedir (Núñez-Sanchez vd., 2016). Bugüne kadar araştırılan türlerde (insan dâhil), ürolithin A (UA) ürolithin B (UB), ürolithin C (UC) ve ürolithin D (UD), hem ET'lerin hem de EA'in son ürünü olduğu düşünülen ölçülebilir metabolitler olduğu görülmüştür (Şekil 1.5) (Tang vd., 2017).



Şekil 1.5. Ürolithinlerin yapısal formülleri (Bayle vd., 2016).

Ürolithinler; EA'in lakton halkalarından birinin açılması, dekarboksilasyonu ve hidroksillerin farklı konumlardan sırayla çıkarılmasıyla üretilirler. EA'in dönüşümü jejunumda (ince bağırsağın 2/3'lük kısmı) başlar ve üretilen ilk metabolit UD'dir. UD; dört fenolik hidroksil grubunu tutar, gastrointestinal sistem boyunca hidroksil gruplarının ardışık olarak ortadan kaldırılmasıyla devam eder. Kolonun distal kısımlarında UC, UA ve son olarak UB'nin üretilmesine yol açar. Son zamanlarda ürolithinlerin biyolojik aktiviteleri ile ilgili yapılan çalışmalarda ürolithin A, C ve D'nin trigliserit birikimini azalttığı ve hepatositlerin yanı sıra yağ hücrelerinin oksidasyonunu arttırdığı görülmüştür. Ayrıca, oksidatif stresle ilişkili insülin sekresyonundaki bozulmayı da önledikleri belirtilmiştir

(Bayle vd., 2016). Doku inceleme çalışmaları ürolithinlerin farelerde prostat, bağırsak ve kolon dokularında fazla oranda olduğunu ortaya koymaktadır. (Landete, 2011).

Vücut hücreleri sıklıkla farklı endojen ve ekzojen ajanlara maruz bırakılmaktadır. ROS bu maruziyet yüzünden üretilmektedir. Son yıllarda EA, reaktif oksijen türlerini etkisiz hale getirme yeteneği uyguladığından tıpta ve gıda biliminde daha fazla ilgi görmektedir (Valipour vd., 2017). Çalışmalar EA'nın oksidatif stresin oluşturduğu olumsuz etkileri antioksidan etkisiyle engellediğini, DNA ve hücre zararlarını azalttığını göstermektedir (Baeeri vd., 2017).

Antimutajen, antigenotoksik, antiapoptotik, antikarsinojenik, antibakteriyel, antivirütik, antisıtma, antialerjik, antiinflamatuvar, antiaterojenik, antidiyabetik, antiepileptik, antidepresan, antianksiyete, böbrek ve karaciğer koruyucu özellikleri bulunmaktadır (Garcia-Nino ve Zazueta, 2015; Liang vd., 2016).

Son on yılda antitümör aktivitesi hakkında umut verici kanıtlar birikmeye başlamıştır. Bu kanıtlar EA'nın tümörlü hücrelerin çoğalmasını inhibe edip apoptozu indüklediğini, anjiyogenezi ve ilaca direnci engelleyip, tümör büyümesini ve metastazı önleyebildiğini göstermektedir (Ceci vd., 2016). Deneysel kanser modellerinde akciğer, meme, ince bağırsak, kolon ve oral tümörlerin insidansını azalttığı da belirtilmiştir (Landete, 2011; Munagala vd., 2013).

Beyin ve nörolojik koşullar üzerindeki yararlı etkilerini gösteren birkaç çalışma bulunmaktadır. Örneğin, nöronların ölümü ile karakterize edilen birçok nörodejeneratif hastalık için potansiyel bir ilaç olarak önerilmiştir. Ayrıca, hayvanların hareketlerini değiştirmeden kognitif bozuklukları önlemek için de kullanılmıştır. Bu da, EA'nın yaşlı kişilerde görülen bunaklık tedavisinde yararlı bir hafıza canlandırıcı madde olarak uygulanabileceğini düşündürmektedir (Liu vd., 2017).

Sitokrom P-450'nin aktivitesini normalleştirip serbest radikal üretimini zayıflatarak karaciğer hücrelerinin yapısal bütünlüğünün korunmasını sağlar. Son zamanlarda, EA içeren doğal ekstraktların antifibrotik aktivitelere sahip olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle, CCl₄ ile hasar oluşturulan sıçanların karaciğerinde EA tedavi edilmesi sonucunda fibrotik septanın oluşumunda azalma olduğu görülmüştür (Garcia-Nino ve Zazueta, 2015).

Süper oksit anyonu ve hidroksil anyon üzerinde etkili bir temizleme etkisi sergilediği gösterilmiştir. Ayrıca lipit peroksidasyonuna karşı koruyucu etki yapmaktadır. Farmakolojik olarak aktiftir ve bu nedenle Hageman faktörünü (pıhtılaşma faktörü) aktive etme yeteneğinin bir sonucu olarak hayvanlarda ve insanlarda kanamayı kontrol ettiği tespit

edilmiştir (Bharathi vd., 2014). Süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz aktivitelerini uyarmakta, biyolojik sistemlerde üretilen değişik türlerdeki serbest radikalleri de etkisiz hale getirmektedir (Baek vd., 2016).

Kaspaz-3 aktivitesini arttırmakta, Bcl-2 düzeyini düşürmektedir. Telomeraz aktivitesini azaltarak kanser hücrelerinin ömrünü de kısaltmaktadır. (Zhao vd., 2017). Ayrıca, yapılan çalışmalarda EA'nın NF-kB yolağının güçlü bir inhibitörü olduğu da bildirilmektedir (Ahad vd., 2014). NF-kB baskılamasına bağlı olarak EA; COX-2 ve TNF- α 'nın düşük regülasyonundan dolayı antiinflamatuvar özelliklere sahiptir (Landete, 2011). EA'nın, KRAS onkogeninin promotör bölgesinde oluşturulan kanseri önlemek için G-quadruplex (Guanine zengin DNA ve RNA yapısı) DNA'yı stabilize ettiği de görülmüştür (Pattanayak vd., 2017).

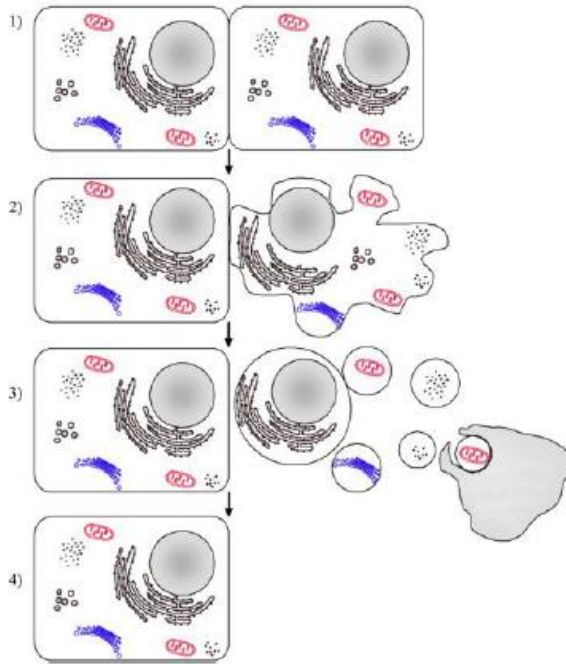
Peptik ülser hastalarından izole edilen *Helicobacter pylori* üzerinde doz bağımlı bir inhibitör etki (IC₅₀=1 mM) sergilemektedir ve ET ekstraktlarının, *Vibrio cholerae*, *Shigella dysenteriae* ve *Campylobacter* spp'de dâhil olmak üzere bir dizi patojen organizmayı inhibe ettiği bildirilmiştir (Landete, 2011).

Son zamanlarda obezite ve tip-2 diyabet geliştirilen sıçan modellerinde EA uygulamasıyla hem obezite hem de tip-2 diyabet de görülen karaciğerdeki serbest yağ asitleri (FFA) birikiminin azaldığı görülmüştür. Ayrıca serumda yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) kolesterolünü arttırdığı ve lipogenez ile β -oksidasyonunu düzenleyerek trigliseridlerin karaciğerde birikimini önlediği de bildirilmiştir (Garcia-Nino ve Zazueta, 2015).

1.4. Apoptozis

Apoptozis; eski yunan dilinde ağaçlardan düşen yaprak veya çiçeklerden ayrılan petal anlamında kullanılmaktadır (Wu vd., 2001; Onal vd., 2016). Programlanmış hücre ölümü, hücre intiharı ya da hücre kaybı gibi tanımları da bulunmaktadır (Aslan, 2011). Apoptozis terimi ilk kez 1972 yılında Kerr vd. tarafından özel bir morfoloji gösteren hücre ölümleri için kullanılmıştır. Yaptıkları çalışmalarda apoptozise uğrayan hücrelerin çekirdeklerinin yoğunlaştığını ve hücre içeriklerinin zar ile çevrili kesecikler (vesiküller) içerisine alındığını belirlemişler ve bunların komşu hücreler tarafından elendiğini gözlemlemişlerdir (Yıldırım, 2010).

Apoptozis için sinyal alındıktan sonra, hücre içinde birçok biyokimyasal ve morfolojik değişiklik gözlenmektedir. İlk olarak hücre küçülmeye ve daha yoğun hale gelmeye başlar, hücre iskeleti parçalanır ve hücre zarı çözünür. Çekirdek DNA'sı birçok parçaya bölünür. Sitoplazmik hücre iskeletinin bozulması apoptozise yol açarken, sitoplazmanın kararlı duruşu ise apoptozisi engellemektedir. Sitoplazma küçülmeye başlamakta, daha sonra çekirdek ayrı parçalara bölünmektedir. Çekirdek, apoptozisdeki olayların odağıdır. Hücre kısılmaya ve küçülmeye devam etmekte ve makrofajlar tarafından tanınabilen zarla çevrili küçük veziküler parçalara ayrılmaktadır. İçlerinde sitoplazmaları, sağlam organelleri ve çekirdek parçalarını (bazılarında) içeren apoptotik cisimler oluşturulabilir. Çekirdek gibi hücre de daralır ve zarla çevrili birkaç parçaya ayrılabilir. Sonunda hücre ölür, plazma zarları parçalanır ve organelleri serbest kalır (Şekil 1.6). Protoplazmanın membrandan ayrılmasından apoptotik vücutun oluşumuna kadar değişen apoptotik olay zinciri birkaç dakika sürer. Bununla birlikte, apoptotik hücrelerin fagositozu 12-18 saat sürebilir (Güleş ve Eren, 2008; Onal vd., 2016).

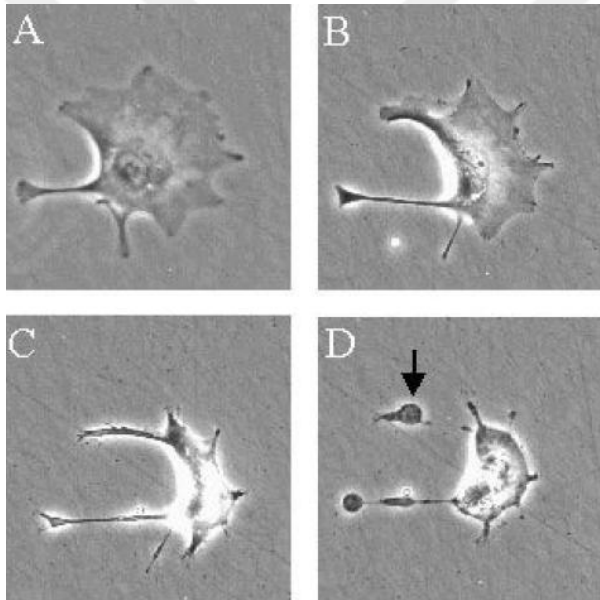


Şekil 1.6. Apoptozis geçiren bir hücre (URL-3, 2017).

Apoptozis, hücre popülasyonunun normal büyümesini ve morfogenezini düzenleyen fizyolojik bir süreçtir (Mishra ve Vinayak, 2015). Apoptotik hücreler, organizmanın bazı hücreleri ile dokularında sürekli olarak oluşmakta ve bu durum tüm yaşam boyunca devam etmektedir. Böylece apoptoz (ölüm) ve mitoz (yeniden yapım) bu dokularda homeostazı üreterek dinamik bir dengede ilerlemektedir. Apoptozis, vücuttaki hücrelerin sayısını sabit

tutmak ve bağışıklık sistemini aktif hale getirmek için, embriyonik ve postembriyonik gelişim sırasında hücrelerin morfojenik ölümünden sorumludur. Ayrıca, farklı dokuların olgunlaşmasında önemli bir rol oynamaktadır (Onal vd., 2016).

Apoptozis, fizyolojik halde hasar gören veya istenmeyen hücrelerin kontrollü olarak uzaklaştırılması işlemidir (Kedzierska ve Piekliko-Witkowska, 2017; Zamaraev vd., 2017) ve intrinsik (mitokondriyal) ve dışsal (ölüm reseptör aracılı) yolların aktivasyonu ile oluşmaktadır. Apoptozom kompleksinin oluşumu için başlatıcı prokaspaz-9 gereklidir. İntrinsik apoptozda, apoptozom kompleksi başlatıcı prokaspaz-9'u parçalayarak aktifleştirmektedir. Bölünmüş kaspaz-9; efektör kaspaz 3, kaspaz 6 ve kaspaz 7'yi aktive ettiğinde apoptoz indüklenmektedir (Dinçel ve Yıldırım, 2016).



Şekil 1.7. Apoptozise uğrayan hücrede görülen değişimler (Yıldırım, 2010; Aslan, 2011; URL-4, 2017).

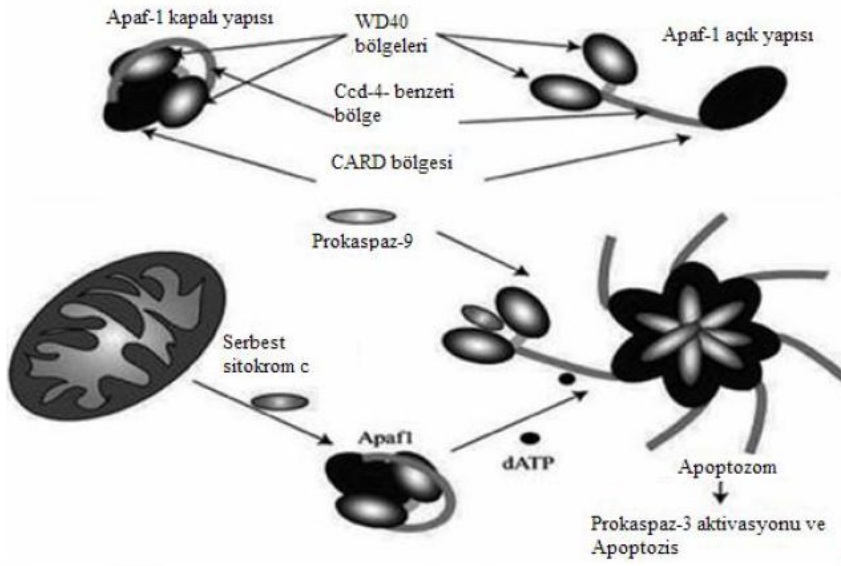
Aktin ve lamin filamentlerinin bölünmeleri ile hücre küçülmeye başlar (Şekil 1.7 A). Hücre çekirdeğinde bulunan yapısal proteinlerin kesilmesi ve kromatin yapısının bozulmasıyla çekirdek yoğunlaşır. Çoğu zaman çekirdek at nalı şeklinde görünür (Şekil 1.7 B). Hücre küçülmeye devam eder (Şekil 1.7 C). Makrofajların tanınmasına imkân verecek biçime dönüştürülerek paketlenir. Makrofajlar diğer hücrelere zarar vermeden apoptotik hücreleri ayırt eder. Apoptotik hücrenin membranında değişimler olur. En belirgin değişim fosfatidilserin birimlerinin hücre membranının dış yüzeyine çıkmasıdır. Apoptozisin son aşamasında zar kabarcıkları ve bazen de küçük veziküller gözlenir (Şekil 1.7 D) (Yıldırım, 2010; Aslan, 2011; URL-4, 2017).

1.5. Apoptotik Markerlar (Kaspaz-3 ve Bcl-2)

Apoptozis mekanizması üzerinde kaspazlar ve bcl-2 proteinleri önemli bir rol oynamaktadır (Aslan ve Can, 2014).

Apoptoz başlangıcında ve yürütülmesinde merkezi bir rol oynayan apoptotik kaspazlar; kaspaz reaksiyonlarındaki rollerine ve aktive mekanizmalarına bağlı olarak başlatıcı ve efektör kaspazlar olarak ikiye ayrılmaktadır. Aktif merkezlerinde sistein aminoasiti bulundurlar. Hedefledikleri proteinleri aspartik asit birimlerinden kestikleri için bu ismi almışlardır. Başlatıcı kaspazlar, yüksek molekül ağırlıklı çoklu protein komplekslerine dâhil edilmektedir. Kısa etki alanlarına sahip efektör kaspazlar ise başlatıcı kaspazlar tarafından etkinleştirilmektedir. Efektör kaspazlar apoptotik hücre ölümünün yürütülmesinde ve birden çok hücrel substratın parçalanmasında kilit rol oynamakta ve böylece hücrenin yıkılması sağlanmaktadır (Zamaraev vd., 2017; Yıldırım, 2010).

Mitokondri normal koşullarda ATP oluşturmak üzere sitokrom-c içermektedir. Mitokondriyal stres durumlarında salınan sitokrom-c, apoptotik bir cisim (apoptozom) oluşturmak üzere apoptoz ile ilgili faktör 1 (Apaf-1) ve prokaspaz-9 ile birleşebilir ve kaspaz-9'u aktive edebilir. Daha sonra aktive edilmiş kaspaz-9 efektör kaspaz-3'ü keserek aktivasyonuna yol açar. Kaspaz-9 ATP/dATP varlığında Apaf-1'de yer alan WD40 domaini (bölge) aracılığıyla sitokrom-c'ye bağlanarak aktive olur. Apaf-1 ve kaspaz-9 da önemli bir bölge bulunur ve bu bölge CARD olarak isimlendirilir. Apaf-1'in CARD bölgesi iki tane WD40 bölgesi ile birlikte bir arada tutulmaktadır. Bu WD40 bölgeleri aracılığıyla Apaf-1 sitokrom-c'ye bağlanır. Bu bağlanma WD40 bölgelerine bağlı olarak CARD domainin yerinin kaybetmesine neden olur. ATP/dATP'nin Apaf-1'e bağlanmasıyla molekül şekil değişimine uğrar. Direksiyon veya tekerleğe benzer bir heptamer oluşur. Bu yapıda yedişer molekül Apaf-1, sitokrom-c ve ATP bulunur. Apoptozom olarak isimlendirilen bu yapı, komplekse yedi molekül prokaspaz-9'un katılmasına imkan tanır (Şekil 1.8) (Sawada vd., 2000; Yılmaz, 2005; Yıldırım, 2010; Xue vd., 2017).

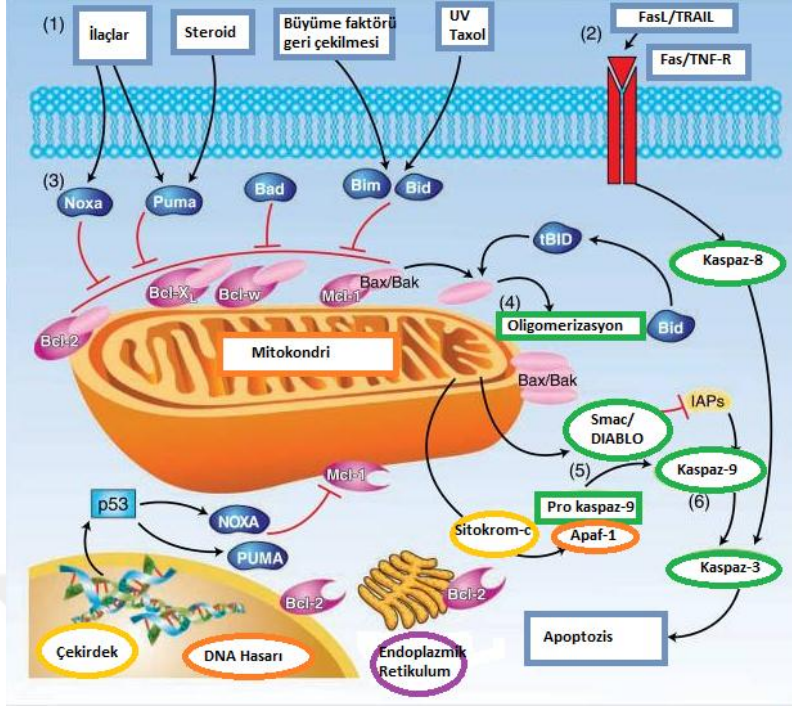


Şekil 1.8. Sitokrom-c ve apaf-1 aracılığı ile apoptozis (Aslan, 2011; Can 2014).

Bcl-2 ailesi proteinleri programlı hücre ölümünün kontrol noktalarında görev alırlar. Bcl-2 kurucu üyedir ve B- hücre lenfomasında (**B** cell lymphoma) tanımlandığından bu adı almıştır. Bcl-2 ailesinin bir kısmı anti apoptotik (apoptozisi inhibe eden) bir kısmı ise pro apoptotik (apoptozisi hızlandıran) üyelerden oluşur. 1988 yılında Bcl-2'nin apoptozisi inhibe ettiği ve kanser gelişime neden olduğu belirlenmiştir. Memeli hücreleri Bcl-2 ailesinin tüm üyelerine sahiptir (Latif vd., 2000; Mousavi vd., 2009; Yıldırım, 2010).

Bcl-2 ailesi mitokondriyal apoptozun düzenlenmesinde yer almaktadır. Mitokondriyal dış zar geçirgenliğini yönetmektedir (Xue vd., 2017; Du vd., 2017). Mitokondri membranından iyon akışını ve sitokrom- c salınımını düzenler. Apaf -1'e bağlanarak inhibisyonunu sağlar (Yıldırım, 2010). Bcl-2 pro-apoptotik proteinlerle bağlanarak apoptozu baskılamaktadır. Foliküler lenfomaların % 85'inden fazlasını eksprese eder ve lenfoma hücrelerini kemoterapiye karşı dirençli yapmaktadır (Dai vd., 2017).

Bcl-2 ailesinin hücre ölümüne giden apoptotik yollar; 1. İntrinsik yolu başta hücre dışı uyarılar olmak üzere çeşitli sinyaller tarafından başlatılır. 2. Ekstrinsik yol Fas ligandı veya TRAIL tarafından aktive edilir, kaspaz-8 etkinleştirilir ve bir kaspaz aktivasyonunu başlatır. 3. BH3'e bağlı proteinler (Bim, Bid, Bad, Noxa, Puma), anti-apoptotik Bcl-2 ailesi proteinleri ile etkileşerek Bax ve Bak proteinlerinin inhibe edilmelerini engeller. 4. Bax ve Bak proteinleri oligomerleşip aktive edilerek mitokondrial dış membrandan geçirgenliğe sebep olur.



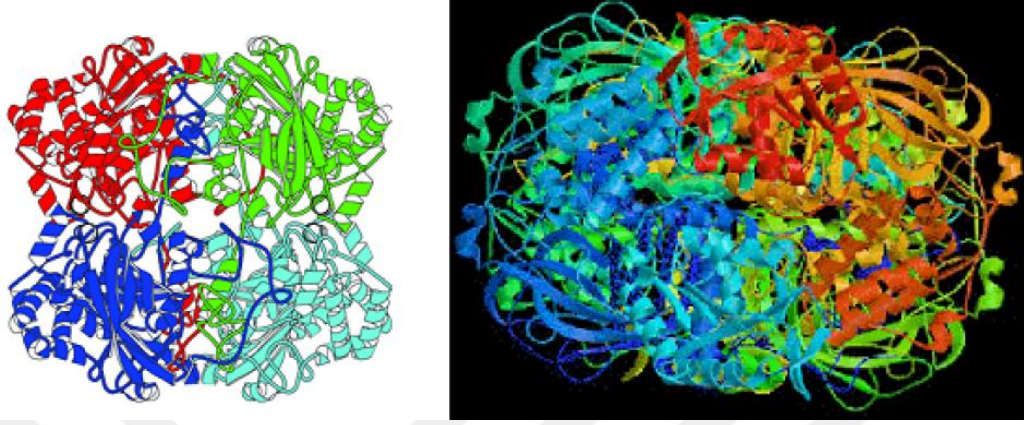
Şekil 1.9. Bcl-2 apoptotik yolu (Kang ve Reynolds, 2009).

5. Mitokondriyal membranlar permeabilize olduktan sonra sitokrom-c veya Smac/DIABLO, apoptozom adı verilen birçoklu protein kompleksi içinde bir adaptör molekülü olan apaf-1 ve aktif olmayan prokaspaz-9 ile birleşip sitoplazmada serbest kalır. Smac/DIABLO, kaspaz-9'u aktive etmek için apoptoz proteinlerinin inhibitörlerini engeller. 6. Kaspaz-9, kaspaz aktivasyon kaskadının başlatma basamağı olan kaspaz-3'ü harekete geçirir. İntrinsik ve ekstrinsik yollar kaspaz-3'te birleşir. Bcl-2 ailesi proteinleri hematopoietik hücrelerdeki endoplazmik retikulum ve perinüklear zarda bulunur, ancak ağırlıklı olarak mitokondride yer almaktadır (Şekil 1.9) (Kang ve Reynolds, 2009).

1.6. Katalaz

Katalaz (EC 1.11.1.6), hemen hemen tüm aerobik solunum yapan organizmalarda bulunan en önemli antioksidan enzimlerden biridir (Şekil 1.10). Katalazın temel işlevi, hidrojen peroksitin (H_2O_2) suya ve moleküler oksijene ayrışmasıdır (Tükel vd., 2013; Krych-Madej ve Gebicka, 2017). Her katalaz molekülü saniyede milyonlarca H_2O_2 molekülünü parçalayabilir ve oksidatif stresi azaltabilir. Katalazlar, reaktif moleküllere karşı savaşmaları gerektiği için alışılmadık derecede kararlı enzimlerdir (Majumder vd., 2017). Neredeyse tüm

hayvanların veya bitki dokularının peroksizomlarında, özellikle karaciğerde bol miktarda bulunmaktadır (Wang vd., 2017).



Şekil 1.10. Katalazın üç boyutlu yapısı (Sağaltıcı, 2012).

Katalaz sınıfı, üç farklı enzim tipini kapsamaktadır. Bunlar; monofonksiyonel, iki fonksiyonlu (peroksidazlar) ve manganez katalazlardır. Bütün bu metaloenzimler birbirinden bağımsız olarak iki farklı protein ailesine sahiptirler. Birincisi; demir-porfirin kofaktörüne sahip Fe içeren (tip I) katalazlardır. İkincisi; dinükleer manganez aktif bölgesi olan hem olmayan (tip II) katalazlardır. Bunlar psödokatalazlar olarak da bilinmektedir. Üçüncüsü ise hem içeren katalazlarla karşılaştırıldığında daha düşük spesifik aktiviteler gösteren katalazlardır (Grigoras, 2017).

Katalaz, sütte H_2O_2 çıkarmak için gıda endüstrisinde kullanılan önemli bir ticari katalizördür. Tekstil endüstrisinde, gıda paketicilerinde, dezenfektanlarda ve kozmetikte de uygulama alanı bulmaktadır (Misra vd., 2017). Kısa kullanım ömrü, iyileşmede güçlükleri ve tekrar kullanılabilirlik gibi bazı dezavantajları sebebiyle endüstriyel uygulamaları sınırlandırır (Wang vd., 2017).

Saflaştırılacak ve kristalleştirilecek ilk enzimlerden biri olan katalaz; insanlarda ve hayvanlarda kansere, şeker hastalığına ve yaşlanmaya sebebiyet verdiği için son yıllarda büyük ilgi görmektedir (Akyılmaz ve Korgus, 2009).

Katalaz düzeyindeki azalma çeşitli tümörlerin H_2O_2 detoksifikasyonu için önemli ölçüde azalmış olmasıyla ilişkilendirilmiştir. Bu durumda lökositler ve eritrositlerde ciddi periodontal yıkım olduğu görülmüştür (Abdel- Mageed vd., 2012). Katalaz eksikliği tip-2 diyabet gelişme olasılığını da arttırabilmektedir. Diyabetli hastaların kanındaki katalaz aktivitesi, sağlıklı insanlardan anlamlı derecede düşük bulunmuş ve benzer şekilde şizofreni

ve aterosklerozlu hastalarda da görülmüştür (Najjar vd., 2017). Apoptozu, mutasyonu, tümör uyarımını ve yaşlanmayı önlemede önemli bir faktör olarak da bilinmektedir (Harifi-Mood vd., 2017). Buna ek olarak H_2O_2 ile anaeroblara karşı antiseptik olarak da kullanılmaktadır (Abdel- Mageed vd., 2012).

Bitkilerde ise, yaşlanma, dehidrasyon, ozmotik stres, yaralanma, paraquat (toksik herbisit), ozon ve ağır metallerin yol açtığı oksidatif strese karşı primer bir enzimatik savunma olarak görülmüştür (Kibinza vd., 2011).

1.7. Lipit Peroksidasyonu

Serbest oksijen radikallerinin meydana getirdiği doku hasarının önemli mekanizması hücre zarlarında bulunan lipitlerin peroksidasyonudur (Yarıktaş vd., 2003). Lipit peroksidasyonu, membranlarda mevcut olan PUFA (çoklu doymamış yağ asitleri)'nin, serbest oksijen radikalleri tarafından alkoller, peroksitler, aldehitler gibi çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur. Lipit peroksidasyonun en önemli göstergesi ve son ürünü MDA'tır (Benzer ve Ozan, 2003; İpek vd., 2012; Can, 2014; Boydak, 2015).

MDA, doymamış omega-3 ve omega-6 yağ asitlerinin, tiyobarbitürik asit (TBA) ile kolay reaksiyonu sebebiyle, lipit peroksidasyonu için uygun bir biyolojik belirteç olarak uzun yıllar yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. MDA, klinik durumlarda oksidatif stresi belirleyen en popüler ve güvenilir göstergelerden biri olmaktadır. Ayrıca, lipit peroksidasyonunun en mutajenik ürünü olduğu da görülmektedir (Fatani vd., 2016).

MDA; enzim aktiviteleri, iyon transportu, hücrelere kalsiyum ve sodyum gibi elektrolit geçişlerinin hızlanması neticesinde ATP kaybı, DNA hasarı ve hücre membranının bozulması gibi değişimlere sebep olmaktadır. Bu nedenle MDA ölçümü hücresel hasarın düzeyini saptamada kullanılmaktadır (Ertuğrul, 2014; Bozukluhan vd., 2017).

MDA; lipit peroksidasyonunun bir sonucu olarak gıda, serum, plazma, doku, idrar dâhil olmak üzere lipit bakımından zengin birçok biyolojik örnekte bulunmaktadır (Jetawattana, 2005; Tsikas vd., 2017). Lipit peroksidasyonları sonucu oluşan membran hasarları geri dönüşümsüzdür. Ancak bu antioksidan reaksiyonlar ile sonlandırılabilir (Tanrıverdi, 2005).

2. MATERYAL ve METOD

2.1. Materyal

2.1.1. Kimyasal Maddeler ve Ellagik Asit

Western Blot aşamasında kullanılan primer antikorlar (anti-kaspaz-3 sc-70497, anti bcl-2 sc-509) ve sekonder antikor (sc-516102) Santa Cruz Biotechnology (Germany)'den temin edildi.

Deneysel çalışmalarda kullanılan bütün kimyasallar Sigma-Aldrich (Almanya), Bio-Rad (ABD), BioShop (Kanada) ve Merck (ABD)'ten, ellagik asit (A15722) ise Alfa Aesar (Germany)'dan sağlandı.

2.2. Metod

2.2.1. Hayvan Materyali ve Araştırma Grupları

Bu Tez çalışmasının hayvan deneyleri bölümü, F.Ü. Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 26.10.2016 toplantı tarihli, 2016-118 protokol numaralı, 2016-19 toplantı sayısı ve 190 karar nolu izni ile F.Ü. Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nde (FÜDAM) yürütüldü.

Çalışmada 36 adet Wistar albino (n=36, 8 haftalık) sıçan kullanıldı. Sıçanlara günlük 12 saat aydınlık; 12 saat karanlık olacak şekilde bir aydınlatma periyodu uygulandı. Sıçanlar, canlı ağırlıkları (CA) birbirine yakın olacak şekilde 4 gruba ayrıldı (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Araştırma grupları (n=9)

Gruplar	Uygulama	Deneme Süresi
Kontrol Grubu	Standart diyet ile beslenen, CCl ₄ ve EA verilmeyen grup	8 hafta
EA Grubu	Standart diyet ile beslenen ve EA (10 mg/kg CA, ip) verilen grup	8 hafta
CCl ₄ Grubu	Standart diyet ile beslenen ve CCl ₄ (1,5 ml/kg CA, ip) verilen grup	8 hafta
CCl ₄ + EA Grubu	Standart diyet ile beslenen CCl ₄ (1,5 ml/kg CA, ip) ve EA (10 mg/kg CA, ip) verilen grup	8 hafta

Gruplar: (i) Kontrol Grubu: Standart diyet ile beslenen grup; (ii) EA Grubu: Standart diyet + EA (10 mg/kg CA, ip) verilen grup; (iii) CCl₄ Grubu: Standart diyet + CCl₄ (1,5 ml/kg CA, ip) verilen grup; (iv) CCl₄ + EA Grubu: Standart diyet + CCl₄ (1,5 ml/kg CA, ip) ve EA (10 mg/kg CA, ip) verilen grup şeklinde ayarlandı. Hayvanların başlangıç canlı ağırlıkları eşit olacak şekilde ayarlanıp gruplar oluşturulmuştur. Canlı ağırlıklar çalışma boyunca haftada 2 kez kaydedildi.

Yem ve su, çalışma süresince *ad libitum* olarak verildi. Çalışma bitiminde sıçanlar dekapite edilerek karaciğer dokuları ve kan serumları alındı ve analizler yapılincaya kadar -80 °C’de muhafaza edildi.

2.2.2. Karbon Tetraklorür Hazırlanması ve Uygulanması

CCl₄ uygulaması, sekiz hafta boyunca haftada iki kez intraperitoneal (karın zarı içine) 1,5 ml/kg canlı ağırlık olacak şekilde, 1:3 oranında zeytinyağı ile birlikte enjekte edilerek gerçekleştirildi (Aslan ve Can, 2014; Lu vd., 2016).

2.2.3. Ellagik Asit Hazırlanması ve Uygulanması

100 mg EA, 10 ml DMSO (dimetil sülfoksit)’da çözündü (Grossi vd., 2014). Stok solüsyonundan alınan EA, hayvanlara ikinci haftadan itibaren haftada beş kez intraperitoneal olarak, 10 mg/kg CA dozlarında yapıldı (Kaya, 2012; Gu vd., 2014).

2.2.4. Karaciğer Dokusu MDA Ölçümleri

Karaciğer doku örnekleri küçük parçalara bölünerek 0,5 gram doku başına 4,5 ml % 1,15’lik KCl eklenerek cam homojenizatörde parçalandı. Elde edilen bu homojenattan MDA tayini Ohkawa vd., (1979)’ya göre değiştirilerek yapıldı. Bu yöntemde 0,1 ml doku homojenatına 0,1 ml % 8,1 sodyum dodesil sülfat (SDS), 750 µl % 20’lik (pH:3,5) asetik asit solüsyonundan eklendi. Ardından 750 µl % 0,8’lik (pH: 3,5) TBA solüsyonundan eklenerek son hacmi 4 ml olacak şekilde saf su eklendi. Daha sonra 95 °C sıcaklıkta kaynar su banyosunda 45 dakika bekletildi ve ardından soğutulularak 1 ml distile su ve 15:1 (v/v) oranında 5 ml n-butanol-piridin karışımından eklenip vortekslendi. 5000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üst kısımdaki organik tabaka alınarak 532 nm dalga boyunda

spektrofotometrik olarak ölçüldü. Sonuçlar nmol/g olarak kaydedildi (Ohkawa vd., 1979; Aslan ve Can, 2014).

2.2.5. Plazma MDA Ölçümleri

Gruplardan 200 µl örnek alınarak % 8,1 SDS'ten 200 µl ilave edildi. % 20'lik asetik asit'ten (pH: 3,5) 1,5 ml ve % 0,8'lik (pH: 3,5) TBA'dan 1,5 ml eklenerek son hacim 4 ml olacak şekilde distile su eklendi. Daha sonra 95 °C sıcaklıkta kaynar su banyosunda 1 saat bekletildi ve ardından soğutulularak 1 ml distile su ve 15:1 (v/v) oranında 5 ml n-butanol-piridin karışımından eklenip vortekslendi. 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra üstteki organik tabaka alınıp 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Sonuçlar nmol/ml olarak kaydedildi (Ohkawa vd., 1979; Aslan ve Can, 2014).

2.2.6. MDA Ölçümleri için Standart Eğri Çizimi

Günlük standart MDA stoklarından (1,1,3,3 tetramethoksiopropan) 10 µl alınıp 100 ml saf suya tamamlandı. Eğri çizimi için günlük standarttan saf suyla 40, 20, 10, 8, 5, 4 oranında seyreltme yapılarak 15, 30, 60, 75, 121, 151 n/mol derişiminde çalışma standartları hazırlandı (Antmen, 2005). Bunun ardından, daha önce bahsedilen MDA prosedürüne göre diğer işlemler yapılarak sonuçlar doku için nmol/g; plazma için nmol/ml olarak kaydedildi ve standart eğri grafiği çizildi.

2.2.7. Western Blotlama Çalışması için Doku Homojenizasyonu

Karaciğer doku örnekleri, küçük parçalara bölünerek cam homojenizatörde lizis tamponu (0,5 M Tris [pH: 8], EDTA, β-Merkaptoetanol, Fenil metil sülfonil florid [PMSF]) içerisinde parçalandı. Parçаланan doku örnekleri 15000 rpm'de 45 dakika santrifüjlendi. Süpernatant alındı ve kullanılıncaya kadar -80 °C'de muhafaza edildi (Aslan, 2011; Aslan ve Can, 2014).

2.2.8. SDS-PAGE ve Western Blotlama Tekniği ile Proteinlerin Analizi

SDS-PAGE (Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi) tekniği ile dokulara ait protein örnekleri % 12'lik jelde yürütüldü. Daha sonra bu proteinler (kaspaz-3 ve bcl-2) Western blotlama tekniği ile nitrosetüloz membrana aktararak ekspresyon düzeylerine bakıldı (Laemmli, 1970) ve protein düzeyleri yoğunluk belirleyici analiz sistemi ile ölçüldü (Image J; National Institute of Health, Bethesda, USA).

2.2.8.1. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

SDS-PAGE, BIO-RAD Mini-PROTEAN®3 Cell jel elektroforez sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Proteinleri ayırmak için kullanılan jel řu şekilde hazırlandı (Laemmli, 1970).

Ayırma Jeli (Separating)'nin Hazırlanışı (% 12)

dH ₂ O	3,35 ml
1,5 M Tris HCl (pH: 8,8)	2,5 ml
% 10 SDS	100 µl
% 30 Akrilamid/Bis	4 ml
% 10 Amonyum Persülfat	75 µl
TEMED	15 µl

Yükleme Jeli (Stacking)'nin Hazırlanışı (% 4)

dH ₂ O	6,1 ml
0,5 M Tris HCl (pH: 6,8)	2,5 ml
% 10 SDS	100 µl
% 30 Akrilamid/Bis	1,3 ml
% 10 Amonyum Persülfat	60 µl
TEMED	12 µl

Hazırlanmış örneklerin kuyulara yüklenmesinden önce, eşit miktarda SDS-PAGE SAB boyası eklenerek 5 dakika kaynatıldı. Elektroforez 30 mA akım uygulanarak yapıldı (Laemmli, 1970). Elektroforezin ardından Western blotlama aşamasına geçildi.

2.2.8.2. Western Blotlama ile Protein Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

SDS-PAGE İçin 5x Tank (Yürütme) Tamponu (5x Running Buffer)

0,025 M Trizma Base	15 g/ml
0,192 M Glisin	72 g/ml
% 0,1 SDS	5 g/l

dH₂O ile 1x Running buffer'a seyreltilerek çalışma solüsyonu hazırlandı.

SDS-PAGE İçin Örnek Uygulama Tamponu (SAB: Sample Amplification Buffer)

% 10 SDS	1 g/10 ml
% 50 M Tris HCl (pH: 6,8)	5 ml/10 ml
% 10 Gliserol	1 ml/10 ml
% 2,5 2-Merkaptoetanol	0,25 ml/10 ml
% 0,05 Bromofenol Mavisi	0,005 g/10 ml
% 2 DTT	0,2 g/10 ml

dH₂O ile 10 ml'ye tamamlandı.

SDS-PAGE Sonrası Protein Boyama Solüsyonu

% 0,1 Commassie Brilliant Mavisi	0,1 g/100 ml
% 40 Metanol	40 ml/100 ml
% 10 Glasiyal Asetik Asit	10 ml/100 ml

dH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı.

SDS-PAGE Sonrası Boya Giderici (Destaining) Solüsyon

% 5 Metanol	5 ml/100 ml
% 7 Asetik Asit	7 ml/100 ml

dH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı.

Western Blot Transfer Tamponu 5X

Glisin	4,3 g/300 ml
Trizma Base	5,81 g/300 ml
Metanol	75 ml/300 ml

dH₂O ile 300 ml'ye tamamlandı.

PBS (Phosphate Buffered Saline) 9X

1,45 M NaCl	84,74 g/l
0,075 M Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O	26,8 g/l
0,025 M NaH ₂ PO ₄ .12 H ₂ O	3,9 g/l

PBS Tween-20

PBS	1000 ml
Tween-20	2 ml

Süt Tozu

Bloklama solüsyonu olarak % 5'lik süt tozu kullanıldı.

Western Blotlama Sonrasında Nitroselüloz Membranda Protein Görüntüleme**Solüsyonu**

1 M Tris (pH: 6,8)	1,33 ml/40 ml
3,3'-Diaminobenzidin (DAB) tablet	4 tablet
% 30 H ₂ O ₂	40 µl/40ml
dH ₂ O ile 40 ml'ye tamamlandı.	

Western blotlama, BIO-RAD Mini-PROTEAN®3 Cell jel elektroforez sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Blotlama öncesinde SDS-PAGE ile proteinlerin jelde ayrılması sağlandı. Jel büyüklüğünde olacak şekilde Nitroselüloz transfer membranı kesildi. Filtre kağıtlarıyla beraber transfer tamponu içerisinde bekletildi. Elektroforezin ardından jel de transfer tamponu içerisinde bekletildi ve sonrasında western blota özgü kasetin kapağı açılarak alt tarafına filtre kağıdı ve onun üzerine de jel yerleştirildi. Hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek nitroselüloz membran ve tekrar bir filtre kağıdı yerleştirilerek kasetin kapağı kapatıldı ve elektroforez tankına yerleştirildi. Tankta buz ünitesi de yerleştirildi ve ardından transfer tamponu doldurularak güç kaynağına bağlandı ve 250 mA'da 90 dakika akım verildi. Isının düzenli dağılması amacıyla, blotlama manyetik karıştırıcı üzerinde yapıldı. Blotlama sonrasında membran, PBS Tween-20'de (PBS yıkama solüsyonu) 15 dakika yıkandı. 4 °C'de bir gece süt tozu içerisinde bloklama işlemi yapıldı. Bloklamadan sonra 90 dakika oda ısısında bekletildi. Daha sonra 1/500 oranında seyreltilmiş primer antikor (kaspaz-3 sc-70497, bcl-2 sc-509) ilave edilir. Yine 90 dakika oda ısısında

bekletildi. 15 dakika PBS çalışma solüsyonu ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. 1/1000 oranında seyreltilmiş sekonder antikor (sc-516102) ilave edilir. 90 dakika oda ısısında bekletildi. Yine aynı şekilde PBS çalışma solüsyonu ile 15 dakika yıkandı. Yıkama işleminin ardından son hacim 40 ml saf suyla tamamlanacak şekilde 4 tablet (20 mg) 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, Amresco), 1,33 ml 1 M Tris (pH: 6,8), % 30'luk 40 µl H₂O₂ içerisinde bantlar belirgin hale gelinceye kadar bekletildi. Ardından dH₂O içerisine alınarak reaksiyon durduruldu. Bu metot Aslan (2011)'in çalışması esas alınarak bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirildi.

2.2.9. Katalaz Aktivite Tayini

Katalaz ölçümünde kullanılmak üzere spektrofotometrede 240 nm'de absorbans 0,7-0,9 oluncaya kadar 1/15 M Na-fosfat tampon (Na₂HPO₄- NaH₂PO₄) pH: 7 çözeltisine derişik (% 35'lik) H₂O₂ ilave edildi. Örneklerin katalaz içeriğini belirlemek için hazırlanan bu karışımdan 1000 µl alınıp küvete konuldu ve üzerine çalışma aralığına bağlı olarak 30 µl'den başlayarak gittikçe artan konsantrasyonlarda süpernatant eklenip ve bir kez karıştırılıp spektrofotometrede 240 nm dalga boyunda 1 dakika süreyle H₂O₂'nin absorbans değişimi okundu. Okunan bu optik dansite farkından U/mg katalaz aktivitesi belirlendi (Luck, 1963; Yiğitcan, 2012, Tutuş, 2016).

2.2.10. Kaspaz-3 ve Bcl-2 Proteinlerinin Analizi

Bu çalışmada kaspaz-3 ve bcl-2 apoptotik proteinlerinin hasarlı ve normal dokulardaki ekspresyon seviyeleri spesifik antikorlar kullanılarak SDS-PAGE ve Western blotlama tekniği ile saptanmıştır.

2.2.11. TUNEL Metoduyla Apoptozis Miktarının Tespiti

Terminal Deoksinükleotidil Transferaz (dUTP) Çentik Uç Etiketleme olarak bilinen TUNEL metodu, DNA bozunmasına uğrayan apoptotik hücreleri belirlemek üzere tasarlanmıştır (Kyrylkova vd., 2012). Parafin blok, dondurulmuş halde bulunan kesitler, kültürü yapılmış solüsyon halindeki veya "plate"lere ekilmiş ya da lameller üzerinde

büyütülmüş hücrelerdeki apoptozis bu yöntemle belirlenebilir (Yılmaz, 2005; Qiu vd., 2007).

Tablo 2.2. TUNEL boyama prosedürü

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

TUNEL metodu şu şekilde yapıldı: Parafin bloklardan 5-6 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon, cat no: S7101, USA) kullanılarak apoptoza giden hücreler tespit edildi. Boyama metodu aşağıdaki tabloda ayrıntılı olarak verilmiştir (Tablo 2.2). Hazırlanan preparatlar Leica DM500 mikroskobunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı (Leica DFC295). TUNEL boyamanın analizinde Harris hematoksilen ile maviye boyanmış çekirdekler normal, kahverengi nükleer boyanma gösteren hücreler apoptotik olarak değerlendirildi. Kesitlerde 10'luk büyütmede rastgele seçilen alanlarda, normal ve apoptotik en az 500 hücre sayıldı. Apoptotik hücrelerin, toplam (normal + apoptotik) hücrelere oranlanması ile Apoptotik indeks (AI)'i hesaplanarak istatistiksel analizleri yapıldı. Skala bar: 5 µm.

2.2.12. İstatistiksel Analizler

Bütün veriler SPSS 20 paket programında varyans analizi ile değerlendirilmiştir. Gruplar içi farklılıkları belirlemek için One-Way ANOVA *Post Hoc* Tukey, Duncan, Games-Howell, LSD testleri uygulanmıştır. Yapılan istatistiklerin güvenilirliği açısından, ölçümler en az 3 tekrar olacak şekilde yapılmıştır.



3. BULGULAR

3.1. Canlı Ağırlık Değişimi

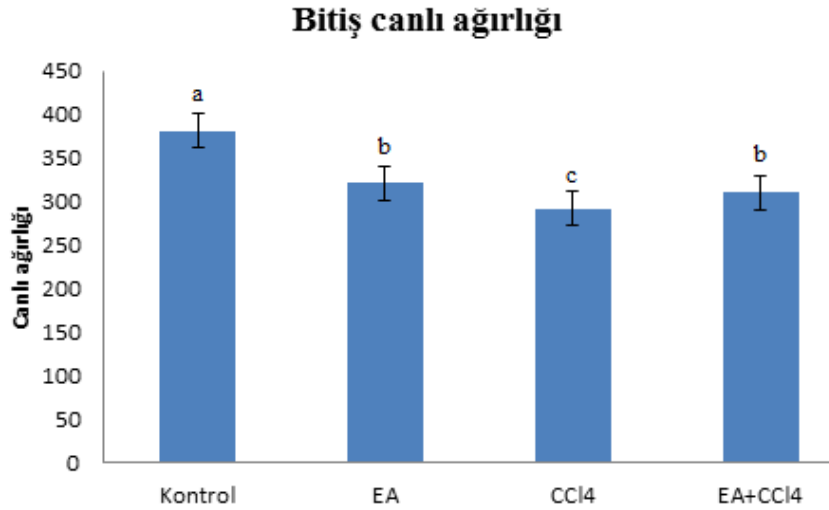
Tablo 3.1. Gruplarda başlangıç ve bitiş canlı ağırlıkları

Gruplar	Başlangıç canlı ağırlığı, (g)	Bitiş canlı ağırlığı, (g)
Kontrol	275,27 ± 5,00	381,33 ± 4,50 ^a
EA	251,82 ± 5,00	321,46 ± 5,50 ^b
CCl ₄	246,15 ± 5,00	291,72 ± 6,02 ^c
CCl ₄ + EA	243,63 ± 5,00	310,14 ± 5,50 ^b

a-c: Aynı sütunda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($p < 0.05$). One-Way ANOVA *Post Hoc* Tukey HSD ve Games-Howell Testi.



Şekil 3.1. Çalışma gruplarının bakım odası



Şekil 3.2. Gruplarda görülen bitiş canlı ağırlık oranları

a-c: Sütun grafikte farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($p < 0.05$). One-Way ANOVA *Post Hoc Tukey HSD* ve *Games-Howell* Testi.

Başlangıç canlı ağırlıklarında gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığı görülürken ($p > 0.05$), bitiş canlı ağırlıkları incelendiği zaman ise gruplar arasında istatistiksel olarak fark olduğu ($p < 0.05$) görülmektedir. Ağırlık artışının en fazla kontrol, en az CCl₄ grubunda olduğu, EA ve CCl₄ + EA gruplarında birbirine yakın olduğu ve bu iki grupta aradaki farkın önemli olmadığı görülmektedir (Tablo 3.1. ve Şekil 3.2).

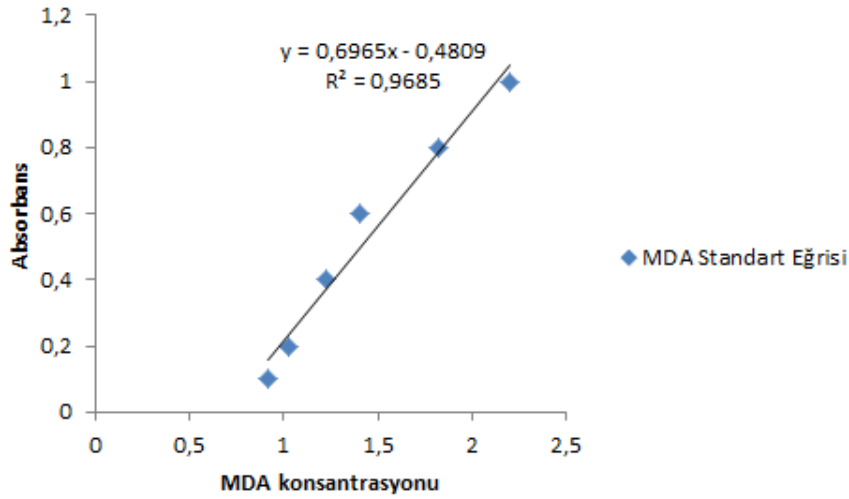
3.2. MDA Ölçüm Sonuçları

Tablo 3.2. Çalışma gruplarında elde edilen plazma ve karaciğer doku MDA düzeyleri

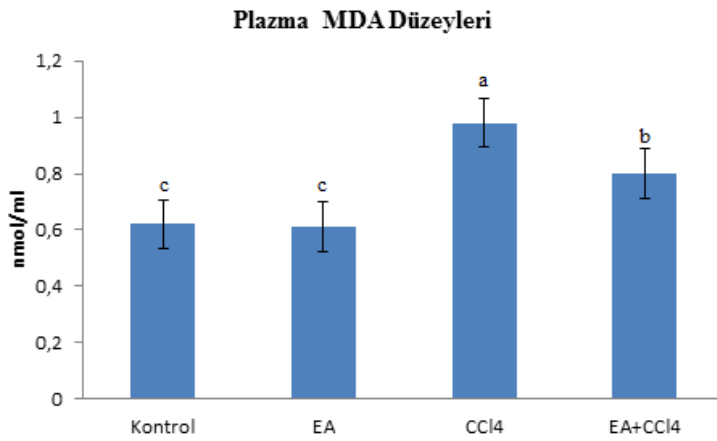
Gruplar	Kontrol	EA	CCl ₄	CCl ₄ + EA
Plazma MDA (nmol/ml)	0,72 ± 0,02 ^c	0,76 ± 0,01 ^c	0,92 ± 0,06 ^a	0,8 ± 0,02 ^b
Karaciğer Doku MDA (nmol/g)	0,66 ± 0,07 ^c	0,68 ± 0,02 ^c	1,3 ± 0,1 ^a	0,94 ± 0,06 ^b

a-c: Aynı satırda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($p < 0.05$). One-Way ANOVA *Post Hoc LSD* ve *Games-Howell* Testi

Tablo 3.2’de görülen değerler, 532 nm dalga boyunda ölçülen MDA değerlerinin, daha önce bahsedilen günlük standart MDA stokları baz alınarak ve gerekli prosedürler uygulanarak hesaplanmış halidir. Hesaplama işlemi $y = 0,6965x - 0,4809$ şeklinde yapılmıştır. Buradaki y değeri spektrofotometrede ölçülen MDA değeridir Bu verilere göre MDA standart eğrisi oluşturulmuştur.



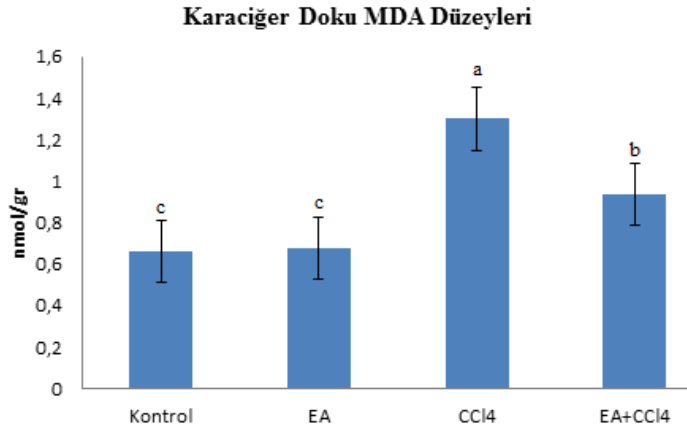
Şekil 11. MDA standart eğrisi



Şekil 3.4. Gruplarda plazma MDA düzeyleri ve karşılaştırılması

a-c: Sütunlarda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($p < 0.05$). One-Way ANOVA *Post Hoc* Games-Howell Testi.

Tablo 3.2'deki değerler, hem plazmada hem de karaciğer dokusunda, EA verilen gruplarda MDA düzeyinin düştüğünü ve en yüksek düzeydeki MDA değerlerinin CCl₄ gruplarında olduğunu göstermektedir. Karaciğer dokusunda ve plazmada, CCl₄ muamelesi gören iki grup, kontrol gruplarına göre istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık göstermiştir ($p < 0.05$). EA verilen gruplarda ise MDA düzeylerinin daha düşük olduğu görülmektedir (Tablo 3.2, Şekil 3.4 ve 3.5).



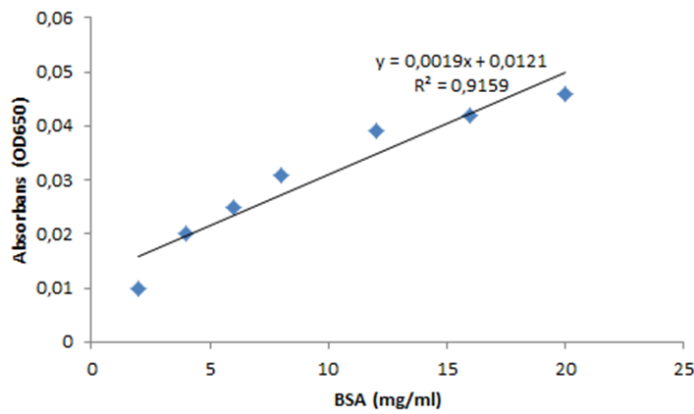
Şekil 3.5. Gruplarda karaciğer dokusu MDA düzeyleri ve karşılaştırılması

a-c: Sütunlarda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($p < 0.05$). One-Way ANOVA *Post Hoc Games-Howell* Testi.

3.3. Katalaz Ölçüm Sonuçları

Tablo 3.3. Katalaz aktivite sonuçları

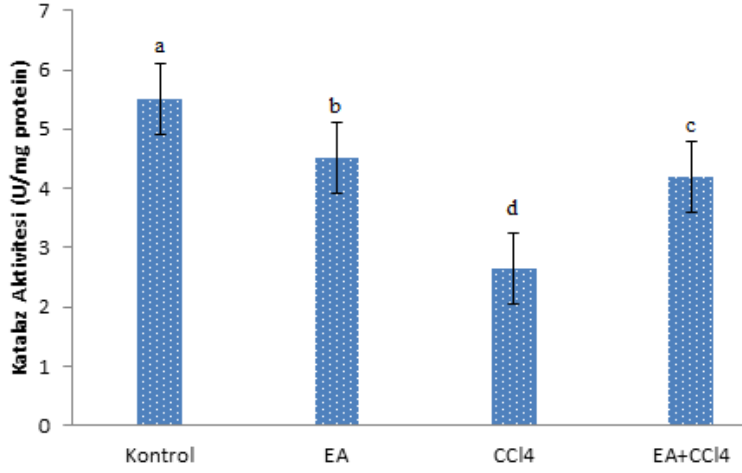
GRUPLAR	Katalaz Aktivitesi
Kontrol	$5,51 \pm 0,11^a$
EA	$4,51 \pm 0,10^b$
CCl ₄	$2,65 \pm 0,11^d$
CCl ₄ + EA	$4,20 \pm 0,10^c$



Şekil 3.6. BSA standart eğrisi

Bulgularımızda karaciğer dokusunda katalaz aktivitesinin kontrol grubunda en yüksek, EA ve CCl₄ + EA gruplarında kontrole göre biraz daha düşük, CCl₄ grubunda ise en

düşük değere geldiği görülmektedir. Tüm gruplarda katalaz seviyeleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$) (Tablo 3.3 ve Şekil 3.7).

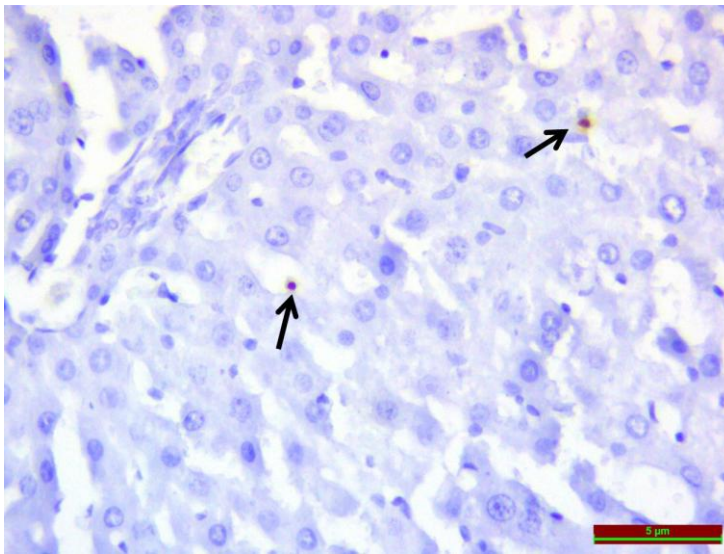


Şekil 3.7. Gruplarda katalaz aktivitesi

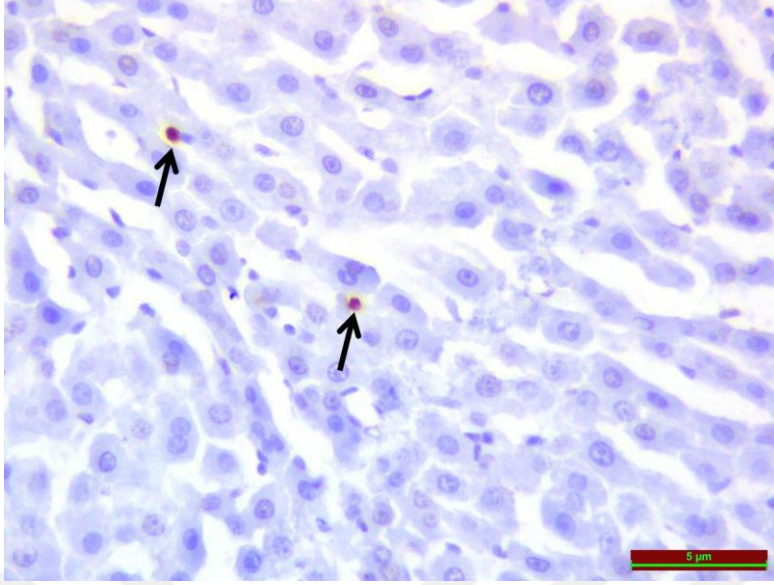
a-d: Sütun grafikte farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($p<0.05$). One-Way ANOVA Post Hoc LSD Testi.

3.4. TUNEL Metoduyla Belirlenen Histolojik Sonuçlar

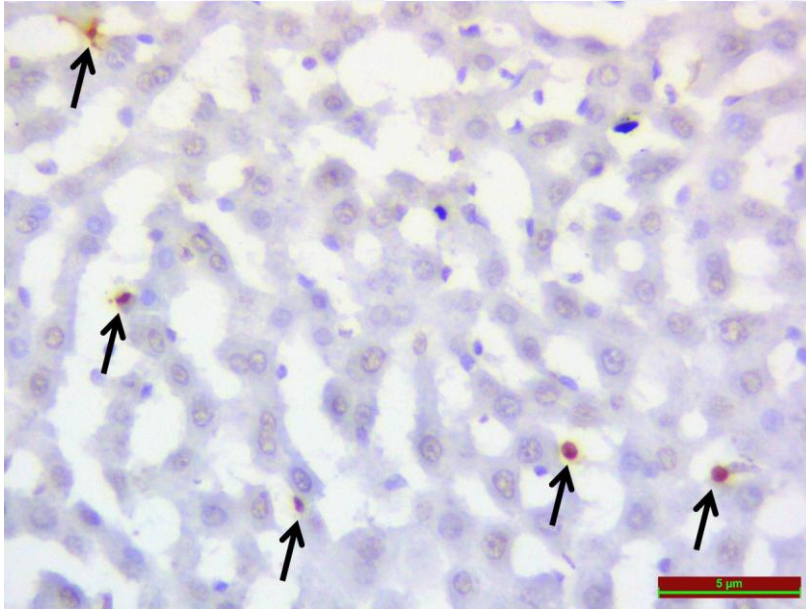
Çalışmanın sonlandırılmasının ardından TUNEL metodu kullanılarak apoptozis düzeyleri belirlenmiştir. Elde edilen görüntülerle, karaciğer dokusunda DNA’da meydana gelen hasar tespit edilmiştir.



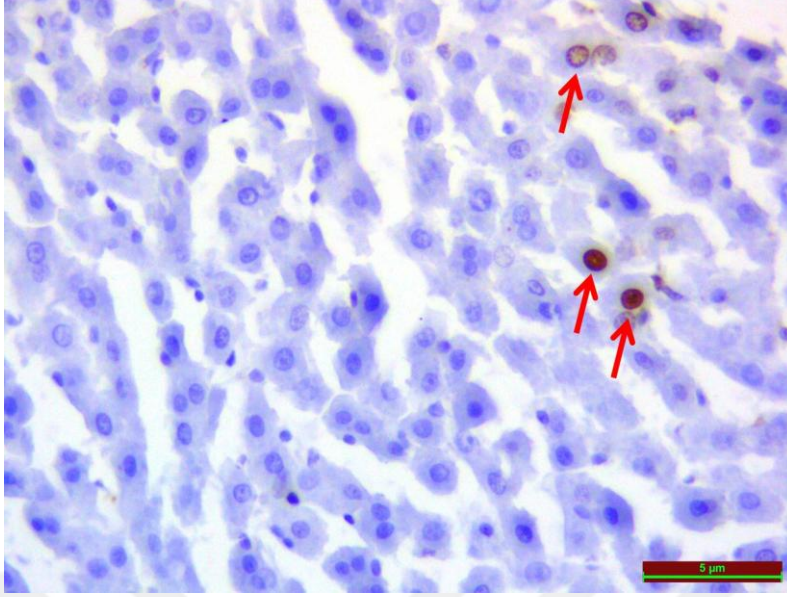
Şekil 3.8. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu sinüzoidal hücrelerde TUNEL pozitif hücreler (→)
Skala bar: 5µm.



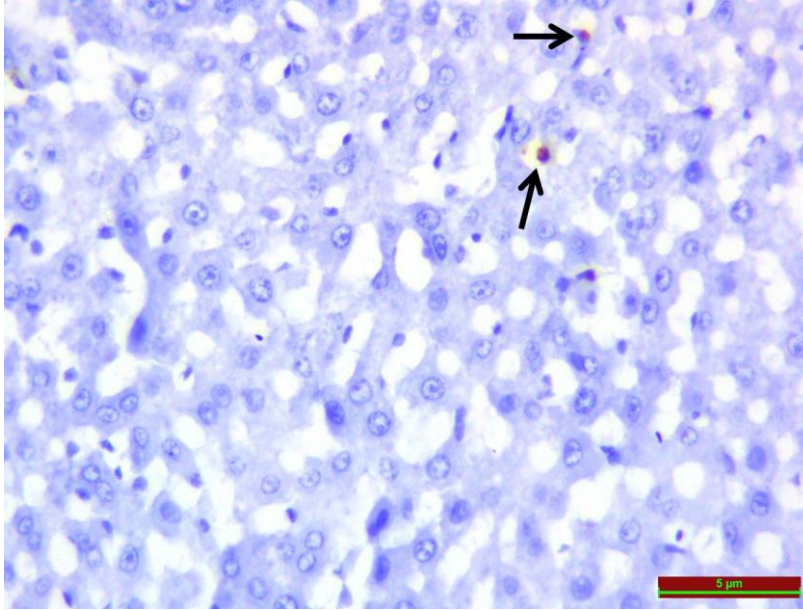
Şekil 3.9. EA grubuna ait karaciğer dokusu sinüzoidal hücrelerde TUNEL pozitif hücreler (→).
Skala bar: 5µm.



Şekil 3.10. CCl₄ grubuna ait karaciğer dokusu sinüzoidal hücrelerde TUNEL pozitif hücreler (→). Skala bar: 5µm.



Şekil 3.11. CCl₄ grubuna ait karaciğer dokusu hepatositlerde TUNEL pozitif hücreler (→). Skala bar: 5µm.



Şekil 3.12. CCl₄ + EA grubuna ait karaciğer dokusu sinüzoidal hücrelerde TUNEL pozitif hücreler (→). Skala bar: 5 µm.

Tablo 3.4. TUNEL metoduyla belirlenen apoptotik indeks (%)

GRUPLAR	Apoptotik indeks (%)	
	Sinüzoidal hücre	Hepatosit
Kontrol	1,66 ± 0,81	0,33 ± 0,81
EA	1,83 ± 0,75	0,16 ± 0,40
CCl ₄	7,33 ± 1,21 ^a	5,83 ± 2,63 ^a
CCl ₄ + EA	2,16 ± 0,98 ^b	0,42 ± 0,53 ^b

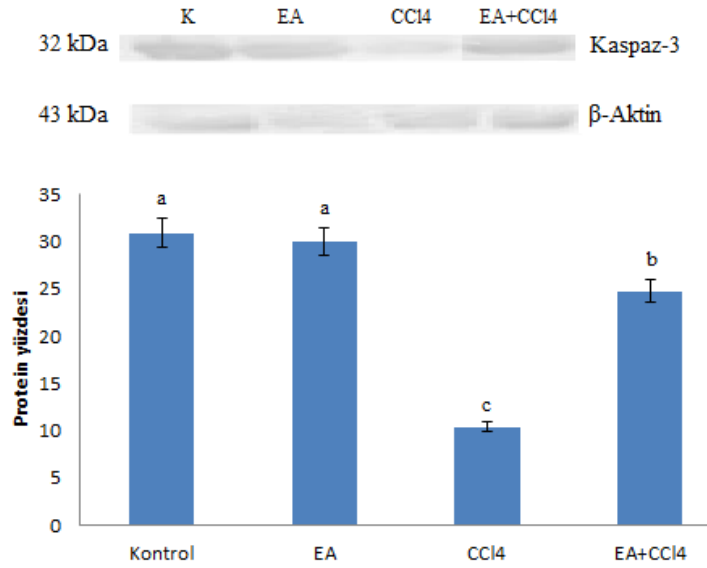
Değerler ortalama ± standart sapma olarak verildi. Gruplar arası değerlendirme One-Way ANOVA ve *Post hoc Tukey* Testi ile yapıldı.

a: Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, (p<0.05).

b: CCl₄ grubu ile karşılaştırıldığında, (p<0.05).

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; TUNEL pozitifliği karaciğer dokusunda sinüzoidal hücrelerde (siyah ok) ve hepatositlerde (kırmızı ok) gözlenmiştir. TUNEL pozitifliği; Kontrol (Şekil 3.8) ve EA (Şekil 3.9) gruplarında benzer olarak gözlenmiştir. Kontrol grubuyla kıyaslandığında CCl₄ (Şekil 3.10 ve Şekil 3.11) grubunda farkın istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı bulunmuştur (p<0.05). CCl₄ grubu CCl₄ + EA (Şekil 3.12) grubu ile kıyaslandığında ise TUNEL pozitifliğinin belirgin olarak azaldığı görülmektedir (p<0.05).

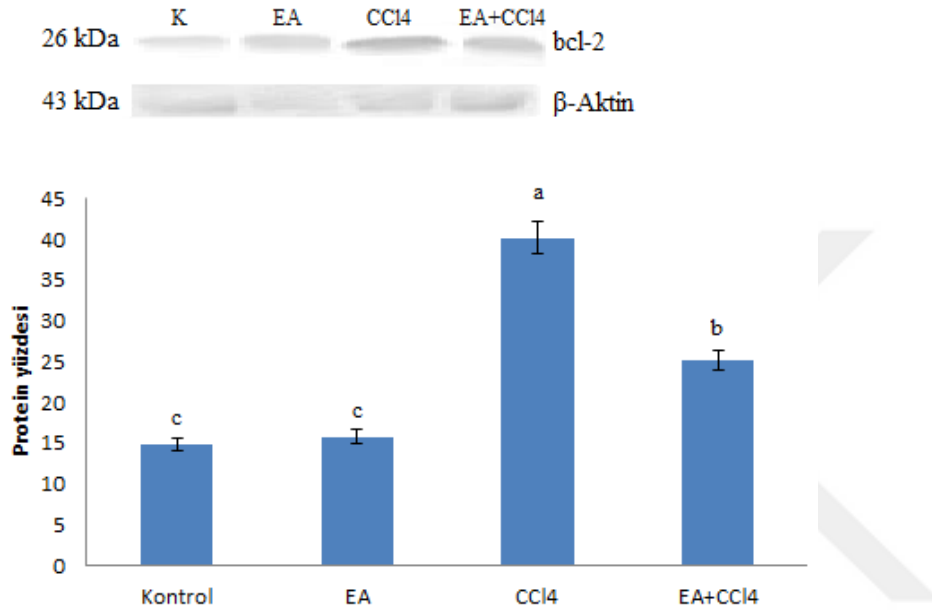
3.5. Kaspaz-3 ve Bcl-2 Proteinlerinin Ekspresyon Düzeyleri (Apoptotik Markerlar)



Şekil 3.13. Gruplarda kaspaz-3 ekspresyon düzeyleri

a-c: Sütun grafikte farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir (p<0.05). One-Way ANOVA *Post Hoc Duncan* Testi.

Apoptotik bir protein olan kaspaz-3 ekspresyon düzeyinin kontrol grubunda en yüksek, EA grubunda bu gruba çok yakın olduğu ve aradaki farkın önemli olmadığı, CCl₄ grubunda en düşük değere ulaştığı, kontrol ve EA gruplarıyla karşılaştırıldığında hem CCl₄ hem de CCl₄ + EA gruplarında aradaki farkın istatistiksel açıdan önemli olduğu görülmektedir (Şekil 3.13).



Şekil 3.14. Gruplarda bcl-2 ekspresyon düzeyleri

a-c: Sütun grafikte farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($p < 0.05$). One-Way ANOVA Post Hoc Duncan Testi.

Bcl-2 ekspresyon düzeyinin kaspaz-3 ekspresyonuna benzer şekilde, kontrol ve EA gruplarında en düşük ve birbirine çok yakın değerlerde olduğu, aradaki farkın önemli olmadığı, zıt olarak da CCl₄ grubunda en yüksek düzeye ulaştığı, CCl₄ + EA grubunda CCl₄ grubuna göre azaldığı, kontrol ve EA grupları ile karşılaştırıldığında CCl₄ ve CCl₄ + EA gruplarında aradaki farkın önemli olduğu görülmektedir (Şekil 3.14). Buna bağlı olarak, EA'nın bu proteinlerin sentezini artırıcı yönde etkisi olduğunu söyleyebiliriz.

4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Birçok çalışma, bitki kökenli polifenolik antioksidanların antiinfertilite, antimutajenik, antikanserojen, antiviral ve antioksidan aktivitelere sahip olduğunu göstermiştir (Pazourek vd., 2011; Cengiz vd., 2017). EA de pek çok meyve ve sebze de bulunan güçlü bir antioksidan aktivite içeren doğal fenolik bileşiktir. EA'nın süperoksit anyon ve hidroksil radikallerini temizleme, lipit peroksidasyonunu önleme sebebiyle karaciğeri koruyucu özellik gösterdiği yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (Ou vd., 2010; Keshtzar vd., 2016).

Long vd. (2017), CCl_4 ile hasara uğratılmış sıçanlarda EA'nın, karaciğer hasarı üzerinde koruyucu etkiye sahip antioksidan maddelerden biri olduğunu; Garcia-Nino ve Zazueta, (2015), EA'nın karaciğer hücrelerinin yapısal bütünlüğünü antioksidan ve sitoprotektif yapıları ile koruduğunu belirtmişlerdir.

Arulmozhi vd. (2013), EA'nın birçok bilimsel raporda karaciğer, akciğer, dil, deri, özofagus ve kolon kanseri gibi çeşitli kanserlerin *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda antikanser özelliğini değerlendirmişlerdir. EA'nın yaşlanmayı geciktirici etkiler de gösterdiği, DNA da oksidatif hasarın büyük bir bölümünü engelleyerek kanser gelişmesini büyük ölçüde durdurduğu belirtilmiştir (Pehlivan ve Güleriyüz, 2004).

Gümüş vd. (2011), EA'nın kolestatik sıçanların karaciğerinde ve serumunda Cu ve Zn seviyelerinin üzerinde düzenleyici etkiye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. EA'nın kanserojenler ve ilaçlar gibi bir grup ksenobiyotik ajana karşı kimyasal olarak önleyici ve farklı biyokimyasal parametrelerin seviyelerini koruyan bir antioksidan madde olduğu belirtilmiştir (Karakurt vd., 2016).

Deney hayvanlarıyla yapılan araştırmalarda, hasar oluşturulan gruplarla diğer gruplar arasındaki farkı anlamak için ilk parametrelerden biri hayvanların ağırlıklarıdır. Bunun için olumsuz etkilenen hayvanlarda ağırlık kaybı olması kaçınılmazdır. Bu yüzden çalışmamızda düzenli olarak sıçan ağırlıkları kaydedilmiştir. Yaptığımız sıçan ağırlıkları tayinini dikkate alarak, deneysel çalışma süresince elde edilen ağırlıklara bakıldığında (Tablo 3.1), kontrol ve EA gruplarında düzenli ve yüksek oranda ağırlık artışı gözlenirken; en az ağırlık artışının ise CCl_4 grubunda olduğu görülmektedir. CCl_4 + EA grubunda ise kontrol grubuna oranla daha az seviyede bir ağırlık artışı olmakla beraber, CCl_4 grubuna göre ise daha yüksek bir ağırlık artışı olmuştur. Sadece ağırlık artışları göz önünde bulundurularak, EA'nın CCl_4 'e karşı, hayvanlarda koruyucu bir etkisi olduğu ve bu

durumun hayvanların beslenmesi dâhil birçok faktör üzerinde pozitif bir etki gösterdiği yorumu yapılabilir.

Lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA'nın, oksidatif stresin bir belirtici olduğu, karaciğer MDA düzeyinin lipopolisakkarit-D-galaktosamin ile muamele gören grupta önemli ölçüde arttığı, ancak EA enjeksiyonunun karaciğer MDA düzeyi artışını önemli derecede azalttığı tespit edilmiştir (Gu vd., 2014).

CCl₄ ile karaciğer hasarı oluşturulan farelerde EA'nın koruyucu etkisini araştırıldığı çalışmada; 50 (n=10) fare normal kontrol grubu, model grubu, düşük, orta ve yüksek dozda EA (160, 320 ve 480 mg/kg) grupları olarak ayrılmış, farklı dozlarda EA gruplarındaki farelerin karaciğerindeki MDA seviyelerinin önemli ölçüde azaldığı (p<0.05), katalaz seviyesinin arttığı (p<0.05) belirlenmiştir (Long vd., 2017).

Girish ve Pradhan, (2012), CCl₄ ile karaciğer hasarı oluşturulan farelerde pikroliv, curcumin ve EA'nın karaciğer koruyucu ve antioksidan aktivitelerini değerlendirmek için gerçekleştirdikleri çalışmada; CCl₄ ile muamele gören farelerin karaciğer dokusu homojenatındaki MDA (p<0.001) düzeyinde artma, katalaz aktivitesinde azalma, histopatolojik incelemesinde sentrizonal nekroz, yağ değişiklikleri ve inflamatuvar reaksiyonlar saptandığını tespit etmişlerdir. Ayrıca, pikroliv, curcumin ve EA ile tedavi sonucunda karaciğer MDA düzeyinde düşüşün (p<0.001) gerçekleştiğini, antioksidan durumun iyileştiğini ve hepatik dokunun normale döndüğünü belirtmişlerdir.

Ding vd. (2017), CCl₄ ile siroz oluşturulan farelerde EA'nın ROS oluşumuna karşı koruyucu etkisi olup olmadığını araştırdıkları çalışmalarında; ROS oluşumunun siroz farelerde kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde arttığını (P=0.0023), bununla birlikte, 7,5 mg/kg ve 15 mg/kg EA uygulamasının siroz farelerindeki ROS oluşumunu önemli ölçüde inhibe ettiğini belirtmişlerdir (P=0.0062 ve 0.0046). Bu veriler, CCl₄ kaynaklı sirozlu farelerde EA'nın oksidatif stresi inhibe etmek için ROS oluşumunu baskıladığı belirtilmiştir.

Kaya, (2012), 8 hafta süre ile NaF (sodyum florid) verilen farelerin hepatositlerinde hidropik veya balonumsu dejenerasyon, karaciğerde kronik flor toksikasyonuna bağlı olarak bazı hepatositlerin çekirdeklerinde büyüme, çift çekirdek oluşumu gözlemlendiğini belirtmiştir. Flor ile birlikte 10 mg/kg dozda EA enjeksiyonu verilen grupta söz konusu bu patolojik değişikliklerin sayısında ve şiddetinde belirgin bir azalma meydana geldiği ve bu durumun flor hepatoksisitesine karşı EA'nın karaciğer koruyucu özellikte olduğunu belirtmiştir.

Salem vd. (2016), sıçan karaciğerinde oluşan oksidatif hasara karşı EA'nin koruyucu rolünü araştırdıkları çalışmada; $AlCl_3$ (Alüminyum klorid) ve γ ile radyasyona maruz bırakılan grupta MDA düzeyinin yüksek olduğunu, katalaz seviyesinin düştüğünü, EA veya Ferulik asitin verilmesiyle MDA düzeyinin önemli ölçüde düştüğünü, katalaz aktivitesini arttığını ve lipit peroksidasyonunu inhibe ettiğini belirtmişlerdir.

Aslan vd. (2015), CCl_4 ile muamele gören sıçanların akciğerinde oluşan hasara karşı *Nigella sativa* (çörek otu) tüketiminin koruyucu bir rolünün olup olmadığını araştırmışlardır. Akciğer dokusunda MDA seviyeleri incelendiğinde, kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı ($p>0.05$) ve en yüksek MDA seviyesinin CCl_4 grubunda olduğu, CCl_4 + çörek otu grubunda ise CCl_4 grubu ile karşılaştırıldığında MDA seviyelerinde ciddi bir azalma olduğu görülmüştür.

Yu-qing vd. (2017), punikalın, punicallin ve EA'nin *in vitro* antioksidan aktivitesini ve *in vivo* antioksidatif stres etkilerini karşılaştırmak için yaptıkları çalışmada; plazma, karaciğer ve bağırsaktaki MDA içeriğinin okside balık yağı (OFO) grubunda taze balık yağı (FFO) grubuna kıyasla belirgin şekilde arttığını ($p<0.05$), OFO grubu ile karşılaştırıldığında, OFO + EA grubunun plazma, karaciğer ve bağırsaktaki MDA içeriğinin önemli ölçüde azaldığını ($p<0.05$) ve FFO grubuna göre anlamlı bir fark göstermediğini ($p>0.05$) belirtmişlerdir.

Warpe vd. (2015), doksorubisin verilen sıçanlarda EA'nin kardiyovasküler etkisini araştırmışlardır. EA'ı 100 mg/kg ve 200 mg/kg dozlarında oral olarak verdikleri çalışmalarında; doksorubisin grubunda lipit peroksidasyonunda ve MDA seviyelerinde bir artış ($p<0.05$) görülürken, EA (100 mg/kg ve 200 mg/kg) ile tedavi edilen gruplarda ($p<0.05$ ve $p<0.01$) EA'nin MDA'yı belirgin bir şekilde düşürdüğü görülmüştür. Doksorubisin grubundaki katalaz düzeyi kontrol gruplarına kıyasla bir azalma ($p<0.05$) gösterirken, EA ile tedavi edilen gruplarda katalaz düzeyinde artış görülmüştür ($p<0.01$). Ayrıca, EA'nin kalp koruyucu etkisinin olduğunu ve bunun sadece yüksek dozda verilen EA (200 mg/kg)'da gözlemlendiğini de belirtmişlerdir.

Nejad vd. (2015), küresel serebral iskemi reperfüzyonunun sıçan modellerinde EA ile tedavisindeki rolünü araştırmışlardır. Global serebral iskemi (GCIR) grubundaki serum MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre yüksek ($p<0.001$) olduğunu, EA + GCIR grubundaki MDA düzeylerinde önemli bir değişiklik olmaksızın kontrol grubundan daha yüksek ($p>0.05$) ve GCIR grubundan anlamlı derecede düşük ($p<0.001$) olduğunu

belirtmişlerdir. 10 gün süreyle 100 mg/kg dozunda EA verilen gruptaki serum MDA seviyesinin kontrol grubuyla özdeşleştiğini açıklamışlardır.

Arafat vd. (2016), alloxan ile diyabet oluşturulan sıçanların karaciğerinde EA bakımından zengin *Momordica charantia*'nın karaciğer koruyucu etkisini araştırmışlardır. Alloxan verilen gruptaki sıçanların, kontrol grubundaki sıçanlara kıyasla plazma ve karaciğerindeki MDA'nın daha yüksek seviyede olduğunu, alloxan + *Momordica charantia* verilen grupta ise karaciğerlerindeki MDA konsantrasyonunun önemli ölçüde azaldığını belirtmişlerdir.

Sakthivel vd. (2008), sodyum selenit ile muamele edilen sıçanlarda oluşturulan kataraktogenezisin EA ile önlenip önlenemediğini araştırmışlardır. EA enjeksiyonu ile katarakt tedavisi edilen grubun en az yarısında EA'nın katarakt oluşumunu önlediğini, katarakt değişiklikleri görülen gözlerdeki donuklaştırma derecesinin sodyum selenit verilen sıçanlarda görülen seviyeden daha az yoğun olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca, sodyum selenit verilen gruptaki MDA seviyesinin kontrol ve EA ile katarakt tedavisi edilen gruba göre yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

Yüce vd. (2007), sisplatin ile sıçan karaciğer ve kalp dokularında oluşturulan toksisite üzerine EA'nın olası koruyucu etkilerini belirlemek üzere araştırdıkları çalışmalarında; sisplatin ile hasar oluşturulan grupta karaciğer ve kalp dokusundaki MDA düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu, ancak, 10 mg/kg dozda gavaj yoluyla verilen EA'nın, sisplatin ile hasar oluşturulan hayvanlara uygulanmasının MDA düzeylerini azalttığını belirtmişlerdir.

Bulgularımızdaki plazma MDA seviyeleri karşılaştırıldığında (Tablo 3.2, Şekil 3.4), gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık görülmektedir ($p<0.05$). Tablo 3.2. ve Şekil 3.4'e bakıldığında, en yüksek MDA düzeyi CCl_4 grubunda ortaya çıkmıştır. CCl_4 + EA grubunun MDA düzeyi ise CCl_4 grubuna göre daha düşük çıkmıştır ve istatistiksel açıdan farklılık vardır. Burada, sadece EA muamelesi gören EA grubunun MDA seviyesinin en düşük çıkması da dikkat çekicidir. Sonuç olarak, EA'nın karaciğer dokusunda ve plazmada, MDA düzeyini düşürüp hasarı azaltmada etkin bir role sahip olduğunu söyleyebiliriz.

Bulgularımızda, karaciğer dokusundaki MDA düzeyi ise gruplar bazında değerlendirildiğinde (Tablo 3.2 ve Şekil 3.5), kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Fakat CCl_4 ve CCl_4 + EA gruplarının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak farklı ($p<0.05$) olduğu ve en yüksek MDA düzeyinin CCl_4

grubunda olduğu görülmüştür. CCl₄ + EA grubunun MDA düzeyi kontrol gruplarına göre yüksek olmakla beraber, CCl₄ grubuna göre daha düşük seviyede olması, EA'in karaciğer dokusunda lipid peroksidasyonuna bağılı olarak oluşan MDA seviyesini düşürmede etkili bir antioksidan olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda katalaz aktivitesinin kontrol grubunda en yüksek, EA ve CCl₄ + EA gruplarında kontrol grubundan biraz daha düşük ve birbirine yakın seviyelerde olduğu, CCl₄ grubunda en düşük değere ulaştığı ve EA uygulamasının katalaz aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir (Şekil 3.7).

Aslan vd. (2016a), CCl₄ uygulanarak karaciğer hasarı oluşturulan sıçanlarda deve dikeninin koruyucu rolünün olup olmadığını araştırmışlardır. Karaciğerdeki apoptoz düzeyini TUNEL yöntemiyle belirledikleri çalışmalarında; karaciğer dokusunda TUNEL pozitifliğinin kontrol grubuyla karşılaştırıldığında CCl₄ grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiğini ($p < 0.05$), CCl₄ ile karşılaştırıldığında, sadece deve dikenini uygulanan kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmediğini, oysa CCl₄ + deve dikenini grubunda apoptotik indeksin CCl₄ grubuna kıyasla azaldığı ve normal değerlere yaklaştığını belirtmişlerdir. CCl₄ uygulanan sıçanlarda akciğer hasarına karşı çörek otunun (*Nigella sativa L.*) koruyucu rolünün olup olmadığını araştırdıkları başka bir çalışmada ise; akciğerlerde TUNEL pozitifliği kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, CCl₄ grubunda apoptotik indeksin en yüksek olduğunu, CCl₄ + çörek otu grubundaki apoptotik indeksin CCl₄'e göre azalmasına ise çörek otunun neden olduğunu ve normal seviyelere yaklaştığını belirtmişlerdir ($p < 0.05$) (Aslan vd., 2016b).

Sıçanlarda EA'in miyokard morfolojisi ve kardiyak fonksiyonu üzerindeki etkisi araştırılmış, EA verilmesinden sonra, enfarktüs alanının önemli ölçüde azaldığı görülmüştür (Wei vd., 2017).

Hwang vd. (2010), Concanavalin (ConA) ile karaciğer hasarı oluşturulan farelerde EA'in koruyucu özelliklerini araştırmışlardır. ConA ile muamele edilen farelerde daha fazla TUNEL pozitif apoptotik hepatosit olduğu, EA ile tedavi edilen farelerde karaciğer bölümlerinde daha az olduğu belirtilmiştir (Hwang vd., 2010).

Ou vd. (2010), okside düşük yoğunluklu lipoprotein (oxLDL) ile muamele gören insan umbilikal ven endotel hücrelerinde (HUVECs) apoptozun indüksiyonunu, TUNEL ve DAPI boyama deneyleri kullanılarak analiz etmişlerdir. 24 saat boyunca 150 µg/ml oxLDL ile inkübe edilen hücreler, yoğunlaştırılmış ve parçalanmış çekirdeklerin oluşumu

da dâhil olmak üzere apoptozun tipik özelliklerini gösterirken, bu apoptotik özellikler, 20 µM EA ile önceden muamele edilmiş HUVECs’lerde gözlenmediğini belirtmişlerdir.

Çalışmamızdaki TUNEL metodu sonuçları (Tablo 3.4) kontrol ve EA grupları arasında istatistiksel olarak fark oluşmadığını göstermektedir. Ancak CCl₄ grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artma gözlenmiş ($p<0.05$), CCl₄ + EA grubunda ise CCl₄ grubuna göre anlamlı bir şekilde azalış gözlenmiştir ($p<0.05$). TUNEL metoduyla apoptozis oranının ifade edildiği bu sonuçları değerlendirdiğimizde, CCl₄’ün karaciğerde DNA’da ciddi düzeyde hasar meydana getiren bir kimyasal olduğunu, CCl₄ ile birlikte EA verdiğimiz grupta ise buna bağlı olarak meydana gelmiş olan karaciğer hasarına karşı EA’ın apoptotik indeksi azaltarak karaciğeri mevcut hasara karşı koruduğunu söyleyebiliriz.

OxLDL’ye maruz bırakılan insan umbilikal ven endotel hücrelerinde EA’ın antiapoptotik etkisinin araştırıldığı çalışmada, EA’ın P53’ün aktivasyonunu ve Bax’ın ekspresyonunu önemli ölçüde arttırdığı ve antiapoptotik protein olan Bcl-2 ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir (Ou vd., 2010).

Srigopalram vd. (2012), dietilnitrosamin (DEN) ile indüklenen karaciğer kanseri sıçanlarda EA’ın etkisini araştırdıkları çalışmalarında; DEN verilen grubun kontrol grubuna kıyasla kaspaz-3 ekspresyonunda düşüş gösterdiğini, EA ile tedavi edilen grupta, DEN ile indüklenen tümör taşıyan gruba kıyasla, kaspaz-3’ün ekspresyonunda artış gösterdiğini belirtmişlerdir.

Umeselma vd. (2015), HCT-15 kolon adenokarsinoma hücrelerine karşı EA’ın antikanser etkisini araştırmışlardır. HCT-15 hücrelerinin EA ile tedavisi sonucu, zamana bağımlı bir şekilde Bcl-2 proteininde belirgin bir düşüş gerçekleşirken, kaspaz-3 protein ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla arttığını belirtmişlerdir. Bu sonuçların EA’ın Bcl-2’nin aşağı ekspresyonu ve kaspazların aktivasyonu yoluyla HCT-15 hücrelerinde apoptozu indüklediğini belirtmişlerdir.

İnsan prostat kanseri hücrelerinin EA (10-100 µM/L) ile tedavisi sonucu hücre yaşayabilirliği üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışmada, EA’ın doza bağımlı olarak bcl-2 ekspresyonunda azalma ve kaspaz-3 ekspresyonunda artış meydana getirdiği tespit edilmiştir (Malik vd., 2011).

Mishra ve Vinayak, (2015), lenfoma taşıyan farelerin karaciğerinde protein kinaz C aracılı apoptozun düzenlenmesinde EA’ın etkisini araştırmışlardır. Lenfoma taşıyan farelerde kaspaz-3 ekspresyonunun normalden düşük olduğunu, EA ile tedavi sonucunda kaspaz-3 aktivasyonunun hızlandığını belirtmişlerdir. EA’ın 60 ve 80 mg/kg dozlarında

verilmesinin sırasıyla aktivasyonu yaklaşık % 133 ve % 112'ye kadar önemli ölçüde arttırdığını tespit etmişlerdir.

DEN ile muamele gören sıçanlarda deneysel karaciğer kanserine karşı EA'nın kimyasal önleyici etkisinin olup olmadığı araştırılmış, DEN verilen grubun kontrol grubuna kıyasla bcl-2 ekspresyonunda artış gösterdiği, DEN + EA grubunda ise bcl-2 ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir (Srigopalram vd., 2014).

Aslan ve Can, (2014), CCl₄ ile karaciğer hasarı oluşturulan sıçanlarda antioksidan bir bitki olan deve dikeninin karaciğerdeki koruyucu rolünü araştırmışlardır. Deve dikenini ekstraktını sıçanların içme suyuna ekleyerek verdikleri çalışmada, CCl₄ grubu; pozitif kontrol ve CCl₄ + deve dikenini grubu ile karşılaştırıldığında bcl-2 ekspresyon seviyesinin daha yüksek olduğunu ve kaspaz-3 ekspresyon seviyesinin ise CCl₄ grubunda en düşük değerde olduğunu tespit etmişlerdir.

Azoksimetan ile kolorektal kanser oluşturulan sıçanlarda domates tozunun (DT) etkileri araştırılmış, kanserli dokularda kaspaz-3 ekspresyon düzeyi, azoksimetan grubu ve DT verilen azoksimetan grubu arasında istatistiksel açıdan fark göstermiş ($p < 0.05$), azoksimetan grubuna göre bu protein, DT verilen azoksimetan grubundan daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Aslan, 2011).

Qiu vd. (2013), T24 insan mesane kanseri hücrelerinde ürolithinlerin ve EA'nın antiproliferatif özelliklerini araştırmışlardır. Ürolithinler ve EA ile tedavi edilen hücrelerin kaspaz-3'ü yaklaşık olarak 2 kat arttırdığını ve ürolithinlerin ve EA'nın T24 hücrelerinde kaspaz-3'e bağlı ölüm oluşturduğunu tespit etmişlerdir.

Balb C çıplak farelerinde EA'nın pankreatik kanser hücrelerinin tümör büyümesini inhibe ettiği mekanizmaları araştırılmış, EA'nın, Bcl-2 ekspresyonunu engellediğini bulmuşlardır (Zhao vd., 2013).

Naiki-Ito vd. (2015), prostat kanseri hücrelerinin çoğalması üzerinde EA'nın etkilerini araştırmışlardır. EA ile tedavi edilen sıçanların prostat hücrelerinde kaspaz-3 aktivasyonunun arttığını ve bu sonuçların kaspaz-3'e bağımlı apoptozu indükleyerek prostat kanserini baskılayıp hücre büyümesini inhibe ettiğini belirtmişlerdir.

Sepand vd. (2016), gentamisin (GEN) verilen sıçanlarda böbrek dokusunda oluşturulan nefrotoksisiteye karşı EA'nın koruyucu etkisini araştırmışlardır. GEN grubundaki sıçanları kontrol grubundaki sıçanlarla karşılaştırdıklarında GEN'in Bcl-2/Bax ifadesinin oranını önemli ölçüde azalttığını, GEN ile birlikte EA (10 mg/kg) verilen grupta ise EA'nın bu oranı etkili bir şekilde arttırdığını ($p < 0.001$), kaspaz-3'ün GEN'e maruz

bırakılmış sıçanların böbrek dokularında belirgin olarak aktive olduğunu, bununla birlikte, GEN ve EA'nın birlikte verildiği gruptaki sıçanların böbrek dokularında kaspaz-3'ün aktivasyonunun inhibe edildiğini belirtmişlerdir.

Ding vd. (2017), CCl₄ ile siroz oluşturulan farelerde kontrol grubundaki farelere kıyasla kaspaz-3 aktivitesinin arttığını, bununla birlikte EA (7,5 mg/kg ve 15 mg/kg) uygulamasıyla EA'nın kaspaz-3 aktivitesini azalttığını belirtmişlerdir (P=0.0041 ve 0.0026). Böylece EA'nın farelerde siroza karşı apoptotik etkisinin olabileceğini açıklamışlardır.

Bulgularımızda, kaspaz-3 miktarı CCl₄ + EA grubunda, oldukça yüksek oranda sentezlenmiştir. Sadece CCl₄ verdiğimiz grupta ise kaspaz-3 oranının daha az olduğu görülmüştür. Kaspaz-3 proteinin sentez oranının CCl₄ + EA gruplarında, sadece CCl₄ verilen gruplara göre fazla çıktığı görülmektedir. Bu durum TUNEL metodu sonuçlarıyla birlikte değerlendirildiğinde, CCl₄ grubunda apoptozis oranının yüksek, kaspaz-3 protein ekspresyon oranının düşük olmasının, CCl₄'ün bu proteini kodlayan genleri baskıladığı sonucunu çıkarabiliriz.

Çalışmamızda, bcl-2 ekspresyon düzeyinde ise kontrol ile EA grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yokken, CCl₄ grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak farkın anlamlı olduğu (p<0.05) görülmektedir. CCl₄ grubunda bcl-2 ekspresyon düzeyi CCl₄ + EA grubuna göre daha yüksek çıkmıştır. Bcl-2 ailesi, anti-apoptotik yapıda olabilmektedir. Sonuçlarımız, karaciğer hasarı oluşturulmuş sıçanlarda bcl-2 ekspresyon düzeyinin EA verilen gruba göre yüksek çıkmasının, bu antioksidan maddenin bcl-2 oranını düşürmesiyle açıklanabilir. Hem CCl₄ gruplarında apoptozis oranının (TUNEL) yüksek çıkması, hem de bcl-2 ekspresyon düzeyinin bu gruplarda yüksek çıkması, bcl-2 proteinlerini kodlayan genlerin CCl₄ gruplarında aktif olmasıyla açıklanabilir.

Bulgularımız önceki verilerle (Ou vd., 2010; Srigopalram vd., 2012; Umeselma vd., 2015; Malik vd., 2011; Mishra ve Vinayak, 2015; Srigopalram vd., 2014; Aslan ve Can, 2014; Aslan, 2011; Qiu vd., 2013; Zhao vd., 2013; Naiki-Ito vd., 2015) EA'nın kaspaz-3'ün aktivasyonunun arttırdığı ve bcl-2'nin aktivasyonunu azaltması bakımından uyum göstermektedir. Ancak bazı verilerde (Sepand vd., 2016; Ding vd., 2017) EA ile tedavi edilen gruplarda kaspaz-3 aktivasyonunun inhibe edildiği ve bcl-2 aktivasyonun artması bakımından farklılık göstermektedir.

Araştırmamızda kullandığımız apoptotik markerların (kaspaz-3 ve bcl-2) ekspresyon düzeyleri incelendiğinde, EA'nın apoptozis üzerindeki etkileri açık bir şekilde görülmektedir.

Yine aynı şekilde apoptozis düzeyini belirlemek amacıyla yapılan TUNEL sonuçları incelendiğinde, CCl₄, EA ve apoptozis arasındaki ilişkiyi daha iyi anlamamız mümkün olmaktadır.

Bulgularımız, güçlü bir antioksidan olan EA'nın karaciğer üzerinde koruyucu etkileri olduğunu ve karaciğer hasarına karşı kullanılabileceğini göstermektedir. Literatür bulguları sonuçlarımızla karşılaştırıldığında, EA'nın sadece karaciğer üzerinde değil, böbrek, akciğer, ağız gibi birçok organda kimyasal önleyici etkiler gösterdiği ve meme, ince bağırsak, kolon tümörlerinin görülme sıklığını azalttığı da belirtilmiştir (Landete, 2011; Munagala vd., 2013; Garcia-Nino ve Zazueta, 2015). Çalışmamızda, sıçanlar üzerinde denenen EA'nın göstermiş olduğu karaciğer koruyucu etkilerin, insanlar içinde benzer etkiler gösterebileceğini ve bunun karaciğer hastalıklarını önlemede gelecekte alternatif tıpta kullanılabileme potansiyelinin olabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Abdel-Mageed, H.M., El-Laithy, H.M., Mahran, L.G., Fahmy, A.S., Mader, K. and Mohamed, S.A.,** 2012. Development of Novel Flexible Sugar Ester Vesicles as Carrier Systems for the Antioxidant Enzyme Catalase for Wound Healing Applications, *Process Biochemistry*, **47**, 1155-1162.
- Ahad, A., Ganai, A.A., Mujeeb, M. and Siddiqui, W.A.,** 2014. Ellagic acid, an NF- κ B Inhibitor, Ameliorates Renal Function in Experimental Diabetic Nephropathy, *Chemico-Biological Interactions*, **219**, 64-75.
- Akyilmaz, E. and Kozgus, O.,** 2009. Determination of Calcium in Milk and Water Samples by Using Catalase Enzyme Electrode, *Food Chemistry*, **115**, 347-351.
- Al-Asmari, A.K., Athar, M.T., Al-Shahrani, H.M., Al-Dakheel, S.I. and Al-Ghamdi, M.A.,** 2015. Efficacy of *Lepidium sativum* Against Carbon Tetrachloride Induced Hepatotoxicity and Determination of Its Bioactive Compounds by GC-MS, *Toxicology Reports* 2, 1319-1326.
- Al-Dbass, A.M., Al- Daihan, S.K. and Bhat, R.S.,** 2012. *Agaricus blazei* Murill as an Efficient Hepatoprotective and Antioxidant Agent Against CCl₄-Induced Liver Injury in Rats, *Saudi Journal of Biological Sciences*, **19**, 303-309.
- Altıntaş, E.,** 2012. Karaciğerin Sonoanatomisi “Görmek İçin Bakmak; Bilmek İçin Görmek Lazım”, *Güncel Gastroenteroloji*, **16(1)**, 75-81.
- Antmen, Ş.E.,** 2005. Beta Talasemide Oksidatif Stres, *Yüksek Lisans Tezi*, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Arafat, S.Y., Nayeem, M., Jahan, S., Karim, Z., Reza, H.M., Hossain, M.H., Shohel, M. and Alam, M.A.,** 2016. Ellagic Acid Rich *Momordica charantia* Fruit Pulp Supplementation Prevented Oxidative Stress, Fibrosis and Inflammation in Liver of Alloxan Induced Diabetic Rats, *Orient Pharmacy and Experimental Medicine*, **16**, 267-278.
- Arıncı, K. ve Elhan, A.,** 2006. Anatomi, 1. Cilt. Güneş Kitabevi, Ankara.
- Arora, B., Choudhary, M., Arya, P., Kumar, S., Choudhary, N. and Singh, S.,** 2015., Hepatoprotective Potential of *Saraca ashoka* (Roxb.) De Wilde Bark by Carbon Tetrachloride Induced Liver Damage in Rats, *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, **53**, 23-28.

- Arulmozhi, V., Pandian, K. and Mirunalini, S.,** 2013. Ellagic Acid Encapsulated Chitosan Nanoparticles for Drug Deliverysystem in Human Oral Cancer Cell Line (KB), *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **110**, 313-320.
- Aslan, A. and Can, M.İ.,** 2014. Milk Thistle Impedes the Development of Carbontetrachloride-Iduced Liver Damage in Rats Through Suppression of Bcl-2 and Regulating Caspase Pathway, *Life Sciences*, **117**, 13-18.
- Aslan, A., Boydak, D., Can, M.I., Kuloğlu, T. and Başpınar, S.,** 2016b. *Black cumin* may be a Potential Drug for Development of Carbontetrachloride-Induced Lung Damage in Rats, *Progress in Nutrition*, **18(1)**, 56-62.
- Aslan, A.,** 2011. Ratlarda Azoksimetan Uygulanarak Oluşturulan Kolorektal Kanserde Likopenin Siklooksijenaz-2 (Cox-2), Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bax, Bcl-2, P53 Proteinlerinin Ekspresyonu ve DNA Hasarı Üzerine Etkisi, *Doktora Tezi*, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Aslan, A., Boydak, D., Can, M.I. and Kuloğlu, T.,** 2015. *Nigella sativa* Improves the Carbon Tetrachloride-Induced Lung Damage in Rats Through Repression of erk/akt Pathway, *Bangladesh J. Pharmacol.*, **10**, 654-659.
- Aslan, A., Can, M.I., Kuloğlu, T. and Başpınar, S.,** 2016a. *Milk thistle* may Induce Apoptosis in Development of Carbontetrachloride-Induced Liver DNA Damage in Rats, *Progress in Nutrition*, **18(2)**, 146-151.
- Baeeri, M., Momtaz, S., Navaei-Nigjeh, M., Niaz, K., Rahimifard, M., Ghasemi-Niri, S.F., Sanadgol, N., Hodjat, M., Sharifzadeh, M. and Abdollahi, M.,** 2017. Molecular Evidence on the Protective Effect of Ellagic Acid on Phosalone-Induced Senescence in Rat Embryonic Fibroblast Cells, *Food and Chemical Toxicology*, **100**, 8-23.
- Baek, B., Lee, S.H., Kim, K., Lim, H.W., and Lim, C.J.,** 2016. Ellagic Acid Plays a Protective Role Against UV-B-Induced Oxidative Stress by Up-Regulating Antioxidant Components in Human Dermal Fibroblasts, *Korean J. Physiol. Pharmacol.*, **20(3)**, 269-277.
- Baran, O.,** 2014. Ratlarda Karbon Tetraklorür ile Oluşturulan Kronik Karaciğer Hasarı Üzerine Zerdaçal (*Curcuma longa*) ve Meryemana Dikeninin (*Silybum marianum*) Etkisi, *Yüksek Lisans Tezi*, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.
- Başaran, A.,** 2010. Tıbbi Biyoloji, Feryal Matbaacılık, Ankara.

- Bayle, M., Roques, C., Marion, B., Audran, M., Oiry, C., Bressolle-Gomeni, F.M.M. and Cros, G.,** 2016. Development and Validation of a Liquid Chromatography-Electrosprayionization-Tandem Mass Spectrometry Method for the Determination of Urolithin C in Rat Plasma and Its Application to a Pharmacokinetic Study, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **131**, 33-39.
- Benzer, F. ve Ozan, S.,** 2003. *Fasciola hepatica* ile Enfekte Koyunlarda Lipid Peroksidasyonu, Antioksidant Enzimler ve Nitrik Oksit Düzeyleri, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, **27**, 657-661.
- Bharathi, E., Jagadeesan, G. and Vijayakumar, M.,** 2014. Hepato-Ameliorative Effect of Hesperidin and Ellagic Acid on Mercuric Chloride Intoxicated Rats, *Biomedicine & Aging Pathology*, **4**, 17-21.
- Bıçakçioğlu, M.,** 2014. Karaciğer Nakli Vericilerinde Farklı Peep Düzeylerinin Karaciğer Fonksiyonlarına Etkisi, *Uzmanlık Tezi*, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Malatya.
- Bilgiç, S.,** 2011. Karaciğeri Rejenere Olan ve Olmayan Sıçanlarda Karbon Tetraklorürle (CCl₄) İndüklenen Akut Karaciğer Hasarı ve N-Asetilsisteinin Koruyucu Etkisi, *Doktora Tezi*, İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Malatya.
- Boydak, D.,** 2015. Karbon Tetraklorür (CCl₄) ile Akciğer Hasarı Oluşturulmuş Ratlarda Çörek Otu (*Nigella sativa* L.)'nin Kaspaz-3, Kaspaz-9, Erk, Akt Proteinlerinin Ekspresyonu ve DNA Hasarı Üzerine Etkisi, *Yüksek Lisans Tezi*, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Bozukluhan, K., Merhan, O., Özcan, A., Gökçe, H.İ. ve Gökçe, G.,** 2017. *Toxocara vitulorum* ile Doğal Enfekte Buzağılarda Serum Haptoglobin Düzeyi, Oksidatif Belirteçler ve Bazı Biyokimyasal Parametrelerin Düzeyinin Belirlenmesi, *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **64**, 75-79.
- Bulani, V.D., Kothavade, P.J., Kundaikar, H.S., Gawali, N.B., Chowdhury, A.A., Degani, M.S. and Juvekar, A.R.,** 2016. Inclusion Complex of Ellagic Acid with B-Cyclodextrin: Characterization and *in vitro* Anti-Inflammatory Evaluation, *Journal of Molecular Structure*, **1105**, 308-315.

- Can, M.İ.**, 2014. Karbon Tetraklorür (CCl₄) ile Karaciğer Hasarı Oluşturulmuş Ratlarda Deve Diken (Silybum marianum L.)'nin Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bax, Bcl-2 Proteinlerinin Ekspresyonu ve DNA Hasarı Üzerine Etkisi, *Yüksek Lisans Tezi*, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Ceci, C., Tentori, L., Atzori, M.G., Lacal, P.M., Bonanno, E., Scimeca, M., Cicconi, R., Mattei, M., Gabriella de Martino, M., Vespasiani, G., Miano, R. and Graziani, G.**, 2016. Ellagic Acid Inhibits Bladder Cancer Invasiveness and *in vivo* Tumor Growth, *Nutrients*, **8(744)**, 1-20.
- Cengiz, M., Ali, J.H., Kutlu, H.M., Vejselova, D. and Ayhancı, A.**, 2017. Potential Recruiting and Hepatoprotective Effects of Ellagic Acid in D-Galactosamine-Induced Liver Damage in Rats, *Pakistan J. Zool.*, **49(4)**, 1251-1259.
- Çetin, A., Çiftçi, O. and Otlı, A.**, 2016. Protective Effect of Hesperidin on Oxidative and Histological Liver Damage Following Carbon Tetrachloride Administration in Wistar Rats, *Archives of Medical Science*, **12(3)**, 486-493.
- Çetin, E. ve Çetin, N.**, 2011. Sıçanlarda Karbon Tetraklorür ile Oluşturulan Oksidatif Beyin ve Böbrek Hasarına Karşı Grelinin Koruyucu Etkisi, *Veteriner Bilimleri Dergisi*, **6(3)**, 195-200.
- Çetinkaya, A.**, 2009. Ratlarda N-Asetil Sistein ve L-Karnitin'in Karbon Tetraklorür ile Oluşturulan Akut Karaciğer Hasarı Üzerine Etkileri, *Yan Dal Uzmanlık Tezi*, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kahramanmaraş.
- Dai, X., Yin, Y. and Qin, L.**, 2017. Valproic Acid Exposure Decreases the Mrna Stability of Bcl-2 Via Up-Regulating miR-34a in the Cerebellum of Rat, *Neuroscience Letters*, **657**, 159-165.
- Dalvi, L.T., Moreira, D.C., Andrade Jr, R., Ginani, J., Alonso, A. and Hermes-Lima, M.**, 2017. Ellagic Acid Inhibits Iron-Mediated Free Radical Formation, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **173**, 910-917.
- Danjolli, D.**, 2015. Deneysel Karaciğer İntoksikasyonunda N Asetil Sisteinin Karaciğerdeki Bazı Lektinlerin Ekspresyonu ve Lokalizasyonu Üzerine Etkileri, *Yüksek Lisans Tezi*, Balıkesir Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.

- Dinçel, G.Ç. ve Yıldırım, S.,** 2016. Increased Expressions of eNOS and iNOS Correlate with Apoptosis of Diabetic Nephropathy in Streptozotocin-induced Type 1 Diabetic Rats, *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **22(3)**, 381-390.
- Ding, Y., Wang, L., Song, J. and Zhou, S.,** 2017. Protective Effects of Ellagic Acid Against Tetrachloride-Induced Cirrhosis in Mice Through the Inhibition of Reactive Oxygen Species Formation and Angiogenesis, *Experimental and Therapeutic Medicine*, **14**, 3375-3380.
- Du, L., Fei, Z., Song, S. and Wei, N.,** 2017. Antitumor Activity of Lobaplatin Against Esophageal Squamous Cell Carcinoma Through Caspase-Dependent Apoptosis and Increasing the Bax/Bcl-2 Ratio, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **95**, 447-452.
- Emek, H., Dönmez, D.B., Bayçu, C. ve Musmul, A.,** 2017. Erişkin Erkek Sıçanlarda Karbon Tetraklorür ile Oluşturulan Testis Hasarı Üzerine Kuersetinin Etkisi, *Osmangazi Tıp Dergisi*, **39**, 65-73.
- Emek, H.,** 2014. Erişkin Erkek Sıçanlarda Karbon Tetraklorür ile Oluşturulan Testis Hasarı Üzerine Kuersetinin Etkisi, *Yüksek Lisans Tezi*, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir.
- Ertuğrul, E.,** 2014. Alt Ekstremitte İskemi-Reperfüzyon Modelinde Ticagrelor'un İskelet Kası Viabilitesi ve ADMA, MDA, GSH Seviyelerine Etkileri, *Uzmanlık Tezi*, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Elazığ.
- Fatani, S.H., Babakr, A.T., NourEldin, E.M. and Almarzouki, A.A.,** 2016. Lipid Peroxidation is Associated with Poor Control of Type-2 Diabetes Mellitus, *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, **10S**, S64-S67.
- Garcia-Nino, W.R. and Zazueta, C.,** 2015. Ellagic Acid: Pharmacological Activities and Molecular Mechanisms Involved in Liver Protection, *Pharmacological Research*, **97**, 84-103.
- Girish, C. and Pradhan, S.C.,** 2012. Hepatoprotective Activities of Picroliv, Curcumin, and Ellagic Acid Compared to Silymarin on Carbon-Tetrachloride-Induced Liver Toxicity in Mice, *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, **3(2)**, 149-155.

- Göksu, Ü.Ş.**, 2012. Farelerde Karbon Tetraklorür ile Karaciğer Hasarı Oluşturulması Üzerine Vitamin E ve N-Asetilsisteinin Koruyucu Etkisinin Araştırılması, *Yüksek Lisans Tezi*, Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kars.
- Grigoras, A.G.**, 2017. Catalase Immobilization-A review, *Biochemical Engineering Journal*, **117**, 1-20.
- Gu, L., Deng, W.S., Liu, Y., Jiang, C.H., Sun, L.C., Sun, X.F., Xu, Q. and Zhou, H.**, 2014. Ellagic Acid Protects Lipopolysaccharide/D-Galactosamine-Induced Acute Hepatic Injury in Mice, *International Immunopharmacology*, **22**, 341-345.
- Guyton ve Hall, 2013.** Tıbbi Fizyoloji, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.
- Güleş, Ö. ve Eren, Ü.**, 2008. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler, *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*, **2**, 73-78.
- Gümüş, M., Yüksel, H., Evliyaoğlu, O., Kapan, M., Böyük, A., Önder, A. and Aldemir, M.**, 2011. Effects of Ellagic Acid on Copper, Zinc, and Biochemical Values in Serum and Liver of Experimental Cholestatic Rats, *Biol. Trace Elem. Res.*, **143**, 386-393.
- Hamid, M., Liu, D., Abdulrahim, Y., Liu, Y., Qian, G., Khan, A., Gan, F. and Huang, K.**, 2017. Amelioration of CCl₄-Induced Liver Injury in Rats by Selenizing *Astragalus* Polysaccharides: Role of Proinflammatory Cytokines, Oxidative Stress and Hepatic Stellate Cells, *Research in Veterinary Science* **114**, 202-211.
- Harifi-Mood, A.R., Ghobadi, R. and Divsalar, A.**, 2017. The Effect of Deep Eutectic Solvents on Catalytic Function and Structure of Bovine Liver Catalase, *International Journal of Biological Macromolecules*, **95**, 115-120.
- Hussein, R.H. and Khalifa, F.K.**, 2014. The Protective Role of Ellagitannins Flavonoids Pretreatment Against N-Nitrosodiethylamine Induced-Hepatocellular Carcinoma, *Saudi Journal of Biological Sciences*, **21**, 589-596.
- Hwang, J.M., Cho, J.S., Kim, T.H. and Lee, Y.I.**, 2010. Ellagic Acid Protects Hepatocytes from Damage by Inhibiting Mitochondrial Production of Reactive Oxygen Species, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **64**, 264-270.

- Ipek, D.N.S., Şaki, C.E. and Çay, M.,** 2012. The Investigation of Lipid Peroxidation, Anti-Oxidant Levels and Some Hematological Parameters in Sheep Naturally Infested with *Wohlfahrtia magnifica* Larvae, *Veterinary Parasitology*, **187**, 112-118.
- Jetawattana, S.,** 2005. Malondialdehyde (MDA), A Lipid Oxidation Product, *Free Radicals in Biology and Medicine*, **77(222)**, 1-10.
- Kang, M.H. and Reynolds, C.P.,** 2009. Bcl-2 Inhibitors:Targeting Mitochondrial Apoptotic Pathways in Cancer Therapy, *Clinical Cancer Research*, **15(4)**, 1126-1132.
- Karakurt, S., Semiz, A., Celik, G., Ozkan, A.M.G., Sen, A. and Adali, O.,** 2016. Contribution of Ellagic Acid on the Antioxidant Potential of Medicinal Plant *Epilobium hirsutum*, *Nutrition and Cancer*, **68(1)**, 173-183.
- Karaman, M., Özen, H., Dağ, S., Atakişi, O., Çığsar, G. and Kaya, O.,** 2017. Ameliorative Effect of Omega-3 in Carbon Tetrachloride Toxicity, *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **23(1)**, 77-85.
- Kaya, İ.,** 2012. Kronik Florozis’li Farelerde Plazma Paraoksonaz, Sialik Asit ve Oksidatif Stres Parametreleri Üzerine Ellagik Asitin Etkisi, *Doktora Tezi*, Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kars.
- Kedzierska, H. and Piekliko-Witkowska, A.,** 2017. Splicing factors of SR and hnRNP Families as Regulators of Apoptosis in Cancer, *Cancer Letters*, **396**, 53-65.
- Keshtzar, E., Khodayar, M.J., Javadipour, M., Ghaffari, M.A., Bolduc, D.L. and Rezaei, M.,** 2016. Ellagic Acid Protects Against Arsenic Toxicity in Isolated Rat Mitochondria Possibly Through the Maintaining of Complex II, *Human and Experimental Toxicology*, **35(10)**, 1060-1072.
- Kibinza,S., Bazin, J., Bailly, C., Farrant, J.M., Corbineau, F. and El-Maarouf-Bouteau, H.,** 2011. Catalase is A Key Enzyme in Seed Recovery from Ageing During Priming, *Plant Science*, **181**, 309-315.
- Kierszenbaum, A.L.,** 2006. Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Patolojiye Giriş. Çev. Ed: Ramazan Demir, Palme Yayıncılık, Ankara.
- Krych-Madej, J. and Gebicka, L.,** 2017. Interactions of Nitrite with Catalase: Enzyme Activity and Reaction Kinetics Studies, *Journal of Inorganic Biochemistry*, **171**,10-17.

- Kuloğlu, N.**, 2013. Sıçan Karaciğer Dokusunda Karbon Tetraklorür ile Oluşturulan Hasar Üzerine Karnozinin Etkilerinin Araştırılması, *Yüksek Lisans Tezi*, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.
- Kyrylkova, K., Kyryachenko, S., Leid, M., Kioussi, C.**, 2012. Detection of Apoptosis by TUNEL Assay, *Methods in Molecular Biology*, 887, 41-47.
- Laemmli, U.K.**, 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685.
- Landete, J.M.**, 2011. Ellagitannins, Ellagic Acid and Their Derived Metabolites: A Review About Source, Metabolism, Functions and Health, *Food Research International*, **44** (5), 1150-1160.
- Latif, N., Khan, M.A., Birks, E., O'Farrell, A., Westbrook, J., Dunn, M.J. and Yacoub, M.H.**, 2000. Upregulation of the Bcl-2 Family of Proteins in End Stage Heart Failure, *Journal of the American College of Cardiology*, **35**(7), 1769-1777.
- Liang, W.Z., Chou, C.T., Cheng, J.S., Wang, J.L., Chang, H.T., Chen, I.S., Lug, T., Yeh, J.H., Kuo, D.H., Shieh, P., Chen, F.A., Kuo, C.C. and Jan, C.R.**, 2016. The Effect of the Phenol Compound Ellagic Acid on Ca²⁺ Homeostasis and Cytotoxicity in Liver Cells, *European Journal of Pharmacology*, **780**, 243-251.
- Lien, D.T.P., Hoang, C.T.K., Hanh, N.T., Chu, D.X., Tram, P.T.B. and Toan, H.T.**, 2017. Hepatoprotective Effect of Tofu Processed from Germinated Soybean on Carbon Tetrachloride Induced Chronic Liver Injury in Mice, *Journal of Food and Health Science*, **3**(1), 1-11.
- Liu, Q.S., Li, S.R., Li, K., Li, X., Yin, X. and Pang, Z.**, 2017. Ellagic Acid Improves Endogenous Neural Stem Cells Proliferation and Neurorestoration Through Wnt/ β -Catenin Signaling in Vivo and in Vitro, *Molecular Nutrition Food Research*, **61**(3), 1-9.
- Long, Y., Luo, J., Hu, M., Chen, J., Zhu, L., Wei, W., Qiao, N. and Yang, L.** 2017. Protective Effect of Ellagic Acid on Acute Liver Injury Induced by CCl₄ in Mice and Its Mechanism, *Journal of Jilin University Medicine Edition*, **43**(3), 572-576.

- Lu, K.H., Weng, C.Y., Chen W.C. and Sheen L.Y.,** 2016. Ginseng Essence, A Medicinal and Edible Herbal Formulation, Ameliorates Carbon Tetrachloride-Induced Oxidative Stress and Liver Injury in Rats, *Journal of Ginseng Research*, **xx**, 1-10.
- Luck., H.** 1963. Methods of Enzymatic Analysis, Verlag Chemie, Academic Press, NewYork, USA.
- Majumder, D., Das, A. and Saha, C.,** 2017. Catalase Inhibition An Anti Cancer Property of Flavonoids: A Kinetic and Structural Evaluation, *International Journal of Biological Macromolecules*, **104**, 929-935.
- Malik, A., Afaq, S., Shahid, M., Akhtar, K. and Assiri, A.,** 2011. Influence of Ellagic Acid on Prostate Cancer Cell Proliferation: A Caspasedependent Pathway, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 550-555.
- Mishra, S. and Vinayak, M.** 2015. Role of Ellagic Acid in Regulation of Apoptosis by Modulating Novel and Atypical PKC in Lymphoma Bearing Mice, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **15(281)**, 2-8.
- Misra, N., Goel, N.K., Shelkar, S.A., Varshney, L. and Kumar, V.,** 2017. Catalase Immobilized-Radiation Grafted Functional Cellulose Matrix: A novel Biocatalytic System, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **xxx**, xxx-xxx.
- Montes, A., Wehner, L., Pereyra, C. and Martínez de la Ossaa, E.J.,** 2016. Generation of Microparticles of Ellagic Acid by Supercritical Antisolvent Process, *J. of Supercritical Fluids.*, **116**,101-110.
- Mousavi, S.H., Tavakkol-Afshari, J., Brook, A. and Jafari-Anarkool, I.,** 2009. Role of Caspases and Bax Protein in Saffron-Induced Apoptosis in MCF-7 Cells, *Food and Chemical Toxicology*, **47**, 1909-1913.
- Munagala, R., Aqil, F., Vadhanam, M.V. and Gupta, R.C.,** 2013. MicroRNA ‘Signature’ During Estrogen-Mediated Mammary Carcinogenesis and Its Reversal by Ellagic Acid Intervention, *Cancer Letters*, **339**, 175-184.
- Naiki-Ito, A., Chewonarin, T., Tang, M., Pitchakarn, P., Kuno, T., Ogawa, K., Asamoto, M., Shirai, T. and Takahashi, S.,** 2015. Ellagic Acid, a Component of Pomegranate Fruit Juice, Suppresses Androgen-Dependent Prostate Carcinogenesis Via Induction of Apoptosis, *The Prostate*, **75**, 151-160.

- Najjar, F.M., Ghadari, R., Yousefi, R., Safari, N., Sheikhhasani, V., Sheibani, N. and Moosavi-Movahedi, A.A.,** 2017. Studies to Reveal the Nature of Interactions Between Catalase and Curcumin Using Computational Methods and Optical Techniques, *International Journal of Biological Macromolecules*, **95**, 550-556.
- Nejad, K.H., Dianat, M., Sarkaki, A., Naseri, M.K.G., Badavi, M. and Farbood, Y.,** 2015. Ellagic Acid Improves Electrocardiogram Waves and Blood Pressure Against Global Cerebral Ischemia Rat Experimental Models, *Electronic Physician*, **7(4)**, 1153-1162.
- Niknahad, H., Heidari, R., Mokhtebaz, T., Mansouri, S., Dehshahri, S., Abdoli, N., Azarpira, N. and Najibi, A.,** 2016. Evaluating the Effects of Different Fractions Obtained from *Gundelia tournefortii* Extract Against Carbon Tetrachloride-Induced Liver Injury in Rats, *Trends in Pharmaceutical Sciences*, **2(1)**, 25-34.
- Niu, L., Cui, X., Qi, Y., Xie, D., Wu, Q., Chen, X., Ge, J. and Liu, Z.,** 2016. Involvement of TGF- β 1/Smad3 Signaling in Carbon Tetrachloride-Induced Acute Liver Injury in Mice, *PLoS ONE*, **11(5)**, 1-18.
- Núñez-Sánchez, M.A., Karmokar, A., Gonzalez-Sarriás, A., García-Villalba, R., Tomas-Barberan, F.A., García-Conesa, M.T., Brown, K. and Espín, J.C.,** 2016. In Vivo Relevant Mixed Urolithins and Ellagic Acid Inhibit Phenotypic and Molecular Colon Cancer Stem Cell Features: A New Potentiality for Ellagitannin Metabolites Against Cancer, *Food and Chemical Toxicology*, **92**, 8-16.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K.,** 1979. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction, *Analyses of Biochemical*, **95**, 351-358.
- Onal, M., Ovet, G. and Onal, O.,** 2016. Review of Apoptosis, *MOJ Immunology*, **3(1)**, 1-4.
- Ou, H.C., Lee, W.J., Lee, S.D., Huang, C.Y., Chiu, T.H., Tsai, K.L., Hsu, W.C. and Sheu, W.H.H.,** 2010. Ellagic Acid Protects Endothelial Cells from Oxidized Low-Density Lipoprotein-Induced Apoptosis by modulating the PI3K/Akt/eNOS Pathway, *Toxicology and Applied Pharmacology*, **248**, 134-143.

- Pattanayak, R., Basak, P., Sen, S. and Bhattacharyya, M.,** 2017. An Insight to the Binding of Ellagic Acid with Human Serum Albumin Using Spectroscopic and Isothermal Calorimetry Studies, *Biochemistry and Biophysics Reports*, **10**, 88-93.
- Pazourek, J., Vaclavik, J. and Zemlicka, M.,** 2011. An Optimised Method for the Rapid Measurement and Calculation of Radical Scavenger Profiles in Plant Extracts by HPLC, *Food Chemistry*, **125**, 785-790.
- Pehlivan, M. ve Güleriyüz, M.,** 2004. Ahududu ve Böğürtlenlerin İnsan Sağlığı Açısından Önemi, *Bahçe*, **33 (1-2)**, 51-57.
- Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M. ve Tanyolaç, B.,** 2010. Moleküler Biyoloji, Nobel Kitap Dağıtım, İstanbul.
- Qiu, J., Liu, Z., Li, Y., Xuan, H., Lin, Q., Li, F., Wang, Y., Li, Z., Zhao, M.,** 2007. Overexpression of the Gene for Transmembrane 4 Superfamily Member 4 Accelerates Liver Damage in Rats Treated with CCl₄, *Journal of Hepatology*, **46**, 266-275.
- Qiu, Z., Zhou, B., Jin, L., Yu, H., Liu, L., Liu, Y., Qin, C., Xie, S. and Zhu, F.,** 2013. In Vitro Antioxidant and Antiproliferative Effects of Ellagic Acid and Its Colonic Metabolite, Urolithins, on Human Bladder Cancer T24 Cells, *Food and Chemical Toxicology* **59**, 428-437.
- Ranawat, L., Bhatt, J. and Patel, J.,** 2010. Hepatoprotective Activity of Ethanolic Extracts of Bark of *Zanthoxylum armatum* DC in CCl₄ Induced Hepatic Damage in Rats, *Journal of Ethnopharmacology*, **127**, 777-780.
- Sağaltıcı, S.,** 2012. Sığır Karaciğeri Kaynaklı Katalaz Enziminin Kalsiyum Alginat Jele İmmobilizasyonu, *Yüksek Lisans Tezi*, Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Hatay.
- Sakthivel, M., Elanchezhian, R., Ramesh, E., Isai, M., Jesudasan, C.N., Thomas, P.A. and Geraldine, P.,** 2008. Prevention of Selenite-Induced Cataractogenesis in Wistar Rats by the Polyphenol, Ellagic Acid, *Experimental Eye Research*, **86**, 251-259.
- Salem, A.M., Mohammaden, T.F., Ali, M.A.M., Mohamed, E.A. and Hassan, H.F.,** 2016. Ellagic and Ferulic Acids Alleviate Gamma Radiation and Aluminium Chloride-Induced Oxidative Damage, *Life Sciences*, **160**, 2-11.

- Sawada, M., Nakashima, S., Banno, Y., Yamakawa, H., Hayashi, K., Takenaka, K., Nishimura, Y., Sakai, N. and Nozawa, Y., 2000.** Ordering of ceramide formation, caspase activation, and Bax/Bcl-2 expression during etoposide-induced apoptosis in C6 glioma cells, *Cell Death and Differentiation*, **7**, 761-772.
- Singh, H., Sidhu, S., Chopra, K. and Khan, M.U., 2017.** The Novel Role of B-Aescin in Attenuating CCl₄-Induced Hepatotoxicity in Rats, *Pharmaceutical Biology*, **55 (1)**, 749-757.
- Sreelatha, S., Padma, P.R. and Umadevi, M., 2009.** Protective Effects of *Coriandrum sativum* Extracts on Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity in Rats, *Food and Chemical Toxicology*, **47**, 702-708.
- Srigopalram, S., Ilavenil, S. and Jayraaj, I.A., 2012.** Apoptosis Associated Inhibition of DEN-Induced Hepatocellular Carcinogenesis by Ellagic Acid in Experimental Rats, *Biomedicine & Preventive Nutrition*, **2**, 1-8.
- Srigopalram, S., Jayraaj, I.A., Kaleeswaran, B., Balamurugan, K., Ranjithkumar, M., Kumar, T.S., Park, J.I., and Nou, I.S., 2014.** Ellagic Acid Normalizes Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization and Attenuates Inflammation-Mediated Cell Proliferation in Experimental Liver Cancer, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **173**, 2254–2266.
- Sun, H.J., Chen, J., Zhang, H., Ni, B., Velkinburgh, J.C.V., Liu, Y., Wu, Y.Z. and Yang, X., 2017.** Von Willebrand Factor Protects Against Acute CCl₄-Induced Hepatotoxicity Through Phospho-P38 MAPK Signaling Pathway Inhibition, *Immunol. Res.*, 1-13.
- Şahin, P., 2015.** Etil Alkol ile Oluşturulan Karaciğer Toksikasyonunda *Chlorella vulgaris* ve Propolis Kullanımının Karaciğer Histopatolojisi, Lipit Peroksidasyon, GSH ve GSH-PX Düzeyleri Üzerine Etkisi, *Yüksek Lisans Tezi*, Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kars.
- Şayan, H., 2014.** Canlı Karaciğer Nakil Vericilerinde Torakal Epidural Anestezinin İntraoperatif Karaciğer Kan Akımı Üzerine Etkisi, *Uzmanlık Tezi*, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Malatya.

- Tang, L., Mo , Y., Li , Y., Zhong, Y., He, S., Zhang, Y., Tang, Y., Fu, S., Wang, X. and Chen, A.,** 2017. Urolithin A Alleviates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury Via PI3K/Akt Pathway, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **xxx**, 1-7.
- Tanrıverdi, G.,** 2005. Karbontetraklorürle (CCl₄) Oluşturulmuş Karaciğer Hasarında Değişik Dozlardaki Nikotinamidin Protektif Etkisinin Işık ve Elektron Mikroskopik Olarak İncelenmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Tsikis, D.,** 2017. Assessment of Lipid Peroxidation by Measuring Malondialdehyde (MDA) and Relatives in Biological Samples: Analytical and Biological Challenges, *Analytical Biochemistry*, **524**, 13-30.
- Tutuş, R.,** 2016. *Oreochromis niloticus*'un Karaciğer Dokusundaki Antioksidan Sistemler ve Lipid Peroksidasyonu Üzerine Chlorpyrifos, Emamectin Benzoate ve Abamectin Türü Pestisitlerin Etkileri, Adıyaman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adıyaman.
- Tükel, S.S., Hürrem, F., Yıldırım, D. and Alptekin, Ö.,** 2013. Preparation of Cross linked Enzyme Aggregates (CLEA) of Catalase and its Characterization, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **97**, 252-257.
- Tür, L.,** 2008. Karbon Tetraklorür ile Karaciğer Hasarı Oluşturulan Ratlarda *Matricaria chamomilla* L.'nin Karaciğer Üzerine Koruyucu Etkilerinin Araştırılması, *Doktora Tezi*, Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar.
- Umesalma, S., Nagendraprabhu, P. and Sudhandiran, G.,** 2015. Ellagic Acid Inhibits Proliferation and Induced Apoptosis Via the Akt Signaling Pathway in HCT-15 Colon Adenocarcinoma Cells, *Mol Cell Biochem.*, **399**, 303-313.
- Uzun, K.,** 2014. Etil Alkol ve Karbon Tetraklorüre Maruz Kalan Sıçanlara *Cyclotrichium niveum* Ekstraktının Bazı Biyokimyasal Parametreler Üzerine Etkisi, *Yüksek Lisans Tezi*, Adıyaman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adıyaman.

- Valipour, M., Maghami, P., Habibi-Rezaei, M., Sadeghpour, M., Khademian, M.A., Mosavi, K., Ahmad, F. and Moosavi-Movahedi, A.A., 2017.** Counteraction of the Deleterious Effects of Reactive Oxygen Species on Hemoglobin Structure and Function by Ellagic Acid, *Journal of Luminescence*, **182**, 1-7.
- Wang, H., Wang, J., Wang, J., Zhu, R., Shen, Y., Xu, Q. and Hu, X., 2017.** Spectroscopic Method for the Detection of 2,4-Dichlorophenoxyaceticacid Based on Its Inhibitory Effect Towards Catalase Immobilized on Reusable Magnetic Fe₃O₄-Chitosan Nanocomposite, *Sensors and Actuators B*, **247**, 146-154.
- Warpe, V.S., Mali, V.R., Arulmozhi, S., Bodhankar, S.L. and Mahadik, K.R., 2015.** Cardioprotective Effect of Ellagic Acid on Doxorubicin Induced Cardiotoxicity in Wistar Rats, *Journal of Acute Medicine*, **5**, 1-8.
- Wei, D.Z., Lin, C., Huang, Y.Q., Wu, L.P. and Huang, M.Y., 2017.** Ellagic Acid Promotes Ventricular Remodeling After Acute Myocardial Infarction by Up-Regulating miR-140-3p, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **95**, 983-98.
- Wu, M., Ding, H.F. and Fisher, D., 2001.** Apoptosis: Molecular Mechanisms, *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-8.
- Xue, M., Ji, X., Xue, C., Liang, H., Ge, Y., He, X., Zhang, L., Bian, K. and Zhang, L., 2017.** Caspase-Dependent and Caspase-Independent Induction of Apoptosis in Breast Cancer by Fucoidan Via the PI3K/AKT/GSK3b Pathway in vivo and in vitro, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **94**, 898-908.
- Yaman, D., 2015.** Karbon Tetraklorür ile Oluşturulan Akut ve Kronik Karaciğer Hasarı Üzerine Nar Çekirdeği Yağı (*Punica granatum*) ve Biberiye Ekstraktının (*Rosmarinus officinalis*) Etkisi, *Doktora Tezi*, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.
- Yarıktaş, M., Döner, F., Doğru, H., Aynalı, G., Yönden, Z. ve Delibaş, N., 2003.** Baş-Boyun Malign Tümörlerinde Malondialdehit Düzeyleri ve Antioksidan Enzim Aktiviteleri, *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **10(4)**, 65-67.

- Yavuz, A.,** 2016. Deneysel Olarak Yapılan Karaciğer Rezeksiyonu Sırasında İskemik Ön Koşullama Yapılan Ratlara Hepatektomi Öncesi Verilen Slimarin'in Karaciğer Rejenerasyonu Üzerine Etkisi, *Uzmanlık Tezi*, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara.
- Yıldırım, M.,** 2004. İnsan Anatomisi, 6. Baskı, Nobel Matbaacılık, İstanbul.
- Yılmaz, İ.,** 2005. Erişkin Ratlarda Deneysel Varikozel Oluşturulması Sonrası Testislerde Germ Hücrelerinde Apoptozis Düzeylerinin Yükselmesi ve Yükselmiş Olan Apoptozisin Varikoselektomi Sonrası Gerileme Düzeyi ve Süresinin TUNEL Yöntemi İle Değerlendirilmesi, *Uzmanlık Tezi*, Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği, İstanbul.
- Yılmaz, T.,** 2010. Sıçanlarda Karbon Tetraklorür ile Oluşturulan Karaciğer Hasarına *Amaranthus lividus* (*A. blitum*) Bitkisinin Antioksidan ve Hepatoprotektif Etkilerinin İncelenmesi, *Doktora Tezi*, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Yiğitcan, B.,** 2012. Karbon Tetraklorür ile Oluşturulan Akut ve Kronik Karaciğer Hasarına Karşı Resveratrol ve Melatoninin Etkileri, *Yüksek Lisans Tezi*, İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Malatya.
- Yoshioka, H., Fukaya, S., Miura, N., Onasaka, S., Nanogaki, T. and Nagatsu, A.,** 2016. Suppressive Effect of Kampo Formula “Juzen-Taiho-To” on Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity in Mice, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **39(9)**, 1564-1567.
- Yu-qing, S., Xin, T., Xiao-ming, M., Zi-wei, X., Tian, W.,** 2017. *In vitro* and *in vivo* Antioxidant Activities of Three Major Polyphenolic Compounds in Pomegranate Peel: Ellagic Acid, Punicalin, and Punicalagin, *Journal of Integrative Agriculture*, **16(8)**, 1808-1818.
- Yüce, A., Ateşşahin, A., Çeribaşı, A.O. and Aksakal, M.,** 2007. Ellagic Acid Prevents Cisplatin-Induced Oxidative Stress in Liver and Heart Tissue of Rats, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, **101**, 345-349.
- Zamaraev, A.V., Kopeina, G.S., Prokhorova, E.A., Zhivotovsky, B., and Lavrik, I.N.,** 2017. Post-translational Modification of Caspases: The Other Side of Apoptosis Regulation, *Trends in Cell Biology*, **27(5)**, 322-339.

Zhao, J., Li, G., Bo, W., Zhou, Y., Dang, S., Wei, J., Li, X. and Liu, M., 2017. Multiple Effects of Ellagic Acid on Human Colorectal Carcinoma Cells Identified by Gene Expression Profile Analysis, *International Journal of Oncology*, **50**, 613-621.

Zhao, M., Tang, S.N., Marsh, J.L., Shankar, S. and Srivastava, R.K., 2013. Ellagic Acid Inhibits Human Pancreatic Cancer Growth in Balb C Nude Mice, *Cancer Letters* 337, 210–217.

URL-1:

http://megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller_pdf/Sindirimi%20Sistem.pdf, 4 Kasım 2017.

URL-2: http://www.turkcebilgi.com/karbon_tetraklor%C3%BCr#bilgi, 4 Kasım 2017.

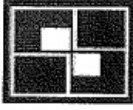
URL-3:

https://brain.fuw.edu.pl/edu/index.php/Biologia_Komórki/Starzenie_się_śmierć_komórki, 4 Kasım 2017.

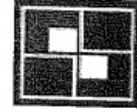
URL-4: <http://www.metafizikbilgiler.com/html/mb9.html>, 4 Kasım 2017.

EKLER

Ek 1. Etik Kurul Kararı



T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı



ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar No	Protokol No	Özü
26.10.2016	2016/19	190	2016/118	Prof. Dr. Orhan ERMAN

KARAR

“Karbon Tetraklorür ile Karaciğer Hasarı Oluşturulmuş Sıçanlarda Ellagik Asit’in Bazı Apoptotik Proteinlerin İfadesine Etkisi” başlıklı araştırma projenizde 36 Adet Wistar Albino Rat kullanılacağı ve hayvanlar üzerinde yapılacak girişimlerde hayvan kullanım etiği ilkelerine uyulacağı tarafınızdan beyan edilmiştir. Bu çerçevede aşağıda ismi bulunan araştırmacılara ait bu çalışmanın “Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesi” yönünden uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

1. Prof. Dr. Orhan ERMAN
2. Doç. Dr. Abdullah ASLAN
3. Yük. Lis. Öğr. Özlem GÖK

GÖREVİ	ADI SOYADI	BÖLÜMÜ	İMZA
Başkan	Prof. Dr. Gülsüm ÖKSÜZTEPE	Veteriner Fakültesi	
Üye	Prof. Dr. Sinan CANPOLAT	Tıp Fakültesi	
Üye	Prof. Dr. Azize BEŞTAŞ	Tıp Fakültesi	Bulunmadı
Üye	Doç. Dr. Asiye BAŞUSTA	Su Ürünleri Fakültesi	Bulunmadı
Üye	Doç. Dr. Mustafa İSSİ	Veteriner Fakültesi	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Serkan DÜNDAR	Dış Hekimliği Fakültesi	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Burcu GÜL BAYKALIR	Sağlık Bilimleri Fakültesi	Bulunmadı
Üye	Vet. Hek. Özgür BULMUŞ	FÜDAM	
Üye	Onur UYGUR	Sivil Üye	
Üye	Murat DAĞHAN	Sivil Üye	

ÖZGEÇMİŞ

Özlem GÖK

Doğum Yeri : Elazığ

Doğum Tarihi : 02.01.1990

e-posta : ozlemgok938@gmail.com

Yüksek Lisans Tez Danışmanı: Prof. Dr. Orhan ERMAN

2015- halen : Fırat Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü,
Zooloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Eğitimi

2010-2014 : Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Lisans Eğitimi

2003-2006 : Lise Eğitimi, Atatürk Lisesi-Elazığ

1995-2003 : Ortaöğretim, Namık Kemal İlköğretim Okulu-Elazığ