

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KARBON TETRAKLORÜR (CCl₄) İLE KARACİĞER HASARI
OLUŞTURULMUŞ RATLARDA DEVE DİKENİ (*Silybum marianum*
L.)'NİN KASPAZ-3, KASPAZ-9, BAX, BCL-2 PROTEİNLERİNİN
EKSPRESYONU VE DNA HASARI ÜZERİNE ETKİSİ**

Muhammed İsmail CAN

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Abdullah ASLAN

TEMMUZ-2014

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KARBON TETRAKLORÜR (CCl₄) İLE KARACİĞER HASARI OLUŞTURULMUŞ
RATLARDA DEVE DİKENİ (*Silybum marianum* L.)'NİN KASPAZ-3, KASPAZ-9, BAX,
BCL-2 PROTEİNLERİNİN EKSPRESYONU VE DNA HASARI ÜZERİNE ETKİSİ**

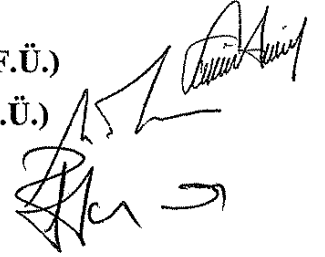
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Muhammed İsmail CAN

(121110101)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 02.07.2014
Tezin Savunulduğu Tarih: 17.07.2014

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Abdullah ASLAN (F.Ü.)
Diğer Jüri Üyeleri : Yrd. Doç. Dr. Mehmet TUZCU (F.Ü.)
Yrd. Doç. Dr. İrfan EMRE (F.Ü.)



TEMMUZ-2014

ÖN SÖZ

Bu yüksek lisans tezinde, ratlarda karbon tetraklorür ile karaciğer hasarı oluşturulmuş ve ratlara deve dikenli bitki ekstraktı verilerek bu bitkinin ratlar üzerinde deneysel olarak etkileri incelenmiştir.

Bu yüksek lisans tezimin oluşum aşamasında ve tüm yüksek lisans eğitimimde gerek teorik gerek pratik alanda bana her zaman yol gösteren, yardımlarını, bilgi ve tecrübelerini her zaman yanımda hissettiğim tez danışmanım ve değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Abdullah ASLAN'a; 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. 13.19); çalışmamızın deney hayvanları aşamasını yürüttüğümüz FÜDAM'ın değerli çalışanlarına; çalışmalar sırasında yardımlarından dolayı yüksek lisans öğrencileri Didem BOYDAK, Betül KAYA ve Seda BEYAZ'a ve Fırat Üniversitesi Biyoloji Bölümü'ndeki değerli hocalarıma teşekkür ediyorum. Ayrıca eğitim hayatım boyunca her zaman bana destek olan ve bu günlere gelmemde en büyük pay sahibi olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

M. İsmail CAN

Elazığ-2014

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖN SÖZ	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 Tetraklorür (CCl ₄)'ün Genel Özellikleri ve Etki Mekanizması	7
1.3. Apoptozis	9
1.3.1. Apoptotik Markerlar (Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bax, Bcl-2)	13
1.4. Deve Dikeni ve Antioksidan Özellikleri	15
1.5. Lipit Peroksidasyonu	17
2. MATERYAL VE METOT	18
2.1. Materyal	18
2.1.1. Kimyasal Maddeler ve Deve Dikeni	18
2.2. Metot	18
2.2.1. Hayvan Materyali ve Araştırma Grupları	18
2.2.2. CCl ₄ Uygulaması	19
2.2.3. Deve Dikeni Ekstraktının Hazırlanması	19
2.2.4. Karaciğer Doku MDA Ölçümleri	19
2.2.5. Plazma MDA Ölçümleri	20
2.2.6. MDA Ölçümleri için Standart Eğri Çizimi	20
2.2.7. DNA Hasarının Analizi	20
2.2.7.1. Karaciğer Dokusundan DNA İzolasyonu	21
2.2.8. Western Blotlama Çalışması için Doku Homojenizasyonu	21
2.2.9. SDS-PAGE ve Western Blotlama Tekniği ile Proteinlerin Analizi	22

2.2.9.1.	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	22
2.2.9.2.	Western Blotlama ile Protein Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	23
2.2.10.	Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bax, Bcl-2 Proteinlerinin Analizi (Apoptotik Markerlar)	25
2.2.11.	TUNEL Metoduyla Apoptozis Düzeylerinin Belirlenmesi	25
2.2.12.	İstatistiksel Analizler	27
3.	BULGULAR	28
3.1.	Canlı Ağırlık Değişimi ve Su Tüketimi	28
3.2.	DNA Hasarı	30
3.3.	MDA Ölçüm Sonuçları	31
3.4.	TUNEL Metoduyla Belirlenen Histolojik Sonuçlar	33
3.5.	Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bax, Bcl-2 Proteinlerinin Ekspresyon Düzeyleri (Apoptotik Markerlar).....	35
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA	38
5.	ÖNERİLER	45
6.	KAYNAKLAR	46
	ÖZ GEÇMİŞ	53

ÖZET

Deve dikenini (DD), özellikle karaciğer üzerinde koruyucu etkileri olan güçlü bir antioksidan bitkidir. İçme suyu yoluyla alınan deve dikeninin, karbon tetraklorür (CCl₄) ile karaciğer hasarına uğratılmış ratlar üzerindeki etkilerini araştırdığımız bu tez çalışmasında, 28 adet erkek Wistar albino rat kullanıldı. Gruplar 4'e bölündü ve her grupta 7'şer rat yer aldı. CCl₄ ve CCl₄+DD gruplarındaki ratlara dört hafta boyunca haftada iki kez intraperitoneal (karın zarı içine) olarak CCl₄ (2 ml/kg canlı ağırlığı [CA]) enjekte edilmiştir. Ratların tümü standart diyetle beslendi. NK ve CCl₄ gruplarına normal içme suyu; PK ve CCl₄+DD gruplarına ise kaynatılmış % 10'luk deve dikenini ekstraktı ilave edilen içme suyu verildi. 4 hafta sonra ratlar dekapite edilerek karaciğer dokuları incelendi. Karaciğer dokusunda bax, bcl-2, kaspaz-3, kaspaz-9 protein ekspresyon düzeylerini Western blotlama tekniğiyle belirledik. Karaciğer dokusundaki DNA hasarını DNA agaroz jel elektroforezi ile tespit ettik. Karaciğer dokusunda meydana gelen lipid peroksidasyonunu MDA (malondialdehit) analizleriyle belirledik. Deve dikenini uygulaması, CCl₄+DD grubunda, CCl₄ grubuna göre bax, bcl-2, kaspaz-3, kaspaz-9 protein ekspresyonları bakımından anlamlı bir fark oluşturdu (p<0.05). Deve dikenini uygulamasıyla kaspaz-3 ve kaspaz-9 protein ekspresyon düzeyleri artış gösterirken, bax ve bcl-2 protein ekspresyon düzeyleri azalış gösterdi. TUNEL metodu incelemelerinde, CCl₄+DD grubunda CCl₄ grubuna göre apoptotik indeks oranının daha düşük olduğu gözlemlendi. Deve dikenini uygulaması, CCl₄+DD grubunda, CCl₄ grubuna göre DNA hasarı düzeyi bakımından azalış gösterdi. Bu sonuçlar, deve dikeninin Wistar albino ratlarda karaciğer hasar oranını azalttığını göstermektedir ve bu bulgular, deve dikenini uygulamasının insanlarda da karaciğer hasarını önleyici etkisini araştırmada yol gösterici olabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Deve Dikeni, Apoptozis, DNA Hasarı, Bax, Bcl-2, Kaspaz-3, Kaspaz-9.

SUMMARY

THE EFFECT OF THISTLE (*Silybum marianum* L.) ON THE CASPASE-3, CASPASE-9, BAX, BCL-2 PROTEIN EXPRESSION AND DNA DAMAGE IN RATS WITH CARBON TETRACHLORIDE (CCl₄)-INDUCED LIVER DAMAGE

Thistle is a strong antioxidant plant having protecting effect particularly on the liver. 28 male Wistar albino rats were used in this thesis study that we investigated the effects of milk thistle taken via drink water on rats modified with liver damage by carbon tetrachloride (CCl₄). Groups were divided into four, and 7 rats involved in each group. CCl₄ (2 ml/kg body weight) has been injected to the rats in groups of CCl₄ and CCl₄+T, intraperitoneally twice weekly for four weeks. All rats were fed a standard diet. Drinking water were given to NC and CCl₄ groups; and boiled 10 % thistle extract added drinking water were given to PC and CCl₄+T groups. After 4 weeks, the rats were decapitated and the liver tissues were examined. Hepatic tissue bax, bcl-2, caspase-3, caspase-9 protein expression levels were determined by Western blotting techniques. DNA damage in the liver was determined by DNA agarose gel electrophoresis. Lipid peroxidation occurring in liver tissue were determined by MDA analysis. Thistle application, in CCl₄+T group, compared to CCl₄ group, bax, bcl-2, caspase-3, caspase-9 protein expression creates a significant difference (p<0.05). Caspase-3 and caspase-9 protein expression levels increased, but bax and bcl-2 protein expression levels were decreased through the application of thistles. The rate of apoptotic index was observed higher in CCl₄+T group than CCl₄ group at Tunel assay examinations. Thistle application, showed a decrease at CCl₄+T group compared to CCl₄ group in terms of the level of DNA damage. These results shows that thistle 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: Thistle, Apoptosis, DNA Damage, Caspase-3, Caspase-9, Bax, Bcl-2.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1. Karaciğerin alttan görünümü (URL-2).....	5
Şekil 2. Apoptozis geçiren bir hücre şeması (URL-3)	10
Şekil 3. Apoptozise uğrayacak hedef hücrede görülen morfolojik değişiklikler (URL-4).....	11
Şekil 4. Apoptozise uğrayan bir hücrenin ölüm aşamaları (URL-5).....	13
Şekil 6. Apoptozom oluşumu (URL-6)	15
Şekil 5. Sitokrom c ve apaf-1 aracılığıyla apoptozis (Aslan, 2011; URL-7)	14
Şekil 7. Deve dikenini (URL-7)	16
Şekil 8. Deney gruplarımızın bakım odası	28
Şekil 9. Gruplarda görülen bitiş canlı ağırlık oranları.....	29
Şekil 10. Gruplara göre günlük su tüketim oranları	29
Şekil 11. Kontrol grubu ve deney grubu ratlarda hücresel DNA hasarı görüntüsü	30
Şekil 12. MDA Standart Eğrisi	31
Şekil 13. Karaciğer dokusunda gruplar arasında MDA düzeylerinin karşılaştırılması	32
Şekil 14. Plazmada gruplar arasında MDA düzeylerinin karşılaştırılması	32
Şekil 15. Negatif Kontrol grubuna ait karaciğer dokusunda TUNEL pozitif hücreler	33
Şekil 16. Pozitif Kontrol grubuna ait karaciğer dokusunda TUNEL pozitif hücreler.. ..	33
Şekil 17. CCl ₄ grubuna ait karaciğer dokusunda TUNEL pozitif hücreler	34
Şekil 18. CCl ₄ + Deve Dikeni grubuna ait karaciğer dokusunda TUNEL pozitif hücreler.....	34
Şekil 19. Gruplara göre bax protein ekspresyon düzeyleri	35
Şekil 20. Gruplara göre bcl-2 protein ekspresyon düzeyleri	36
Şekil 21. Gruplara göre kaspaz-3 protein ekspresyon düzeyleri	36
Şekil 22. Gruplara göre kaspaz-9 protein ekspresyon düzeyleri	37

TABLÖLAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Araştırma Grupları (n=7).....	19
Tablo 2. TUNEL Boyama Prosedürü	26
Tablo 3. Gruplarda başlangıç ve bitiş canlı ağırlıkları ve günlük su tüketimi.....	28
Tablo 4. Çalışma gruplarında elde edilen plazma ve karaciğer doku MDA düzeyleri...	31
Tablo 5. TUNEL metoduyla belirlenen apoptotik indeks (%).....	35

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

Apaf	: Apoptozis Proteaz Aktive Edici Faktör
CA	: Canlı Ağırlık
VLDL	: Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
DD	: Deve Diken
PMSF	: Fenil Metil Sülfonil Florid
FÜDAM	: Fırat Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi
GSH	: Glutasyon
CCl ₄	: Karbon Tetraklorür
MDA	: Malondialdehit
NK	: Negatif Kontrol
SAB	: Örnek Uygulama Tamponu
PK	: Pozitif Kontrol
PUFA	: Poliansatüre Yağ Asitleri
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SOD	: Süperoksit Dismutaz
HDL	: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
TUNEL	: Terminal Deoksinükleotidil Transferaz dUTP Çentik Uç Etiketleme

1. GİRİŞ

Günlük hayatta birçok alanda sıkça kullanılan kimyasal maddeler, insanların bilinçsiz kullanımları da eklenince istenmeyen birçok sağlık problemi ortaya çıkmaktadır. Bu kimyasalların önemli bir kısmı, deterjanlar gibi yaygın kullanıma sahip olan temizlik malzemelerinde bol miktarda bulunmaktadır. Deterjanların aşırı ve bilinçsiz kullanımı, prostat, rahim kanseri gibi bazı kanserlerde tetikleyici rol oynamaktadır. Bu zararlı kimyasallardan biri karbon tetraklorür (CCl_4)'dür. Karaciğer hasarı modelinde yaygın olarak kullanılan CCl_4 'ün hepatoksik (karaciğer hasarı oluşturan) etkisi, duyarlı ara ürünlerinin metabolik aktivasyonuna ve lipit peroksidasyon miktarındaki artışa bağlıdır ve parçalanma ürünleri de hücrede birikince hasar daha da ağırlaşmış olur (Erdoğan vd., 2004; Feng vd., 2011). CCl_4 , deneysel olarak karaciğer hasarı oluşturulmasında sıkça kullanılan bir ksenobiyotiktir ve mitokondriyal monooksijenaz sistemi tarafından metabolize edilmektedir (Üstündağ vd., 2005; Vuda vd., 2012). CCl_4 'ün toksik etkisi, granülsüz endoplazmik retikulum içerisinde yer alan ve karaciğerde fazlaca bulunan sitokrom P-450 sistemi tarafından çevrimi sonucunda meydana gelen oldukça reaktif, toksik serbest radikal CCl_3 nedeniyledir. Lipit peroksidasyonunu da CCl_3 başlatmaktadır. Karaciğer epitel hücreleri dejenerasyona uğradığında görevlerinin büyük bir kısmında aksamalar olur. Bu durum, klinik semptomlara yansımaktadır (Sheweita vd., 2001; Nakahira vd., 2003).

Eski çağlardan günümüze kadar, hastalıkların tedavisinde tıbbi bitkilerin yaygın bir şekilde kullanıldığı bilinmektedir. Günümüzde biyoloji biliminde yaşanan gelişmelere bağlı olarak antioksidan özelliğe sahip birçok bitki tespit edilmiştir ve bunlara her geçen gün bir yenisi eklenmektedir. Son yıllarda yapılan birçok çalışmayla, antioksidan özellikleri olduğu belirlenen bitkilerden biri de deve dikenidir. Deve dikeninin, karaciğer fibrozu ve nekrozuna karşı koruyucu rolünün olduğu tespit edilmiştir. Güçlü bir antioksidan bitki olan deve dikenini, karaciğer yağlanması, siroz hastalığı, bazı kimyasal toksinlere bağlı olarak gelişen karaciğer hasarları, sarılık gibi birçok karaciğer bozukluğuna karşı oldukça etkilidir. İnsan vücudunda birçok hayati fonksiyonu yerine getiren karaciğerde meydana gelen bu bozuklukların, hayatı ne kadar olumsuz etkileyeceği düşünüldüğünde, deve dikenini gibi karaciğer dostu bir bitkinin önemi daha iyi anlaşılmaktadır (Sonnenbichler vd., 1999; Shaker vd., 2010). Bu yüksek lisans tezinde,

ratlar üzerinde karaciğer hasarı oluşturarak, meydana gelen bu hasara antioksidan bir bitki olan deve dikenî ekstraktının etkilerini incelemek amaçlanmıştır.

1.1. Karaciğerin Histolojik ve Fizyolojik Özellikleri

Karaciğer, omurgalılarda ve diğer bazı hayvanlarda bulunan hayati bir organdır. İnsanda yaklaşık 1.8 kilogram ağırlığa sahip olan karaciğer, vücudun en büyük iç organlarından biridir ve aynı zamanda vücuttaki bezlerin en büyüğüdür (Campbell ve Reece, 2006). Karaciğerin, ilaç metabolizması, amino asit metabolizması, lipid metabolizması ve glikoliz gibi çok çeşitli fonksiyonları vardır. Zengin kanlılığından dolayı karaciğerin kırmızı-kahverengi bir mikroskobik görüntüsü vardır. Karaciğer, toksik maddeleri detoksifiye etme ve faydalı olanları sentezleme yeteneğindedir (Al-Dbass vd., 2012).

Karaciğer, kendisini saran zarlar, karaciğer dokusu ve safra yollarından oluşmuştur. En dışında bulunan periton zarı ile mide ve diyaframa bağlanır. Peritonun altında ise bağ dokusundan meydana gelmiş ve karaciğer kapsülü denilen ikinci bir zar bulunmaktadır. Bu zar, karaciğer içerisine uzantılar göndererek onu küçük lobcuklara ayırır. Lobcukların çevresinde genellikle atardamar kılcalları; merkezde ise toplardamarlara ait kılcallar bulunmaktadır. Lobcuklarda Kupffer hücreleri de bulunmaktadır. Karaciğer, fizyolojik ve morfolojik olarak birbirine eş olan, karaciğer lobülleri denilen çok sayıda küçük bölgeye ayrılmıştır (Aktümsek, 2007). Karaciğer lobülü, yaklaşık 0,7 x 2 mm ebatlarında olan poligonal, prizmatik bir karaciğer kitlesidir. Karın boşluğunda bulunur ve sağ tarafta diyaframın altına yerleşmiştir. Anatomik olarak, iki derin yarık, sağ ve sol iki büyük lob ve iki küçük lob görülmektedir. Sağdaki lob en büyük olup safra (öd) kesesini taşır. Ortadaki yarıktan karaciğeri besleyen karaciğer atardamarı (arteria hepatica, hepatik arter) ve bağırsaktan gelen kapı toplardamarı (vena porta, portal ven) girer. (Organa kanın % 75-80'i portal venden; % 25 kadarı da hepatik arter tarafından sağlanmaktadır.) Ayrıca bu yarıktan, karaciğerin ürettiği safra sıvısını getiren bir kanal çıkar, bu kanala karaciğer kanalı denilmektedir (Campbell ve Reece, 2006; Ranawat vd., 2010).

Karaciğer, “Glisson kapsülü” denilen bir yapıyla sarılmıştır. Bu yapı, hilumda (bir organa damar ve sinirler gibi yapıların girdiği bölge) kalınlaşmış, kollajen ve elastik lifler bakımından zengin bir fibröz dokudur. Bu bölgelerde bir arter (arteria hepatica'nın dalı),

bir ven (vena interlobularis) ve bir safra kanalcığı olan ductuli biliferi ve lenfatik damarlar bulunmaktadır (McLaughlin vd., 2007).

Karaciğer dokusunda dört tip hücre bulunmaktadır. Aktif metabolizması nedeniyle hepatosit, yani karaciğer hücresi organel bakımından zengindir. Karaciğer hücrelerinin normalde yenilenme yeteneği de bulunmaktadır (Karaduman, 2007). Hepatositler, 6 veya daha fazla yüzeyli olan polihedral hücrelerdir. Çok sayıda mitokondri içerirler. 200-300 arasında değişen peroksizoma sahiptirler. Genelde bir, bazen de iki çekirdekli, pembe sitoplazmalılardır. Sitoplazmalarında, lobülün orta bölümünde granüller şeklinde lipofüsin pigmenti ve nadiren yağ vakuolleri bulunmaktadır. Hepatositler, lobül içerisinde çevreden merkeze doğru yönelen, bir hücre kalınlığında olan kordonlar meydana getirirler. Bu hücre kordonları, bağlantılar yaparak labirent şeklinde bir yapı meydana getirirler (Aksoy, 1977).

Kupffer hücreleri, dinlenme durumunda partiküler elemanları fagosit ederek reseptörleri vasıtasıyla çözünmüş materyali hücre içine alırlar ve vücudun immün sistemine katarlar. Kupffer hücrelerinin antikor yapımında da rolleri vardır. Stellat hücresi (yıldız hücresi), hepatositler arasında bulunmaktadır. Lipit vakuollerine sahiptir. A vitamini fazlalığında bu hücrelerin sayısı arttığı için, yağda eriyen vitaminlerin depo yeri olduğu düşünülmektedir. Karaciğer dokusundaki önemi tam olarak bilinmeyen Pit hücreleri (karaciğer ile ilişkili lenfositler) ise içinde nöroendokrin granüller içermektedir (Campbell ve Reece, 2006; Karaduman, 2007).

Diğer bezlerde olduğu gibi karaciğer de stroma ve parankima olmak üzere iki ana kısımdan meydana gelmektedir. Karaciğer parankiması, fonksiyonu bakımından dolaşım sistemiyle doğrudan bağlantılıdır. Karaciğer dolaşım sistemi oldukça özel bir yapıya sahiptir. Karaciğerdeki kan dolaşımı incelendiğinde, arteryel ve fonksiyonel olmak üzere ikili dolaşım mevcut olduğu görülmektedir. Vena porta ile başlayan fonksiyonel dolaşım, oksijence fakir, besince zengin kanı (deoksijenize kan) taşır. Arteryel dolaşım ise hepatik arterle başlar. Hepatik arter, oksijen bakımından zengin kanı (oksijenize kan) karaciğere getirmektedir (Campbell ve Reece, 2006). Hepatik venlerle karaciğerden ayrılan kan abdomenin üst tarafında inferior vena cava (diyaframın altındaki yapı ve organlardan kalbe kan taşıyan büyük karın damarı) içine boşalır (Aktümsek, 2007).

Karaciğere kan iki yolla gelmektedir. Dalak ve bağırsaktan kan getiren bir sistemin yanı sıra, kalpten gelen ana damardan da karaciğere kan gelmektedir. Karaciğere gelen bu

kan damarları, karaciğerin her bir hücresi için ayrı bir damar ağı oluşturmaktadır. Böylece hiçbir hücre damarsız kalmaz. Ayrıca karaciğer kan damarlarına sinir lifleri de eşlik eder (Lin vd., 2008). Portal ven ve hepatik arter damar sistemleri karaciğer sinüzoidlerinde birleşerek hepatik ven yolu vasıtasıyla vena cava inferior'a dökülürler. Damar sistemlerinin karaciğer içerisindeki dağılımı şu şekildedir:

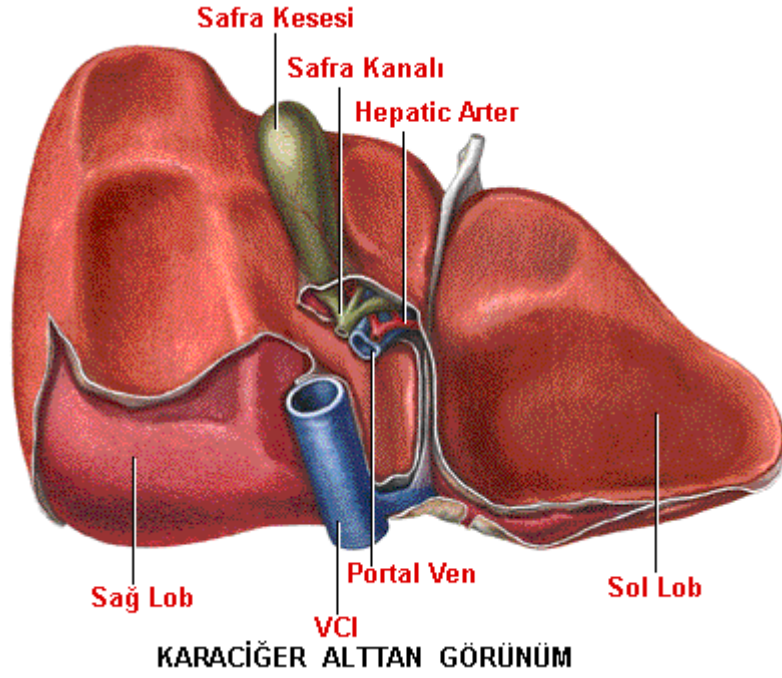
Vena Porta:

- a- Vena interlobaris (loblararası toplardamarı)
- b- Vena interlobularis (lobüllerarası toplardamarı)
- c- İntralobüler venöz sinüzoidler (lobüllerarası toplardamar sinüzoidleri)
- d- Venula perilobularis (lobüller çevresi küçük toplardamarı)

Hepatik Arter:

- a- Arteria interlobaris (loblararası atardamarı)
- b- Arteria interlobularis (lobüllerarası atardamarı)
- c- Arteriola perilobularis (lobüller çevresi küçük atardamarı)
- d- İntralobüler venöz sinüzoidler (lobüllerarası toplardamar sinüzoidleri)
(Tanrıverdi, 2005)

Karaciğere kan desteğinin bir başka yolu daha bulunmaktadır. Karaciğer kapillerleri oldukça geçirgendirler. Bu kapillerlere karaciğer sinüzoidleri denilmektedir. Sinüzoidleri oluşturan epitelial hücreler arasındaki boşluklar çok geniştir. Kan ile hepatositler arasında, vücudun başka yerinde bulunmayan bir biçimde geçişe izin verirler. Hepatositler, sinüzoid içerisinde dolaşımda bulunan kandan perisinüzoidal bir boşluk, yani Disse boşluğu ile ayrılmaktadır (Junqueira vd., 2002; Aktümsek, 2007).



Şekil 1. Karaciğerin alttan görünümü (URL-2)

Yavaş yenilendikleri bilinen karaciğer hücreleri devamlı olarak yenilenme yeteneğindedirler. Sıçanlarda karaciğer, 3'te 2'lik bir kaybı bir ayda yenileyebilmesine rağmen, insanlarda bu kapasite oldukça sınırlıdır. Karaciğerdeki hücre yenilenmesinin (rejenerasyon), dolaşımdaki 'şalon' adı verilen maddeyle kontrol edildiği düşünülmektedir. Rejenerasyon ilerledikçe şalon miktarı arttığı için mitotik aktivite azalmaktadır (Junqueira vd., 2002).

Karaciğer, hem endokrin hem de ekzokrin işlev gösteren çok yönlü bir organdır (Campbell ve Reece, 2006). Karaciğerin önemli depolama fonksiyonu bulunmaktadır. Sindirim kanalından emilen besin bileşenleri karaciğere, yani depolanmış oldukları yere taşınırlar. Glukoz, glikojen halinde depolanmaktadır. Kan glukozu belirli bir düzeyin üstüne çıktığında pankreasın endokrin bölümünden glukozun hepatositlerin içine taşınmasını sağlayan insülin salgılanarak glukoz, hepatositlerde glikojene dönüştürülür. Bazı vitaminler de karaciğerde depolanarak daha sonra kullanılmak üzere saklanır. Depo özelliği dikkate alındığında vitaminlere örnek olarak, yağda eriyen vitaminler (A, D, E, K), B₁₂ ve B₁₉ vitaminleri verilebilir. Ayrıca karaciğerde Fe ve Cu gibi elementlerin depolanması da söz konusudur (Campbell ve Reece, 2006; Aktümsek, 2007).

Karaciğer, HDL (yüksek yoğunluklu lipoprotein) ve VLDL (çok düşük yoğunluklu lipoprotein) öncü parçaları halinde kana verilen trigliseritleri de sentezlemektedir. Vücuttaki endokrin salgının düzenlenmesinde, ayrıca birçok hormonun metabolizmasında etkilidir. Bazı hormonların aktif olmasında etkili olan faktörleri üretir. Mesela, karaciğerden salınan anjiotensinojen, böbrek tarafından üretilen renin enzimiyle anjiotensin I haline dönüştürülmektedir (Aktümsek, 2007).

Karaciğer, kendisi için ürettiği proteinlerin yanı sıra albümin, fibrinojen, lipoproteinler, kan pıhtılaşmasında önemli olan protrombin ve bağışıklıkta önemli olan komplement proteinleri gibi diğer plazma proteinlerinin de üretildiği başlıca merkezdir. Granüler endoplazmik retikulumla bağlı poliribozomlarda sentezlenen bu proteinler, daima kanla ilişkili Disse boşluklarından geçerek kan plazmasında bulunurlar. Diğer bez hücrelerinin tersine, hepatositler proteinleri sitoplazmada depolamazlar, endokrin bez özelliği göstererek kan dolaşımına verirler (Campbell ve Reece, 2006; McLaughlin vd., 2007).

Karaciğer, vücutta önemli bir protein merkezidir. Hepatositler, yeni proteinleri sentezlerler ve azotlu atık ürünlerin böbrekler vasıtasıyla üreye dönüştürülerek vücuttan uzaklaştırılmasında kolaylık sağlarlar. Fakat bazı durumlarda ara metabolitler, hepatositler için toksik olabilmektedir. Örneğin, parasetamol (asetaminofen, ağrı kesici ve ateş düşürücü etkiye sahip bir ilaç maddesi) bileşiğinin aşırı dozu karaciğer yetmezliğine yol açabilir (Aktümsek, 2007).

Karaciğerin ayrıca, endojen atık ürünlerin ve zararlı ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, safranin oluşturulması ve salgılanması, steroidler ve toksinlerin etkisiz hale getirilmesi, steroid bağlayan hormonların sentezi, bağışıklık, bilirubinin metabolize edilerek atılması gibi görevleri bulunmaktadır (Karaduman, 2007).

Karaciğerin başlıca salgı ürünü olan safra; bikarbonat ve sodyum iyonları, safra tuzları, lesitin, kolesterol, fosfolipitler ve ayrıca hemoglobinin hem gruplarının metabolizmasının son ürünü olan bilirubini içermektedir. Safra salgısı, hepatositler tarafından üretilmektedir. Safra, safra kesesinde depolanır ve orada sodyum iyonlarının sekonder aktif taşınması ve suyun osmotik hareketiyle yoğunlaştırılır. Kalori bakımından zengin besinin duodenuma (onikiparmak bağırsağı) girişine cevap olarak ince bağırsak epitel hücrelerinden kana salınan kolesistokinin, safra kesesinin kasılmasını tetikleyen

faktörlerden biridir. İnce bağırsak kanalına dökülen safra tuzları, yağ asitlerini ve 2-monogliseritleri absorbsiyon öncesi emülsifiye etme yeteneğindedir (Aktümsek, 2007).

Safra kesesi, ya karaciğere bağlıdır veya onun dokusu içine gömülüdür. İnsanlardaki safra kesesi karaciğere bağlı vaziyettedir. Karaciğerden safra toplayan ve safra kesesine getiren kanallara sistik kanallar; karaciğeri ve safra kesesini onikiparmak bağırsağına bağlayan kanala koledok kanalı (ductus choledocus) denilmektedir. Safra, sindirim enzimleri içermez; fakat yağ sindirim enzimlerini aktive ederek, yağları emülsiyon haline getirerek sindirim olayına katkıda bulunur, ayrıca K vitamininin emilmesi için de gereklidir (Campbell ve Reece, 2006).

Billirubin, fonksiyonu bozulmuş, yaşlı ve hasarlı eritrositlerin sindirildiği makrofajlarda ‘hem’ metabolizmasından oluşmaktadır. Konjuge olmayan billirubin, albümine bağlanmış vaziyette kanla taşınır ve hepatositler tarafından Disse boşluklarından emilir. Hepatositler vasıtasıyla safraya salgılanan billirubin, glukuronik aside bağlanır ve safra kesesinden serbest bırakıldığında ince bağırsağına boşaltılır. Konjuge bilirubin ince bağırsakta absorbe olmaz; ama ileumun (ince bağırsağın alt kısmı) sonunda dekonjuge olarak bir kısmı urobilinojene çevrilir. Bazı karaciğer hastalıkları bilirubinin atılımını etkileyebilir ve bilirubinin plazmada miktarının yükselmesi olan birkaç tehlikeli sarılık türüyle sonuçlanabilir (Aktümsek, 2007).

1.2. Karbon Tetraklorür (CCl₄)’ün Genel Özellikleri ve Etki Mekanizması

Deneyisel araştırmalarda birçok etken ile birlikte karaciğer hasarı meydana getirilebilmesine karşın, insandaki siroz gelişim aşamasına benzerliğinden dolayı CCl₄ en sık tercih edilen ve kullanılanıdır (Jeon vd., 2003; Singhal ve Gupta, 2012).

Karbon tetraklorür, çabuk buharlaşma özelliği olan, saydam, yoğun, yanıcı olmayan bir sıvıdır. Bu maddenin güçlü bir stabilitesi vardır. Doğal olarak bulunabildiği gibi birçok kimyasal reaksiyonun sonucu olarak da ortaya çıkabilir (Stehbens, 2003). Düzgün tetraedron molekül yapısı olup merkezinde karbon atomu bulunur. Apolar yapıdadır. Suda çözünmez; ancak alkol gibi apolar çözücülerde çözünür. CCl₄, katalizör varlığında karbon sülfürün kuru klor gazıyla ısıtılmasından elde edilir. Bu madde, sanayi çözücüsü ve yağ giderici başka bazı maddelerin elde edilmesinde ara madde olarak kullanılmaktadır. İyi bir kimyasal çözücüdür. Yangın söndürücülerin önemli bir bileşenidir. Ayrıca, tahılların buharlanmasında ve böcek öldürücü olarak ziraat alanında kullanılmaktadır (URL-1).

CCl_4 , solunum yoluyla, yutma ve dermal absorpsiyon ile vücuda kolayca alınabilir. Gastrointestinal kanaldan oldukça hızlı emilir. İnsanlarda CCl_4 'ün önemli bir kısmı yağ dokusuna yerleşir. Ardından, buradan ayrılıp akciğerlere doğru hareket eder. Metabolize olan CCl_4 'ün yaklaşık % 4'ü nefesle dışarı verilir, diğer kısmı ise protein ve hücre içi moleküllerle etkileşime girer. Yapılan bazı araştırmalarda, bu maddenin fazla solunmasının kanser riskini artırdığı gösterilmiştir (Tanrıverdi, 2005; Al-Dbass vd., 2012).

CCl_4 , sentrilobüler nekrozis (bir karaciğer nekrozu) için steatosisten, hızla karaciğer hasarına yol açan klasik bir hepatoksik ajandır. CCl_4 'ün uzun vadeli uygulaması kronik karaciğer hasarına yol açar ve hepatik fibrozis üretimi için geniş olarak kabul edilen modeldir. CCl_4 'ün, reaktif oksijen oluşumunu indüklediği GSH faz II enzimini tükettiği ve akut ve kronik karaciğer hasarında önemli bir faktör olan oksidatif stresi indüklemek için antioksidan enzim ve antioksidan substratları azalttığı bilinmektedir (Lin vd., 2008).

CCl_4 tarafından indüklenen karaciğer hasarı, serbest radikaller ve karaciğer hücrelerinin hasarına yol açan lipid peroksidasyonu ile sonuçlanmaktadır. Yapılan deneysel araştırmalar, CCl_4 'ün toksisitesinin CCl_3^- (triklorometil) serbest radikale dönüşümüyle başladığını göstermektedir (Lin vd., 2008; Ranawat vd., 2010). CCl_4 metabolizmasının ilk basamağında sitokrom P-450 enzim sistemi vasıtasıyla CCl_3^- ve proxy triklorometil radikali ($^{\bullet}\text{OCCl}_3$) serbest radikali oluşmaktadır. Bu serbest radikaller, alkoxy ve peroxy radikallerini üretmek için çoklu doymamış yağ asidiyle bağlanarak, hücre membranında hasara neden olan lipid peroksidasyonu oluşturur, enzim aktivitesini değiştirir ve son olarak hepatik hasar veya nekrozisi indükler (Lin vd., 2008). CCl_3^- , mikrozomal lipitlere ve diğer hücresel makromoleküllere doğrudan tutunarak, zar yapısının bozulmasına, hücrenin enerji kaynaklarının azalmasına ve protein sentezinin baskılanmasına yol açmaktadır (Tanrıverdi, 2005; Feng vd., 2011).

Hücrede bulunan üç bin çeşit enzimin bir grubunu oluşturan P-450 enzimleri neredeyse tüm canlıların hücrelerinde sentezlenmektedirler. Bu enzimler, sigara dumanında bulunan benzo(a)pireni, izolasyon malzemelerinde kullanılan poliklorlanmış bifenilleri, kimyasal aşınma sonucu ortaya çıkan dioxin gibi birçok zehirli bileşiği karaciğer hücrelerinde değişikliğe uğratarak zararsız hale getirmektedir. Bu enzimler daha çok karaciğerde bulunmaktadır ve bunların 40 alt tipi vardır. Karaciğer hücrelerindeki P-

450 enzimleri, zararlı kimyasal maddeleri ve ilaçları değişikliğe uğratmaktadır (Nebert ve Russell, 2002; Lin vd., 2008).

Öldürücü dozlarda akut olarak CCl₄'e maruz kalan vakalarda yapılan otopsi sonuçlarında yağlı dejenerasyon gözlenmiştir. CCl₄'ün toksik metabolitleri LDL (Düşük Yoğunluklu Lipoprotein) fonksiyonlarında yapısal bir bozukluk meydana getirmektedir. CCl₄'ün reaktif serbest radikal metabolitleri çoklu yağ asitleriyle reaksiyona girdiği zaman, ya lipit peroksidasyonunu başlatır ya da kovalent olarak lipit ve proteinlere bağlanarak hücre zarının bozulmasına yol açmakta ve böylece karaciğer hasarına neden olmaktadır (Shewita, 2001; Tanrıverdi, 2005).

CCl₄, lipit peroksidasyonu meydana getirerek oksidatif hasarlara sebep olmaktadır. CCl₄, oluşturduğu bu serbest radikallerle lipit peroksidasyonunu indükler ve lipit peroksidasyonunun belirlenmesinde ayraç olarak kullanılan MDA seviyelerinde artışa yol açar, bunlardan başka mast hücrelerinde hasara sebep olur (Lin vd., 2008; Al-Dbass vd., 2012).

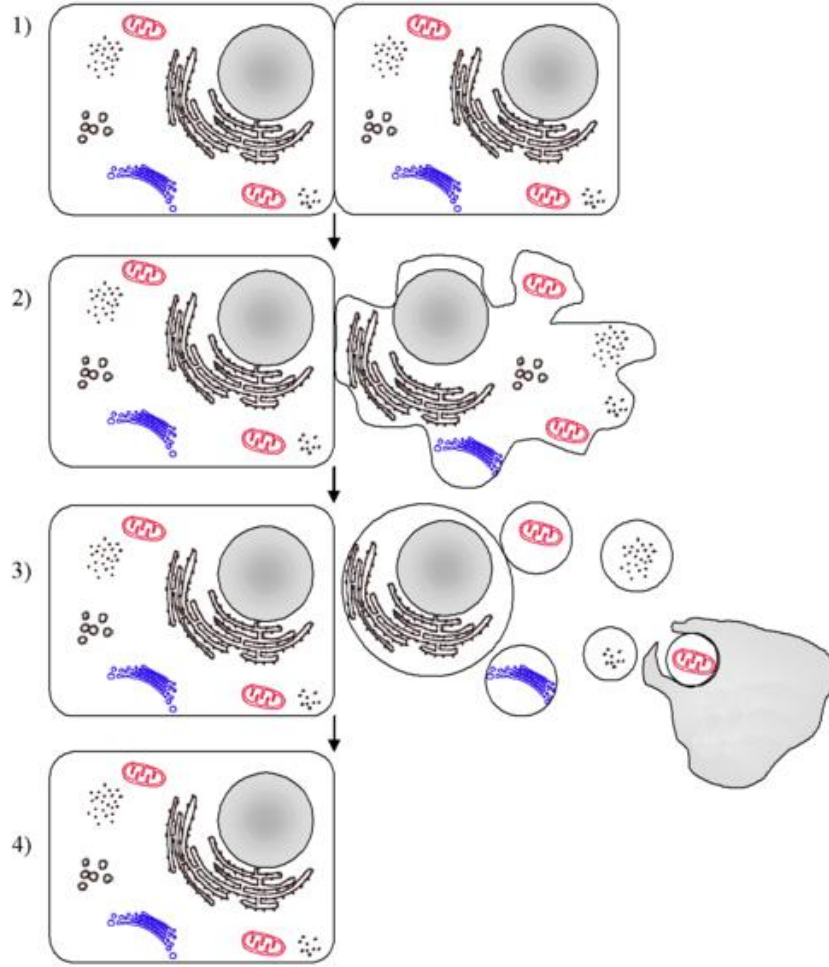
Lipit peroksidasyonu ardından lipit bozulmasına bağlı olarak endoplazmik retikulumunun fonksiyonu ve yapısı bozulmaktadır. ER şişmeye başlar ve ribozomlar GER'den ayrılmaya başlar. Lipoproteini yapımını gerçekleştiremeyen hücrelerde lipit birikimi söz konusu olur. Mitokondriler de hasar görür ve plazma geçirgenliği artarak hücreler şişer. Sonunda da hücre ölümü gerçekleşir (Tanrıverdi, 2005).

CCl₄, tek enjeksiyonun ardından bile yağ dejenerasyonu oluşturabilmektedir. CCl₄, akut hasarlar oluşturmalarının yanı sıra, uzun süreli kullanımı ile siroza kadar uzanan sonuçlara neden olabilmektedir. CCl₄ uygulamasının ilerleyen dönemlerinde hepatik yapı bozularak metabolik bölgeselleşme ortadan kaybolur. Son aşamada ise karaciğer yetmezliği gelişebilir (Onori vd., 2000; Shyu vd., 2008).

1.3. Apoptozis

Eski Yunan dilinde sonbaharda sararmış yaprakların dökülmesi manasında kullanılan apoptozis, organizma tarafından düzenlenen enerji bağımlı, programlı hücre ölümü demektir. Bu süreç, doku homeostazının korunmasında önemli bir role sahiptir. Ayrıca fetal gelişim ve erişkin dokulardaki birçok fizyolojik olayda da rolü vardır. Embriyogenez, menstrüasyonda endometrial hücrelerin yıkımı, timusun (tiroyit bezinin altında bulunan bez) gelişimi sırasında otoreaktif (fazla duyarlı) T hücrelerinin yok

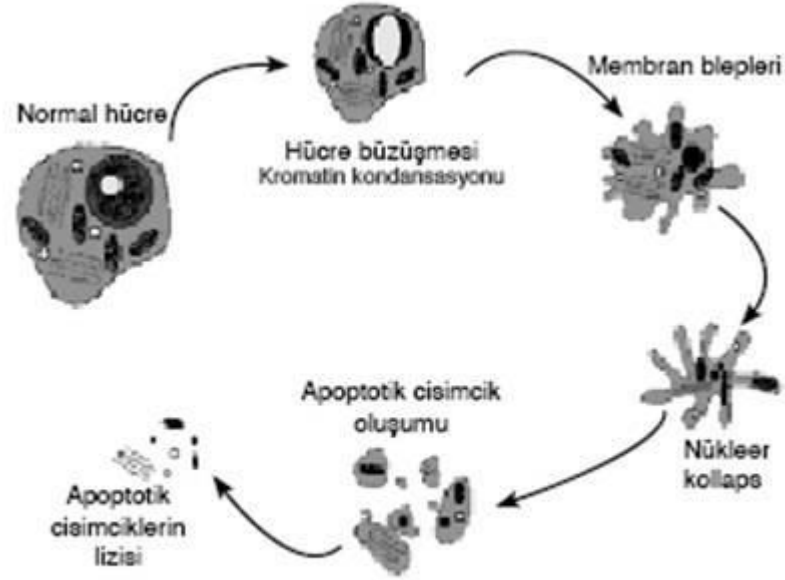
edilmesi bunlardan birkaçıdır (Yüksel vd., 2009). Fizyolojik bir işlem olan apoptozis, normal gelişim esnasında ve olgun organizmadaki çeşitli hücre tiplerinin tahribatı sırasında özel hücrelerin kaybindan sorumludur (Thompson, 1995). Apoptozis oranının az olması durumunda hücre sayısı artarken, bilakis, apoptozis oranı arttığında hücre sayısı azalır ve istenmeyen doku tahribatı oluşmuş olur (Thompson, 1994; Altunkaynak ve Özbek, 2008).



Şekil 2. Apoptozis geçiren bir hücre şeması (URL-3)

Hücre ölümünün iki çeşidi vardır, bunlardan birisi apoptozis ve diğeri nekrozdur. Nekroz, hücresel zarar sonucu meydana gelir. Apoptozis, nekrozdan farklı olarak, belirli bir moleküler işlemler sırasının ardından hücrenin ölümünü gerçekleştirir ve organizmanın yaşam döngüsü için gereklidir. Her ikisinde de, düzenli olarak birbirini takip eden biyokimyasal ve morfolojik olaylar neticesinde hücre ölümü gerçekleşir (Thompson, 1995; Yılmaz, 2005). ‘Fizyolojik hücre ölümü’, ‘hücre intiharı’, ‘programlanmış hücre ölümü’ gibi ifadeler apoptozisle aynı manada kullanılabilirler. Apoptozis, genler tarafından kontrol

edilir, yani genetik olarak kontrolü yapılan fizyolojik sistemlerle düzenlenir. Memeliler üzerinde gerçekleştirilen çalışmalar, apoptoziste mitokondrilerin çok önemli rolü olduğunu ortaya koymuştur (Cohen, 1992).

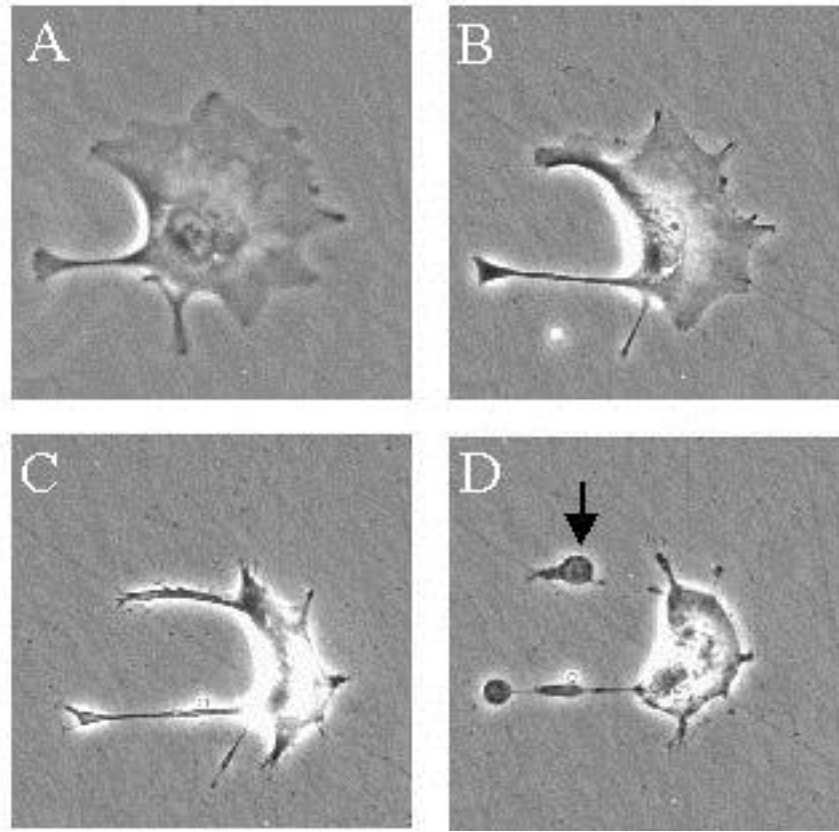


Şekil 3. Apoptozise uğrayacak hedef hücrede görülen morfolojik değişiklikler
(URL-4)

Bir hücre, ölmek için uygun bir sinyal aldığı zaman, hücresel proteinlerin ve DNA'nın parçalanmasına ve sonuçta hücrenin ölmesine sebep olan, birbirini izleyen protein aktivasyon olayı gerçekleşir. Ölen hücrelerden gelen sinyaller, ölü hücrelerden artakalan artıkları yutup sindirmek için komşu hücelere bilgi verir ve böylelikle embriyonun zararlı enzimlerden ve metabolitlerden arınmış olarak kalması sağlanmış olur (Campbell ve Reece, 2006). Hücre tipine göre yaşam süresi değişmektedir. Ancak travma ve kaza neticesinde meydana gelen nekrozis haricinde oluşan tüm hücre ölümleri apoptozis ile gerçekleşmektedir. Programlanmış hücre ölümü, dengelenmiş hücre çoğalması ve dokulardaki hücre sayısının sabit tutulmasından sorumludur. Örneğin, insanlarda 5×10^{11} civarında kan hücresi her gün programlanmış hücre ölümü vasıtasıyla kandan elimine edilmektedir. Apoptozis, özellikle doku homeostasisi ve istenmeyen etkilere karşı doku bütünlüğünün gerçekleştirilmesinde önemlidir (Lüleyap, 2008; Aslan, 2011).

DNA hasarı meydana geldiği takdirde, hasarın olduğu hücre apoptozise yönlendirilerek ortadan kaldırılmaktadır. Böylece, DNA'da zararlı mutasyonları bulunduran hücrelerin kanserleşme potansiyeli ortadan kaldırılmış olur. İmmün sistemin önemli hücrelerinden olan T lenfositlerin etkisiz olanları ya da organizmanın kendi dokularına karşı reaksiyon verme potansiyeli bulunanları, dolaşıma girmeden önce apoptozisle uzaklaştırılırlar (Aslan, 2011). Hücrede intihar mekanizmasının meydana getirilmiş olması, tüm hayvanlardaki gelişim olayı için gereklidir. Yuvarlak solucanlar ile memelilerdeki apoptozis genlerinin benzerlikleri, temel mekanizmanın evrimsel süreçte erken dönemde ortaya çıktığını göstermektedir. Omurgalılarıdaki programlı hücre ölümü, sinir sisteminin normal gelişimi için; bağışıklık sisteminin normal olarak çalışabilmesi için; insan el ve ayaklarının normal morfogenezi için gereklidir. Örneğin, normal hücre ölümünün artması, perdeli el ve ayak parmakları gelişimine sebep olmaktadır. Ayrıca sinir sisteminin bozulmasına neden olan bazı hastalıkların, apoptozis genlerinin gerektiği gibi aktive edilememesinden kaynaklandığı ve bazı kanserlerin, hücre olayının iflas etmesinden ötürü olduğu olasılıkları araştırmacılar tarafından incelenmektedir. Kansere sebep olan DNA bozuklukları da dâhil, tamir edilemeyen bozuklukları bulunan hücreler, normalde apoptozisi tetikleyen iç sinyalleri üretirler (Campbell ve Reece, 2006).

Hücre ölümünde birçok aşamadan oluşan bir durum ortaya çıkmaktadır. Hücre iskeletini meydana getiren aktin ve lamin proteinlerinin bölünmesiyle hücre küçülmeye başlar, hücre çekirdeğinde kromatin bozulur ve çekirdek yoğunlaşması söz konusu olur. Birçok hücre ölümünde çekirdek atnalı şeklini almaktadır. Gittikçe küçülen hücreler paketlenerek makrofajlar tarafından ortadan kaldırılırlar. Apoptozisin son fazlarında ise zar kabarcıkları ve bazen de küçük çapta veziküller gözlenebilmektedir (Campbell ve Reece, 2006; Aslan, 2011).



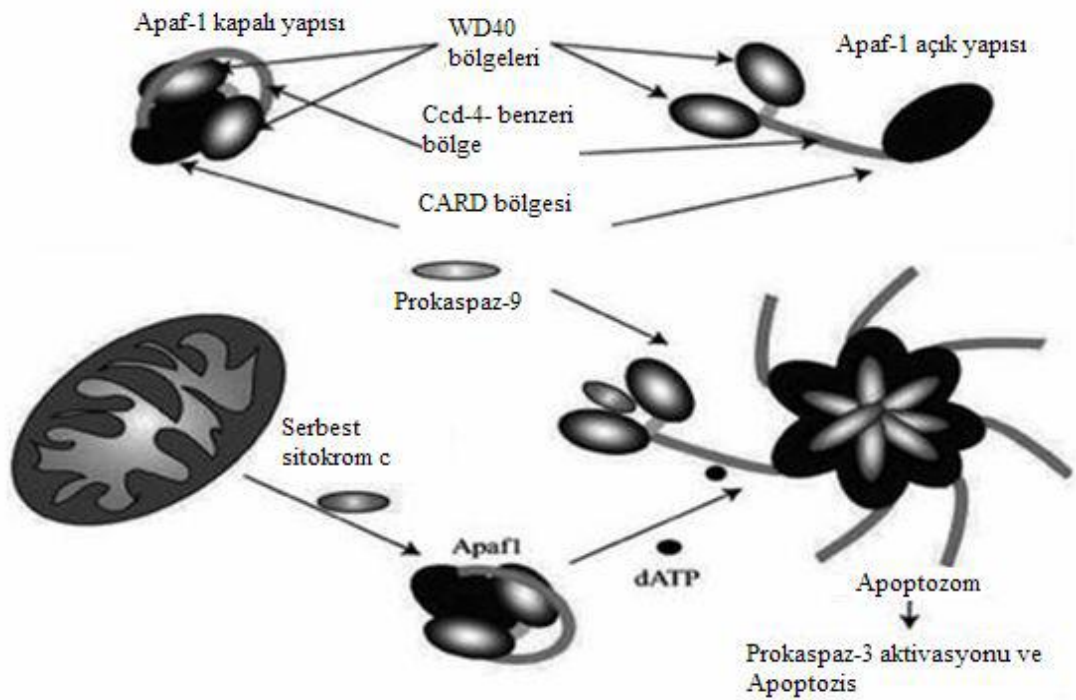
Şekil 4. Apoptozise uğrayan bir hücrenin ölüm aşamaları (URL-5)

1.3.1. Apoptotik Markerlar (Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bax, Bcl-2)

Apoptozis olayının gerçekleştiği sırada meydana gelen genetik olaylar, hem en toksik ilaçlar hücre ölümünü bu şekilde gerçekleştirdiği için hem de bu işlemde tümör supresör genleri ile onkoproteinler birlikte işlev gördüğü için önemlidir ve bu yüzden son yıllarda apoptozis genetiğiyle ilgili çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Apoptozis mekanizması üzerinde kaspaz-3, kaspaz-9, bax ve bcl-2 proteinleri oldukça önemli bir yere sahiptir (Korsmeyer, 1999; Altunkaynak ve Özbek, 2008).

Kaspazlar, normalde sitoplazmada inaktif proenzimler olarak bulunmaktadır. Ancak proteolitik parçalanmanın ardından aktif olurlar ve kaspaz aktivasyonu başlamış olur. İlk etapta kaspazlar mitokondride membran hasarı meydana getirirler ve bunların neticesinde zar değişimleri, hücre iskeleti ve çekirdek değişimine sebep olan hasarlar söz konusu olur. Ayrıca sitokrom C'nin prokaspaz zimojenlerini de aktive etmektedir (Altunkaynak ve Özbek, 2008; Feng ve ark., 2011). Hücrede sitoplazmada lokalize olan kaspazlar, başlatıcı ve efektör kaspazlar olarak ikiye ayrılmaktadırlar ve sistein proteazlar olarak da isimlendirilmektedirler. Apoptoziste, özellikle aspartat kalıntılarından olan peptitleri

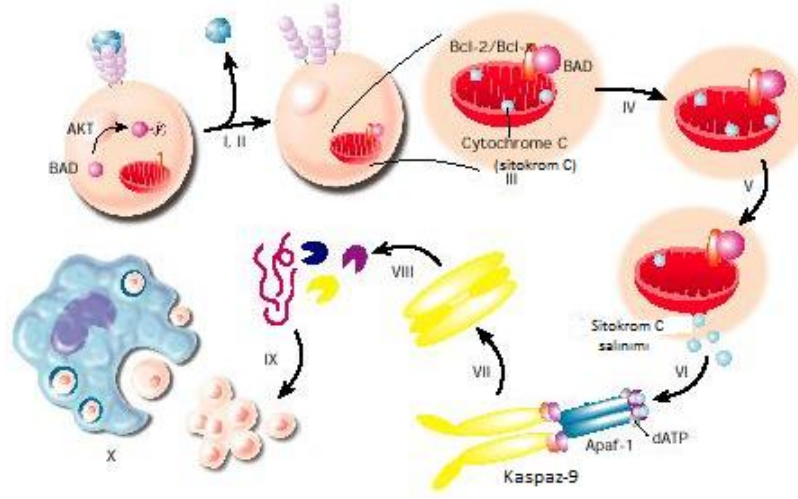
yıkıma uğratılmaktadırlar ve temel fonksiyonları ise DNA polimeraz enzim aktivitesini engelleyerek hücrenin apoptozise uğrayıp yok olmasını gerçekleştirmektir (Aslan, 2011). Mitokondri, normal şartlarda ATP oluşturmak için sitokrom c bulundurur. Mitokondrial stres koşullarında serbestleşen sitokrom c, apoptotik hücre ölümünde kaspaz-3 aktivasyonu için önemli rol oynamaktadır. Bu yolda mitokondri tarafından kontrol edilen apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 (apaf-1) ve kaspaz-9 yer almaktadır. Kofaktör nükleotit trifosfat ile aktif hale getirilen sitokrom c ve apaf-1 birleşip prokaspaz-9'u aktif hale getirir. Aktif olan kaspaz-9 ise kaspaz-3'ü aktifleyerek diğer kaspaz kaskadının tetiklenmesine yol açar (Yılmaz, 2005; Kuwahata vd., 2012).



Şekil 5. Sitokrom c ve apaf-1 aracılığıyla apoptozis (Aslan, 2011; URL-7)

Normal bir hücre mitokondrisinin dışı zarında bcl-2 proteini yer almaktadır. Bcl-2 ailesi, bir kısmı anti-apoptotik bir kısmı ise pro-apoptotik üyelerden oluşmaktadır ve apoptozisin düzenlenmesinde en önemli rolü olan onkoprotein grubudur. Bu protein, mitokondri porlarının geçirgenliğini kontrol etmektedir. Bcl-2, apaf-1 proteininin bir molekülünü bağlamaktadır. Bcl-2, yol açtığı iç hasarla mitokondride çatlaklar meydana getirerek apaf-1 ve sitokrom c salınımına yol açar. Bu iki protein ise, kaspaz-9 moleküllerine bağlanır (Korsmeyer, 1999; Yılmaz, 2005). Kaspaz-9'u aktive eden oligomerik sinyal platformuna apoptozom denir ve apoptozom yapısının oluşabilmesi için

sitokrom c ve dATP/ATP gereklidir (şekil 6) (URL-6). Bir hücrenin apoptozise eğilimli olması, heterodimer ya da homodimer formunda olan bcl-2 ailesi genlerinin etkisine bağlıdır. Bcl-2 salgılanması neticesinde bcl-2 homodimerleri şekillenmektedir. Böylece apoptozis inhibe edilir (Altunkaynak ve Özbek, 2008).



Şekil 6. Apoptozom oluşumu (URL-6)

Proapoptotik bir protein olan Bax proteini, mitokondrinin üzerinde yer almaktadır ve apoptozisin gerçekleşmesinde önemli role sahiptir (Aslan, 2011). Bax proteinleri, etkilerini kaspazlar üzerinden gerçekleştirir. Bax ve Bad gibi proapoptotik proteinler, heterodimerizasyon yoluyla kaspaz serbestleşmesini uyararak ve mitokondri membranının geçiş porlarının açıklığını değiştirerek sitokrom c'yi serbest hale getirirler. Böylece kaspaz aktivasyonuna sebep olurlar. Bcl-2'nin aksine, çok fazla Bax, apoptozisi aktive eder (Altunkaynak ve Özbek, 2008).

1.4. Deve Dikeni ve Antioksidan Özellikleri

Deve dikeni, kapalı tohumlu bitkilerin (Magnoliophyta ya da Angiospermae) çift çenekliler (Magnoliopsida) sınıfına ait papatyagiller (Asteraceae) familyasından bazı dikenli bitkilerin genel adıdır. Yol ve tarla kenarlarında yetişen, 30-100 santimetre yüksekliğinde olabilen, bir ya da iki yıllık otsu bitkilerdir. *Carduus*, *Carlina*, *Cirsium*,

Silybum gibi cinsleri bulunan deve dikenini, ayrıca meryemana dikenini, peygamber dikenini, sütlü kengel olarak da bilinmektedir (Campbell ve Reece, 2006; Şentürk vd., 2010).



Şekil 7. Deve dikenini (URL-7)

Yüksek antioksidan içerikleriyle tıbbi bitkiler, yeni antioksidanlar bulmak için gerçekten zengin kaynaklardır. Deve dikenini yaprak ve çiçeklerinin ekstraktları da yüzyıllardır karaciğer, safra kesesi ve dalak bozukluklarında tedavi için kullanılmaktadır. 1960’larda tohum ve meyve ekstraktlarının aktif biyolojik esasları araştırılmış ve kimyasal yapıları aydınlatılmıştır (Sonnenbichler vd., 1999). Örneğin, *Silybum* cinsine ait *Silybum marianum* türü, etken maddesi silymarin olan kuvvetli bir antioksidan bitkidir. Son çalışmalar, silymarin maddesinin kanseri önlemedeki olası etkileri üzerine odaklanmıştır. Kimyasal olarak silymarin; silibin, izosilibin, silikristin ve dehidrosilibinin denilen izomer flavanolignanlardan oluşmaktadır (Şentürk vd., 2010; Aghazadeh vd., 2011). Tohum ekstraktında, silymarinden başka, taxifolin, kuercetrin, sabit yağ, albümin, müsilaj gibi maddeler mevcuttur. Silymarin, hücre siklus düzenleyicileri ve apoptotik proteinlerin ekspresyonlarına yaptığı müdahale sayesinde hücre canlılığı ve apoptozis arasındaki dengesizliği azaltır. *Silybum marianum* ekstraktlarının ve silimarinin, CCl₄’ün neden olduğu karaciğer nekrozu ve fibrozuna karşı koruyucu etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Çalışmalar, silimarini ve bitki içeriklerinin antioksidan etkisi, antitümör faktörü ve antienflamasyon etkisi üzerinde yoğunlaşmıştır (Shaker vd., 2010).

1.5. Lipit Peroksidasyonu

Normal şartlar altında aerobik metabolizmanın ürettiği reaktif oksijen türleri, organizmada bulunan antioksidan savunma sistemlerince daima inhibe edildiğinden dolayı patolojik bir durum söz konusu olmaz. Organizma, meydana gelen radikallerden, serbest radikal oluşum hızı ile savunma sistemlerinin gücü arasındaki denge stabil olduğu sürece olumsuz etkilenmez. Ancak bu denge antioksidan sistemlerin aleyhine bozulduğu takdirde meydana gelen potansiyel hasara oksidatif stres denir. Oksidatif hasar, DNA, lipit, protein ve karbonhidrat gibi tüm moleküllerde ortaya çıkabilir (Nakahira vd., 2003; Tanrıverdi, 2005).

Hücrede serbest radikal hasarı için önemli bölge olan hücre membranında kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle kolayca etkileşerek peroksidasyon ürünlerini açığa çıkarmaktadır. Lipit peroksidasyonu, membranlarda yer alan PUFA (poliansatüre yağ asitleri)'nin, serbest oksijen radikalleri tarafından alkoller, peroksitler, aldehitler gibi çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur. Lipit hidroperoksitleri yıkıldığı zaman birçoğu biyolojik açıdan aktif aldehit meydana gelmektedir. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler ya da ilk baştaki etki alanlarından diffüze olarak hücrenin diğer kısımlarına zararı yayarak doku hasarına ve birçok hastalığa sebep olmaktadır. Lipit peroksidasyonunun en önemli ve son ürünü MDA'tir. Oluşan malondialdehit, hücre zarlarından iyon alışverişine etki göstererek zardaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına sebep olur, böylece iyon geçirgenliği ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz neticelere yol açar (Benzer ve Ozan, 2003; Lin vd., 2008; Al-Dbass vd., 2012). CCl₄'e bağlı karaciğer hasarında oluşan lipit peroksidasyonu, bu hasara bağlı olarak ilerleyen dönemde karaciğer fibrozu ve siroz oluşabildiği için oldukça önemli bir yere sahiptir. Yapılan birçok çalışmada, karaciğer hastalıklarında oksidatif stres ve buna bağlı olarak meydana gelen karaciğer hasarı ile fibrozis arasında ilişki olduğu belirlenmiştir (Üstündağ vd., 2005).

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Kimyasal Maddeler ve Deve Dikeni

Hayvansal dokulardan DNA izolasyon kiti Qiagen (QIAamp® DNA Mini Kit, Cat. No. 51304, ABD)'den temin edilmiştir.

Western blot aşamasında kullanılan primer antikorlar BioVision (ABD)'den; sekonder antikor ise Santa Cruz Biotechnology (ABD)'den temin edilmiştir. Deneysel çalışmalarda kullanılan diğer bütün kimyasallar Sigma-Aldrich (Almanya), Bio-Rad (ABD), BioShop (Kanada) ve Merck (ABD)'ten sağlanmıştır.

Ratların günlük içme sularına kaynatarak katmak suretiyle, toz halindeki deve dikeni tohumları Öz Gıda Organik ve Yöresel Ürünler Ltd. Şti. (Elazığ)'den temin edilmiştir.

2.2. Metot

2.2.1. Hayvan Materyali ve Araştırma Grupları

Araştırmamızın hayvan deneyleri bölümünün tamamı, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 27.11.2013 toplantı tarihi, 2013-11 toplantı sayısı ve 132 karar nolu izni ile F.Ü. Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nde (FÜDAM) yürütülmüştür.

Araştırmada 28 adet erkek Wistar albino (n=28, 8 haftalık) rat kullanılmıştır. Ratlara günlük 12 saat aydınlık; 12 saat karanlık olacak şekilde bir aydınlatma periyodu uygulanmıştır. Ratlar canlı ağırlıkları birbirine yakın olacak şekilde 4 gruba ayrılmıştır. Gruplar: (i) Negatif Kontrol: Normal su tüketen, CCl₄ ve deve dikeni verilmeyen grup; (ii) Pozitif Kontrol: Normal su tüketen, CCl₄ verilmeyen fakat deve dikeni verilen grup; (iii) CCl₄ Grubu: Normal su tüketen ve CCl₄ verilen grup (2 ml/kg CA, ip); (iv) CCl₄ + deve dikeni Grubu: CCl₄ (2 ml/kg CA, ip) ve deve dikeni verilen grup şeklinde ayarlanmıştır. Deve dikeni kaynağı olarak kaynatılmış deve dikeni tohumlarının ekstresi hayvanların içme suyuna katılmıştır (% 10). Hayvanların başlangıç canlı ağırlıkları eşit olacak şekilde ayarlanıp gruplar oluşturulmuştur. Canlı ağırlıklar çalışma boyunca haftada 3 kez olmak üzere kaydedilmiştir.

Tablo 1. Araştırma Grupları (n=7)

Gruplar	Uygulama	Deneme Süresi
Negatif Kontrol	Normal su tüketen, CCl ₄ ve deve dikenini verilmeyen grup	4 hafta
Pozitif Kontrol	Normal su tüketen, CCl ₄ verilmeyen fakat deve dikenini (% 10) verilen grup	4 hafta
CCl ₄ Grubu	Normal su tüketen ve CCl ₄ (2 ml/kg CA) verilen grup	4 hafta
CCl ₄ ve deve dikenini verilen grup	CCl ₄ (2 ml/kg CA) ve deve dikenini (% 10) verilen grup	4 hafta

Ratların normal su tükettiği bir haftalık alışma döneminden sonra, önceden belirtildiği gibi ağırlık ortalamaları eşit olacak şekilde seçilip gruplara ayrılmıştır. Yem ve su, çalışma süresince *ad libitum* olarak verilmiştir. Çalışma süresince 2 günlük su tüketimi belirlenmiştir. Çalışma bitiminde ratlar dekapite edilerek karaciğer dokuları ve kan serumları alınmış ve analizler yapılincaya kadar -80°C’de muhafaza edilmiştir.

2.2.2. CCl₄ Uygulaması

CCl₄ uygulaması, ratlar canlı ağırlıkları birbirine yakın olacak şekilde 4 gruba ayrıldıkları ilk günden başlanarak, dört hafta boyunca haftada iki kez olmak üzere 2 ml/kg canlı ağırlığında intraperitoneal (karın zarı içine) olarak, 1:3 oranında zeytinyağı ile birlikte enjekte edilerek gerçekleştirilmiştir (Bahçecioğlu vd., 2008; Shaker vd., 2010).

2.2.3. Deve Dikeni Ekstraktının Hazırlanması

Toz haline getirilmiş vaziyetteki deve dikenini tohumlarının su içerisinde kaynatılmasıyla oluşturulan ekstrakt, ratların günlük içme sularına % 10 oranında katılmıştır. Ratların su tüketimleri düzenli periyotlarla takip edilip kaydedilmiştir.

2.2.4. Karaciğer Doku MDA Ölçümleri

Karaciğer doku örnekleri küçük parçalara bölünerek 0,5 gram doku başına 4,5 ml % 1,15’lik KCl olacak şekilde mekanik homojenizatörde parçalandı. Hazırlanan bu homojenattan lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA tayini Ohkawa vd., (1979)’ya göre değiştirilerek yapılmıştır. Bu yöntem, lipid peroksidasyonunun aldehit ürünlerinden

biri olan MDA ve TBA (tiyobarbütirik asit)'nin reaksiyonu temeline dayanmaktadır. Ölçüm prosedüründe 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 95⁰C sıcaklıkta kaynar su banyosunda 45 dakika bekletildi ve ardından soğutularak 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; Benzer ve Ozan, 2003; Üstündağ vd., 2005).

2.2.5. Plazma MDA Ölçümleri

Plazma örneklerinin MDA tayini Ohkawa vd. (1979)'nın yöntemine göre değiştirilerek yapılmıştır. 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 95⁰C sıcaklıkta kaynar su banyosunda 1 saat bekletildi ve ardından soğutularak 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.

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. DNA Hasarının Analizi

Apoptozis esnasında DNA'yı 200 baz çiftlik parçalara ayırarak kırılmalar meydana getiren endonükleaz enzimi, apoptozisin önemli bir işareti olan merdiven görüntüsünü oluşturmaktadır ve bu oluşum DNA agaroz jel elektroforezinde (Thermo EC, mini cell, EC 320) tespit edilebilmektedir. Dokularda Qiagen DNA izolasyon kiti kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır ve ardından DNA, Tris-EDTA solüsyonunda çözülerek DNA agaroz

jel elektroforezinde % 1'lik jelde analiz edilmiştir (Wang vd., 2003; Aslan, 2011). Sonrasında DNA bantlarının görüntüsü alınarak gruplar arasındaki benzerlik ve farklılıklar tespit edilmiştir.

2.2.7.1. Karaciğer Dokusundan DNA İzolasyonu

Dokularda Qiagen DNA izolasyon kiti kullanılarak DNA izolasyonu şu şekilde yapılmıştır (Qiagen, QIAamp® DNA Mini Kit, Cat. No. 51304):

- 1- 25 mg doku alınır, küçük parçalara ayrılır. 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne alınır. 180 µl ATL Buffer'ı eklenir.
- 2- 20 µl Proteinaz-K ilave edilir, vortekslenir. 56⁰C'de doku eriyinceye kadar (1-3h) inkübe edilir (ara sıra vortekslenir).
- 3- 200 µl AL Buffer'ı ilave edilir. 15 saniye darbeli vorteksleme yapılır. Ardından 70⁰C'de 10 dakika inkübe edilir. (Doku kaybını önlemek için gerekirse kısa süreli santrifüj yapılır.)
- 4- 200 µl etanol ilave edilip 15 saniye vortekslenir.
- 5- Karışım Spin Kolona aktarılır ve kapağı kapatılır. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir. Spin Kolon çıkarılır. Temiz bir Collection tüpe bırakılır, diğeri atılır.
- 6- 500 µl AW1 Buffer'ı Spin Kolona ilave edilir, kapak kapatılır. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir. Spin Kolon alınır, Collection tüp atılır, temiz bir Collection tüpe bırakılır.
- 7- Spin Kolona 500 µl AW2 Buffer'ı eklenir ve 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilir.
- 8- Spin Kolon 1,5 ml eppendorf tüpe bırakılır. Spin Kolon içerisine 200 µl AE Buffer'ı veya distile su bırakılır. Oda sıcaklığında 1 dakika beklenir. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.
- 9- 8. basamak tekrarlanır.

2.2.8. Western Blotlama Çalışması için Doku Homojenizasyonu

Karaciğer doku örnekleri, küçük parçalara bölünerek mekanik homojenizatörde lizis tamponu (0,5 M Tris [pH: 8], EDTA, β-Merkaptoetanol, Fenil metil sülfonil florid [PMSF]) içerisinde parçalandı. Parçalanmış doku örnekleri 15000 rpm'de 45 dakika

santrifüjlendi. Süpernatant alındı ve kullanılıncaya kadar -80°C’de muhafaza edildi (Aslan, 2011).

2.2.9. 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 yürütülmüştür. Daha sonra bu proteinler Western blotlama tekniği ile nitroselüloz membrana aktarılarak sentez oranlarına bakılmış (Laemmli, 1970) ve sonrasında protein düzeyleri yoğunluk belirleyici analiz sistemi ile ölçülmüştür (Image J; National Institute of Health, Bethesda, USA).

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

SDS-PAGE, BIO-RAD Mini-PROTEAN® 3 Cell jel elektroforez sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Proteinleri ayırmak için kullanılan jel şu şekilde hazırlanmıştır (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 Akrlamid/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 Akrlamid/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 kaynatılır. Elektroforez için 1 x tank tamponu kullanılır ve proteinlerin jeldeki hareketini izlemek için kullanılan boya olan bromofenol mavisine ait mavi bant, jelin sonuna gelinceye dek 20 mA akım uygulanır. Elektroforezin ardından jel, oda sıcaklığında yarım saat süreyle Coomassie mavisi ile boyandıktan sonra jeldeki protein bantları görünür hâl alıncaya kadar boya uzaklaştırıcı solüsyon ile yıkanır. Fotoğrafları alınan jeller, jel kurutma sistemi ile kurutularak saklanır (Laemmli, 1970).

2.2.9.2. Western Blotlama ile Protein Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

SDS-PAGE için 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
0,5 M Tris HCl (pH: 6.8)	5 ml/10 ml
% 10 Gliserol	1 ml/10 ml
% 25 2-Merkaptoetanol	0,25 ml/10 ml
% 0,05 Bromofenol Mavisi	0,005 g/10 ml
DTT	0,2 g/10 ml

dH₂O ile 10 ml'ye tamamlandı.

SDS-PAGE Sonrası Protein Boyama Solüsyonu

% 0,1 Coomassie 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 Na₂HPO₄.12 H₂O 26,8 g/l

0,025 M NaH₂PO₄.12 H₂O 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 H₂O₂ 40 µl/40ml

dH₂O ile 40 ml'ye tamamlandı.

Western blotlama, BIO-RAD Mini-PROTEAN[®]3 Cell jel elektroforez sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Blotlama öncesinde SDS-PAGE ile proteinlerin jelde

ayrılması sağlanır. Jel büyüklüğünde olacak şekilde NitroBind transfer membranı kesilir. Filtre kağıtlarıyla beraber transfer tamponu içerisinde bekletilir. Elektroforezin ardından jel de transfer tamponu içerisinde bekletilir ve sonrasında western blota özgü kasetin kapağı açılarak alt tarafına filtre kağıdı ve onun üzerine de jel yerleştirilir. Hava kabarcığı kalmamasına dikkat ederek nitroselüloz membran ve tekrar bir filtre kağıdı yerleştirilerek kasetin kapağı kapatılır ve elektroforez tankına yerleştirilir. Tanka buz ünitesi de yerleştirilir ve ardından transfer tamponu doldurularak güç kaynağına bağlanır ve 250 mA'da 90 dakika akım verilir. Isının düzenli dağılması amacıyla, blotlama manyetik karıştırıcı üzerinde yapılır. Blotlama sonrasında membran, PBS Tween-20'de (PBS yıkama solüsyonu) 15 dakika yıkanır. 4⁰C'de bir gece süt tozu içerisinde bloklama işlemi yapılır. Bloklamadan sonra 90 dakika oda ısısında bekletilir. Daha sonra 1/1000 oranında seyreltilmiş primer antikor ilave edilir. Gene 90 dakika oda ısısında bekletilir. 15 dakika PBS çalışma solüsyonu ile yıkama işlemi gerçekleştirilir. 1/1000-2000 oranında seyreltilmiş sekonder antikor ilave edilir. 90 dakika oda ısısında bekletilir. Yine aynı şekilde PBS çalışma solüsyonu ile 15 dakika yıkanır. Yıkama işleminin ardından son hacim 40 ml saf suyla tamamlanacak şekilde 4 tablet (20 mg) 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, Amresco), 1,33 ml 1M Tris (pH: 6,8), %30'luk 40 µl H₂O₂ içerisinde bantlar belirgin hale gelinceye kadar bekletilir. Ardından dH₂O içerisine alınarak reaksiyon durdurulur. Bu metotta Aslan (2011)'in çalışması esas alınarak bazı değişiklikler yapılmıştır.

2.2.10. Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bax, Bcl-2 Proteinlerinin Analizi (Apoptotik Markerlar)

Apoptozisin önemli belirteci olan bu proteinlerin dokulardaki sentez oranları oldukça önemlidir. Bu çalışmada kaspaz-3, kaspaz-9, bax, bcl-2 apoptotik proteinlerinin hasarlı ve normal dokulardaki ekspresyon seviyeleri özel antikorlar kullanılarak SDS-PAGE ve Western blotlama tekniği ile belirlenmiştir.

2.2.11. TUNEL Metoduyla Apoptozis Düzeylerinin Belirlenmesi

Terminal Deoksiniükleotidil Transferaz dUTP Çentik Uç Etiketleme olarak bilinen TUNEL metodu, hücrelerde meydana gelen apoptozis oranlarını belirlemede standart yöntemlerden biridir. (Taş vd., 2012) Parafin blok, dondurulmuş halde bulunan kesitler, kültürü yapılmış solüsyon halindeki ya da "plate"lere ekilmiş veya lameller üzerinde büyütülmüş hücrelerdeki apoptozis bu yöntemle belirlenebilir (Yılmaz, 2005; Qiu vd., 2007).

TUNEL metodu sırasında şu işlemler yapılmıştır: Parafin bloklardan 5 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 belirlendi. Boyama metodu aşağıdaki tabloda ayrıntılı olarak verilmiştir (Tablo 2). Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskopunda (Olympus BH-2) incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı. TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde metil green ile yeşile 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 hesaplandı. Skala bar: 50µm.

Tablo 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 peroksidaz 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	5-10dakika
16	PBS	3X5 dakika
17	Distile su	5 dakika
18	Metil green	1-5dakika
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.	

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 testi uygulanmıştır. Yapılan istatistiklerin güvenilirliği açısından, ölçümler en az 3 tekrar olacak şekilde yapılarak, SPSS 20 paket programında sonuçlar kaydedilmiş ve ardından değerlendirme sürecine geçilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Canlı Ağırlık Değişimi ve Su Tüketimi

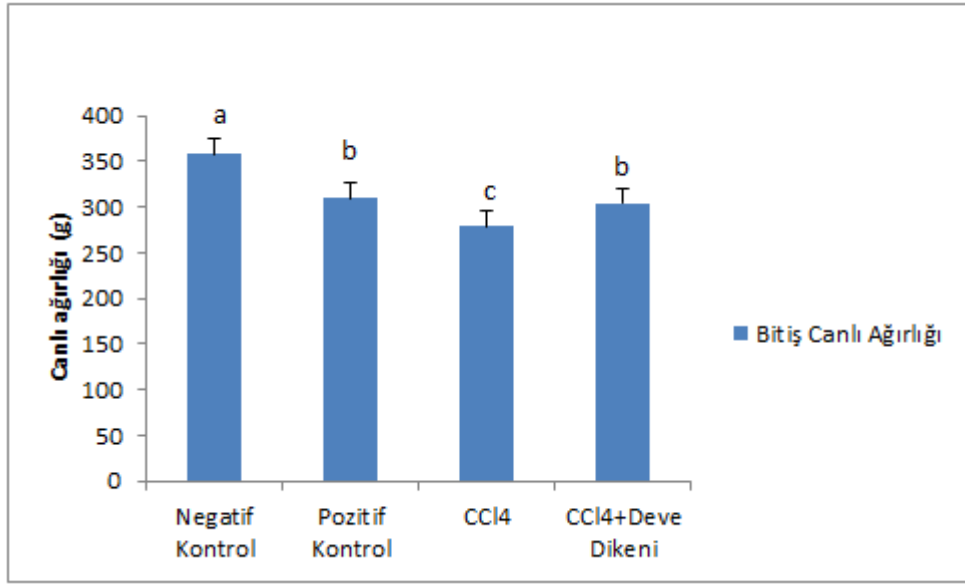
Tablo 3. Gruplarda başlangıç ve bitiş canlı ağırlıkları ve günlük su tüketimi

Gruplar	Başlangıç canlı ağırlığı, g	Bitiş canlı ağırlığı, g	Günlük su tüketimi, ml
Negatif Kontrol	264,85 ± 9,68	357,85 ± 16,26 ^a	307,33 ± 1,52 ^a
Pozitif Kontrol	237,14 ± 14,15	309,28 ± 15,46 ^b	280,35 ± 1,56 ^b
CCl₄	249,57 ± 29,23	279,28 ± 34,60 ^c	184,29 ± 1,53 ^d
CCl₄ + Deve Dikeni	255,42 ± 18,03	304,57 ± 18,84 ^b	233,32 ± 1,52 ^c

a-d: Aynı sütunda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir (p<0.05). One-Way ANOVA *Post Hoc* Tukey Testi

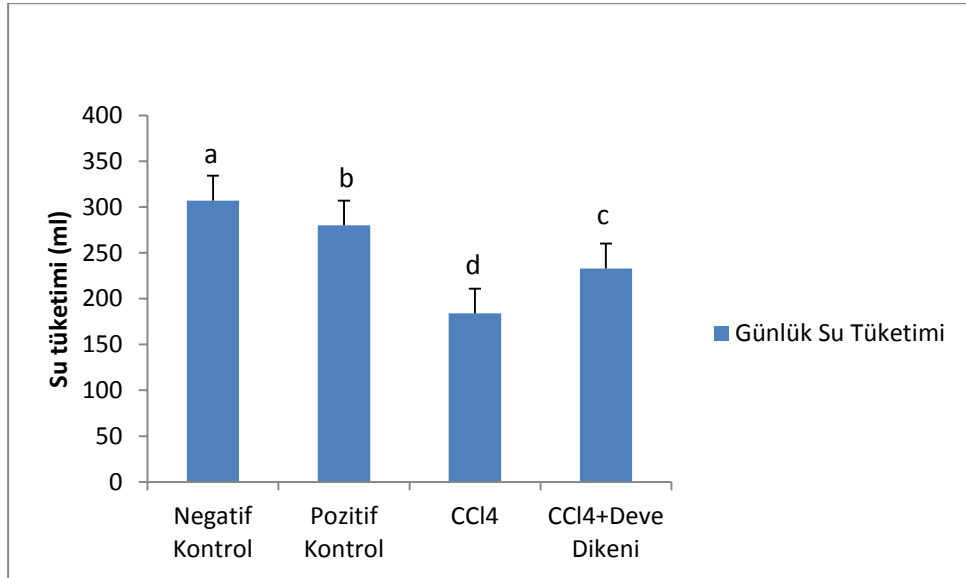


Şekil 8. Deney gruplarımızın bakım odası



Şekil 9. Gruplarda görülen bitiş canlı ağırlık oranları

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



Şekil 10. Gruplara göre günlük su tüketim oranları

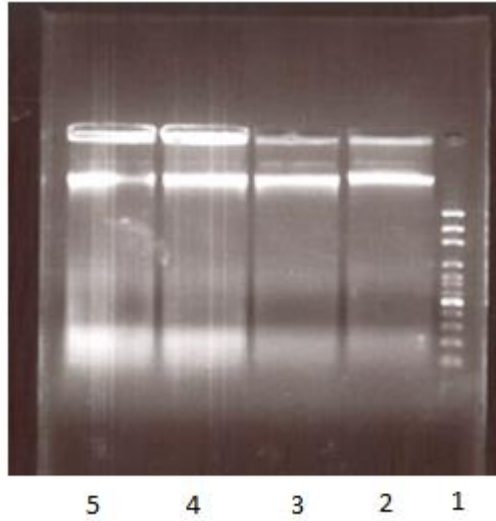
a-d: Aynı sütunda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark anlamlıdır ($p < 0.05$). One-Way ANOVA *Post Hoc* Tukey Testi

Tablo 3'teki istatistiksel değerlere su tüketimi açısından bakıldığında gruplar arasındaki farklar önemlidir ($p < 0.05$). Özellikle CCl₄ uygulanan gruplarda su tüketiminin

kontrol gruplarına göre daha az olması, zamanla meydana gelen hasarın, önemli bir fizyolojik faaliyet olan su tüketimini olumsuz yönde etkileyebildiğini göstermesi açısından önemlidir.

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 ($p<0.05$) ve en düşük ağırlık oranının CCl_4 grubunda olduğu; deve dikenini ekstraktı verilen CCl_4 grubunda ise belirgin bir şekilde ağırlık artışının olduğu görülmektedir.

3.2. DNA Hasarı



Şekil 11. Kontrol grubu ve deney grubu ratlarda hücresel DNA hasarı görüntüsü

Hatlar (sağdan sola): (1) Marker; (2) NK; (3) PK; (4) CCl_4 ; (5) CCl_4 + DD

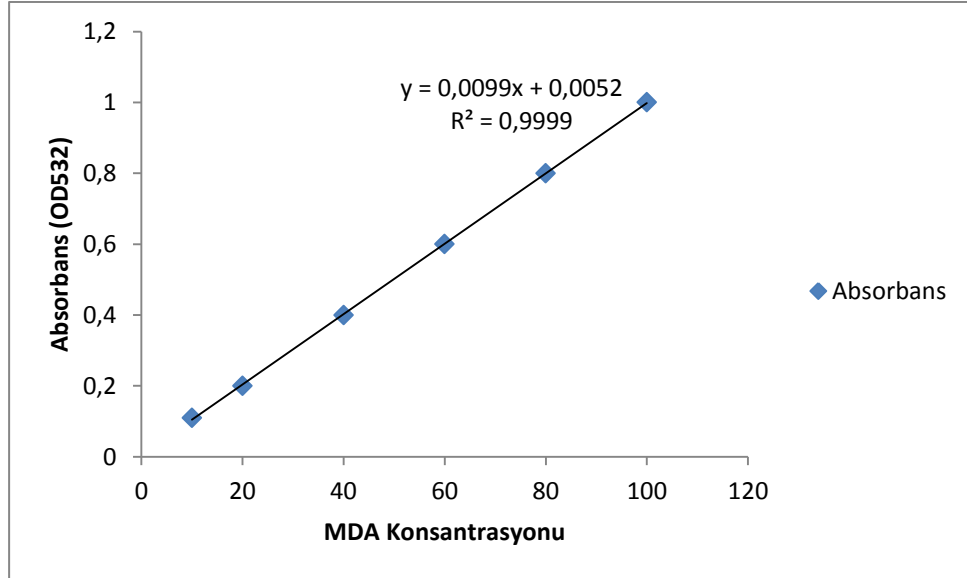
Şekil 11'deki DNA agaroz jel görüntüsüne bakıldığında, karbon tetraklorür grubunda meydana gelen kırılmaların (merdiven görüntüsü) kontrol gruplarına göre daha fazla olduğu anlaşılmaktadır. CCl_4 + DD grubunda ise DNA'daki kırılmalar CCl_4 grubuna göre kısmen daha azdır. Bu sonuçlara göre şu yorum yapılabilir: DD verilen ve karaciğer hasarı olan grupta DNA'daki hasar oranı, DD verilmeyen ve karaciğer hasarı olan gruba göre nispeten daha azdır ve buna bağlı olarak deve dikeninin antioksidan etkisi, karaciğer hasarı bakımından düşünüldüğünde, DNA hasarını azaltabileceği söylenebilir (Üstündağ vd., 2005; Şentürk vd., 2010).

3.3. MDA Ölçüm Sonuçları

Tablo 4. Çalışma gruplarında elde edilen plazma ve karaciğer doku MDA düzeyleri

Gruplar		Negatif Kontrol	Pozitif Kontrol	CCl ₄	CCl ₄ + Deve Dikeni
Plazma MDA					
(nmol/ml)		2,72 ± 0,18 ^c	1,59 ± 0,25 ^d	4,25 ± 0,21 ^a	3,65 ± 0,15 ^b
Karaciğer					
Doku	MDA	4,03 ± 1,57 ^c	4,35 ± 1,55 ^c	14,13 ± 1,58 ^a	8,48 ± 1,57 ^b
(nmol/g)					

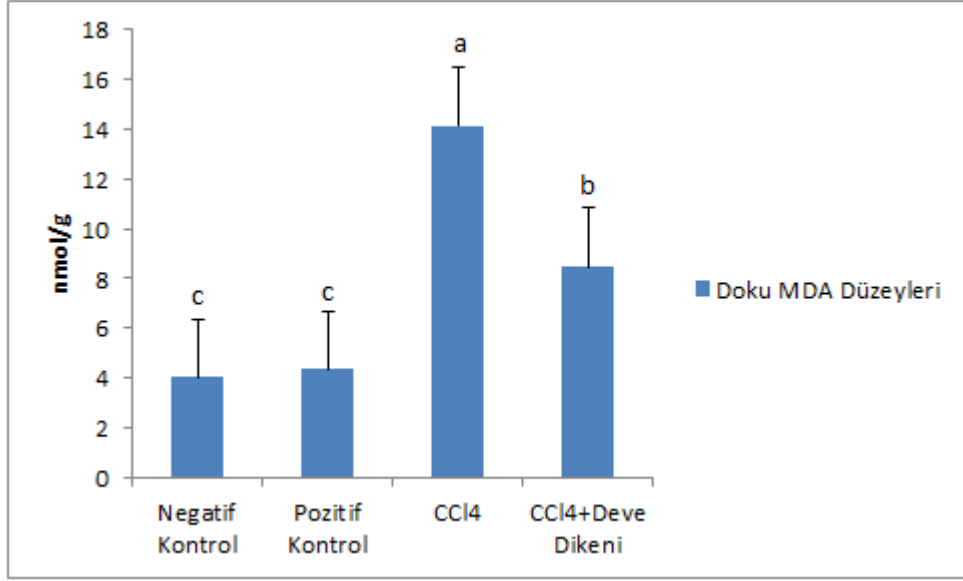
Tablo 4’te görülen değerler, 532 nm dalga boyunda ölçülen MDA değerlerinin, daha önce bahsedilen günlük standart MDA stokları baz alınarak ve gerekli prosedürler uygulanarak hesaplanmış halidir. Hesaplama işlemi $x = (y - 0,0052)/0,0099$ şeklinde yapılmıştır. Buradaki y değeri spektrofotometrede ölçülen MDA değeridir ($y=0,0099x + 0,0052$). Bu verilere göre MDA standart eğrisi oluşturulmuştur.



Şekil 12. MDA Standart Eğrisi

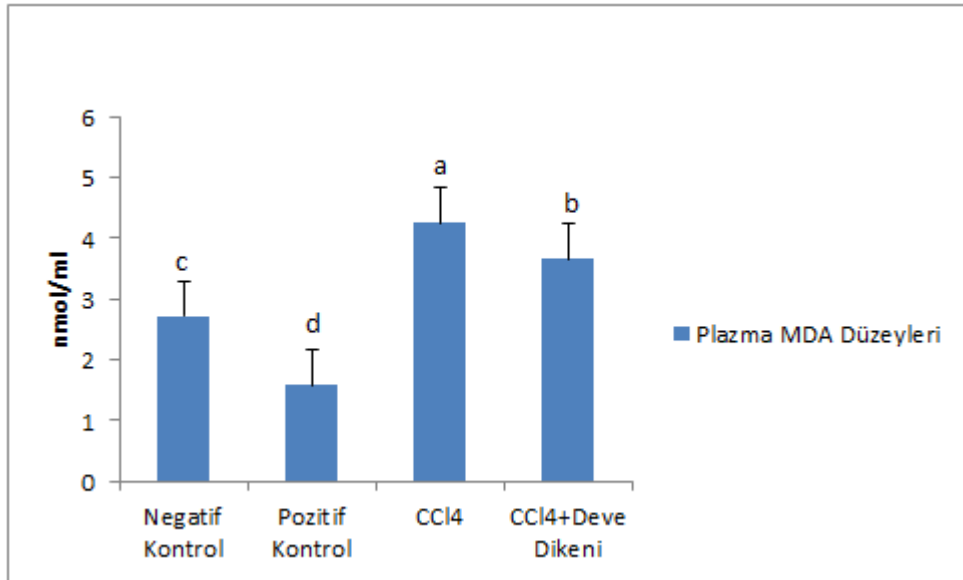
Tablo 4’teki değerler, hem plazmada hem de karaciğer dokusunda, deve dikeni verilen gruplarda MDA düzeyinin düştüğünü ve en yüksek düzeydeki MDA değerlerinin CCl₄ gruplarında olduğunu göstermektedir. Karaciğer dokusunda ve plazmada, CCl₄ muamelesi gören iki grup, kontrol gruplarına göre istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık göstermiştir

($p < 0.05$). Deve dikenini verilen gruplarda ise MDA düzeylerinin daha düşük olduğu görülmektedir.



Şekil 13. Karaciğer dokusunda gruplar arasında MDA düzeylerinin karşılaştırılması

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

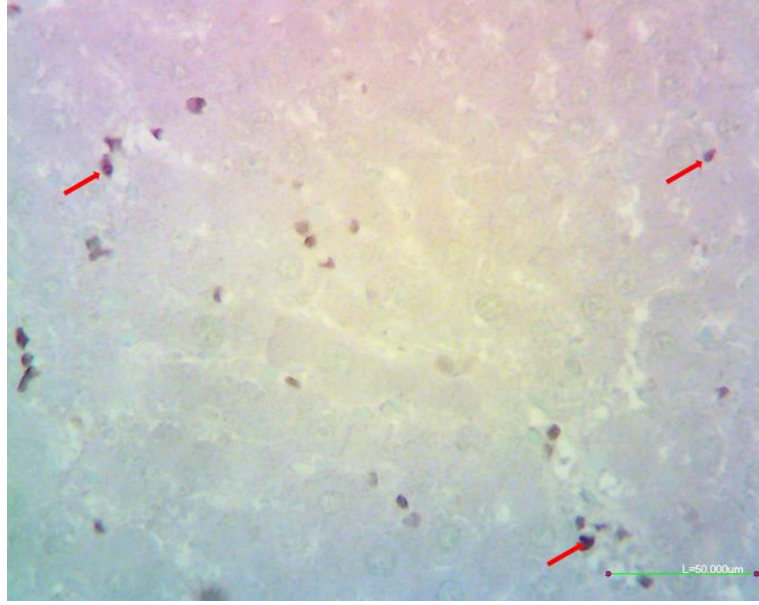


Şekil 14. Plazmada gruplar arasında MDA düzeylerinin karşılaştırılması

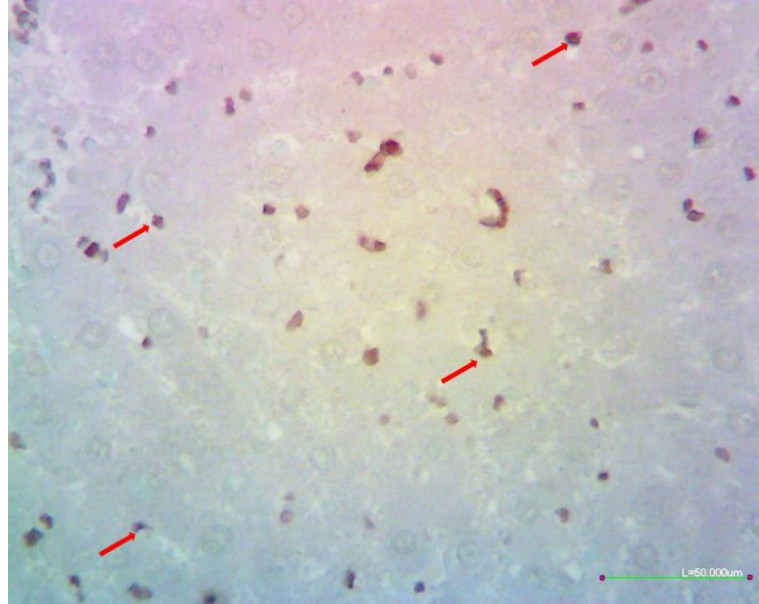
a-d: Aynı sütunda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark anlamlıdır ($p < 0.05$). One-Way ANOVA *Post Hoc* Tukey Testi

3.4. TUNEL Metoduyla Belirlenen Histolojik Sonuçlar

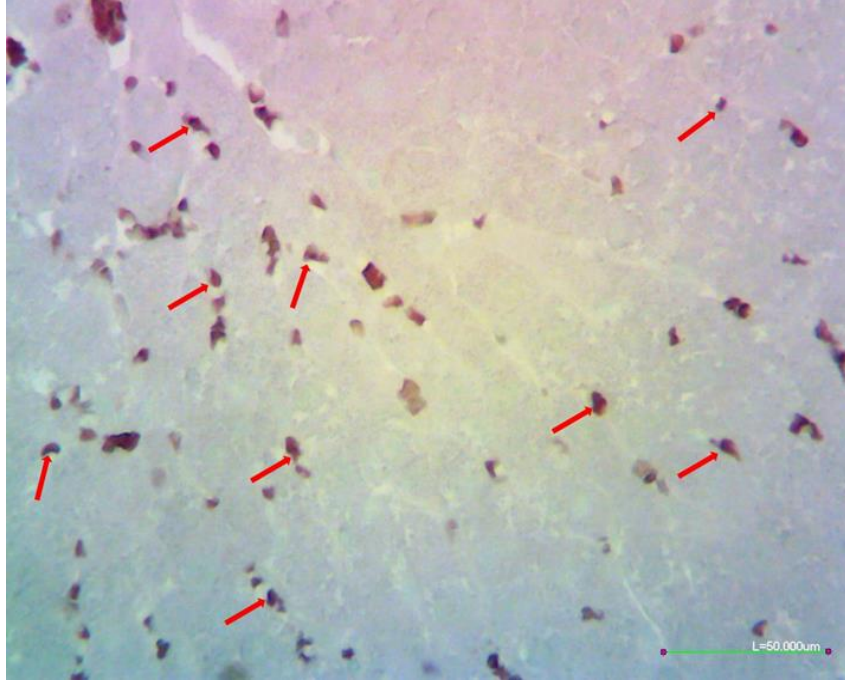
Çalışmanın sonlandırılmasının ardından TUNEL metodu kullanılarak apoptozis düzeyleri belirlenmiştir. Elde edilen görüntülerle, karaciğer dokusunda DNA’da meydana gelen hasar tespit edilmiştir.



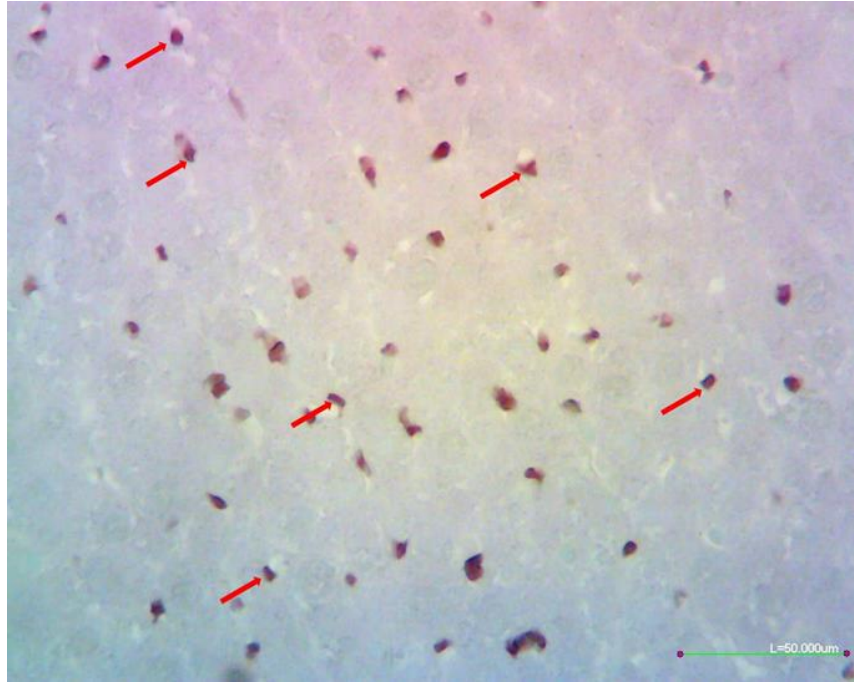
Şekil 15. Negatif Kontrol grubuna ait karaciğer dokusunda TUNEL pozitif hücreler (→). Skala bar: 50µm.



Şekil 16. Pozitif Kontrol grubuna ait karaciğer dokusunda TUNEL pozitif hücreler (→). Skala bar: 50µm.



Şekil 17. CCl₄ grubuna ait karaciğer dokusunda TUNEL pozitif hücreler
(→). Skala bar: 50µm.



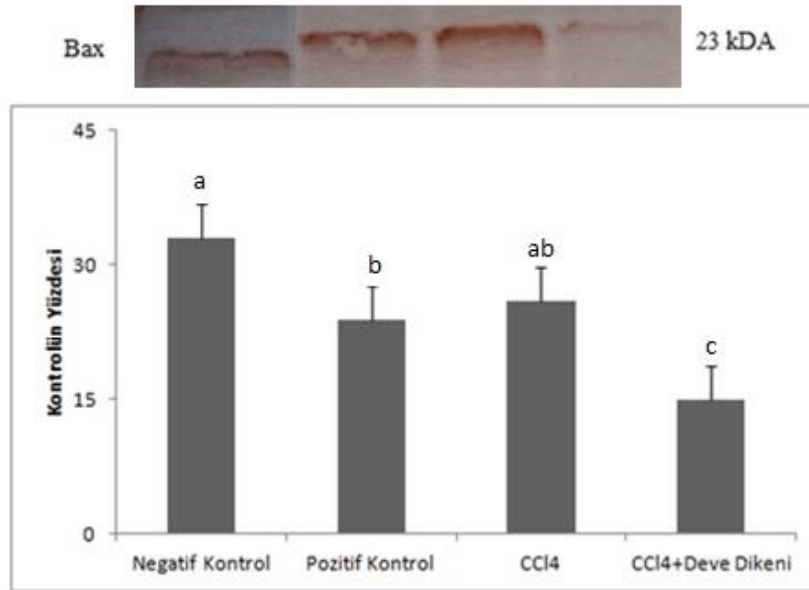
Şekil 18. CCl₄ + Deve Diken grubuna ait karaciğer dokusunda TUNEL pozitif
hücreler
(→). Skala bar: 50µm.

Tablo 5. TUNEL metoduyla belirlenen apoptotik indeks (%)

Gruplar	Apoptotik indeks %
Negatif Kontrol	6
Pozitif Kontrol	7
CCl ₄	23
CCl ₄ +DD	13

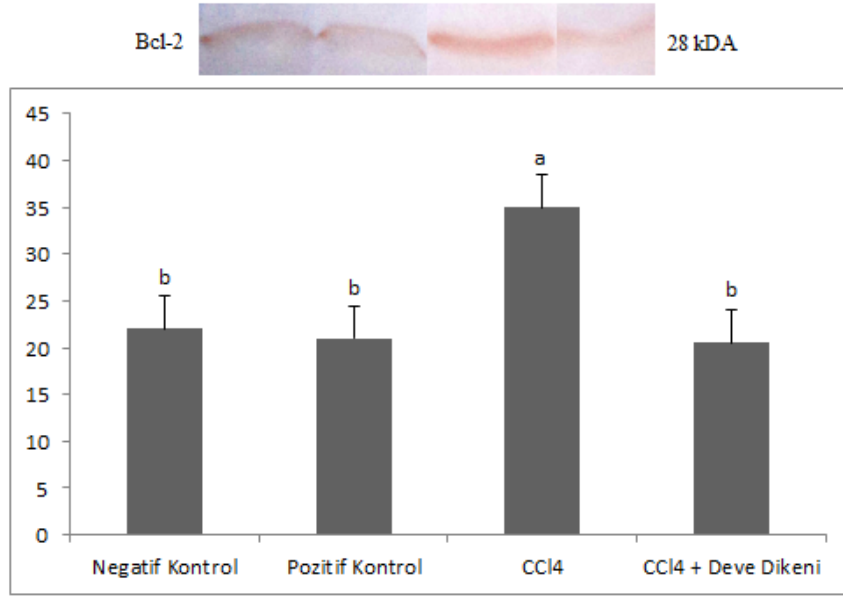
Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; TUNEL pozitifliği karaciğer dokusunda NK (şekil 15) grubu ile karşılaştırıldığında CCl₄ (şekil 17) grubunda anlamlı bir artış gözlemlendi ($p<0.05$). CCl₄ grubu ile kıyaslandığında sadece deve dikenini verilen PK grubunda (şekil 16) ise anlamlı bir değişiklik yoktu. CCl₄+DD (şekil 18) grubunda ise apoptotik indeksin, CCl₄ grubuna göre azalış göstererek normale yaklaştığı görülmektedir.

3.5. Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bax, Bcl-2 Proteinlerinin Ekspresyon Düzeyleri (Apoptotik Markerlar)



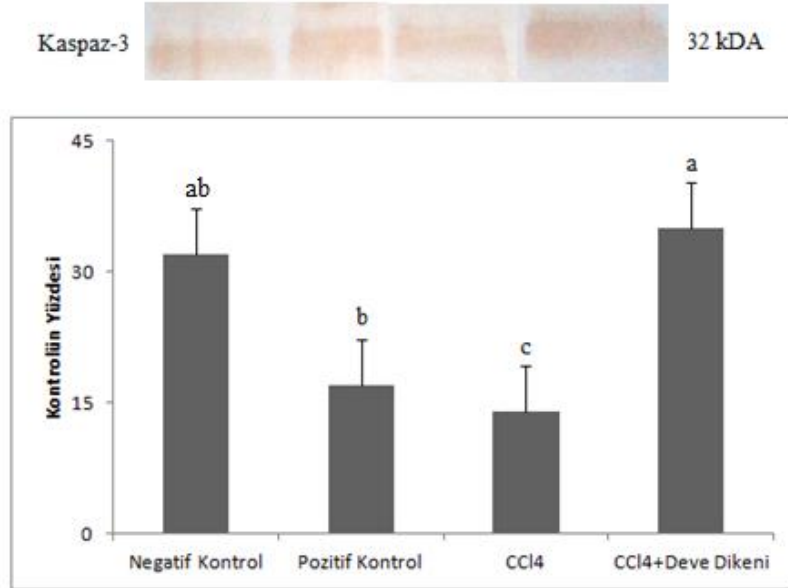
Şekil 19. Gruplara göre bax protein ekspresyon düzeyleri

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



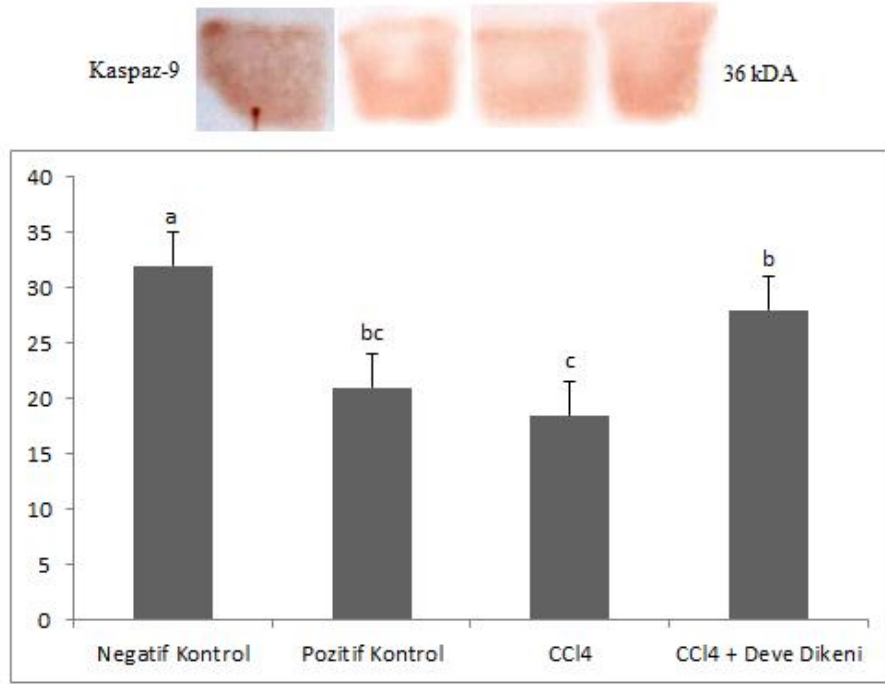
Şekil 20. Gruplara göre bcl-2 protein ekspresyon düzeyleri

a-b: Aynı sütunda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark anlamlıdır ($p < 0.05$). One-Way ANOVA *Post Hoc* Tukey Testi



Şekil 21. Gruplara göre kaspaz-3 protein ekspresyon düzeyleri

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



Şekil 22. Gruplara göre kaspaz-9 protein ekspresyon düzeyleri

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

Bölüm 3.5.'te, hücre ölüm mekanizması aşamalarında yer alan proteinlerin ekspresyon seviyeleri görülmektedir. Şekil 19 incelendiğinde, Bax proteininin ekspresyon düzeyi gruplar arasında istatistiksel açıdan bir fark göstermiştir ($p < 0.05$). En yüksek yüzde negatif kontrol grubunda, en düşük yüzde ise $CCl_4 + DD$ grubunda gözlenmiştir. Şekil 20'de bcl-2 proteininin ekspresyon düzeyi incelendiğinde, kontrol grupları ve $CCl_4 + DD$ grubu arasında istatistiksel olarak farklılık yokken, CCl_4 grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak fark olduğu ($p < 0.05$) görülmektedir. Şekil 21'de, apoptotik bir protein olan kaspaz-3 proteininin ekspresyon düzeyi incelendiğinde, CCl_4 ile $CCl_4 + DD$ grubu arasında istatistiksel açıdan fark olduğu ($p < 0.05$) görülmüştür. En yüksek yüzde $CCl_4 + DD$ grubunda; en düşük yüzde ise CCl_4 grubunda ortaya çıkmıştır. Buna bağlı olarak, deve dikeninin bu proteinlerin sentezini artırıcı yönde etkisi olduğunu söyleyebiliriz. Son olarak şekil 22'de yine bir apoptotik protein olan kaspaz-9 proteininin ekspresyon düzeyi incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak fark olduğu ($p < 0.05$) görülmektedir. Burada da, karbon tetraklorür verilen DD grubunun, CCl_4 grubuna göre yüzdesi daha fazla çıkmıştır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Yapılan birçok çalışmada antioksidan özelliği olduğu bilinen bitkilerin dokulardaki hasarı önlemedeki önemi anlaşılmıştır. Yapılarındaki flavanoidler, flavanolignanlar ve diğer polifenolik bileşiklerle deve dikenini bitkisinin de serbest radikal tutucu işleviyle antioksidan özellik gösterdiği belirtilmiştir. Bu bitkinin özellikle karaciğer üzerindeki iyileştirici etkileriyle ilgili birçok araştırma bulunmaktadır (Şentürk vd., 2010; Aghazadeh vd., 2011).

Al-Rasheed vd. (2014), CCl₄ toksisitesi ile hasara uğratılmış ratlarda deve dikeninin doku harabiyetini önlemede etkili antioksidan bitkilerden biri olduğunu belirtmişlerdir (Al-Rasheed vd., 2014). Aghazadeh vd. (2011) ise yüksek polifenolik içeriği olan *Silybum marianum*'un, serbest radikalleri temizlemesi sayesinde esasen oksidasyonu hızlandırıcı (prooxidant) ürünlere karşı hepatoprotektif etkisinin olduğunu belirtmişlerdir (Aghazadeh vd., 2011).

Sonnenbichler ve ark., böbrek hücreleri üzerinde deve dikeninin antioksidan etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, büyüme oranı, protein sentezi ve LDH aktivitesi gibi parametrelerdeki değişimleri incelemişler ve deve dikeninin toksik maddelere karşı etkin bir antioksidan bitki olduğunu belirtmişlerdir (Sonnenbichler vd., 1999). Bizim bulgularımıza göre, ratlara CCl₄ verilerek oluşturulan karaciğer hasarında, DNA agaroz jel elektroforezi görüntülerimiz incelendiğinde (şekil 11), NK ve PK gruplarında DNA kırıklarının olmadığı görülmüştür. CCl₄ ve CCl₄+DD gruplarında ise DNA hasarı meydana geldiği ve DD verilen hasara uğratılmış grup ile DD verilmeyen hasara uğratılmış grup arasında DNA'da meydana gelen kırıklar açısından bir fark olduğu anlaşılmaktadır. DD verilen hasarlı grupta, DD verilmeyen hasarlı gruba göre DNA kırıklarının daha az seviyede olduğu görülmektedir. Bu farklılık ise deve dikeninde bulunan etken maddelerin, hasarlı hücrelerdeki DNA hasarını nispeten de olsa engelleyebileceğini düşündürmektedir.

Şentürk ve ark., deve dikeninin bazı etken maddelerinin GSH seviyesinde artışa neden olduğunu, SOD aktivitesini artırdığını ve lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini belirtmişlerdir (Şentürk vd., 2010).

Aghazadeh vd. (2011), deve dikenini ekstraktının hepatositleri etanol, serbest yağ asitleri, karbon tetraklorür gibi çeşitli toksinlere karşı koruduğunu belirtmişlerdir (Aghazadeh ve ark., 2011).

Deve dikeninin ilaç olarak kullanımı 1. yüzyıla kadar dayanmaktadır. Romalı doğa bilimci Plinius yüzyıllar önce, bu bitkinin suyunun safrayı akıtmaya yaradığını belirtmiştir. Karaciğer enzimlerini düzenleme, sarılığı önleme gibi birçok karaciğeri koruyucu etkisinin yanında, bazı kanser türlerini önlemede rolünün olduğu da bilinmektedir. Japonya'da bulunan kanser araştırma merkezi Clinical Cancer Research'ta Dr. Zi vd. (1998) tarafından yapılan çalışmada deve dikenini etken maddelerinin meme kanserinde ilerlemeyi durdurduğu tespit edilmiştir. 1996'da European Journal of Cancer adlı merkezde yapılan çalışmada da deve dikeninin yumurtalık ve meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını durdurduğu belirlenmiştir (Zi vd., 1998).

Deney hayvanlarıyla yapılan araştırmalarda, hasar oluşturulan gruplarla diğer gruplar arasındaki farkı anlamak için ilk parametrelerden biri hayvanların ağırlıklarıdır. Zira hasar görmüş hayvanlarda ağırlık kaybı olması muhtemeldir. Bu nedenle çalışmamızda düzenli olarak rat ağırlıkları kaydedilmiştir. Yaptığımız rat ağırlıkları tayinini dikkate alarak, ilk günlük ağırlıklar ile kesimden 24 saat önceki ağırlıklara bakıldığında (Tablo 3), negatif kontrol ve pozitif kontrol grubunda düzenli ve yüksek oranda ağırlık artışı gözlenirken; en az ağırlık artışının ise CCl₄ grubunda olduğu görülmektedir. CCl₄ + DD grubunda ise kontrol gruplarına oranla daha az seviyede bir ağırlık artışı olmakla beraber, CCl₄ grubuna göre ise daha yüksek bir ağırlık artışı olmuştur. Sadece ağırlık artışları göz önünde bulundurularak, deve dikeninin, ksenobiyotik etkisi olan CCl₄'e karşı hayvanlarda koruyucu bir etkisi olduğu ve bu durumun hayvanların beslenmesi dâhil birçok faktör üzerinde etki gösterdiği yorumu yapılabilir.

Çalışmamızda ratlara verilen içme suları düzenli olarak kontrol edilmiştir. Özellikle içme sularına deve dikenini ekstraktı kattığımız PK ve CCl₄+DD gruplarındaki ratların suları ne düzeyde içtikleri sık sık kontrol edilerek kaydedilmiştir. Şekil 10'daki günlük su tüketimi oranları incelendiği zaman, en az su tüketiminin karbon tetraklorür verilen grupta olduğu görülmektedir. Bu durum da, çalışma sırasınca ratların gördükleri hasarın tükettikleri suya da yansıdığını göstermektedir.

Shaker vd (2010)., lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA'nın karaciğer hasarında dikkat çekici serbest radikal rolünü gösterdiğini belirtmişlerdir. Shaker ve ark.'nın yaptığı çalışmada, normal diyetle beslenen ve herhangi başka bir muamele görmeyen ratların plazmasında MDA düzeyinin, CCl₄ ile muamele gören gruba göre oldukça düşük çıktığı görülmüştür. Aynı çalışmanın, enjeksiyon yoluyla deve dikenini etken maddesi ilave edilen 3. grubunun MDA düzeyinin ise 2. gruba göre düşük çıktığı (p<0.05) görülmüştür (Shaker vd., 2010).

Şentürk vd. (2010), rat böbreğinde oluşan oksidatif hasarda deve dikeninin rolünü araştırdıkları çalışmada, iskemi rüperfüzyonu grubunda MDA düzeyinin yüksek olduğunu, 50 mg/kg deve dikenini ekstraktı grubunda bu oranın düştüğünü, 100 mg/kg deve dikenini ekstraktı grubunda ise MDA düzeyinin yüksek olduğunu görmüşler ve belirli oranda deve dikeninin MDA seviyesini düşürdüğünü ancak yüksek doz uygulamanın olumsuz etkisinin olabileceğini belirtmişlerdir (Şentürk vd., 2010).

Aghazadeh vd. (2011)'nin çalışmasında, metiyonin ve kolin bakımından eksik beslenen ratların plazma MDA düzeyi, normal diyetle beslenen kontrol grubuna göre oldukça yüksek çıkmıştır. Aynı grup, bu diyetle ek olarak deve dikenini takviyesi yapılan grupla kıyaslandığı zaman ise, diyetlerine deve dikenini eklenen grupta plazma MDA düzeyinin istatistiksel olarak daha düşük çıktığı görülmüştür (p<0.05).

Al-Rasheed vd. (2014), deve dikeninin kalp dahil birçok dokuda koruyucu rolü olduğunu, MDA düzeyi, protein ekspresyon oranları ve birçok fizyolojik mekanizmayı etkilediğini belirtmişlerdir.

Bizim bulgularımızda, karaciğer dokusundaki MDA düzeyi gruplar bazında değerlendirildiğinde (Tablo 4), kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Fakat CCl₄ ve CCl₄+DD gruplarının negatif kontrol grubuna göre istatistiksel olarak farklı (p<0.05) olduğu ve en yüksek MDA düzeyinin CCl₄ grubunda olduğu görülmüştür. CCl₄+DD grubunun MDA düzeyi kontrol gruplarına göre yüksek olmakla beraber, CCl₄ grubuna göre daha düşük seviyede olması, deve dikeninin karaciğer dokusunda lipid peroksidasyonuna bağlı olarak oluşan MDA seviyesini düşürmede etkili bir antioksidan olduğunu düşündürmektedir.

Bulgularımızdaki plazma MDA seviyeleri karşılaştırıldığında ise (Tablo 4), gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık görülmektedir (p<0.05). Tablo 4'e

bakıldığında, en yüksek MDA düzeyi CCl₄ grubunda ortaya çıkmıştır. CCl₄+DD grubunun MDA düzeyi ise CCl₄ grubuna göre daha düşük çıkmıştır ve istatistiksel açıdan farklılık vardır. Burada, sadece deve dikenini muamelesi gören PK grubunun MDA seviyesinin en düşük çıkması da dikkat çekicidir. Sonuç olarak, deve dikeninin karaciğer dokusunda ve plazmada, MDA düzeyini düşürüp hasarı azaltmada etkin bir role sahip olduğunu söyleyebiliriz.

Zhou vd. (2006), ratlarda deve dikenini etken maddelerinin DNA hasarı ve hücre döngüsü düzenlemesi üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, hasara uğratılmış gruplarda TUNEL pozitif hücrelerin sayısının, deve dikenini verilen gruplara oranla daha yüksek çıktığını belirtmişlerdir. Aynı zamanda DNA agaroz jel elektroforezi görüntüleriyle de deve dikeninin DNA hasarını azaltmada etkili bir bitki olduğunu ifade etmişlerdir.

Yu vd. (2014), CCl₄'e bağlı oluşan karaciğer hasarında *Dioscorea nipponica* bitkisinin etkilerini araştırmışlar ve karaciğer hasarını belirlemede TUNEL metodunu kullanmışlardır. CCl₄ verilen model grubundaki apoptotik indeksin, diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek çıktığı görülmüştür ($p<0.05$).

Zhao vd. (2012)'nin, asetoaminofenin karaciğer üzerindeki olumsuz etkilerini araştırdıkları çalışmalarında TUNEL metodu sonuçlarına bakıldığı zaman, bu maddeyle yüksek oranda hasara uğramış olan gruplarda apoptotik indeks oranı diğer gruplara kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı şekilde yüksek çıkmıştır ($p<0.05$).

Singh ve Agarwal (2005), deri kanserini klinik öncesi dönemde inceledikleri çalışmada, deve dikenini etken maddelerinden olan silibinini denemişlerdir. Yaptıkları TUNEL metodu sonuçlarında, hastalığın erken dönemlerinde kullanılan deve dikeninin, antikanser ajanı olarak ifade ettikleri silibinin maddesi sayesinde kanseri önleyebileceğini ifade etmişlerdir.

Bizim çalışmamızdaki TUNEL metodu sonuçları incelendiği zaman ise NK ve PK grupları arasında istatistiksel olarak fark oluşmadığı gözlenmektedir. Ancak CCl₄ grubunda NK grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artma gözlenmiştir ($p<0.05$), CCl₄+DD grubunda ise CCl₄ grubuna göre anlamlı bir şekilde azalış gözlenmiştir ($p<0.05$). TUNEL metoduyla apoptozis oranının ifade edildiği bu sonuçları değerlendirdiğimizde, karbon tetraklorürün karaciğerde DNA seviyesinde ciddi düzeyde hasar meydana getiren bir kimyasal olduğunu, CCl₄ ile birlikte deve dikenini verdiğimiz grupta ise buna bağlı

olarak meydana gelmiş olan karaciğer hasarına karşı deve dikeninin apoptotik indeksi azaltarak karaciğeri mevcut hasara karşı koruduğunu söyleyebiliriz.

Lu vd. (2012)'nin yaptığı çalışmada bax protein ekspresyon düzeyi, CCl₄ uygulanan grupta, kontrol grubu, deve diken grubu ve dioscin grubuna göre istatistiksel açıdan fark olacak şekilde yüksek çıkmıştır ($p<0.05$). Lee vd. (2014) yaptığı çalışmada ise sadece CCl₄ muamelesi gören grupta bax protein ekspresyon düzeyi en yüksek çıkmış, bunu hem CCl₄ hem de 50 mg/kg diallil disülfid verilen grup izlemiştir. Hem CCl₄ hem de 100 mg/kg diallil disülfid verilen grupta ise bax protein ekspresyon seviyesi daha düşük çıkmış ve sadece CCl₄ verilen grupla arasında istatistiksel olarak fark gözlenmiştir ($p<0.05$). Bizim çalışmamızda ise, CCl₄ grubunda bax protein ekspresyon düzeyi, PK ve CCl₄+DD gruplarına göre istatistiksel açıdan fark oluşacak şekilde yüksek çıkmış, NK grubuna göre ise düşük çıkmıştır ($p<0.05$). Proapoptotik bir protein olan bax proteini, daha önce de bahsedildiği gibi apoptozisin gerçekleşmesinde rol oynar ve çalışmamızda elde ettiğimiz sonuç, hasara uğratılan grupta apoptozis oranının daha fazla olduğunu göstermesi açısından önemlidir.

Zhao vd. (2012), normal dozlarda hasar oluşturmayan; ancak aşırı dozlarda kullanımı ağır karaciğer zararıyla sonuçlanabilen asetoaminofenin etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, normal ve düşük dozlardaki asetoaminofen uygulanan gruplardaki bcl-2 protein ekspresyon düzeylerinin, aşırı doz asetoaminofen uygulanan gruba oranla daha düşük çıktığını belirtmişlerdir ($p<0.05$). Çalışmalarında en yüksek bcl-2 protein ekspresyon düzeyi, aşırı doz asetoaminofen verilen grupta görülmüştür.

Lu vd. (2012)'nin çalışmasında bcl-2 protein ekspresyon düzeyi, dioscin grubu, deve diken grubuna göre istatistiksel olarak yüksek çıkmıştır ($p<0.05$). Bizim bulgularımıza göre ise bcl-2 protein ekspresyon düzeyine bakıldığında, kontrol grupları ve CCl₄+DD grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yokken, CCl₄ grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak fark olduğu ($p<0.05$) görülmektedir. CCl₄ grubunda bcl-2 ekspresyon düzeyi CCl₄+DD grubuna göre daha yüksek çıkmıştır. Bcl-2 protein ailesi, pro-apoptotik veya anti-apoptotik yapıda olabilmektedir. Çalışma sonuçlarımız göz önünde bulundurulduğunda, karaciğer hasarı oluşturulmuş ratlarda bcl-2 protein ekspresyon düzeyinin deve diken verilen gruba göre yüksek çıkmasını, bu antioksidan bitki içeriğinin bcl-2 proteinin oranını düşürmesiyle açıklayabiliriz. Hem CCl₄ gruplarında apoptozis

oranının yüksek çıkması hem de bax ve bcl-2 protein ekspresyon düzeylerinin bu gruplarda yüksek çıkmasını ise, bax ve bcl-2 proteinlerini kodlayan genlerin CCl₄ gruplarında aktif olmasıyla açıklayabiliriz.

Lu vd. (2012), CCl₄ uygulaması yapılan gruplarda yüksek; deve diken grubunda daha düşük çıkmasına bağlı olarak, deve dikeninin bax ve bcl-2 proteinlerinin oranını düşürdüğünü belirtmişlerdir.

Kabak ve Gülbahar (2013)'ın çalışmasında, 14 gün boyunca (75mg/kg) CuSO₄ verilen grupta kaspaz-3 aktivitesi, kontrol grubu ve 28 gün boyunca (75mg/kg) CuSO₄ verilen gruba göre istatistiksel açıdan fazla çıkmıştır (p<0.05). Kabak ve Gülbahar, 14 gün CuSO₄ verilen grubun karaciğer dokularında daha fazla apoptozis olduğunu belirtmişlerdir. Lu vd. (2012)'ne göre, CCl₄ uygulanan grupta kaspaz-3 aktivitesi, kontrol grubu, deve diken grubu ve dioscin grubuna göre beklenenden yüksek çıkmıştır (p<0.05). Lee vd. (2014)'nin çalışmasında kaspaz-3 aktivitesi, sadece CCl₄ verilen grupta, kontrol grubu, CCl₄+50 mg/kg diallil sülfat ve CCl₄+100 mg/kg diallil sülfat gruplarına göre istatistiksel olarak farklı şekilde yüksek çıkmıştır (p<0.05).

Zhou vd. (2006), ratlarda deve diken uygulamasının kaspaz-3 protein ekspresyon düzeyine etkisini araştırmışlardır. Çalışma sonuçlarına göre, fazla oranda deve diken ekstraktı verdikleri grupta kaspaz-3 proteini fazla sentezlenmiştir. Ancak daha düşük dozlarda deve diken verilen gruplarda ise sentez oranının düştüğünü belirtmişlerdir. Bizim bulgularımıza göre, CCl₄ grubunda kaspaz-3 aktivitesi, diğer gruplara oranla istatistiksel açıdan düşük çıkmıştır (p<0.05). En yüksek kaspaz-3 protein ekspresyon oranının ise CCl₄+DD grubunda olduğu görülmektedir.

Kromatin yoğunlaşması, DNA'nın parçalanması ve membran proteinlerin yıkılması gibi görevlerinden dolayı kaspaz-3'ü cellat kaspazlar olarak adlandıran Taş vd. (2012), yaptıkları çalışmada sıçan profrenal korteksinde tolüenin yol açtığı apoptozise karşı melatoninin koruyucu etkisi olup olmadığını incelemişlerdir. Tolüenin en çok beyin dokusunda apoptotik nörodejenerasyona yol açtığını belirtmişler; fakat karaciğer, akciğer, testis gibi dokuların da etkilendiğini ve TUNEL metodu incelemelerinde, tolüenin kaspaz-3 aktivitesinde artışa yol açtığını ifade etmişlerdir. Bizim çalışmamızda, CCl₄+DD grubunda kaspaz-3 miktarı oldukça yüksek oranda sentezlenmiştir. Fakat sadece CCl₄ verdiğimiz grupta ise kaspaz-3 oranının daha az olduğu görülmüştür.

Kabak ve Gülbahar (2013)'ın çalışmasına göre, 14 gün boyunca (75mg/kg) CuSO₄ verilen gruptaki kaspaz-9 aktivitesi, kontrol grubu ve 28 gün boyunca (75mg/kg) CuSO₄ verilen gruba göre istatistiksel açıdan farklı çıkmıştır (p<0.05). En fazla ekspresyon oranı 14 günlük uygulama yapılan I. deneme grubunda görülmüştür. Yu vd. (2014)'nin, karaciğerde CCl₄'e bağlı oluşan karaciğer hasarında *Dioscorea nipponica*'nın etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, sadece CCl₄ verilen grubun kaspaz-9 protein ekspresyon oranı, kontrol grubu ve hem CCl₄ hem de farklı dozlarda (100, 200, 300 mg/kg) bitki ekstraktı verilen gruplara oranla istatistiksel olarak fazla çıkmıştır (p<0.05). Kauntz vd. (2011), deve dikeninin kolon adenokarsinom hücreleri üzerindeki apoptotik sinyaller ile ilişkilerini incelemişler ve deve dikenini etken maddelerinin kaspaz-9 aktivasyonu üzerinde etki gösterdiğini, onu aktifleştirdiğini belirtmişlerdir.

Bizim bulgularımıza göre, kaspaz-9 protein ekspresyon düzeyleri PK ve CCl₄ gruplarında, CCl₄+DD grubuna göre nispeten düşük çıkmıştır. CCl₄ grubundaki oran, NK grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak farkın olduğu gözlenmektedir (p<0.05). CCl₄+DD grubunda daha fazla kaspaz-9 protein sentezi söz konusu olmuştur. Kaspaz-9 proteini de kaspaz-3 gibi yıkım olayında ve apoptozisin gerçekleşmesinde etkindir. Çalışmamızda kaspaz-9 proteininin CCl₄+DD grubunda daha fazla sentezlendiğini görmekteyiz. Kaspaz-3 ve kaspaz-9 proteinlerinin sentez oranının CCl₄+DD gruplarında, sadece CCl₄ verilen gruplara göre fazla çıktığı görülmektedir. Bu durum TUNEL metodu sonuçlarıyla birlikte değerlendirildiğinde, CCl₄ grubunda apoptozis oranının yüksek, kaspaz-3 ve kaspaz-9 protein ekspresyon oranlarının bu gruplarda düşük olmasını, CCl₄'ün bu iki proteini kodlayan genleri baskıladığı yorumunu yapabiliriz.

5. ÖNERİLER

Analiz verilerimize göre, deve dikenini ekstraktındaki etken maddeler, bilhassa karaciğer hasarı sürecinde, dokulardaki hasar oranını azaltabilmekte, lipid peroksidasyon düzeyini düşürebilmekte ve yine DNA hasarını da azaltabilmektedir (Şentürk vd., 2010; Yu vd., 2014). Apoptozisten sorumlu proteinlerin sentezini indükleyerek bu sürecin başlamasına yol açmakta ve böylece karaciğer dokusunda hasarlı hücrelerin apoptoze uğrayarak yok olmalarında rol oynamaktadır (Kuwahata vd., 2012). Çalışmamızda kullandığımız apoptotik markerların ekspresyon düzeyleri incelendiğinde, deve dikeninin apoptozis üzerindeki etkileri açık bir şekilde görülmektedir. Aynı şekilde, apoptozis düzeyini belirlemek amacıyla yaptığımız TUNEL metodu çalışmasının sonuçlarını incelediğimiz zaman, CCl₄, deve dikenini ve apoptozis arasındaki ilişkiyi daha iyi anlamamız mümkün olmaktadır.

Elde ettiğimiz bu bilgiler ışığında, güçlü bir antioksidan bitki olan deve dikeninin karaciğer üzerinde koruyucu etkileri olduğunu ve karaciğer hasarına karşı kullanılabileceğini söyleyebiliriz. Aynı zamanda, yapılan literatür araştırmasıyla beraber sonuçlarımız karşılaştırıldığında, deve dikeninin sadece karaciğer üzerinde değil, böbrek, beyin, kalp gibi birçok organda ve birçok kanser türünde çalışıldığı ve bunlar üzerinde ciddi düzeyde koruyucu etkilerinin olduğu anlaşılmıştır. Çalışmamızın sonucunda, ratlar üzerinde denenen deve dikenini bitkisinin göstermiş olduğu karaciğer koruyucu etkilerin, insanlar üzerinde de benzer etkiler gösterebileceğini ve bunun karaciğer hastalıklarını önlemede gelecekte bir umut olabileceğini düşünmekteyiz.

6. KAYNAKLAR

- Abedin, M.J., Wang, D., McDonell, M.A., Lehmann, U., Kelakar, A.,** 2007. Autophagy Delays Apoptotic Death in Breast Cancer Cells Following DNA Damage, *Cell and Differentiation*, **14**, 500-510.
- Aghazadeh, S., Amini, R., Yazdanparast, R., Ghaffari, S.H.,** 2011. Anti-apoptotic and Anti-inflammatory Effects of *Silybum marianum* in Treatment of Experimental Steatohepatitis, *Experimental and Toxicologic Pathology*, **63**, 569-574.
- Aktümsek, A.,** 2007. İnsan Fizyolojisi, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara.
- Aksoy, F.,** 1977. Karaciğerin Histolojisi, *Türk Patoloji Dergisi*, **3**, 153-155.
- Al-Dbass, A.M., Al-Daihan, S.K., 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.
- Al-Rasheed, N.M., Faddah, L.M., Mohamed, A.M., Mohammad, R.A., Al-Amin, M.,** 2014. Potential Impact of Silymarin in Combination with Chlorogenic Acid and/or Melatonin in Combating Cardiomyopathy Induced by Carbon Tetrachloride, *Saudi Journal of Biological Science*, **21 (3)**, 265-274.
- Altunkaynak, B.Z. ve Özbek, E.,** 2008. Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir?, *Tıp Araştırmaları Dergisi*, **6**, 93-104.
- Antmen, Ş.E.,** 2005. Beta Talasemide Oksidatif Stres, *Yüksek Lisans Tezi*, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- 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.
- Bahçecioğlu, İ.H., Koca, S.S., Poyrazoğlu, O.K., Yalnız, M., Özercan, İ.H., Üstündağ, B., Şahin, K., Dağlı, A.F., Işık, A.,** 2008. Hepatoprotective Effect of Infliximab, and Anti-TNF- α Agent, on Carbon Tetrachloride-Induced Hepatic Fibrosis, *Inflammation*, **31**, 215-221.

- Baydaş, G., Reiter, R.J., Akbulut, M., Tuzcu, M., Tamer, S., 2005.** Melatonin Inhibits Neural Apoptosis Induced by Homocysteine in Hippocampus of Rats Via Inhibition of Cytochrome C Translocation and Caspase-3 Activation and by Regulating Pro- and Anti-Apoptotic Protein Levels, *Neuroscience*, **135**, 879-886.
- Benzer, F. ve Ozan, S., 2003.** *Fasciola hepatica* ile Enfekte Koyunlarda Lipid Peroksidasyonu, Antioksidant Enzimler ve Nitrik Oksit Düzeyleri, *Turkish Journal Veterinary and Animal Science*, **27**, 657-661.
- Campbell, N.A. ve Reece, J.B., 2006.** Biyoloji, Palme Yayıncılık, Ankara.
- Cohen, J.J., Duke, R.C., Fadok, V.A., Sellins, K.S., 1992.** Apoptosis and Programmed Cell Death in Immunity, *Annual Review of Immunology*, **10**, 267-293.
- Erdoğan, E., Kaya, A., Rağbetli, M.Ç., Özbek, H., Cengiz, N., 2004.** Anason (*Pimpinella anisum*) Ekstresinin Deneysel Akut Karaciğer Hasarında Karaciğer Koruyucu Etkisi Var mı?, *Van Tıp Dergisi*, **11**, 69-74.
- Feng, Y., Wang, N., Ye, X., Li, H., Feng, Y., Cheung, F., Nagamatsu, T., 2011.** Hepatoprotective Effect and its Possible Mechanism of *Coptidis rizoma* Aqueous Extract on Carbon Tetrachloride-Induced Chronic Liver Hepatotoxicity in Rats, *Journal of Ethnopharmacology*, **138**, 683-690.
- Gerçek, Z., 2012.** Kimyanın Yeşil Rengi: Yeşil Kimya, *Yükseköğretim ve Bilim Dergisi*, **2**, 50-53.
- Jeon, T., Hwang, S.G., Park, N.G., Jung, Y.R., Shin, S.I., Choi, S.D., Park, D.K., 2003.** Antioxidative Effects of Chitosan on Chronic Carbon Tetrachloride Induced Hepatic Injury in Rats , *Toxicology*, **187**, 67-73.
- Junqueira, L.C., Carneiro, J., Kelley, R.O., 2002.** Temel Histoloji, Barış Kitapçılık, İstanbul.
- Kabak, Y.B., Gülbahar, M.Y., 2013.** Sıçanlarda Deneysel Bakır Zehirlenmesinde Karaciğer ve Böbrek Dokularında Apoptozisin Belirlenmesi, *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **60**, 39-45.

- Karaduman, A.,** 2007. Deneysel Karaciğer Sirozu Oluşturulan Sıçanlarda Karvakrolün Etkisi, *Yüksek Lisans Tezi*, Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Gaziantep.
- Karkanis, A., Bilalis, D., Efthimiadou, A.,** 2001. Cultivation of Milk Thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn), a Medicinal Weed, *Industrial Crops and Products*, **34**, 825-830.
- Kauntz, H., Bousserouel, S., Gosse, F., Raul, F.,** 2011. Silibinin Triggers Apoptotic Signaling Pathways and Autophagic Survival Response in Human Colon Adenocarcinoma Cells and Their Derived Metastatic Cells, *Apoptosis*, **16 (10)**, 1042-1053.
- Korsmeyer, S.J.,** 1999. BCL-2 Gene Family and The Regulation of Programmed Cell Death, *Cancer Research*, **59**, 1693-1700.
- Kuwahata, M., Kubota, H., Kanouchi, H., Ito, S., Ogawa, A., Kobayashi, Y., Kido, Y.,** 2012. Supplementation with Branched-Chain Amino Acids Attenuates Hepatic Apoptosis in Rats with Chronic Liver Disease, *Nutrition Research*, **32**, 522-529.
- Laemmli, U.K.,** 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685.
- Lee, I., Kim, S., Baek, H., Moon, C., Kang, S., Kim, S.H., Kim, Y., Shin, I., Kim, J.,** 2014. The Involvement of Nrf2 In The Protective Effects of Diallyl Disulfide on Carbon Tetrachloride-Induced Hepatic Oxidative Damage and Inflammatory Response in Rats, *Food and Chemical Toxicology*, **63**, 174-185.
- Lin, H., Tseng, H., Wang, C., Lin, J., Lo, C., Chou, F.,** 2008. Hepatoprotective Effects of *Solanum nigrum* Linn Extract against CCl₄-Induced Oxidative Damage in Rats, *Chemico-Biological Interactions*, **171**, 283-293.
- Lu, B., Xu, Y., Cong, X., Yin, L., Li, H., Peng, J.,** 2012. Mechanism Investigation of Dioscin Against CCl₄-Induced Acute Liver Damage in Mice, *Environmental Toxicology And Pharmacology*, **34**, 127-135.
- Lüleyap, H.Ü.,** 2008. Moleküler Genetiğin Esasları, Nobel Kitabevi, Ankara.
- McLaughlin, D., Stamford, J., White, D.,** 2007. Human Physiology, Taylor&Francis Group, New York.

- Millau, J.F., Mai, S., Bastien, N., Drouin, R.,** 2010. p53 Functions and Cell Lines: Have We Learned the Lessons from the Past?, *Bioessays*, **32**, 392-400.
- Mousavia, S.H., Afshari, J.T., Brook, A., Anarkooli, I.J.,** 2009. Role of Caspases and Bax Protein in Saffron-Induced Apoptosis in MCF-7 Cells, *Food and Chemical Toxicology*, **47**, 1909-1913.
- Nakahira, K., Takakashi, T., Shimizu, H., Maeshima, K., Uehara, K., Nakatsuka, H., Yokoyama, M., Akagi, R., Morita, K.,** 2003. Protective Role of Oxygenase-1 Induction in Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity, *Biochemical Pharmacology*, **66**, 1091-1105.
- Nebert, D.W. ve Russell, D.W.,** 2002. Clinical Importance of The Cytochromes P450, *The Lancet*, **360**, 1155-1162.
- Nehls, O., Okech, T., Hsieh, C.J., Enzinger, T., Sarbia, M., Borchard, F., Gruenagel, H.H., Gaco, V., Hass, H.G., Arkenau, H.T., Hartmann, J.T., Porschen, R., Gregor, M., Klump, B.,** 2007. Studies on p53, Bax, and Bcl-2 Protein Expression and Microsatellite Instability in Stage III (UICC) Colon Cancer Treated by Adjuvant Chemotherapy: Major Prognostic Impact of Proapoptotic Bax, *British Journal of Cancer*, **96**, 1409-1418.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K.,** 1979. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction, *Analyses of Biochemichal*, **95**, 351-358.
- Onori, P., Morini, S., Franchitto, A.,** 2000. Hepatic Microvascular Features in Experimental Cirrhosis: A Structural And Morphometrical Study in CCl₄-Treated Rats, *Journal of Hepatology*, **33**, 555-563.
- 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.
- Ranawat, L., Bhatt, J., 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.
- Sawada, M., Nakashima, S., Banno, Y., Yamakawa, H., Hayashi, K., Takenakal, K., Nishimura, Y., Sakai, N., 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.

Shaker, E., Mahmoud, H., Mnaa, S., 2010. Silymarin, the Antioxidant Component, and *Silybum marianum* Extracts Prevent Liver Damage, *Food and Chemical Toxicology*, **48**, 803-806.

Sheweita, S.A., El-Gabar, M.A., Bastawy, M., 2001. Carbon Tetrachloride Changes the Activity of Cytochrome P450 System in the Liver of Male Rats: Role of Antioxidants, *Toxicology*, **169**, 83-92.

Shyu, M., Kao, T., Yen, G., 2008. Hsian-tsao (*Mesona procumbens* Heml.) Prevents Against Rat Liver Fibrosis Induced by CCl₄ Via Inhibition of Hepatic Stellate Cells Activation, *Food and Chemical Toxicology*, **46**, 3707-3713.

Singhal, K.G., Gupta, G.D., 2012. Hepatoprotective and Antioxidant Activity of Methanolic Extract of Flowers of *Nerium oleander* Against CCl₄-Induced Liver Injury in Rats, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, **(2012)**, 677-685.

Singh, R.P. ve Agarwal, R., 2005. Mechanisms and Preclinical Efficacy of Silibinin in Preventing Skin Cancer, *European Journal of Cancer*, **41**, 1969-1979.

Sonnenbichler, J., Scalera, F., Sonnenbichler, I., Weyhenmeyer, R., 1999. Stimulatory Effects of Silibinin and Silicristin from the Milk Thistle *Silybum marianum* on Kidney Cells, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **290**, 1375-1383.

Stehbens, E.W., 2003. Oxidative Stress, Toxic Hepatitis, and Antioxidant with Particular Emphasis on Zinc, *Experimental and Molecular Pathology*, **75**, 265-276.

Şentürk, H., Kolankaya, D., Şahin, Y., 2010. Renal İskemi-Rüperfüzyonu Sırasında Sıçan Böbreğinde Oluşan Oksidatif Stres Hasarına Silimarin Etkisi, *Çankaya University Journal of Science and Engineering*, **1**, 59-74.

Tanrıverdi, G., 2005. Karbon Tetraklorür (CCl₄) ile Oluşturulmuş Karaciğer Hasarında Değişik Dozlardaki Nikotinamidin Protektif Etkisinin Işık ve Elektron Mikroskopik Olarak İncelenmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

- Taş, U., Ögetürk, M., Sapmaz, H., Karaca, Z.İ., Özyurt, B., Söğüt, E., Sarsılmaz, M.,** 2012. Sıçan Prefrontal Korteksinde Tolüenin Neden Olduğu Apoptoza Karşı Melatoninin Koruyucu Etkisinin Araştırılması, *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi*, **26**, 1-6.
- Thompson, C.B.,** 1995. Apoptosis in the Pathogenesis and Treatment of Disease, *Science*, **267**, 1456-1462.
- Thompson, E.B.,** 1994. Apoptosis and Steroid Hormones, *Molecular Endocrinology*, **8**, 665-673.
- Üstündağ, B., Bahçecioğlu, İ., Şahin, K., Gülcü, F., Düzgün, S., Özercan, İ.H., Gürsu, M.F.,** 2005. Soy İzoflavonların Karbon Tetraklorüre (CCl₄) Bağlı Karaciğer Hasarı ve Plazma Paraksonaz ile Arilesteraz Aktivite Düzeylerine Olan Etkileri, *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi*, **19**, 263-271.
- Vuda, M., D'Souza, R., Upadhya, S., Kumar, V., Rao, N., Kumar, V., Boillat, C., Mungli, P.,** 2012. Hepatoprotective and Antioxidant Activity of Aqueous Extract of *Hybanthus enneaspermus* Against CCl₄-Induced Liver Injury in Rats, *Experimental and Toxicologic Pathology*, **64**, 855-859.
- Wang, J.Y., Shum, A.Y., Ho, Y.J., Wang, J.Y.,** 2003. Oxidative Neurotoxicity in Rat Cerebral Cortex Neurons: Synergistic Effects of H₂O₂ and NO on Apoptosis Involving Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and Caspase-3, *Journal of Neuroscience Research*, **72**, 508-519.
- Yılmaz, İ.,** 2005. Erişkin Ratlarda Deneysel Varikosel Oluşturulması Sonrası Testislerde Germ Hücrelerinde Apoptozis Düzeylerinin Yükselmesi ve Yükselmiş Olan Apoptozisin Varikoselektomi Sonrası Gerileme Düzeyi ve Süresinin Tunel Yöntemi ile Değerlendirilmesi, *Uzmanlık Tezi*, Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği, İstanbul.
- Yu, H., Zheng, L., Yin, L., Xu, L., Qi, Y., Han, X., Xu, Y., Liu, K., Peng, J.,** 2014. Protective Effects of The Total Saponins From *Dioscorea Nipponica* Makino Against Carbon Tetrachloride-Induced Liver Injury in Mice Through Suppression of Apoptosis and Inflammation, *International Immunopharmacology*, **19**, 233-244.

- Yüksel, B., Kılıç, S., Taşdemir, N., Batioğlu, S., Burak, Z.T.,** 2009. Apoptozis ve Kaspaz Sistemi, *Jinekoloji-Obstetrik ve Neonatoloji Tıp Dergisi*, **10**, 58.
- Zhao, X., Cong, X., Zheng, L., Xu, L., Yin, L., Peng, J.,** 2012. Dioscin, A Natural Steroid Saponin, Shows Remarkable Protective Effect Against Acetaminophen-Induced Liver Damage in Vitro and in Vivo, *Toxicology Letters*, **214**, 69-80.
- Zhou, B., Wu, L.J., Tashiro, S., Onodera, S., Uchiumi, F., Ikejima, T.,** 2006. Silibinin Protects Rat Cardiac Myocyte from Isoproterenol-Induced DNA Damage Independent on Regulation of Cell Cycle, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **29 (9)**, 1900-1905.
- Zi, X., Feyes, D.K., Agarwal R.,** 1998. Anticarcinogenic Effect of A Flavonoid Antioxidant, Silymarin, In Human Breast Cancer Cells MDA-MB 468, *Clinical Cancer Research*, **4**, 1055-1064.
- URL-1: http://www.turkcebilgi.com/ansiklopedi/karbon_tetraklor%C3%BCr/, 9 Ocak 2014.
- URL-2: <http://www.saglik.im/karaciger-yetmezligi/>, 24 Aralık 2014.
- URL-3: <http://tr.wikipedia.org/wiki/Dosya:Apoptosis-blank.png/>, 26 Aralık 2013.
- URL-4:
<https://www.google.com.tr/search?q=Apoptoza+uğrayacak+hedef+hücrede+görülen+morfolojik+değişiklikler/>, 7 Şubat 2014.
- URL-5:
<https://www.google.com.tr/search?q=Apoptoza+uğramış+hücrenin+ölüm+aşamaları/>, 8 Şubat 2014.
- URL-6:
http://www.rndsystems.com/mini_review_detail_objectname_MR00_ApoptosisI.aspx/, 11 Şubat 2014.
- URL-7: <http://www.kanserebitkisel.com/deve-diken.html/>, 12 Şubat 2014.

ÖZ GEÇMİŞ

Muhammed İsmail CAN

Doğum Yeri: Elazığ

Doğum Tarihi: 05.02.1987

Görevi: Araştırma Görevlisi

İş Adresi: Aksaray Üniversitesi, Sabire Yazıcı Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Bölümü, Moleküler Genetik A.B.D., Aksaray

Tel.: 0 382 2882220

e-posta: ismailcan@aksaray.edu.tr

is_mail_can@hotmail.com

Yüksek Lisans Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Abdullah ASLAN

2008-2012: Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümünde Lisans Eğitimi

1998-2004: Ortaöğretim

1992-1997: İlköğretim