

**T.C.**  
**FIRAT ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**PATOLOJİ ANABİLİM DALI**



**RATLARDA DENEYSEL MONOCROTALİN  
TOKSİKASYONU: HİSTOPATOLOJİK VE  
İMMUNOHİSTOKİMYASAL İNCELEMELER**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Şevket SOYLU**

**2016**

**ONAY SAYFASI**

Prof.Dr.Mustafa KAPLAN

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü**

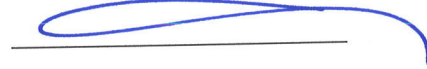
Bu tez Yüksek Lisans Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.



Prof. Dr. Hatice ERÖKSÜZ Anabilim Dalı Başkanı

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

Doç. Dr. Aydın ÇEVİK



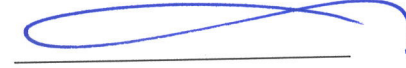
**Danışman**

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof.Dr.Hatice ERÖKSÜZ (Başkan)



Doç.Dr.Aydın ÇEVİK (Danışman)



Doç.Dr.Hayati YÜKSEL



## TEŐEKKÖR

Yüksek lisans çalışmada yardımlarını esirgemeyen Fırat Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Hatice ERÖKSÜZ'e başta olmak üzere, danışman hocam Sayın Doç. Dr. Aydın ÇEVİK, Prof. Dr. Yesari ERÖKSÜZ, Prof. Dr. Necati TİMURKAAN ve Araştırma Görevlisi Burak KARABULUT'a minnet ve şükranlarımı sunarım. Biyokimyasal analizlerimin yapımında katkılarından dolayı Fırat Üniversitesi Tıp Fakóltesi Merkez Laboratuvarı çalışanlarına ayrıca Fırat Üniversitesi Tıp Fakóltesi Patoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. İbrahim ÖZERCAN'a, Histoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Tuncay KULOĐLU'na ve VF14 nolu proje ile destekleyen FÜBAP birimine teşekkür ederim.

<b>İÇİNDEKİLER</b>	
<b>ONAY SAYFASI</b>	<b>HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.</b>
<b>TEŞEKKÜR</b>	<b>İ</b>
<b>TABLolar LİSTESİ</b>	<b>V</b>
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b>	<b>VI</b>
<b>KISALTMALAR LİSTESİ</b>	<b>Viii</b>
<b>1. ÖZET</b>	<b>1</b>
<b>2. ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>3. GİRİŞ</b>	<b>5</b>
3.1. Pirolizidin Alkaloitlerinin Genel Özellikleri	5
3.1.2. Pirolizidin Alkaloitlerin Bitkilerde Varlığı	6
3.2. Pirolizidin Alkaloitlerin Kimyasal Yapısı	7
3.2.1. Monocrotalin	8
3.3. Pirolizidin Alkaloitlerin Metabolizması, Emilim, Dağılım ve Atılma Yolları	8
3.4. Pirolizidin Alkaloit Toksikasyonunun Patogenezi	9
3.5. Pirolizidin Alkaloitlerinin Toksisitesi	10
3.5.1. Pirolizidin Alkaloitlerinin İnsanlardaki Toksisitesi	10
3.5.2. Pirolizidin Alkaloitlerinin Hayvanlarındaki Toksisitesi	11
3.5.3. Pirolizidin Alkaloitlerinin Toksikasyonuna Duyarlılık	11
3.6. Pirolizidin Alkaloit Toksikasyonlarında Histopatolojik Bulgular	12
3.6.1. Akut Toksikasyonda Histopatolojik Bulgular	12
3.6.2. Kronik Toksikasyonda Histopatolojik Bulgular	13

3.7. Apoptozis ve Oluşum Aşamaları	14
3.8. İmmünohistokimyasal Yöntemler	16
3.8.1. TUNEL Yöntemi (Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-digoxigenin nick-end labeling)	16
3.8.2. Bax / Bcl-2	17
3.8.3. PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen)	17
<b>4. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>18</b>
4.1. Deney Hayvanları	18
4.2. Monocrotalin Solüsyonunun Hazırlanması	19
4.3. Deneysel Toksikasyonun Oluşturulması	19
4.4. Deneme Planı	19
4.5. Histopatolojik İnceleme İçin Doku Kesitlerinin Hazırlanması	20
4.6. İmmünohistokimyasal Boyamalar	21
4.6.1. PCNA ve Bax/Bcl-2 Uygulanmaları	21
4.7. TUNEL Tekniğinin Uygulanması	24
4.8. Biyokimyasal Testler	25
4.9. İstatistiksel Analiz	26
4.10. Canlı Ağırlık ve Organ Hesaplanması	26
<b>5. BULGULAR</b>	<b>27</b>
5.1. Canlı Ağırlık	27
5.2. Klinik Bulgular	28
5.3. Makroskobik Bulgular	28
5.4. Organ Ağırlıkları	29
5.5. Mikroskobik bulgular	32

5.5.1. Onsekiz Saat Sonunda Ötenazi Edilen Ratlarda Karaciğerdeki Mikroskopik Bulgular	32
5.5.2. Altıncı Hafta Sonunda Ötenazi Edilen Ratlarda Karaciğerdeki Mikroskopik Bulgular	36
5.5.3. Karaciğer Dışındaki Diğer Organlarda Görülen Mikroskopik Bulgular	39
5.6. Biyokimyasal Bulgular	41
5.6.1. Enzim Düzeyleri	41
5.7. İmmunohistokimyasal Bulgular	44
<b>6. TARTIŞMA</b>	<b>50</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b>	<b>53</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>56</b>

## TABLolar LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b> Türkiye’de yaygın PA içeren çiçekli bitki türleri .....	7
<b>Tablo 2.</b> Deneme planı .....	20
<b>Tablo 3.</b> Çalışmada kullanılan antikorlar .....	22
<b>Tablo 4.</b> İmmünohistokimyasal boyama prosedürü (avidin-biotin-peroxidase complex, ABC).....	23
<b>Tablo 5.</b> İmmünohistokimyasal boyama değerlendirmeleri .....	24
<b>Tablo 6.</b> Grupların haftalık canlı ağırlık ortalamaları .....	27
<b>Tablo 7.</b> Grupların 18. saat sonu organ ağırlık ortalamaları .....	30
<b>Tablo 8.</b> Grupların 6. hafta sonu organ ağırlık ortalamaları .....	31
<b>Tablo 9.</b> Karaciğerdeki histopatolojik bulguların 18. saat sonu semikalitatif değerlendirmesi .....	33
<b>Tablo 10.</b> Karaciğerdeki histopatolojik bulguların 6. hafta sonu semikalitatif değerlendirmesi .....	36
<b>Tablo 11.</b> Grupların 18. saat sonu biyokimyasal enzim değerleri .....	42
<b>Tablo 12.</b> Grupların 6. hafta sonu biyokimyasal enzim değerleri.....	43

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Monocrotalin kimyasal yapısı .....	8
Şekil 2. Apoptotik süreç ve bu süreçte yer alan proteinler (63).....	16
Şekil 3. Hayvanların canlı ağırlıkları (gr) .....	28
Şekil 4. 18. saat sonu organ ağırlık ortalamaları .....	31
Şekil 5. 6. hafta sonu organ ağırlık ortalamaları .....	32
Şekil 6. Karaciğerde yaygın orta şiddette bulanık şişkinlik/vakuoler dejenerasyon dejenerasyon, 18. saat sonu (I. grup), HE.....	33
Şekil 7. Karaciğerde fokal apoptozis, ok, 18. saat sonu (II. grup), HE .....	34
Şekil 8. Karaciğerde multifokal apoptotik hücreler, oklar, 18. saat sonu (III. grup), HE .....	34
Şekil 9. Karaciğerde sinuzoidal konjesyon, 18. saat, (I. grup), HE.....	35
Şekil 10. Karaciğerde çok sayıda çift çekirdekli hepatositler, oklar, 18. saat sonu (III. grup), HE.....	35
Şekil 11. Karaciğerde yaygın megalositozis, oklar, 6. hafta sonu (IV. grup) ...	37
Şekil 12. Karaciğerde safra kanalı proliferasyonu 6. hafta sonu (IV. grup) HE	37
Şekil 13. Karaciğerde post nekrotik fibrosiz 6. hafta sonu (IV. grup) HE .....	38
Şekil 14. Karaciğerde fokal mononükleer hücre infiltrasyonları, oklar, 6. hafta sonu (IV. grup) HE .....	38
Şekil 15. Karaciğerde yağ dejenerasyonu, oklar, 6. hafta sonu (IV. grup) HE.	39
Şekil 16. 18. saat sonu grupların enzim düzeyleri.....	42

<b>Şekil 17.</b> 6. hafta sonu grupların enzim düzeyleri .....	44
<b>Şekil 18.</b> Karaciğerde TUNEL pozitif boyama gösteren hepatositler, 18. saat sonu (I.grup), Mayer hemotoksilen ile zıt boyama .....	46
<b>Şekil 19.</b> Karaciğerde TUNEL pozitif boyama gösteren hepatositler, 18. saat sonu (IV. grup), Mayer hemotoksilen ile zıt boyama .....	46
<b>Şekil 20.</b> Karaciğerde Bax pozitif boyama gösteren hepatositler, 18. saat sonu (IV. grup), IHC .....	47
<b>Şekil 21.</b> Karaciğerde Bax pozitif boyama gösteren hepatositler, 6. hafta sonu (II. grup), IHC .....	47
<b>Şekil 22.</b> Karaciğerde Bcl-2 pozitif boyama gösteren hepatositler, 18. saat sonu (IV. grup), IHC .....	48
<b>Şekil 23.</b> Karaciğerde Bcl-2 pozitif boyama gösteren hepatositler, 6. hafta sonu (II. grup), IHC.....	48
<b>Şekil 24.</b> Karaciğerde PCNA pozitif boyama gösteren hepatositler, 18. saat sonu (IV. grup), IHC .....	49
<b>Şekil 25.</b> Karaciğerde PCNA pozitif boyama gösteren hepatositler, 18. sonu (I. grup), IHC .....	49

## KISALTMALAR LİSTESİ

<b>PA</b>	: Prolizidin alkaloitleri
<b>PCNA</b>	: Proliferating Cell Nuclear Antigen
<b>Bcl-2</b>	: B-cell lymphoma
<b>Bax</b>	: Bcl-2-associated X protein
<b>TUNEL</b>	: TdT- Mediated Nick and Labeling Technique
<b>AST</b>	: Aspartat Amino Transferaz
<b>GGT</b>	: Gama Glutamil Transferaz
<b>HE</b>	: Hemotoksilen-Eozin
<b>ALT</b>	: Alanin Amino Transferaz
<b>i.p</b>	: İntra peritoneal
<b>TdT</b>	: Terminal deoksinükleotidil transferaz
<b>PBS</b>	: Phosphate Buffer Solution
<b>MCT</b>	: Monocrotalin
<b>DAB</b>	: Diaminobenzidine
<b>IHC</b>	: İmmunohistokimyasal boyama
<b>pH</b>	: Power of Hydrogen

## 1. ÖZET

Bu çalışmada ratlarda monocrotalin ile oluşturulan deneysel toksikasyonda, histolojik ve immunohistokimyasal çalışmalar yapıldı. Monocrotalin pirolizidin alkaloitlerinin bir üyesi olup; pirolizidin alkaloit toksikasyonu çalışmalarında model olarak, yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Seksen adet erişkin erkek Wistar ırkı rat (120-200 gr.) periton içi uygulanan monocrotalin dozuna göre; 50 mg/kg (I.grup), 100 mg/kg (II. grup), 150 mg/kg (III. grup), 200 mg/kg (IV. grup) ve tek doz periton içi 1 ml serum fizyolojik uygulanan bir kontrol grubu olmak üzere toplam 5 gruba (her grupta 16 hayvan) ayrıldı. İnokulasyonu takiben 18. saatte her gruptan 6 hayvan, toplam 30 hayvan, 6. hafta sonunda ise geriye kalan hayvanlar ötenazi edildi ve aşağıda belirtilen sonuçlar elde edildi.

1. İnokulasyondan 18 saat sonra ötenazi edilen hayvanlarda tüm deneme gruplarında en dikkat çekici bulgu hepatosit apoptozisi oldu ve apoptotik hücre sayısının doza bağlı olarak artmış olduğu görüldü. Bu apoptotik hücrelerin en yaygın görüldüğü bölgeler ise periportal ve mid-zonal bölgeler idi. TUNEL boyama sonuçlarının, morfolojik bulgular ile tamamen uyumlu olduğu gözlemlendi. Diğer bulgular olarak, hafif dereceden orta dereceye kadar değişen sinuzoidal konjesyon, vakuoler dejenerasyon ve yağ dejenerasyonu kaydedildi. Dejeneratif değişiklikler tüm deney gruplarında orta dereceden, şiddetli seviyede yıkıma kadar değişen düzeylerde gözlemlendi.

2. Karaciğer dışındaki organlarda; renal, pulmoner, testiküler ve intestinal lezyonlar, 18. saat sonunda ötenazi edilen tüm deney grubu hayvanlarda minimal düzeyde gözlemlendi ya da lezyon görülmedi.

3. Deney grupları ve kontrol grubu arasında, 18. saatte ötenazi edilen hayvanların karaciğer kesitlerine yapılan proliferating cell nuclear antigen (PCNA) boyamalarında bir fark görülmedi.

4. Bax-Bcl-2 boyamalarında; yüksek doz ve orta seviyede doz uygulanan gruplarda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farka rastlandı.

5. Altıncı hafta sonunda ötenazi edilen deneme grubu hayvanlarında; doza bağımlı, megalohepatositozis, safra kanalı proliferasyonu, post nekrotik ve kapsüler fibrozis ana bulgular olarak kaydedildi. En yüksek doz uygulanan grupta hepatosit çekirdeklerinde inklüzyon cisimciklerine rastlandı.

6. Biyokimyasal olarak plazma ALT ve AST seviyelerinin 18. saat sonunda tüm deneme grubu hayvanlarında, kontrol grubuna göre arttığı görüldü. Plazma GGT düzeylerinde ise 6. hafta sonunda ötenazi edilen deneme grubu hayvanlarında artış olduğu görüldü.

Sonuç olarak periton içi monokrotalin uygulamasıyla, doz ile orantılı olarak karaciğerde apoptotik değişimlerin inokülasyon sonrası 18. saat sonu en yüksek değerlere ulaştığı, kronik olgularda ise apoptozisin azaldığı ve antimitotik etki sonucu megalositozisin meydana geldiği ortaya konmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Monokrotalin, Rat, İmmunohistokimya, Patoloji

## 2. ABSTRACT

### **EXPERIMENTAL MONOCROTALINE TOXICATION IN RATS: HISTOPATHOLOGIC AND IMMUNOHISTOCHEMICAL EXAMINATIONS**

Histopathological and immunohistochemical studies were performed in experimentally induced monocrotalin toxication in rats. Monocrotaline is a member of pyrrolozidin alkaloids (PAs) and has been widely used as a model for pyrrolizidine alkaloid toxication. Eighty adult, male Wistar rats (120-200gr.) were divided into 5 groups (16 animals in each group) in terms of intraperitoneal monocrotaline injection including 50 mg / kg (I. group), 100 mg / kg (II. group), 150 mg / kg (III. group), and 200 mg / kg (IV. group) monocrotalin. Fifth group was designed as control group and these animals were administrated single dose of intraperitoneal physiological saline. Thirty and 50 animals were euthanized in 18 hours and 6 weeks at postinoculation, respectively. Accordingly, following results were obtained.

1. At the end of 18 hours; the most striking lesion was hepatocytic apoptosis which was present in all experimental group sand the number of apoptotic cells increased in a dose dependent manner. The most common location of these apoptotoic cells were periportal and mid-zonal areas. TUNEL staining was completely in agreement to morphologic findings. Other changes detected were mild to moderate sinusoidal congestion, vacuolar and fatty degeneration. The degenerative changes were moderate to severe and diffuse in distribution in all test groups.

2. The extra-hepatic changes including renal, pulmonary, testicular, splenic and intestinal were minimal to absent in all the experiment, groups at the end of 18 hours.

3. At the end of 18 hours; no difference was present in proliferating cell antigen nuclear (PCNA) staining among the test and control groups liver sections.

4. In regard to; Bax/Bcl-2 staining, there was statistically difference between in highest and moderate dose groups in control group.

5. At the end of 6 th weeks; dose dependent megalohepatocytosis, bile duct proliferation, post necrotic and capsular fibrosis were the main finding detected. In highest dose group; scant intranuclear inclusion bodies were also present.

6. Biochemically; ALT and AST levels in plazma were increased in all dozed groups as comparedto control at the end of 18 hours. Whereas, GGT level was increasaed in test groups and the end of 6 weeks.

In conclusion, apoptotic changes in liver reached the highest values at the end of 18 th hour post-inoculaotion with the intra peritoneal monocrotaline application in chronic cases, apoptosis was observed to decrease megalocytosis occured as a result of antimitotic effect.

**Keywords:** Monocrotaline, Rat, Immunohistochemistry, Pathology

### 3. GİRİŞ

#### 3.1. Pirolizidin Alkaloidlerinin Genel Özellikleri

Pirolizidin alkaloidleri (PA) geniş coğrafik dağılıma sahip bitkisel toksinlerdir (1-3). On üç bitki ailesindeki 6000 bitki türünde birbirinden farklı yapıda 660 kadar PA'ı saptanmıştır (4-8). Kabaca dünyadaki çiçekli bitkilerin %3 'ü PA'leri içermektedir (3, 9-12). Hayvanlar, PA'leri içeren bitkileri doğrudan doğruya meradaki otları tüketmek suretiyle veya bu bitkilerin tahıl ürünlerine karışması suretiyle alırlar. Doğada yaygınlığı ve toksik etkileri nedeniyle, hayvanlar ile insanlar için önemli bitkisel toksikasyon kaynağıdır (13-15). İnsanlardaki PA toksikasyonlarına ise tahıl ürünlerinin bu alkaloidleri içeren bitkilerle kontaminasyonu sonucu epidemiler tarzında rastlanmıştır. Bu bitkilerden hazırlanan ekstrelerin bilinçsizce kullanılması sonucu da insanlarda toksikasyon olguları bildirilmiştir (16). Ayrıca kimi hayvansal ürünlerde de (süt, bal, yumurta ve benzeri vs.) bu alkaloidler saptanmış olmakla birlikte, saptanan düzeylerin insan sağlığı bakımından hepatotoksik etkilerinin sınırlı olacağı bildirilmiştir. PA'leri kimyasal olarak reaktif olmayıp karaciğerde metabolitlerine dönüştürüldükten sonra aktive olarak toksik etki gösterirler (8, 17-20). PA'lerinin bu dönüşümü sitokrom P-450 enzimi vasıtasıyla olur.

PA'lerinin; çeşitli alt sınıflarına göre değişim göstermekle birlikte, hepatotoksik, antimitotik, karsinojenik, teratojenik ve pnömotoksik etkileri bulunmaktadır (6). PA'leriyle yapılan çalışmalarda heliotrin, lasiocarpine, selesionine, senecionine, jacobine ve monocrotalin gibi alkaloidlerin etkileri laboratuvar hayvanlarında incelenmiştir. Monocrotalinin etkileri birçok alkaloidin aksine sadece karaciğerle sınırlı kalmayıp akciğerlerde de pulmoner

hipertansiyona yol açmaktadır. Buna bağılı olarak ta kalpte yetmezliğine (sağ kalp hipertrofisi) sebep olduğu bildirilmiştir (21, 22).

### 3.1.2. Pirolizidin Alkaloitlerin Bitkilerde Varlığı

Bitkiler bileşimlerinde yer alan toksik maddeleri zararlılara karşı savunma sistemi olarak geliştirmişlerdir. Bu toksik maddelerden biri pirolizidin alkaloitleridir. PA'lar yapısal olarak bitkilerin toksik sekonder savunma komponentleri olarak ifade edilirler. 6000 den fazla bitki türünde bulunan PA'leri predominant olarak Asteraceae (Papatyagiller), Boraginaceae (Hodangiller) ve Leguminosa (Baklagiller) familyasında yer alır (23).

Sık rastlanılan türleri;

1-Senecio türleri

2-Crotalaria türleri

3-Heliotropium türleri

4-Echium türleri

5-Trichodesma türleri

6-Symphytum türleri

Bu bitki türlerinin birçoğu ülkemizde de yaygın bir şekilde bulunmakta ve her bölgede geniş bir dağılım göstermektedir. Özellikle **Echium vulgare** ve **E. plantagineum** arıcılık sektöründe önemli nektar kaynakları arasındadır.

-E.vulgare daha çok Marmara ve Karadeniz bölgesinde bulunur.

-E.plantagineum ise çoğunlukla Akdeniz havzasında yer alır.

-Pirolizidin alkaloiti içeren diğer bir bitki türü de **Borago officinalis'tir**.

Borago officinalis çoğunlukla Marmara bölgesi ile Orta ve Dođu Karadeniz Bölgesinde bulunmak üzere, İç Anadolu Bölgesinde de görülür.

-Türkiye’de yaygın olarak görülen bir diğer bitki türü ise **Senecio** türleri içinde yer alan **S. jacobaea**’dır.

Türkiye’de yaygın PA içeren çiçekli bitki türleri, yaygın isimleri ve yer aldıkları familyalar aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Tablo 1).

**Tablo 1. Türkiye’de yaygın PA içeren çiçekli bitki türleri**

TÜRLER	YAYGIN İSİMLERİ	FAMİLYA
Senecio spp.	Kanarya Otu	Asteraceae
Senecio jacobaea	Yakup kanarya otu	Asteraceae
Senecio vulgaris	Adi kanarya otu	Asteraceae
Eupatorium spp.	Grip otu	Asteraceae
Echium spp.	Engerek otu	Boraginaceae
Heliotropium spp.	Bambul otu	Boraginaceae
Myosotis alpestris	Dağ minesi	Boraginaceae
Myosotis sylvatica	Unutma beni	Boraginaceae
Cynoglossum spp.	Mavi köpek dili	Boraginaceae

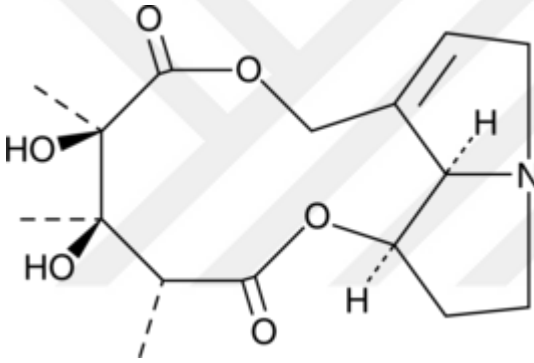
### 3.2. Pirolizidin Alkaloitlerin Kimyasal Yapısı

Pirolizidin alkaloitleri ornitin aminoasitinden biyosentetik yolla türeyen alkaloit gruplarından biridir. PA’leri biyogenetiksel ve biyokimyasal analizlere göre 5 farklı büyük yapısal tipe ayrılır. Ortak özellik olarak hepsi bir pirolizidin çekirdeği içerirler. Bazik ve N-oksit olmak üzere bitkilerde iki farklı yapısal formda bulunurlar (11, 16). PA’lerin N-oksit formu bağırsak kanalında enzimatik olarak bazik alkaloitlere dönüştürülür (16). Karaciğerde biyoaktivasyonu sonucu oluşan metabolitler toksik etkiye sahiptirler (12). PA’lerin toksik etkileri kimyasal yapıları ile yakından ilişkilidir. En fazla toksik etkiye sahip olan PA’ler siklik

diester yapısındadır. En az olanlar monoester, orta derecede olanlar ise siklik olmayan diester yapısındadırlar.

### 3.2.1. Monocrotalin

Monocrotalin (MCT), 1960'lı yıllarda Turner ve Lalich tarafından pulmoner hipertansiyon için bir deneysel model olarak kullanılmıştır (24). Bu model günümüzde hipertansiyonla ilgili çalışmalarında en yaygın model olarak kullanılmaktadır. Monocrotalin; *Crotalaria spectabilis* bitkisinden elde edilen 11 üyeli makrosiklik bir pirolizidin alkaloididir (Şekil 1).



Şekil 1. Monocrotalin kimyasal yapısı

### 3.3. Pirolizidin Alkaloidlerin Metabolizması, Emilim, Dağılım ve Atılma Yolları

Karaciğer zehirli maddelerin ve toksinlerin yok olmasına yardımcı olan, safra ile vücuttan atılımını sağlayan bezsel bir organdır.

PA'leri karaciğerdeki çeşitli enzimler aracılığıyla toksik veya toksik olmayan bileşiklere metabolize edilirler. PA'lerinin sitokrom P 450 başta olmak üzere, çok amaçlı oksidaz enzimleri tarafından karaciğerde biyotransformasyonu sonucu oluşan pirolik metabolitler, yüksek derecede reaktif ve toksik etkili bileşiklerdir (18). PA'lerinin hayvanlardaki metabolizma şekilleri hidroliz, N-

oksidasyon ve dehidrojenasyondur. PA'leri kimyasal olarak inaktif prekürsörler olarak değerlendirilmelidir (21).

Hidroliz ve N-oksidasyon ile detoksifiye ürünler, dehidrojenasyon sonucunda ise toksik metabolitler şekillenir. Hidroliz, N-oksidasyon ve dehidrojenasyonundan oluşan primer metabolit, dehidropirolizidin esteri olarak isimlendirilir (piroller). Bunlar DNA, protein, aminoasit ve glutasyon gibi nükleofillerle bağlanan oldukça reaktif bileşiklerdir. Bunun dışında, pirolik alkole hidrolize olurlar ya da ikincil metabolit olarak kabul edilen dehidronesine dönüştürülürler. Dehidronesin de nükleofillerle yavaş reaksiyona girer (25-27).

Oral yolla alınan PA'leri bağırsaklardan (ileum, jejunumdan) emilerek, portal vena ile karaciğere ulaşırlar. PA'lerin toksik olmayan metabolitler 24 saat içerisinde vücuttan idrar ve safra ile uzaklaştırılır. Toksik metabolitlerin de önemli bir bölümü ise yaklaşık 48-72 saatte idrarla atılır (4). Sıçanlara 60mg/kg intraperitoneal olarak tek doz retrorsine verildiğinde, ilk günde idrar ile atılan PA miktarı, ikinci güne göre yaklaşık 20 kat fazla olduğu, aynı zamanda total metabolitin çok az bir bölümün (yaklaşık %1-2'sinin) safra ile atıldığı kaydedilmiştir (4, 9).

### **3.4. Pirolizidin Alkaloit Toksikasyonunun Patogenezi**

PA toksikasyonunda karaciğer primer hedef organdır (3, 16). Piroller, dokuların yapısal unsurları ile alkilleyici reaksiyon oluştururlar ve bu maddeler hidrojen iyonları yerine alkil radikallerini yerleştirme yeteneğindedirler (28). DNA, protein, amino asit ve glutasyon gibi hücresel yapı ya da içeriği kovalent olarak bağlanarak (3, 12, 16), hepatotoksik etkinin yanı sıra; karsinogeneze (25,

29), terotogeneze (30, 31) mitozun ve bağıklık sisteminin baskılanmasına (32) da sebep olurlar.

Pirolik metabolitlerin proteinlere veya nükleik asitlere bağlanması ile antimitotik etki oluşur (25, 33). Piroller, sitoplazma proteinleri ve nükleik asitlerin tiyol gruplarına bağlanarak, hücrelerde dejenerasyon ve nekroz oluşumuna sebep olur (12, 25). Bir kısım pirolik metabolit ise, kan dolaşımına geçerek eritrositlere bağlanır, bir kısmı da serbest halde kan ile diğer dokulara taşınır (19). Metabolitlerin DNA üzerinde özel hedef bölgelere bağlanması sonucu mitozun, G-2 ve M aşamaları gerçekleşmez. Bununla birlikte G1 ve S fazları etkilenmez. Hepatositler, G-2 veya M evresini ihmal ederek, tekrar geriye G1 evresine döner ve hücrede protein sentezi devam eder (16). Bunun sonucunda ise, karakteristik büyük sitoplazmalı ve nükleuslu megalositik hepatositler şekillenir (2, 20, 34, 35). Mutajenik ve teratojenik etkileri de pirolik metaboliklerin DNA sarmalına bağlanmasıyla oluşur (16, 29). PA' lerinin karsinojenik etkisinin ise, DNA zincirindeki P 53 genindeki hasardan kaynaklandığı bildirilmiştir (19).

### **3.5. Pirolizidin Alkaloitlerinin Toksikitesi**

#### **3.5.1. Pirolizidin Alkaloitlerinin İnsanlardaki Toksikitesi**

Pirolizidin alkaloitlerin'den kaynaklanan zehirlenmeler gelişmekte olan ülkelerin sorunu olmaktan çıkarak bugün artık gelişmiş ülkelerinde önemli bir sorunu haline gelmiştir. Bunun sebebi alternatif tıpa olan ilginin artmasıdır (23).

İnsanlarda zehirlenmeye sebep olan nedenler;

-PA ile kontamine tahıl ürünlerinin tüketimi,

- Toksik bitkilerin tıbbi kullanımı,
- Geleneksel tıpta PA içeren bitkilerin direk kullanımı,
- Süt ve süt ürünleri,
- Bal,
- Polen gibi başlıklarla karşımıza çıkmaktadır.

### **3.5.2. Pirolizidin Alkaloidlerinin Hayvanlarındaki Toksisitesi**

Hayvanlar doğada PA içeren bitkileri direk tüketmemelerine rağmen, indirekt olarak bu gibi bitkilerle karışık yemlerin alınması sonucu ve gıda besinlerinin yetersiz olduğu durumlarda veya meydana gelen kuraklık dönemlerinde bu bitkileri tüketebilmektedirler. Bunun sonucu olarak da zehirlenme ve ekonomik kayıplar meydana gelir.

### **3.5.3. Pirolizidin Alkaloidlerinin Toksikasyonuna Duyarlılık**

Hayvan türlerinin duyarlılıkları arasında önemli farklar bulunur. Genellikle ruminatlar, at, domuz ve kanatlılara göre daha az duyarlıdır. Yaş, cinsiyet, ırk, hayvanların fizyolojik durumları (laktasyon, gebelik vb.) türün dışındaki duyarlılığı etkileyen diğer faktörlerdir (14). Pirol üretimi, detoksifikasyon mekanizmaları ve alkaloidlerin atılımındaki farklılıklar türler arasında duyarlılığı belirleyen en önemli nedenlerdendir (13, 21). Pirolik esterler, glutasyona bağlanarak vücuttan uzaklaştırıldığından, aynı tür içinde karaciğer glutasyon seviyesi yüksek olan hayvanlar toksikasyona daha dirençlidir (21). Sığır ve sığan gibi duyarlı türlerde yüksek, kobay, koyun ve bıldırcın gibi dirençli türlerde ise düşük oranda pirolik metabolit şekillenir (1, 21). Bazı hayvan türleri, özellikle

tavşanlar yüksek oranda pirol üretmelerine karşın, toksikasyona oldukça dirençlidirler. Bu dirençlilik yüksek oranda detoksifikasyon enzimlerinin varlığıyla açıklanmaktadır (6, 19, 25).

Türün dışındaki duyarlılığı etkileyen diğer faktörler yaş ve cinsiyettir. Genç hayvanların erişkinlere göre daha duyarlı olduğu görülmüştür. Süt emen sıçanlarda toksikasyonla ilgili belirtilerin ve lezyonların daha belirgin olarak şekillendiği tespit edilmiştir (36-38). Cinsiyet bakımından yapılan çeşitli çalışmalarda; erkek sıçanların dişi sıçanlara göre daha duyarlı olduğu gözlenmiştir (21, 25).

Toksikasyona bağlı olarak şekillen lezyonların şiddetindeki değişimler hayvanların beslenmesinde kullanılan yemlerle birlikte aldıkları metaller (bakır, molibden) ve aminoasitlerin (metionin, sistin) miktarına bağlı olarak değişir (25, 39).

### **3.6. Pirolizidin Alkaloit Toksikasyonlarında Histopatolojik Bulgular**

Hayvan türüne ve doza bağlı olarak PA toksikasyonları akut, subakut veya genellikle kronik değişimlerle karakterizedir (25).

#### **3.6.1. Akut Toksikasyonda Histopatolojik Bulgular**

Akut toksikasyonlarda lezyonlar çoğunlukla karaciğerle sınırlıdır. Yüksek PA dozları 12-48 saat içerisinde karaciğerde yaygın hemoraji ve nekroz oluşumuna öncülük eder (16). Bu değişimler maymun, fare, sıçan, kanatlı türleri, domuz ve insanlarda bildirilmiştir.

### 3.6.2. Kronik Toksikasyonda Histopatolojik Bulgular

Çiftlik hayvanlarında doğal toksikasyonlar ve laboratuvar hayvanlarında ise düşük dozlarda verilmesiyle çoğunlukla kronik değişimler şekillenir (16).

Çiftlik hayvanlarından sığırlarda kronik toksikasyonlarda akut olaylarda olduğu gibi ilk etkilen organ karaciğerdir. Bunun yanı sıra metabolitlerin kan dolaşımıyla akciğer, kalp ve böbreklere taşınması sonucu patolojik değişiklikler şekillenebilir (7, 40). Sığırlarda, karaciğerde kronik toksikasyonun en önemli bulguları fibrosiz, asites ve mezenterial ödemdir (1, 25, 41). Bazı kronik toksikasyonlarda hiçbir klinik semptom görülmemekle birlikte, karaciğer hücre hasarları ve bunu takiben nekroz, yangı, fibrosiz ve son olarak siroz gelişir (24, 42-44).

Sığırlarda PA toksikasyonlarında en önemli mikroskopik bulgu karaciğerde hepatositlerin nükleus ve sitoplazma hipertrofisiyle karakterize megalositozistir. Karaciğer hücrelerinin hipertrofisi ve devamında dejenerasyon ve bunu takiben nekroz şekillenir (1, 37, 44). Karaciğerdeki diğer mikroskopik bulgular nekroz, kapsüler, periportal veya periasiner fibrozis, safra kanalı hiperplazisi, oval hücre proliferasyonu (28, 45) ve veno-oklüziv değişimlerdir (46). Megalohepatositlerin nüklear membranı bazik boyalar ile kuvvetli boyanır. Kromatin miktarı azalarak karyomegali daha da belirginleşir (2, 9, 13). Karyomegali ile birlikte, nüklear inklüzyonlar önemli belirtiler olarak değerlendirilmiştir (12, 25, 44).

Laboratuvar hayvanlarında monocrotalin ile yapılan çalışmalarda, toksik metabolitlerin kan yoluyla akciğere ulaşarak, kapillar endotel hücrelerinde nekrotik değişimlere ve mikrotrombozlara neden olduğu bildirilmiştir (1, 15, 47). Bu değişimlerin sonucunda; pulmoner arterioller hipertrofi şekillenebileceği vurgulanmıştır (7).

Gerek laboratuvar hayvanlarında gerekse sığırlardaki kronik PA toksikasyonlarında renal tubüler megalositosiz de oldukça sabit bir bulgudur (48, 49). Laboratuvar hayvanlarında monocrotalin toksikasyonunda böbreklerde; glomeruler nekroz ve hiyalinizasyon, kapillar tromboz, Bowman kapsülünde kalınlaşma, tubulus epitellerinde ve mezengial hücrelerde dejenerasyon, büyük arterlerde fibrinoid nekroz ve tromboz ilişkin değişimler önemli bulgular olarak kaydedilmiştir (4, 40).

### **3.7. Apoptozis ve Oluşum Aşamaları**

Organizma yaşamı boyunca sürekli bir denge halindedir. Dengenin korunmasında yaşlanmış ve özelliğini yitirmiş bir kısım hücreler ölüm ile ortadan kaldırılmakta ve bunların yerine yeni hücreler sentez edilerek veya farklılaşma yoluyla denge sağlanmaktadır. Hücre ölümü iki şekilde gerçekleşir. Bunlar apoptozis ve nekrozdur (50, 51). Her iki olayda da birbirini izleyen biyokimyasal ve morfolojik olaylar sonucu hücre ölümü meydana gelir (52). Yaşlı, hasar görmüş ya da anormal bir hücreler programlanmış hücre ölümü olarak adlandırılan apoptozis ile ölüme gider. Apoptozis terimi ilk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır (53). Başlangıçta büzüşme nekrozu olarak adlandırılmıştır. Fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinde yoğun kromatin parçalarının biriktiği ve hücre organellerin korunduğunu fark edildiği için bu isim

verilmiştir. Köken olarak "apo-TOE-sis" den türetilmiş ve eski Yunanca 'da "sonbaharda yaprak dökümü" anlamına gelmektedir (54). Başladığında hızlı gelişen genler tarafından düzenlenen, yangısal olmayan, enerjiye ihtiyaç duyan, fizyolojik ve patolojik durumlarda gözlenebilen yapısal değişikliklerle karakterize biyolojik bir olaydır (Şekil 2).

### **Apoptozun gerçekleşme aşamaları;**

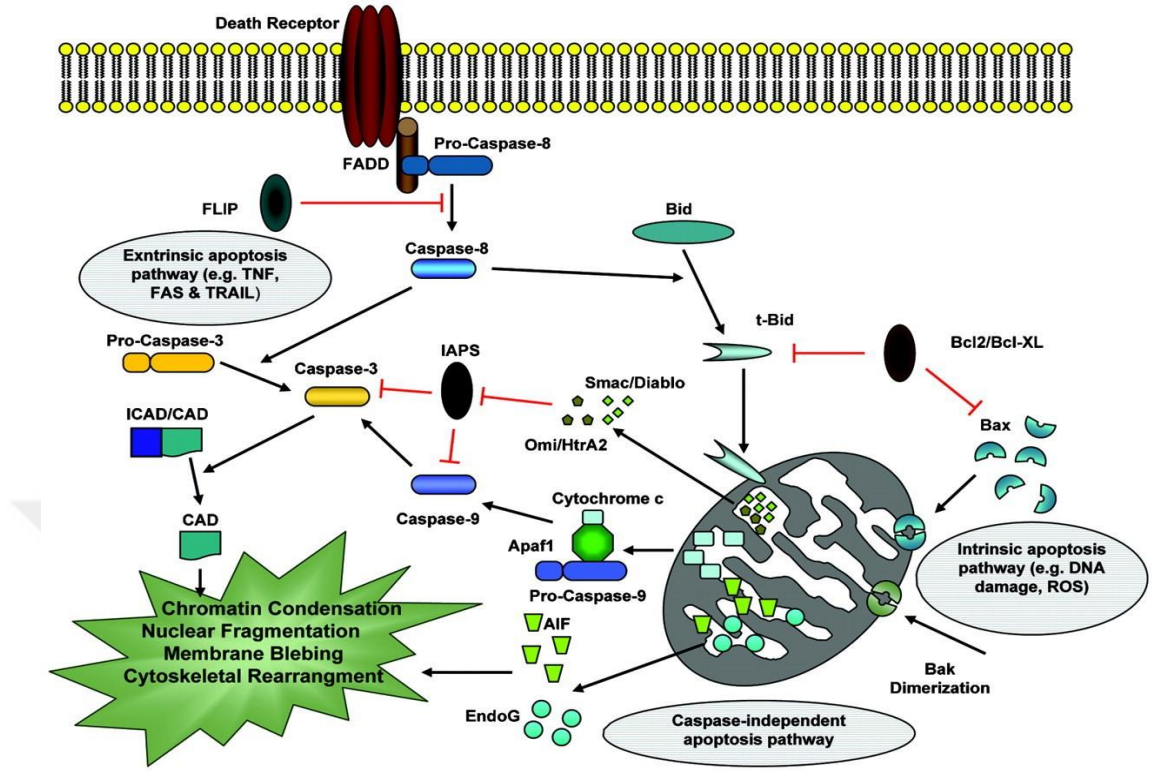
Hücrede apoptozis dıştan veya içten gelen etkilerle başlar. DNA hasarı, kalsiyum seviyesinde yükselme, hücre içi pH'sında azalma bunu takiben de hücre yapısındaki bozulmalar bu etkiler arasındadır (55).

Hücre içerisindeki kaspas olarak adlandırılan enzimler gelen sinyallerle aktive olur. Bu sinyaller mitokondri zarındaki geçirgenliği kolaylaştırır. Bu geçirgenlik Bcl-2 protein ailesi ile düzenlenmektedir. Bcl-2 proteinler hem pro-apoptotik hemde anti-apoptotik etki yaparlar. Pro-apoptotikler sitokrom c salıverilmesini sağlar. Anti-apoptotikler ise bunu engellerler (56).

Apoptotik mekanizma aktive olduğunda hücre büzüşmeye başlar ve diğer sağlam hücrelerden kopar daha sonra yaklaşık 1/3 kayba uğrar (57). Nükleer kromatin yoğunlaşır. DNA parçalanır. Endoplazmik retikulum dilatasyona uğrar, mitokondri şişer. Hücrede tomurcuklanma meydana gelir, bu takiben DNA ve organeller parçalanarak apoptotik cisimcikler oluşur (58). Bu apoptotik cisimcikler fagositoz yolu ile yangı oluşturmadan yok edilir (59).

Apoptotik cisimler mikroskobik olarak oval sitoplazmalı ve kromatin kümeleri hilal gibi görünen yapıya sahiptirler (60). Bu cisimcikler dağınık şekilde bulunurlar (61). Apoptotik boşluklar rezidual hücreler tarafından doldurulduğu

için bu boşluklar normal yapının bozulması etkilemez (62).



Şekil 2. Apoptotik süreç ve bu süreçte yer alan proteinler (63)

### 3.8. İmmünohistokimyasal Yöntemler

#### 3.8.1. TUNEL Yöntemi (Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-digoxigenin nick-end labeling)

TUNEL metodu 1992 yılında Gavrieli ve arkadaşları tarafından bulunmuştur (64). Bu yöntem yaygın olarak “TdT-dUTP nick-end-labelling” sözcüklerinin kısaltılması olan “TUNEL” adıyla anılmaktadır. Bu yöntem, apoptotik hücrelerdeki DNA sarmal kırıklarını, serbest 3'-OH uçlarında enzimatik bir reaksiyon ile tespit etmeye dayanarak, apoptozise giden hücrelerin görüntülenmesini sağlamaktadır. Parafin bloklar, donmuş kesitler, kültürü yapılmış solüsyon halindeki ya da lameller üzerinde büyütülmüş hücreler TUNEL boyama yöntemi ile boyanarak apoptozise uğrayıp uğramadıkları belirlenir.

Apoptotik sinyaller hücrelerdeki DNA'ları hızla parçalayarak, üzerinde kırıklar meydana getirirler. Ortamda 3'-OH içeren DNA parçacıklarının sayısı artar (64). DNA parçacıklarının serbest 3'-OH uçlarına terminal deoksinükleotidil transferaz (Tdt) enzimi, biotin-deoxyuridine triphosphate-digoxigenini ekler (65). Biotin ile işaretlenen DNA parçacıkları ortama avidin eklenmesiyle görünür hale gelir.

### **3.8.2. Bax / Bcl-2**

Apoptoziste önemli role sahip ve apoptozisi başlatan yolların kesiştiği en önemli noktaya sahip hücre organeli mitokondridir. Mitokondrinin zarar görmesi apoptozisi geri dönüşümsüz etkilemektedir. Mitokondrinin zarar görmesinin en önemli sebebi ise Bcl-2 proteindir.

Bcl-2 (B-cell lymphoma gene-2) protein ailesinde hem apoptotik hem de antiapoptotik üyeler bulunmaktadır.

Bcl-2 proteini mitokondrinin dış membranı, çekirdek membranı ve endoplazmik retikulum membranında bulunmaktadır (66). Anti-apoptotik bir proteindir.

Bax; proapoptotik bir proteindir. Bcl-2 proteiniyle aynı yapıdadır. Bax Bcl-2 ye göre baskın olduğundan apoptozis artmaktadır (67).

Bunun sonucu olarakta bir pro-apoptotik protein olan Bax sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salıverilmesini indükler. Anti-apoptotik olan Bcl-2 ise sitokrom c salıverilmesini baskılar. Böylece hücrenin yaşamı ile ölüm arasındaki seçeneğini Bax ile Bcl-2 proteinleri belirler.

### **3.8.3. PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen)**

Proliferatif hücre çekirdek antijeni, daha çok kullanılan adıyla PCNA, hücrenin yaşam döngüsünde görev alan proteinler olan siklinlerin bir üyesidir. DNA'yı sararak yüzük gibi bir yapı oluşturan hücredeki yuvarlak şekilli tek proteindir (68-70). Endojen bir protein olan PCNA, hem hayvan hem de bitki hücrelerinde bulunur (71-75). Bir hücrenin yaşamından ya da ölümünden sorumlu olan temel moleküllerden birisidir. PCNA, nükleik asit metabolizmasının replikasyon ve onarım mekanizmasında önemli rol oynar (76, 77). Hücre bölünmesinde rol alan proteinleri koordine ederek onların görevlerini düzenler (78). PCNA'nın esas rolü, DNA polimeraz enziminin kofaktörü olarak DNA sentezini ve hücre proliferasyonunu düzenlemektir (18). PCNA yapım hızı, hücre siklusunun G1 fazının ortasından itibaren hızla artar. S fazı boyunca yüksek seviyesini korur ve G2/M fazında düşmeye başlar. Bu nedenle hücredeki PCNA seviyesi, proliferatif hücrelerin tespit edilmesinde bir parametre olarak kullanılır (25, 33, 79). PCNA'nın olmadığı veya çok az olduğu durumlarda hücrenin apoptozise gittiği bildirilmiştir (80).

#### **4. GEREÇ VE YÖNTEM**

##### **4.1. Deney Hayvanları**

Çalışmada Fırat Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma (FÜDAM) Merkezinden sağlanan, 80 adet erkek, erişkin, Wistar ırkı rat (ortalama ağırlıkları 150-200 gr) kullanıldı. Hayvanlar dört deneme ve bir kontrol grubu olmak üzere toplam beş gruba ayrıldı. Her bir grup 16 hayvandan oluşturuldu. Çalışmada kullanılan deney hayvanları için Fırat Üniversitesi Yerel Hayvan Etik Kurulundan gereken izinler alındı. (karar no:38 ve 05.02.2014 tarihli) Denemeler başlamadan

önce tüm ratlar tartıldı. Deney süresince ratlar *ad libitum* olarak normal rat yemiyle beslendi.

#### **4.2. Monocrotalin Solüsyonunun Hazırlanması**

Ratlarda monocrotalin toksikasyonu oluşturmak için, katı formdaki monocrotalin (Crotaline, Sigma, Katalog No: 315-22-0) distile su ile sulandırılarak, % 10'luk solusyon ( 1 ml'de 100 mg monocrotalin) hazırlandı. Solüsyonun pH'ı sodyum bikarbonat ile 7,2'ye ayarlandı.

#### **4.3. Deneysel Toksikasyonun Oluşturulması**

Çalışmanın başlangıcında ratların ağırlıkları ölçüldü ve kaydedildi. Her gruptaki ratların ortalama canlı ağırlıkları birbirine yakın olacak şekilde gruplar oluşturuldu. Emiliminin yüksek olması, uygulama kolaylığı ve çalışma süresine olan uygunluğu nedeniyle i.p. enjeksiyonu tercih edilmiştir. Hazırlanan monocrotalin solüsyonu canlı ağırlıkları hesaplanarak i.p olarak uygulandı. I., II., III. ve IV. gruba sırasıyla 50 mg/kg, 100 mg/kg, 150 mg/kg, 200 mg/kg monocrotalin verildi. Kontrol gruplarındaki ratlara ise 1 ml serum fizyolojik i.p enjekte edildi.

#### **4.4. Deneme Planı**

Çalışmada; 16 adet rattan oluşan dört deneme (I.,II., III., IV. grup) ve bir kontrol grubu (V. grup) oluşturuldu. Uygulama I.,II., III., IV. deneme grubuna tek doz monocrotalin, V. (kontrol) gruba ise tek doz serum fizyolojik enjeksiyonu i.p. şeklinde yapıldı (Tablo 2 ).

**Tablo 2. Deneme planı**

<b>Gruplar</b>	<b>Denek Sayısı (n)</b>	<b>Uygulanan Madde</b>	<b>Doz (mg/kg)</b>	<b>Uygulama Süresi (gün)</b>
I.Deneme grubu	16	Monocrotalin	50 mg/kg (0,5ml)	Tek Doz
II.Deneme grubu	16	Monocrotalin	100 mg/kg (1,0 ml)	Tek Doz
II.Deneme grubu	16	Monocrotalin	150 mg/kg (1,5 ml)	Tek Doz
IV.Deneme grubu	16	Monocrotalin	200 mg/kg (2,0 ml)	Tek Doz
V.Deneme grubu (Kontrol)	16	Serum Fizyolojik	1ml	Tek Doz

#### **4.5. Histopatolojik İnceleme İçin Doku Kesitlerinin Hazırlanması**

Deneme süresince gerek ölen gerekse deneme sonrası ötenazi edilen ratların sistemik nekropsileri yapılarak karaciğer, böbrek, bağırsak, dalak, akciğer, kalp, beyin, testis örnekleri alındı. Örnekler %10'luk tamponlu formalin solüsyonunda tespit edilip, 24 saat sonra trimlendi. Doku örnekleri bir gün boyunca akarsu altında yıkandıktan sonra otomatik doku takip cihazında (Leica TP 1020, Almanya) otomatik program kullanılarak alkol, ksilol ve parafin serilerinden geçirildi. Parafin bloklama cihazı (Leica EG 1150 H, Almanya) ile bloklandı. Hazırlanan bloklardan rotary mikrotom (Leica RM 2125 RTS) ile 3-5 µm kalınlığında alınan kesitler, rutin histopatolojik incelemeler için hematoksil-eozin (HE) ile boyandı. Histopatolojik değerlendirilme trinoküler ışık mikroskobu (Olympus BX43, Japonya) yardımıyla yapıldı ve kamera ataçmanı (Olympus DP-72, Japonya) ile mikroskobik fotoğrafları çekildi.

## 4.6. İmmunohistokimyasal Boyamalar

### 4.6.1. PCNA ve Bax/Bcl-2 Uygulanmaları

Karaciğerden hazırlanan parafin kesitlerde mitotik baskılanma oranlarını belirlemek için Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) , B-cell lymphoma (Bcl-2) ve B-cell lymphoma associated X protein (Bax) primer antikoları kullanıldı. Primer antikolar, (Santa cruz Kits, ESP) üretici firmanın önerileri doğrultusunda ve daha önce yapılan ön çalışmalarla belirlenen oranlarda phosphate buffered saline (PBS, pH: 7,4) ile sulandırıldı (Tablo 3). İmmunohistokimyasal boyamalarda tüm aşamalar için gerekli maddeleri içinde bulunduran hazır kitler ve bunların protokolleri kullanıldı. Buna göre kesitler, pozitif şarjlı lamlara alındı. 30 dakika 58°C'lik etüvde kurutuldu. Ksilolde deparafinize edilip seri alkollerde dehidre edildi. Formalinin dokudaki antijenik yapıyı maskeleyici etkisini gidermek için kesitler, sitrat tamponlu solüsyonda mikrodalga fırında 600 watta 5 dakika kaynatıldı. Kesitler, endojen peroksidaz aktivitesini gidermek için metanolde hazırlanmış %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'te 5 dakika bekletildi ve protein bloke edici serumda 5 dakika tutuldu. Daha sonra primer antikolar ile Tablo 3'de belirtilen sulandırma oranları ve sürelerde inkubasyona bırakıldı. Kesitlere biotinle işaretli sekonder antikor damlatılarak 30 dakika bekletildikten sonra Streptavidin peroksidaz enzimi (Santa cruz Kits, Teneferi, ESP) ile 30 dakika inkübe edildi. Protein bloke edici serumu ile inkubasyon aşaması hariç tüm işlemlerden sonra kesitler 3 kez 5 dakika süreyle PBS ile yıkandı. Son olarak kesitler 3-amino-9-etilkarbazol (AEC) (Thermoscientific AEC RED substrat kit, ABD) kromojeni ile mikroskop altında kontrollü olarak 10 dakika süreyle boyandı. Mayer hematoksilen ile karşıt boyamaları yapıldı. Su bazlı yapıştırıcı (Bio-Optica Mount

quick acquose) ile kesitler kapatıldı ve ışık mikroskobunda incelendi (Tablo 4). Değerlendirmede rastgele 20'lik objective ile 10 bölge tarandı. Sitoplazması ve/veya çekirdeği kırmızı boyanan hücrelerin sayısı ile hücrelerin boyanma yoğunluğu dikkate alınarak semikalitatif olarak yapıldı (Tablo 5).

**Tablo 3. Çalışmada kullanılan antikolar**

<b>Antikor (Klon)</b>	<b>Antikor Türü</b>	<b>Antikor Konağı</b>	<b>Antijen geri alma yöntemi</b>	<b>Kullanılan dilüsyon</b>	<b>İnkubasyon Süresi</b>	<b>Üretici Firma</b>
PCNA	Monoclonal	Mouse	Sitrat tamponlu solusyonda 600 watt 5 dk	1/200	4 <sup>0</sup> C bir gece	Santa cruz
Bax	Polyclonal	Rabbit	Sitrat tamponlu solusyonda 600 watt 5 dk	1/400	4 <sup>0</sup> C bir gece	Santa cruz
Bcl-2	Polyclonal	Rabbit	Sitrat tamponlu solusyonda 600 watt 5 dk	1/400	4 <sup>0</sup> C bir gece	Santa cruz

**Tablo 4. İmmünohistokimyasal boyama prosedürü (avidin-biotin-peroxidase complex, ABC)**

Sıra	İşlem	Süre
1	Xylol I	10 dakika
2	Xylol II	10 dakika
3	Xylol III	10 dakika
4	% 100 Alkol	10 dakika
5	% 96 Alkol	10 dakika
6	% 80 Alkol	10 dakika
7	Distile su	5 dakika
8	Mikrodalga	5 dakika
9	Oda ısısında soğutma	20 dakika
10	PBS	3x5 dakika
11	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 dakika
12	PBS	3x5 dakika
13	Normal blok solüsyonu	5 dakika
14	Primer antikor	60 dakika
15	PBS	3x5 dakika
16	Sekonder antikor	30 dakika
17	PBS	3x5 dakika
18	Streptavidin HRP (Horse radish peroksidaz)	20 dakika
19	PBS	3x5 dakika
20	AEC (3-Amino-9-ethyl carbazole)	5 dakika
21	Distile su	5 dakika
22	Zıt boya olarak Mayer's hematoksilen	10 saniye
23	Akarsu	5 dakika
24	Özel kapatma maddesi ile kapatma	.....

**Tablo 5. İmmünohistokimyasal boyama değerlendirmeleri**

Değerlendirilen Hücre Sayısı	Anlamı
0	Yok
1-5	Hafif
6-10	Orta
10<	Şiddetli

#### **4.7. TUNEL Tekniğinin Uygulanması**

Monocrotalin toksikasyonunun dokulardaki apoptozis üzerine olan etkilerini incelemek için TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labelling) metodu kullanıldı. Kesitler, In Situ Cell Death Detection, POD (Millipore, Kanada) apoptozis kiti kullanılarak ve önerilen standart prosedüre göre boyandı. Kesitler, pozitif şarjlı lamlara 3-5 µm kalınlığında alındı. Kesitler, bir gece 60°C'lik etüvde tutuldu. Ksilolde deparafinize edilip seri alkollerde dehidre edildi. Kesitlerin çevreleri sınırlayıcı kalemle ile çizildi. Kesitler 1:500 dilüsyondaki proteinaz k solüsyonu ile 7 dk oda sıcaklığında tutuldu. Kesitler, endojen peroksidaz aktivitesini gidermek için metanolde hazırlanmış %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'te 5 dakika bekletildi. Her bir kesit için 13µl /cm<sup>2</sup> Equilibration tampon solüsyonu ile 6 dk oda sıcaklığında yıkandı. Üzerleri plastik lamel ile kapatılarak bekletildi. Sürenin sonunda tampon solüsyonu dökülerek her kesit için 13 µl TdT (terminal deoxynucleotidyl transferaz) enzimi solüsyonu 37°C'de 1 saat tutulduktan sonra, reaksiyon durdurma solüsyonu hazırlanarak 10 dakika oda sıcaklığında yıkandı. Anti-digoxigenin konjugatı ile 30 dk oda ısısında bekletildi. 3 kez 5 dakika süreyle PBS ile yıkandı. Kesitlerin

boyanması için kromojen olarak 3-amino-9-etil karbazol (AEC) (Thermoscientific AEC RED substrat kit, ABD) ya da 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid (DAB) (Thermoscientific AEC RED substratkit, ABD) kromojenleri kullanıldı. Boyamalar mikroskop altında kontrollü olarak 10 dakika süreyle yapıldı. Karşıt boyamalarda AEC substrat ile boyanan kesitler Gill's hematoksilen ile boyanıp su bazlı yapıştırıcı (Bio-Optica Mount quick acquose) ile DAB ile boyanan kesitler Mayer hematoksilen ile boyanıp Entellan (Merck, Almanya) kullanılarak kapatıldı.

TUNEL metoduyla boyanan doku kesitlerinde apoptotik aktivitenin belirlenmesi ışık mikroskopunda yapıldı. İncelemede hücrelerin boyanma yoğunluğuna bakılmaksızın kırmızı-kahverengi boyanan çekirdekler pozitif, mavi boyanan çekirdekler negatif olarak kabul edildi. Rastgele 20'lik objective ile 10 bölge tarandı. Değerlendirme boyanan hücre çekirdeği sayısına göre semikalitatif olarak yapıldı.

#### **4.8. Biyokimyasal Testler**

Biyokimyasal analizler için uygulanan ilk enjeksiyonu takiben 18 saat sonucunda her gruptan dekapite edilen 6 hayvandan antikoagülsüz tüp içerisinde 5 ml kan örnekleri alındı. Örnekler 4000 devirde 5-10 dk santrifüj edildikten sonra, üst kısımda kalan serum kısmı alınarak, otoanalizörde (Siemens Advia 2400, Almanya), alanin amino transferaz (ALT), aspartat amino transferaz (AST), gama glutamil transferaz (GGT), direk bilirubin, total protein ve üre enzim düzeyleri tespit edildi.

#### **4.9. İstatistiksel Analiz**

Çalışmadan elde edilen immunohistokimyasal bulgular Olympus DP-72 kamera ataçmanlı Olympus BX43 trinoküler ışık mikroskobu altında görüntülendi ve mikroskobik fotoğrafları çekildi. Pozitif boyanmaların derecesi semikalitatif olarak değerlendirildi. Sonuçlar S.P.S.S. 22.0 istatistik analiz programı ile değerlendirildi.

Gruplar arası farkın istatistiksel kontrollerinde Kruskal Wallis Varyans Analizi kullanıldı. Analiz sonucunda gruplar arası farkın belirlenmesinde ise Mann-Whitney testi uygulandı.

Kontrol ve deneme gruplarına ait serum ALT, AST, GGT, direk bilirubin, total protein ve üre değerlerinin gruplar arasındaki karşılaştırmalarında ise non-parametrik testlerden Kruskal Wallis Varyans Analizi kullanıldı. Analiz sonucunda gruplar arası farkın belirlenmesinde ise Mann-Whitney testi uygulandı.

#### **4.10. Canlı Ağırlık ve Organ Hesaplanması**

Toksikasyonun hayvanların canlı ve organ ağırlıkları üzerine etkisini görebilmek için, deneme başlanmadan önce hayvanların canlı ağırlıkları ölçüldü. Denemenin başlamasından itibaren 6 hafta boyunca, haftada bir kez olmak üzere hayvanlar tartıldı. Gruplar arası farkın istatistiksel farkını ortaya koymak için non-parametrik testlerden Kruskal Wallis Varyans Analizi kullanıldı. Analiz sonucunda gruplar arası farkın belirlenmesinde ise Mann-Whitney testi uygulandı. Deneme süresince ölen ve deneme sonunda ötenazi edilen hayvanların nekropsileri yapılarak, organ ağırlıkları saptandı. Belirtilen testler organ ağırlıkları içinde uygulandı.

## 5.BULGULAR

### 5.1. Canlı Ağırlık

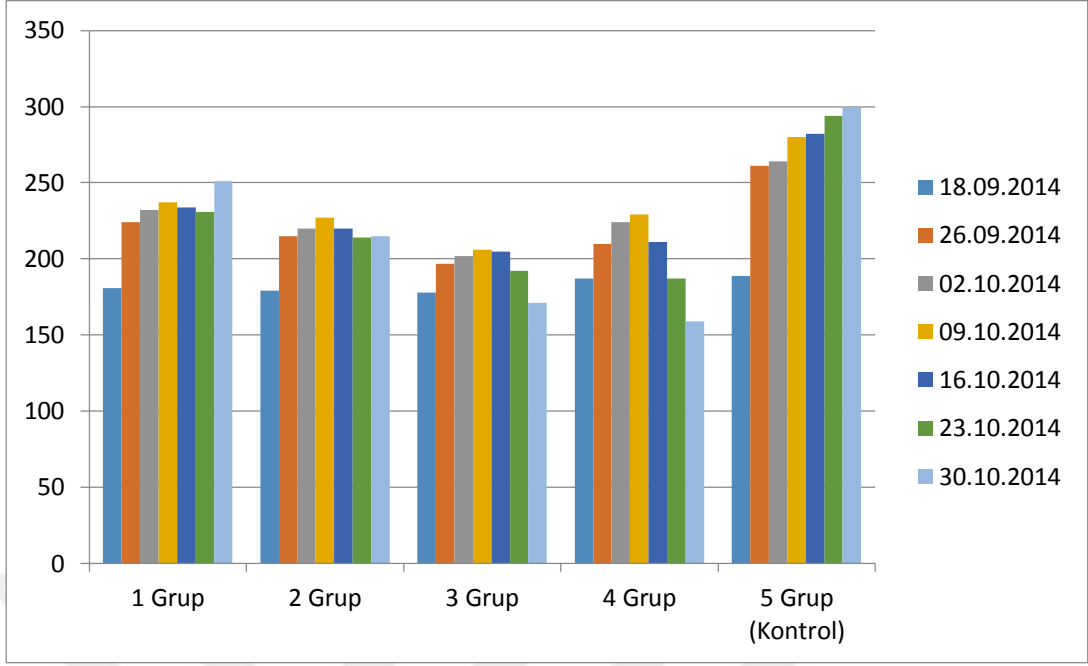
Deneme grupları ve kontrol grubu arasında canlı ağırlık değerleri bakımından istatistiksel olarak önemli ( $P<0,001$ ) bir fark görülmüş ve bu farklılık deneme boyunca devam etmiştir (Tablo 6), (Şekil 3). Deneme grupları arasında anlamlı bir fark görülmedi.

**Tablo 6. Grupların haftalık canlı ağırlık ortalamaları (gr)**

Hafta	I. grup (50mg/kg) X±SX	II. grup (100mg/kg) X±SX	III. grup (150mg/kg) X±SX	IV. grup (200mg/kg) X±SX	V. grup (Kontrol) X±SX	P
0	213,81±22,05 <sup>b</sup>	213,69±29,55 <sup>b</sup>	201,68±27,76 <sup>b</sup>	208,63±26,01 <sup>b</sup>	255,12±13,28 <sup>a</sup>	**
1	224,30±25,78 <sup>b</sup>	214,90±31,98 <sup>b</sup>	197,40±32,32 <sup>b</sup>	210,33±39,89 <sup>b</sup>	260,90±12,26 <sup>a</sup>	*
2	231,90±26,45 <sup>b</sup>	220,20±30,65 <sup>b</sup>	202,40±33,12 <sup>b</sup>	223,60±38,30 <sup>b</sup>	264,40±11,01 <sup>a</sup>	*
3	236,50±24,90 <sup>b</sup>	226,50±36,08 <sup>b</sup>	205,60±28,27 <sup>b</sup>	229,00±27,50 <sup>b</sup>	279,60±16,15 <sup>a</sup>	*
4	233,50±30,03 <sup>b</sup>	220,44±35,06 <sup>b</sup>	205,00±22,83 <sup>b</sup>	210,60±28,75 <sup>b</sup>	282,40±20,33 <sup>a</sup>	**
5	231,10±44,45 <sup>b</sup>	213,67±39,57 <sup>b</sup>	191,80±27,25 <sup>b</sup>	186,75±19,58 <sup>b</sup>	293,70±22,04 <sup>a</sup>	**
6	250,63±26,21 <sup>b</sup>	214,75±51,70 <sup>b</sup>	171,00±24,97 <sup>b</sup>	158,66±26,76 <sup>b</sup>	300,20±22,60 <sup>a</sup>	**

\*:  $P<0.01$       \*\*:  $P<0.001$

a,b: Farklı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar önemlidir.



**Şekil 3. Hayvanların canlı ağırlıkları (gr)**

### 5.2. Klinik Bulgular

Yüksek doz gruplarında (III. ve IV. gruplar) enjeksiyonu takiben ilk haftadan denemenin sonuna kadar ki dönemde halsizlik, dış uyarılara tepki vermeme, iştahsızlık, hareket azlığı ve kontrol grubuna göre kilo kaybı bulgularına rastlandı. Denemede I gruptan 37, 39 günde 2 adet, II grupta 29, 30, 40 sırasıyla 1, 1, 4 toplam 6 adet, III gruptan 4, 6, 39, 40 gülerde 3, 2, 1, 1 toplam 7 adet, IV gruptan 7, 8, 38 günlerde 3, 2, 2 adet hayvan olmak üzere toplam 7 hayvan da ölüm görüldü. Kontrol grubunda ise ölüm görülmedi.

### 5.3. Makroskopik Bulgular

Dördüncü grupta 18. saat sonunda nekropsileri yapılan 3 hayvanın karın boşluğunda 2-4 ml açık sarı ve berrak görünümlü sıvıya (asites) rastlandı. İnce bağırsak mukozasında yaygın ve orta şiddette konjesiyon olduğu gözlemlendi. Böbreklerin şişkin olduğu tespit edildi. Göğüs boşluğunda 2-3 ml açık sarı ve

berrak görünümlü sıvıya (hidrotraks) rastlandı. Akciğerde hafif şiddette ödem ve konjesiyona rastlandı. Karaciğerde aşırı derece konjesiyon, kıvamında yumuşama, kenarlarında kütleşme görüldü.

Onsekizinci saat sonunda nekropileri yapılan I.,II.,III. gruptaki hayvanlarda IV. gruba göre bulguların daha hafif seyrettiği gözlemlendi.

İkinci grup'ta 29. günde ölen hayvanın karın boşluğunda serozal yüzeylerde orta derecede ikterus, karaciğer lobları bal peteği görünümünde, bağırsaklar da otolitik değişiklikler ve akciğer konjesyonluydu.

Üçüncü ve IV. gruptaki hayvanlardan 7. ve 8. günde ölen 3 hayvanın karaciğerlerinde hindistan cevizi görünümü, visceral lopta milier tarzda boz beyaz renkli odaklar ve mevcuttu.

Altıncı hafta sonunda nekropsileri yapılan tüm deneme grubu hayvanlarda ise makroskopik olarak dikkati çeken önemli bir bulgu gözlenmedi.

#### **5.4. Organ Ağırlıkları**

Grupların 18. saat ve 6. hafta sonundaki karaciğer ağırlık değerleri incelendiğinde; sadece kontrol grubu ile anlamlı farklılıklar görülmüş, deneme grupları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark görülmemiştir (Tablo 7).

Grupların 18. saat ve 6. hafta sonundaki akciğer, testis ağırlık değerleri incelendiğinde; kontrol ve deneme grupları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark görülmemiştir (Tablo 8).

Grupların 18. saat sonundaki kalp, böbrek ağırlık değerleri incelendiğinde; gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark görülmemiştir ( $P<0.05$ ).

Deneme sonunda deneme gruplarından I.grup (50 mg/kg), II. grup (100 mg/kg) , III. grup (150 mg/kg), IV. grup (200 mg/kg) ile V.grub (kontrol) arasında istatistiksel olarak önemli bir fark görülmüştür (Şekil 4).

Grupların 6. hafta sonundaki kalp, böbrek ağırlık değerleri incelendiğinde; gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark görülmüştür (Şekil5).

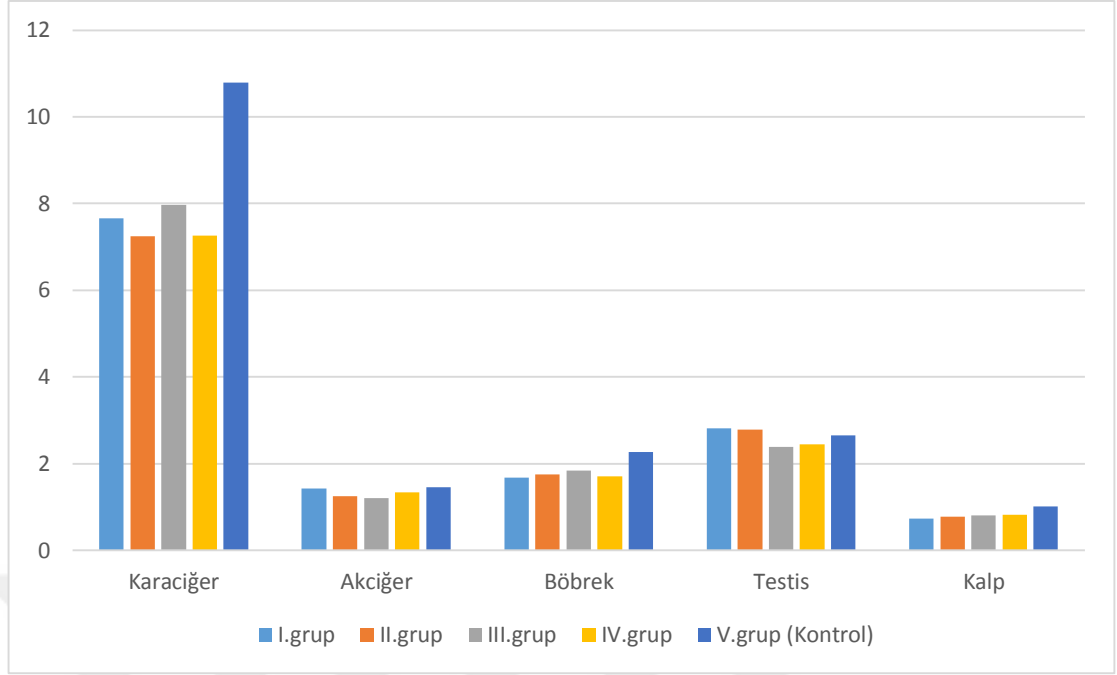
**Tablo 7. Grupların 18. saat sonu organ ağırlık ortalamaları ( gr)**

<b>Organ</b>	<b>I. grup (50mg/kg) X±SX</b>	<b>II. grup (100mg/kg) X±SX</b>	<b>III. grup (150mg/kg) X±SX</b>	<b>IV. grup (200mg/kg) X±SX</b>	<b>V. grup (Kontrol) X±SX</b>	<b>P</b>
<b>Karaciğer</b>	7,659±0,757 <sup>b</sup>	7,255±1,234 <sup>b</sup>	7,97±0,788 <sup>b</sup>	7,263±1,330 <sup>b</sup>	10,793±0,739 <sup>a</sup>	*
<b>Akciğer</b>	1,420±0,182	1,246±0,244	1,209±0,139	1,334±0,290	1,458±0,294	ÖD
<b>Böbrek</b>	1,687±0,170 <sup>b</sup>	1,758±0,28 <sup>b</sup>	1,847±0,167 <sup>b</sup>	1,700±0,172 <sup>b</sup>	2,263±0,245 <sup>a</sup>	*
<b>Testis</b>	2,821±0,493	2,794±0,450	2,389±0,748	2,454±0,252	2,656±0,157	ÖD
<b>Kalp</b>	0,730±0,101	0,778±0,081	0,804±0,055	0,826±0,148	1,011±0,103	ÖD

\*: P<0.05

ÖD: Önemli Değil

a,b: Farklı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar önemlidir.



Şekil 4. 18. saat sonu organ ağırlık ortalamaları

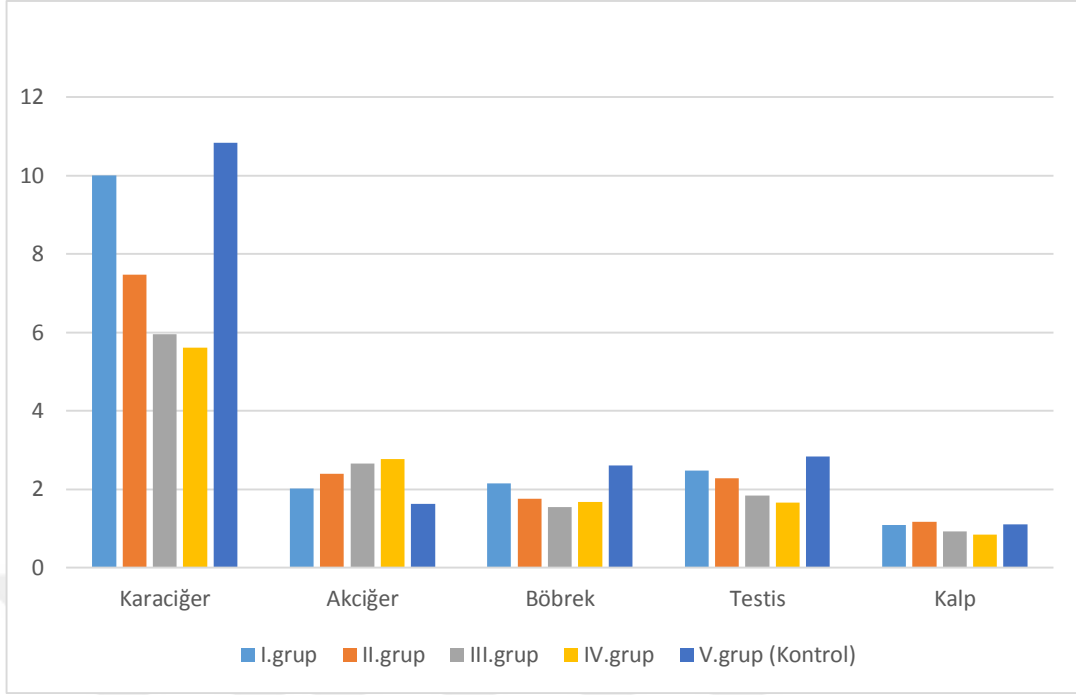
Tablo 8. Grupların 6. hafta sonu organ ağırlık ortalamaları ( gr)

Organ	I. grup (50mg/kg) X±SX	II. grup (100mg/kg) X±SX	III. grup (150mg/kg) X±SX	IV. grup (200mg/kg) X±SX	V. grup (Kontrol) X±SX	P
<b>Karaciğer</b>	10,016±1,177 <sup>b</sup>	7,474±1,884 <sup>b</sup>	5,961±1,087 <sup>b</sup>	5,614±0,276 <sup>b</sup>	10,836±0,884 <sup>a</sup>	*
<b>Akciğer</b>	2,02±0,359	2,403±0,653	2,655±0,778	2,778±0,940	1,622±0,208	ÖD
<b>Böbrek</b>	2,149±0,303 <sup>b</sup>	1,760±0,497 <sup>b</sup>	1,543±0,245 <sup>b</sup>	1,671±0,461 <sup>b</sup>	2,607±0,306 <sup>a</sup>	*
<b>Testis</b>	2,484±0,209	2,288±0,566	1,839±0,749	1,651±0,522	2,835±0,354	ÖD
<b>Kalp</b>	1,097±0,190	1,170±0,226	0,926±0,193	0,849±0,111	1,112±0,193	ÖD

\*: P<0.05

ÖD: Önemli Değil

a,b: Farklı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar önemlidir.



**Şekil 5. 6. hafta sonu organ ağırlık ortalamaları**

### **5.5. Mikroskopik bulgular**

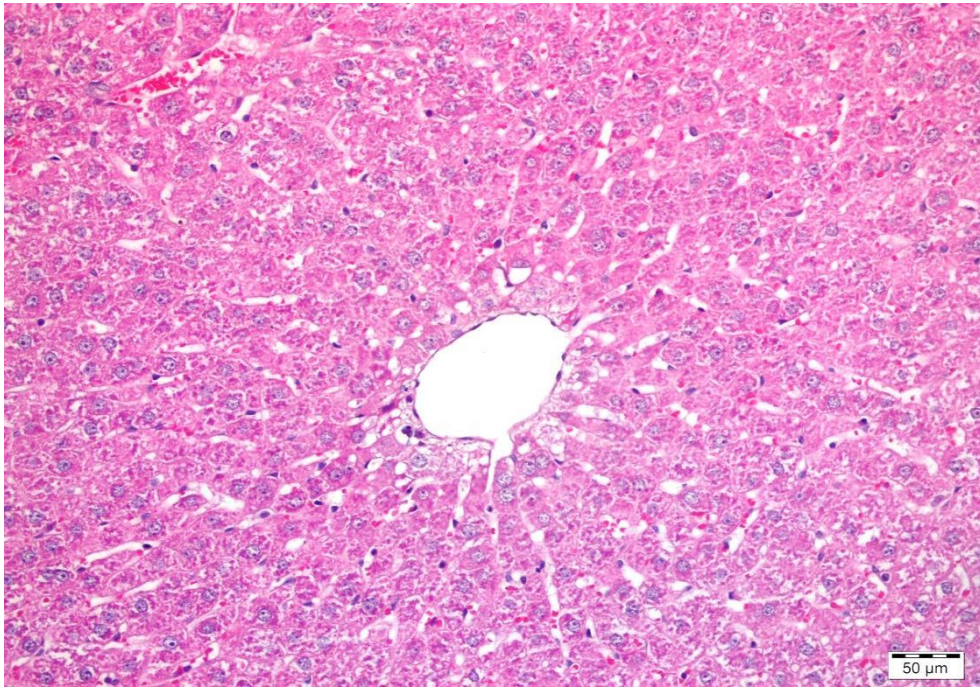
#### **5.5.1. Onsekiz Saat Sonunda Ötenazi Edilen Ratlarda Karaciğerdeki Mikroskopik Bulgular (Tablo 9):**

Tüm deneme gruplarında karaciğerde değişen şiddet derecelerinde, yaygın, bulanık şişkinlik/vakuoler dejenerasyon ve Kupffer hücre aktivasyonu gözlemlendi (Şekil 6). Fokal nekroz odakları vardı. Anılan bulgular yüksek doz gruplarında daha şiddetli derecedeydi. Benzer şekilde tüm deneme gruplarında saptanan ve doza bağlı olarak derecesi artan apoptozis 18. saatin sonunda saptanan en önemli mikroskopik bulgu olarak kaydedildi (Şekil 7). Buna göre düşük doz gruplarında (I. ve II. gruplar) geliş güzel olarak serpiştirilmiş tarzda, her bir mikroskop alanında 1-2 adet apoptotik cisimciğe rastlanırken, yüksek doz gruplarında özellikle II. ve III. bölgelerde kümeler halinde apoptotik hücreler tespit edildi (Şekil 8). Bu hücreler koyu eozinofilik ve yuvarlak sitoplazmalı, çekirdekleri

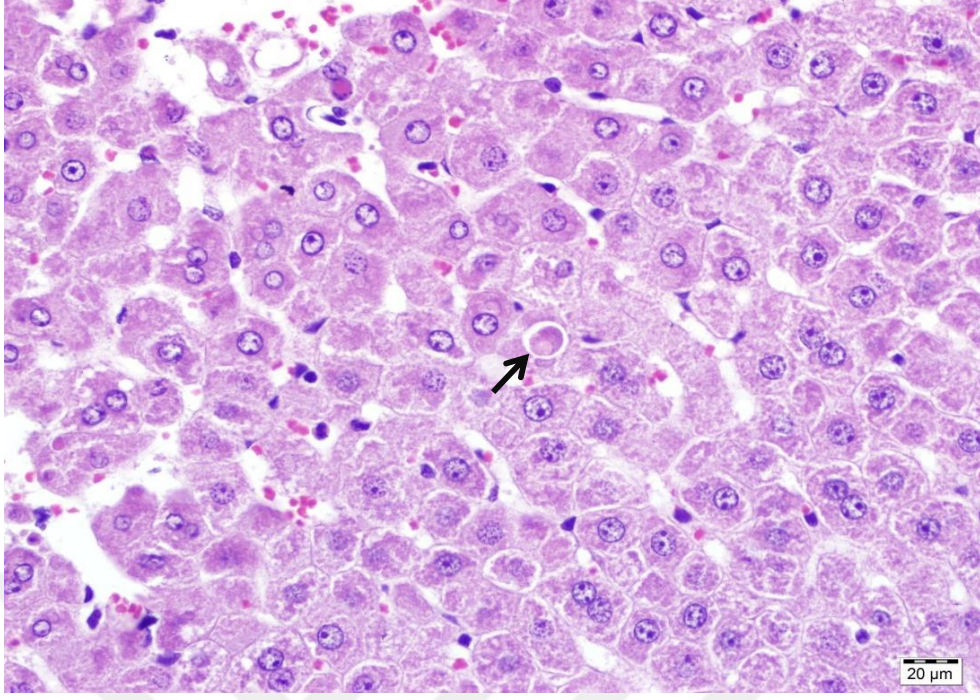
büzüşmüş ve etraflarındaki hücrelerden ayrılmışlardı. Yüksek doz grublarındaki (III. ve IV. gruplar) ratlarda periportal lenfositik infiltrasyonlar ve hafif-orta şiddette multifokal sinüzoidal konjesyon alanlarına rastlandı (Şekil 9). Deneme gruplarında megalositoza rastlanmamakla birlikte, yüksek doz gruplarında tek tük serpiştirilmiş halde karyomegalik hepatositlere ve çok sayıda çift çekirdekli karaciğer hücrelerine rastlandı (Şekil 10).

**Tablo 9. Karaciğerdeki histopatolojik bulguların 18. saat sonu semikalitatif değerlendirmesi**

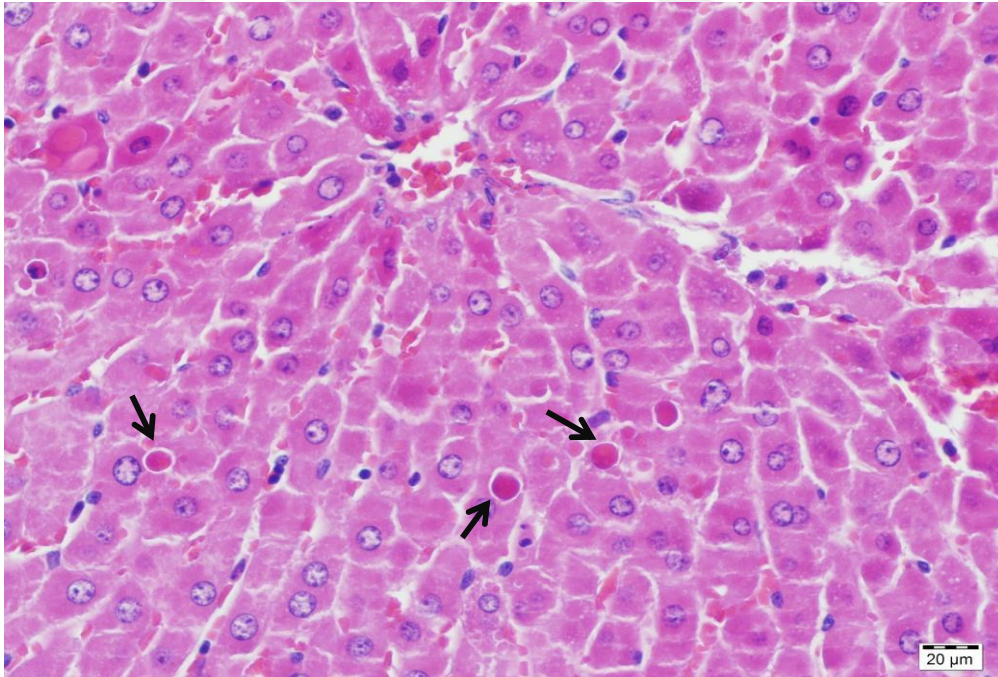
	Hidropik Dejenerasyon	Yağ Dejenerasyonu	Sinüzoidal Konjesyon	Nekroz	Yangısal Hücre İnfiltrasyonu	Megalositoz
I. grup	1	0	1	0	0	0
II. grup	1	0	1	3	0	0
III. grup	3	0	2	3	1	0
IV. grup	4	1	4	5	2	0
V. grup	0	0	0	0	0	0



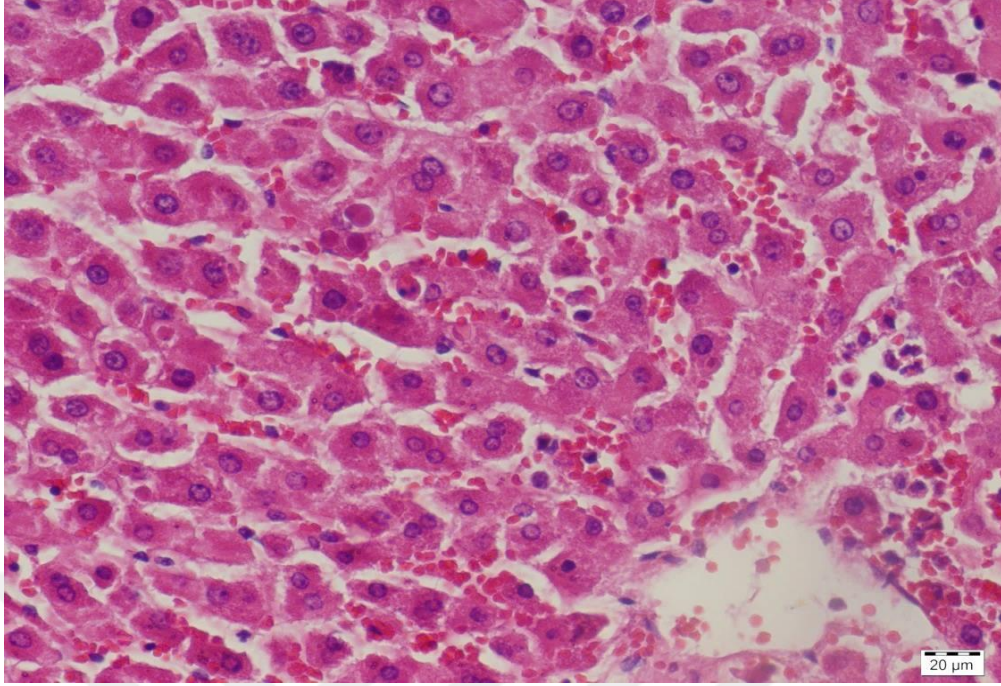
**Şekil 6. Karaciğerde yaygın orta şiddette bulanık şişkinlik/vakuoler dejenerasyon, 18. saat sonu (I. grup), HE**



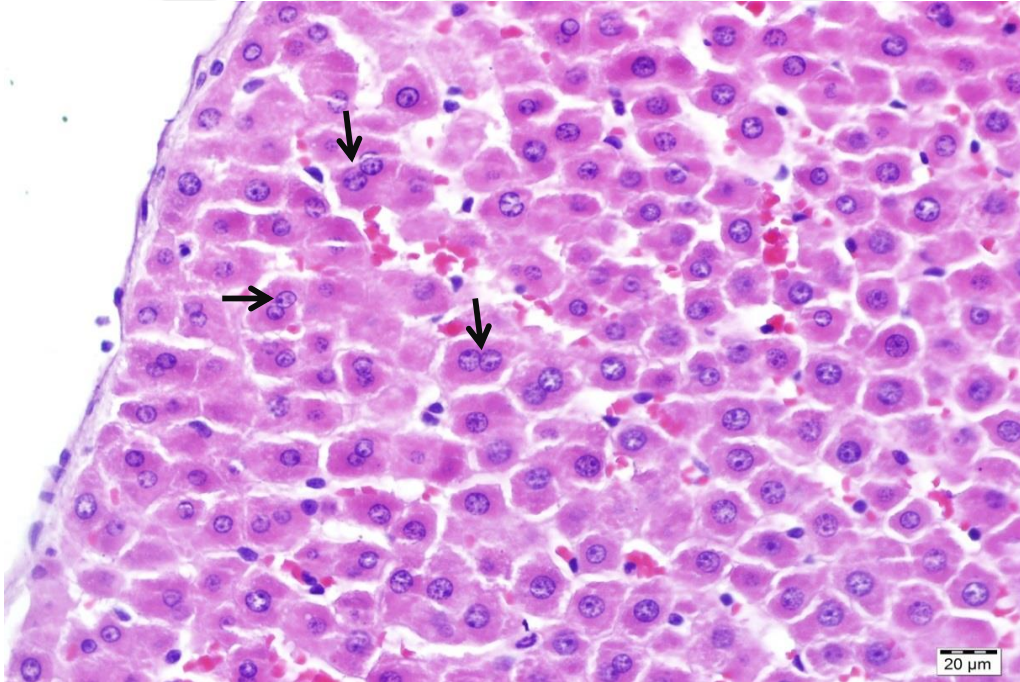
Şekil 7. Karaciğerde fokal apoptozis, ok, 18. saat sonu (II. grup), HE



Şekil 8. Karaciğerde multifokal apoptotik hücreler, oklar, 18. saat sonu (III. grup), HE



Şekil 9. Karaciğerde sinuzoidal konjesyon, 18. saat, (I. grup), HE



Şekil 10. Karaciğerde çok sayıda çift çekirdekli hepatositler, oklar, 18. saat sonu (III. grup), HE

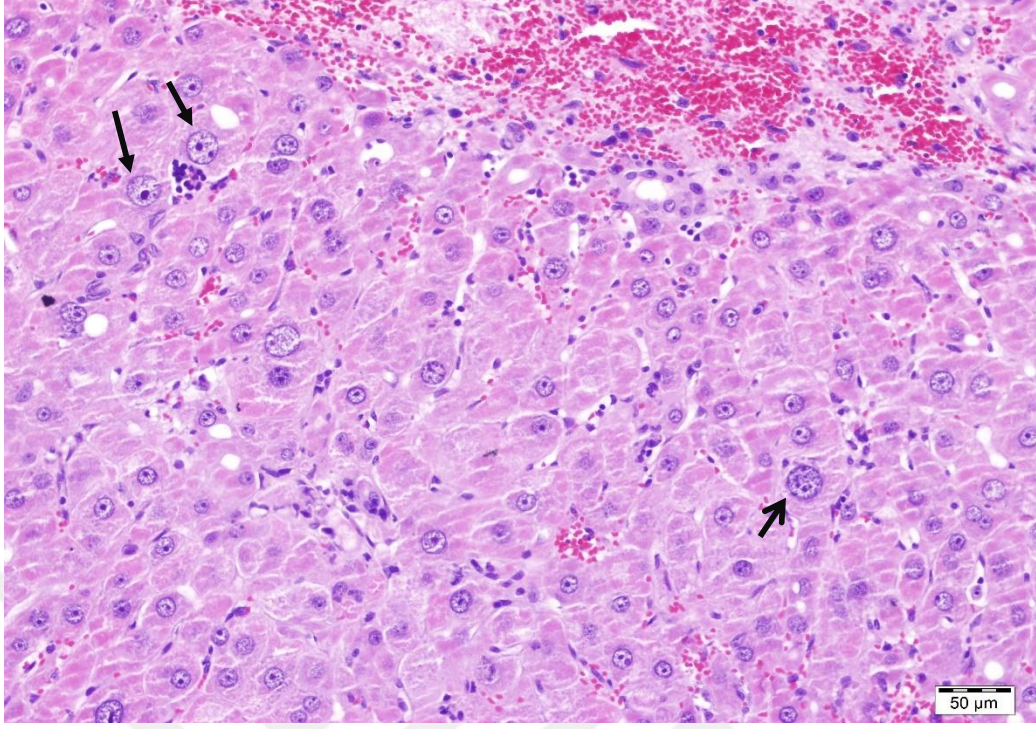
### 5.5.2. Altıncı Hafta Sonunda Ötenazi Edilen Ratlarda Karaciğerdeki

#### Mikroskopik Bulgular (Tablo 10):

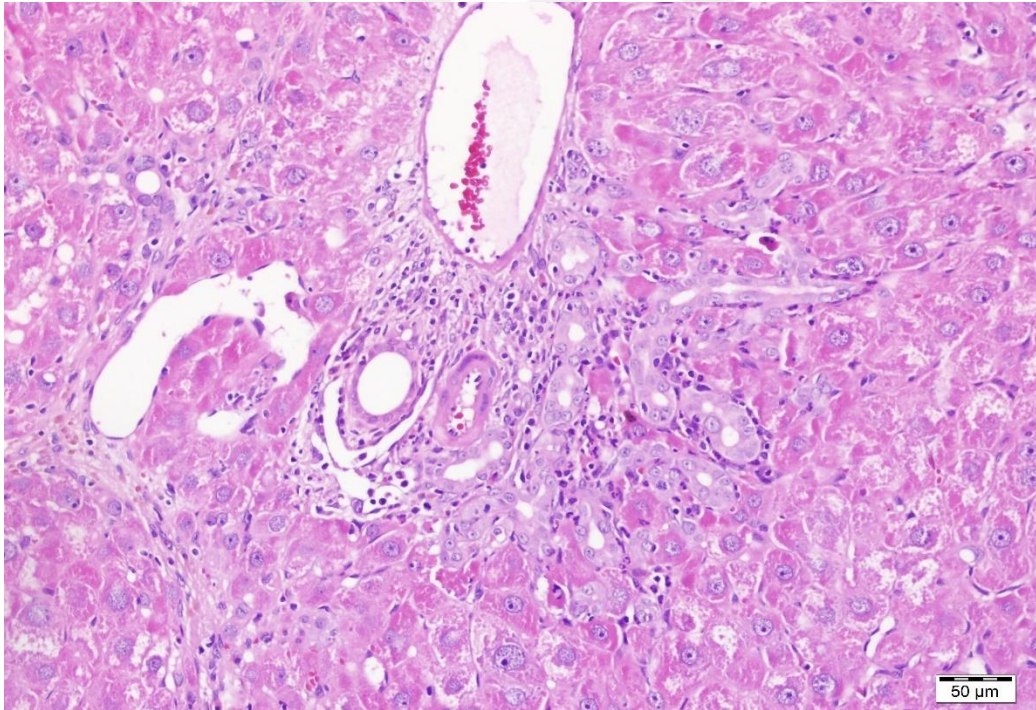
Bu süre sonunda kesilen hayvanlarda hem hücre sitoplazmasının hemde çekirdeklerinin büyümesiyle karakterize, III. ve IV. gruplarda şiddetli yaygın bir megalositoz saptanan en önemli bulgu idi (Şekil 11). Tüm deneme gruplarında özellikle III. ve IV. gruptaki ratlarda şiddetli safra kanalı proliferasyonu gözlemlendi (Şekil 12). Aynı zamanda bu bulguyla birlikte III. ve IV. gruptaki ratlarda da görülen post nekrotik fibrozis (Şekil 13) ve hafif-orta şiddette seyreden kapsüler fibrozis gözlemlendi. Nekrotik alanlara yakın bölgelerde mononükleer hücre infiltrasyonları dikkati çekti (Şekil 14). Bunun yanı sıra hepatositlerde yağ dejenerasyonu gözlemlendi (Şekil 15). En yüksek doz grubundaki hayvanlarda nadiren hepatositlerde intranükleer inklüzyon cisimciği görüldü.

**Tablo 10. Karaciğerdeki histopatolojik bulguların 6. hafta sonu semikalitatif değerlendirmesi**

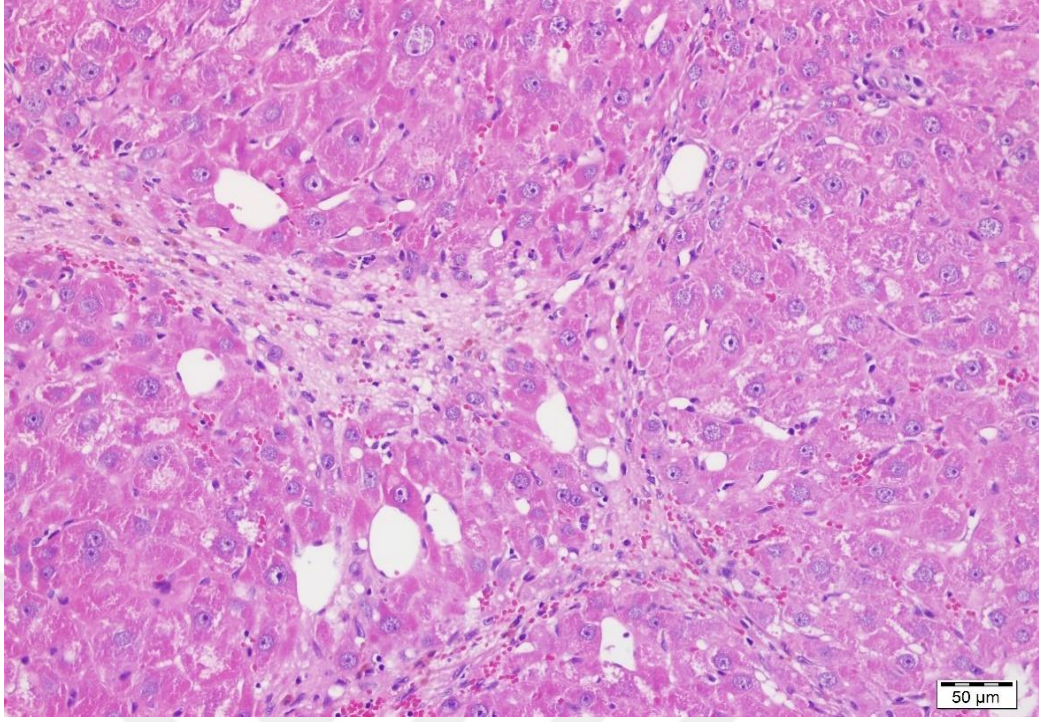
	Safra kanal proliferasyonu	Yağ Dejenerasyonu	Post-nekrotik fibrozis	Kapsüler fibrozis	Yangısal Hücre İnfiltrasyonu	Megalositoz
I. grup	0	0	0	0	0	1
II. grup	1	1	1	1	1	3
III. grup	3	1	3	2	2	4
IV. grup	4	1	5	3	2	5
V. grup	0	0	0	0	0	0



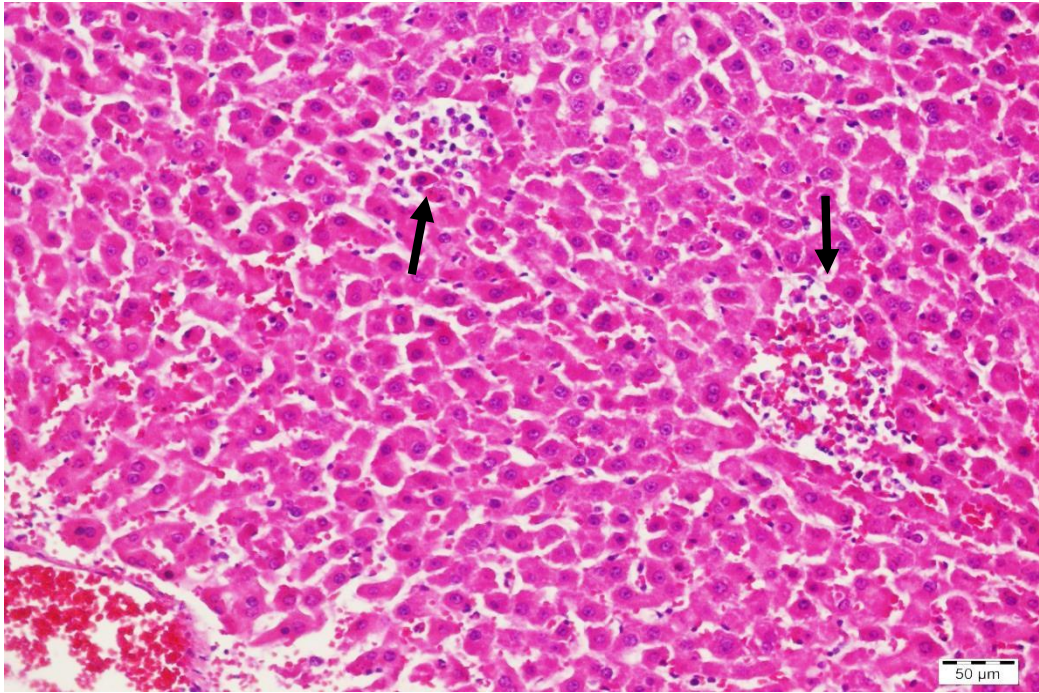
**Şekil 11. Karaciğerde yaygın megalositozis, oklar, 6. hafta sonu (IV. grup) HE**



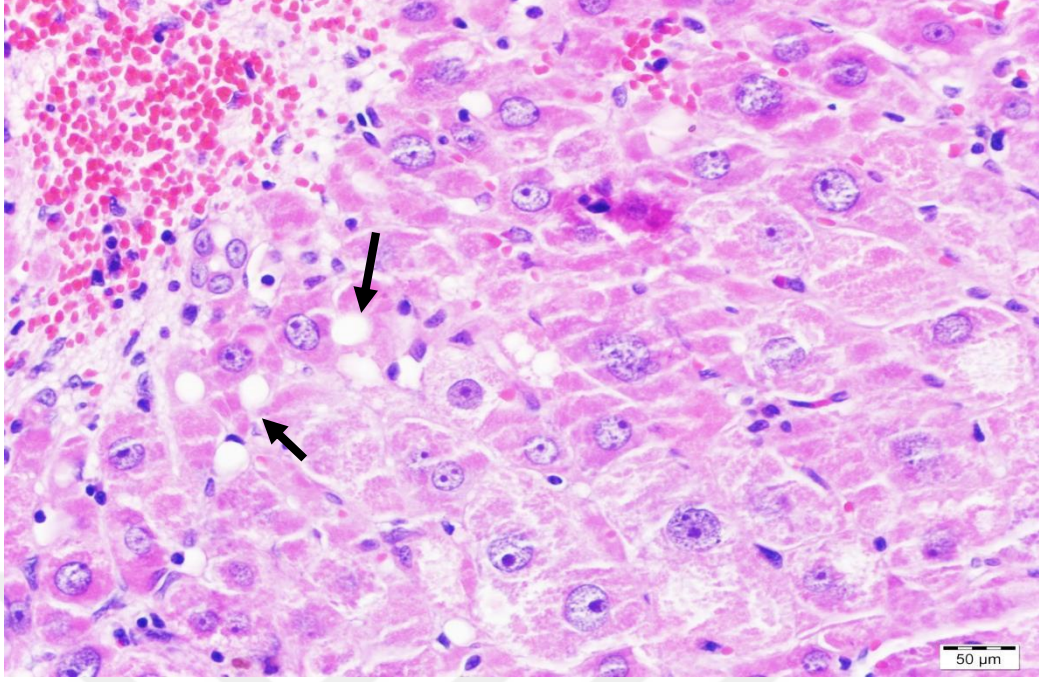
**Şekil 12. Karaciğerde safra kanalı proliferasyonu 6. hafta sonu (IV. grup) HE**



**Şekil 13. Karaciğerde post nekrotik fibrosiz 6. hafta sonu (IV. grup) HE**



**Şekil 14. Karaciğerde focal mononuklear hücre infiltrasyonları, oklar, 6. hafta sonu (IV. grup) HE**



**Şekil 15. Karaciğerde yağ dejenerasyonu, oklar, 6. hafta sonu (IV. grup) HE**

### **5.5.3. Karaciğer Dışındaki Diğer Organlarda Görülen Mikroskopik**

#### **Bulgular:**

Böbreklerde şiddeti gruplar arasında farklılık göstermekle birlikte intertubuler alanlardaki damarlarda şiddetli konjesyon gözlemlendi. Tubulus epitel hücrelerinde yaygın nekrotik değişikliklerle birlikte hücrelerde hidropik dejenerasyon mevcuttu. Dördüncü grupta gerek ölen, gerekse deneme sonunda ötenazi edilen hayvanlarda intertubuler kanamalar oldukça yaygındı.

Kalp'te miyokarda konjesyon ve kanama dikkati çeken ilk bulgular idi. İntertisyel ödemin varlığıyla, kas fibrinlerinde ayrışmalar gözlemlendi. Bu fibrillerde nekrotik değişiklikler mevcuttu. Ayrıca miyofibrinler arasında mononükleer hücre infiltrasyonları ve endokardial fibrozis görüldü.

Bağırsaklarda villüslerin epitel tabakasında dökülme, propria ve submukozada yaygın kanamalar mevcut idi. Kript epitellerinde nekrotik değişiklikler ve yaygın şiddetli vakuoller dejenerasyon dikkati çekti.

Dalakta venüllerde yaygın konjesyon gözlemlendi. Lenf foliküllerinde aşırı damarlaşma ile birlikte fibröz bağ doku artışı dikkati çekti.

Akciğerlerde en yaygın bulgu şiddetli konjesyondur. İnteralveoller septumunda kalınlaşma ve alveoller ödem gözlemlendi. Bazı damarlar çevresinde şiddetli kanamalar ve bu bölgedeki damarlarda trombozların varlığı saptandı. Ayrıca arterlerde kas hipertrofisi ve kapillar damar endotel hücrelerinde zedelenme dikkati çekti.

Testislerde testikuler dejenerasyon, interstisyel ödem, konjesyon ve intertubuler dev hücre formasyonu görüldü. Deneme gruplarından III. grupta 18. saatte ötenazi edilen hayvanlarda 6. hafta sonunda ötenazi edilen hayvanlara göre şiddetli testikuler dejenerasyon görüldü. Dördüncü grupta 18. saat sonunu hem 6. hafta sonu hem de diğer deneme gruplarına göre daha şiddetli testiküler dejenerasyon görüldü.

Gerek ölen gerekse deneme sonunda ötenazi edilen hayvanlarda alınan diğer organlarda ve kontrol grubu hayvanların organlarında patolojik değişikliklere rastlanmadı.

## 5.6.Biyokimyasal Bulgular

### 5.6.1.Enzim Düzeyleri

Deneme gruplarına ait serum ALT, AST, GGT, direk bilirubin, total protein ve ürenin 18. saat ve 6. hafta sonundaki düzeyleri ilgili tablolar ile sunuldu.

Yapılan çalışmanın sonunda deneme grupları arasında ALT değerleri incelendiğinde; en düşük ALT değerine sahip grubun V.grup (kontrol ) olduğu, diğer deneme gruplarının ( I., II., III., IV. grup) ALT seviyelerinin V. gruba göre yüksek olduğu gözlemlendi. En yüksek ALT değerinin en yüksek doza sahip olan IV. grupta bulunduğu görüldü (Tablo 11). Aynı zamanda IV. grubun I. ve II. gruptan daha yüksek ALT değerine sahip olduğu diğer deneme grupları arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılığın bulunmadığı görüldü ( $P<0.001$ ).

Grupların 18. saat sonundaki AST değerleri incelendiğinde; gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark görülmüştür ( $P<0.001$ ). Bu farklılık V.gruba (kontrol) göre III. grup ve IV. grupta AST seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı artışı şeklinde gözlemlenmiştir (Şekil 6).

GGT, direk bilirubin ve üre değerlerinde istatistiksel olarak önemli bir fark görülmemiştir.

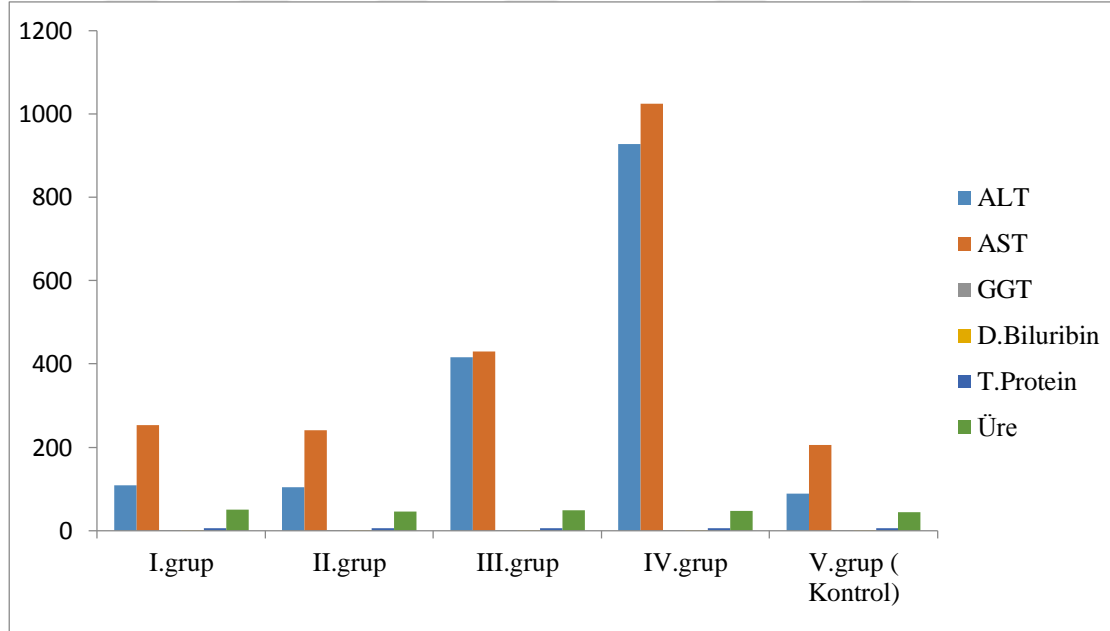
Grupların 18. saat sonundaki total protein değerleri incelendiğinde; gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark görülmüştür ( $P<0.001$ ). En düşük total protein değerinin IV. grupta (200 mg/kg) olduğu görüldü. İstatistiksel olarak

anlamlılık sadece V. grup (kontrol) ile IV. grup arasında gözlenmiştir. Diğer gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir.

**Tablo 11. Grupların 18. saat sonu biyokimyasal enzim değerleri**

Biyokimyasal Değerler	I. grup (50mg/kg) X±SX	II. grup (100mg/kg) X±SX	III. grup (150mg/kg) X±SX	IV. grup (200mg/kg) X±SX	V. grup (Kontrol) X±SX	P
ALT	108,50±40,05 <sup>b</sup>	103,83±31,36 <sup>b</sup>	415,83±298,72 <sup>ab</sup>	926,83±685,08 <sup>a</sup>	88,33±5,35 <sup>c</sup>	**
AST	252,83±47,39 <sup>c</sup>	241,16±30,40 <sup>c</sup>	430,33±184,53 <sup>b</sup>	1023,83±687,84 <sup>a</sup>	205,16±27,42 <sup>c</sup>	**
GGT	1,50±0,54	1,00±0,00	1,00±0,00	1,00±0,40	1,00±0,51	ÖD
D.Bilirubin	0,10±0,00	0,10±0,00	0,10±0,00	0,10±0,00	0,10±0,00	ÖD
T.Protein	6,23±0,45 <sup>a</sup>	6,11±0,40 <sup>a</sup>	5,90±0,23 <sup>ab</sup>	5,40±0,25 <sup>c</sup>	5,66±0,175 <sup>ab</sup>	*
Üre	50,00±3,84	45,66±3,20	49,50±5,95	47,50±2,16	44,16±2,71	ÖD

\*: P<0.01    \*\*: P<0.001    ÖD: Önemli Değil  
a,b,c: Farklı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar önemlidir.



**Şekil 16. 18. saat sonu grupların enzim düzeyleri**

ALT, AST, total protein değerlerinde 6. hafta sonunda istatistiksel olarak önemli bir fark görülmemiştir (Tablo 12), (Şekil 17).

Grupların 6. hafta sonundaki GGT değerleri incelendiğinde; gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark görülmüştür ( $P<0.001$ ). III. ve IV. grubun GGT değerlerinin, V. gruba (kontrol) göre anlamlı derecede yüksek değerlere sahip olduğu gözlemlendi. En yüksek GGT değeri III. grupta gözlenmesine rağmen, IV. grup ile kıyaslandığında istatistiksel anlamlılık görülmemiştir.

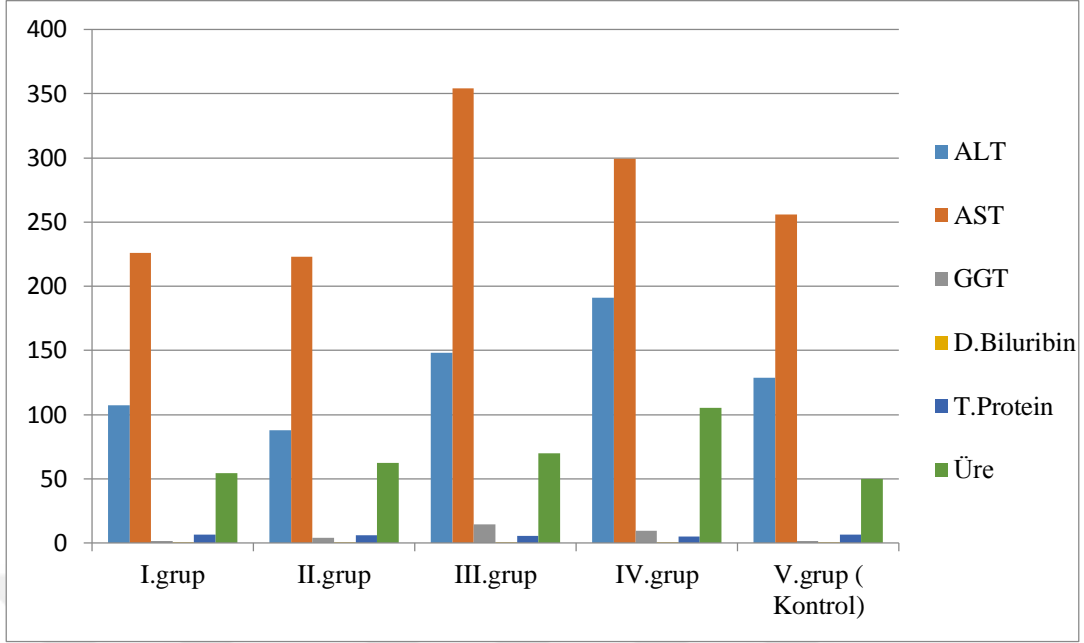
6. hafta sonunda direk bilirubin ve üre değerleri incelendiğinde; III.grup ve IV.gruba ait direk bilirubin ve üre değerlerinin en yüksek iki grup olarak gözlemlendi. Bu yükseklik diğer gruplarla (I., II., V.(kontrol)) kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu. En yüksek değere sahip IV. grup ile III. grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $P<0.001$ ).

**Tablo 12. Grupların 6. hafta sonu biyokimyasal enzim değerleri**

Biyokimyasal Değerler	I. grup (50mg/kg) X±SX	II. grup (100mg/kg) X±SX	III. grup (150mg/kg) X±SX	IV. grup (200mg/kg) X±SX	V. grup (Kontrol) X±SX	P
ALT	107,37±66,64	87,75±9,42	148,00±79,68	191,00±157,77	128,60±142,85	ÖD
AST	226,12±36,34	223,25±27,32	354,33±212,45	299,33±174,13	256,10±182,85	ÖD
GGT	1,75±1,38 <sup>a</sup>	4,25±5,25	14,33±11,01 <sup>b</sup>	9,33±8,38 <sup>b</sup>	1,80±0,78 <sup>a</sup>	*
D.Bilirubin	0,03±0,04 <sup>a</sup>	0,05±0,05	0,26±0,20 <sup>b</sup>	0,53±0,75 <sup>b</sup>	0,01±0,00 <sup>a</sup>	**
T.Protein	6,31±0,12	5,96±0,47	5,60±0,40	5,13±1,00	6,33±0,25	ÖD
Üre	54,50±6,30 <sup>a</sup>	62,50±20,43	69,66±9,60 <sup>b</sup>	105,33±45,70 <sup>b</sup>	49,80±3,58 <sup>a</sup>	*

\*:  $P<0.01$  \*\*:  $P<0.001$  ÖD: Önemli Değil

a,b: Farklı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar önemlidir.



**Şekil 17. 6. hafta sonu grupların enzim düzeyleri**

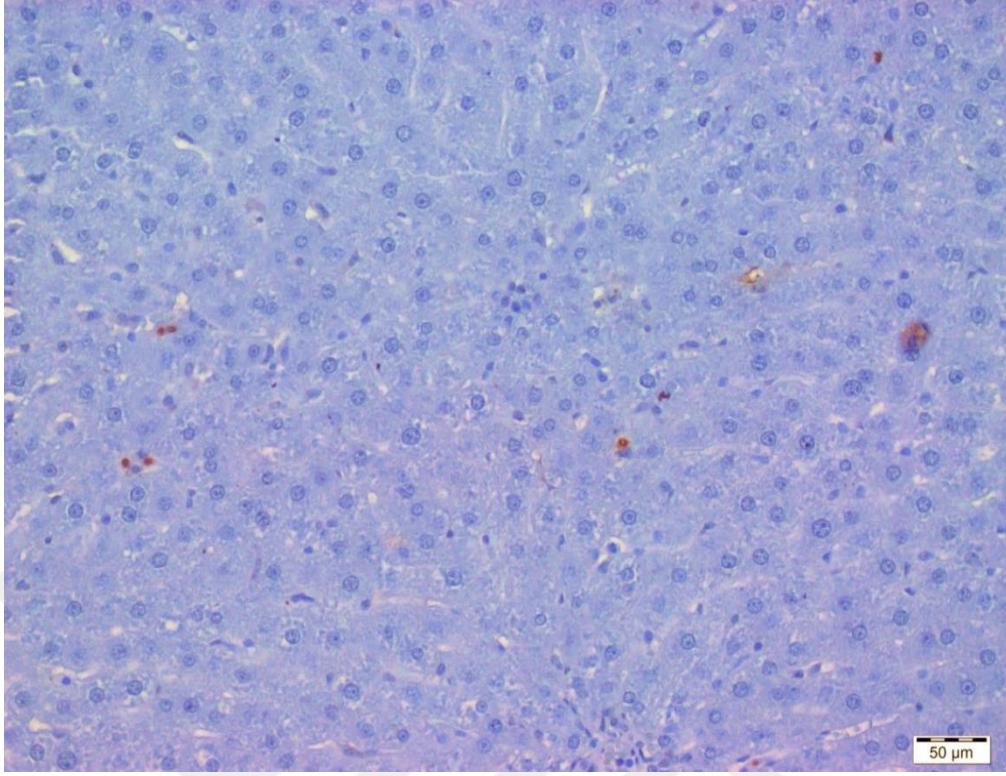
### 5.7. İmmunohistokimyasal Bulgular

**TUNEL** boyamalarında, 50 mg/kg, 100 mg/kg, 150 mg/kg, 200 mg/kg uygulanan gruplarda ilk 18. saat sonunda ötenazi edilen hayvanların karaciğerinde hepatositlerin çekirdeklerinde doza bağlı olarak şiddeti artan pozitif boyamalar dikkati çekti (Şekil 18). Altıncı hafta sonunda ötenazi edilen tüm gruplarda verilen dozlara paralel olarak pozitif boyamanın şiddetinde 18. saat'te göre azalma dikkati çekti (Şekil 19).

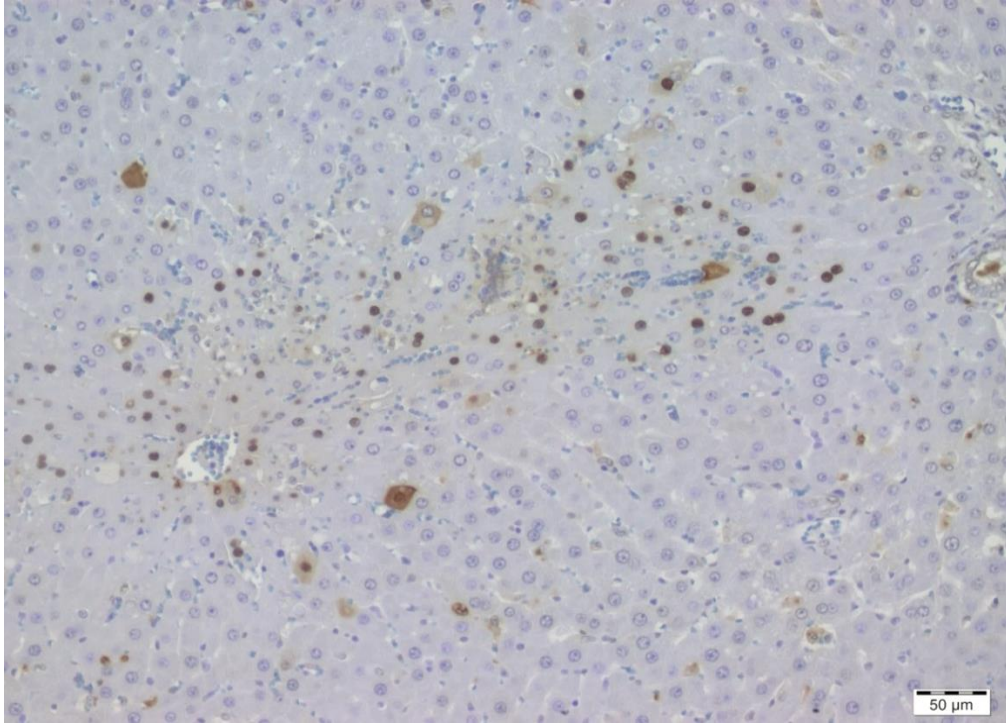
**Bax** immun boyamalarında, deneme gruplarına verilen doza (50 mg/kg, 100 mg/kg, 150 mg/kg ve 200 mg/kg) paralel olarak 18. saat sonunda ötenazi edilen hayvanların karaciğer hepatositlerinin sitoplazmaları şiddetli pozitif olarak boyandığı görüldü (Şekil 20). Altıncı hafta sonunda ise hepatositlerin hafif şiddette boyandığı görüldü (Şekil 21).

**Bcl-2** immun boyamalarında, deneme gruplarına verilen doza (50 mg/kg, 100 mg/kg, 150 mg/kg ve 200 mg/kg) paralel olarak 18. saat sonunda karaciğerlerin hepatositlerin sitoplazmaları hafif pozitif olarak boyandığı, 6. hafta sonunda 200 mg/kg uygulanan hayvanlarda hepatositlerde çok şiddetli pozitif boyama, diğer gruplarda ise 200 mg/kg doz uygulanan gruptaki hayvanlara nazaran boyamanın şiddetinde bir azalma gözlemlendi (Şekil 22-23).

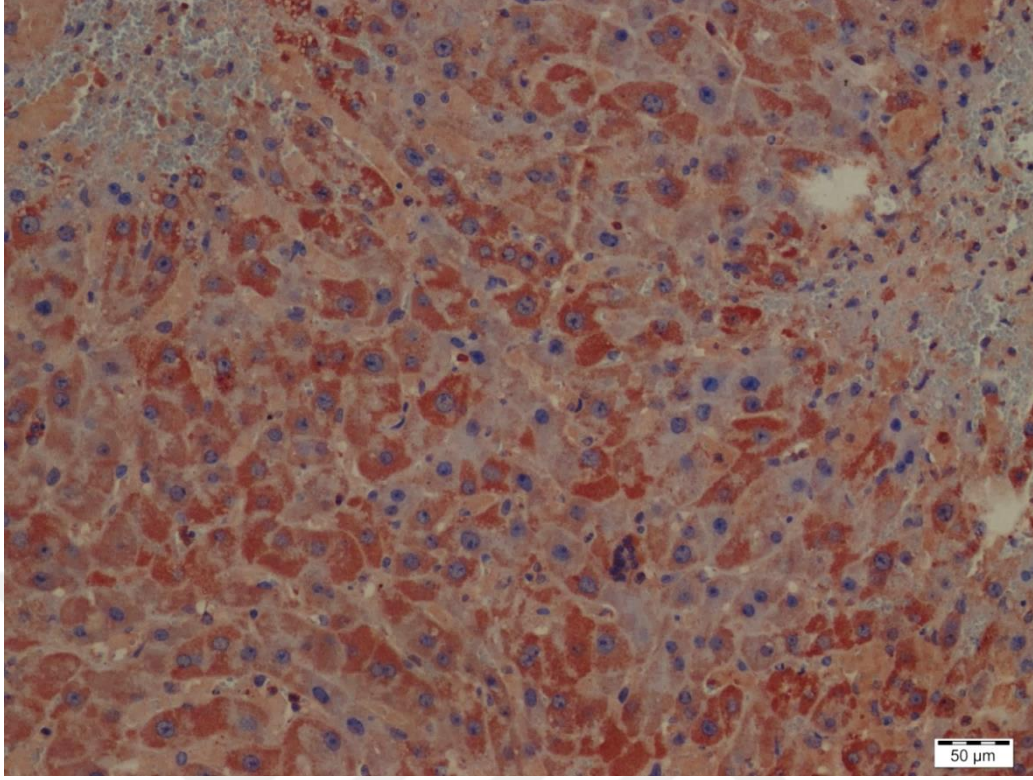
**PCNA** immun boyamalarında, 18. saatte kesilen tüm gruplardaki hayvanların karaciğer hepatositlerinin çekirdeklerinde birbirlerinden farklı olmayan hafif şiddetli bir boyama gözlemlendi (Şekil 24). Altıncı hafta sonunda ötenazi edilen hayvanlarda ise verilen doza bağlı olarak şiddeti artan pozitif boyama tespit edilen bulgulardı (Şekil 25).



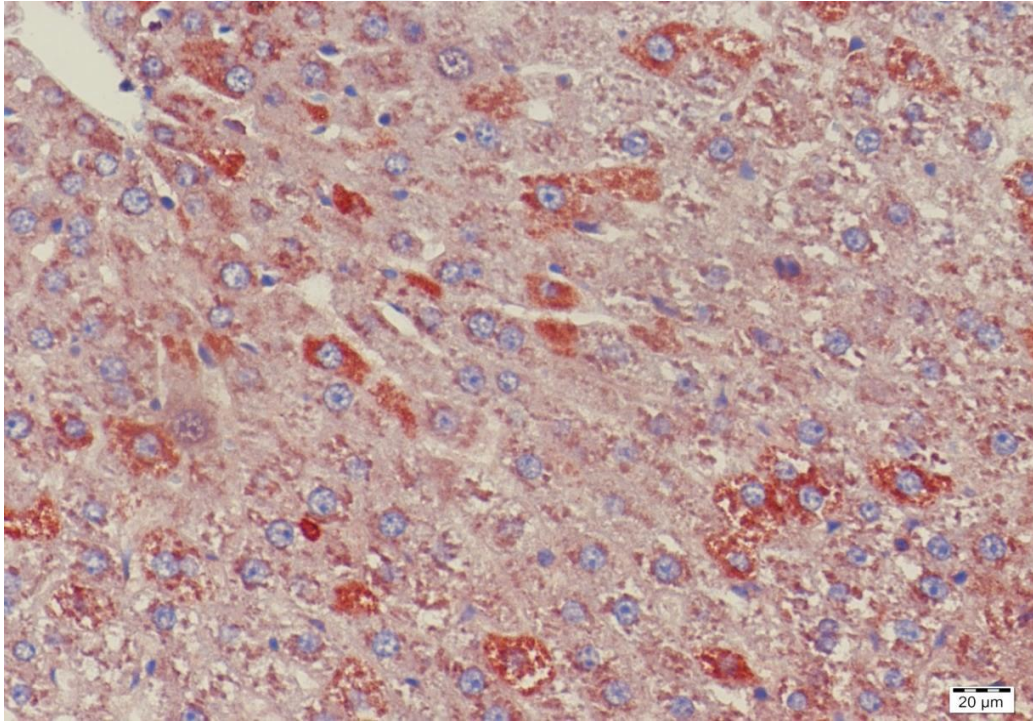
**Şekil 18. Karaciğerde TUNEL pozitif boyama gösteren hepatositler, 18. saat sonu (I.grup), Mayer hemotoksilen ile zit boyama**



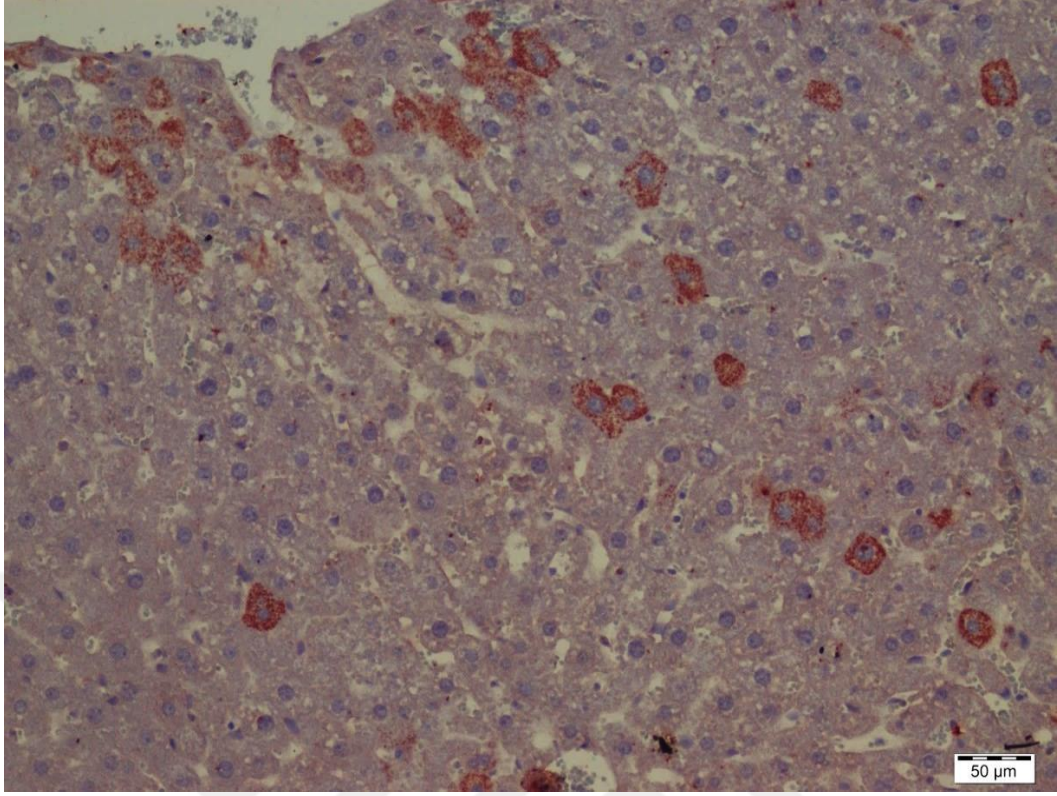
**Şekil 19. Karaciğerde TUNEL pozitif boyama gösteren hepatositler, 18. saat sonu (IV. grup), Mayer hemotoksilen ile zit boyama**



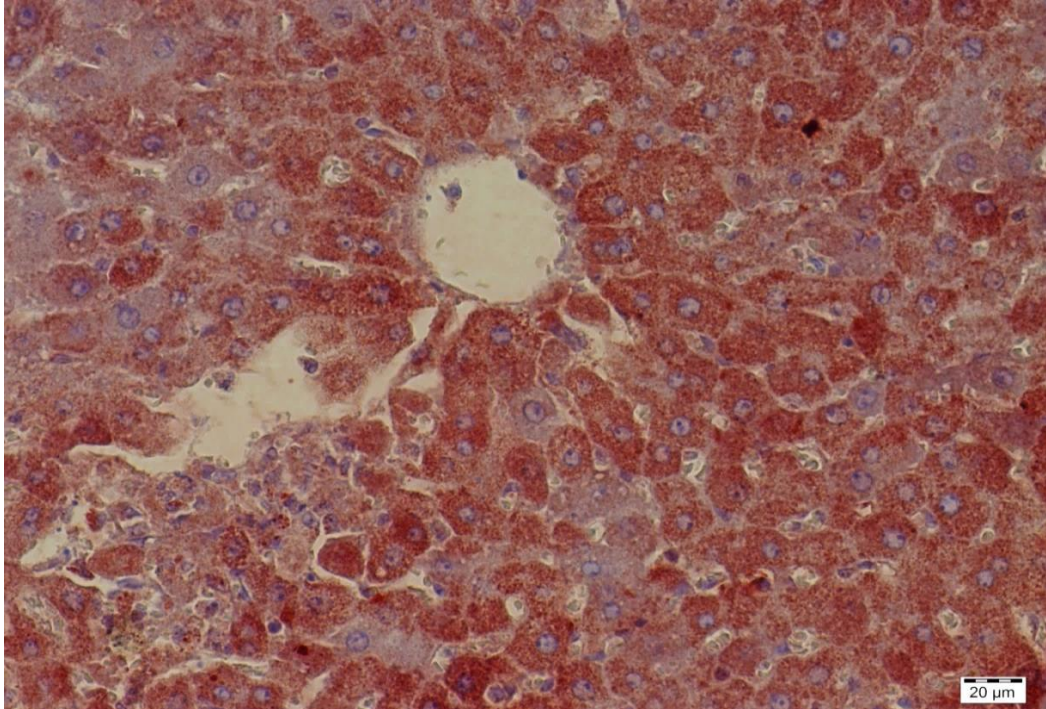
**Şekil 20. Karaciğerde Bax pozitif boyama gösteren hepatositler, 18. saat sonu (IV. grup), IHC**



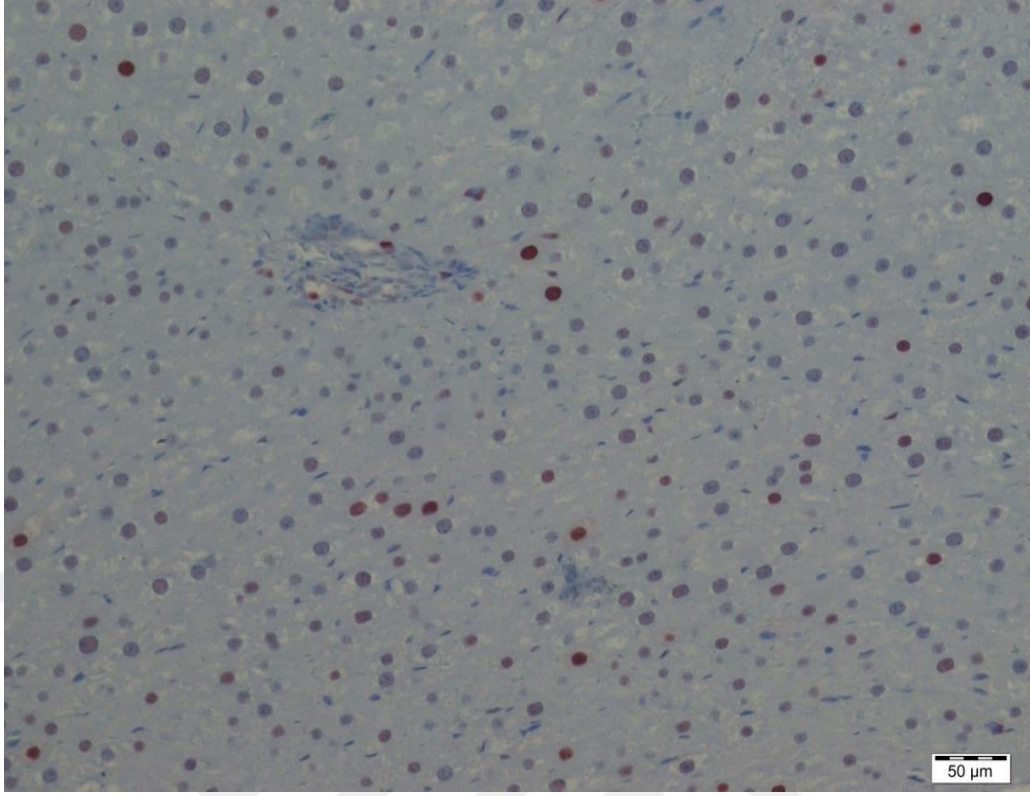
**Şekil 21. Karaciğerde Bax pozitif boyama gösteren hepatositler, 6. hafta sonu (II. grup), IHC**



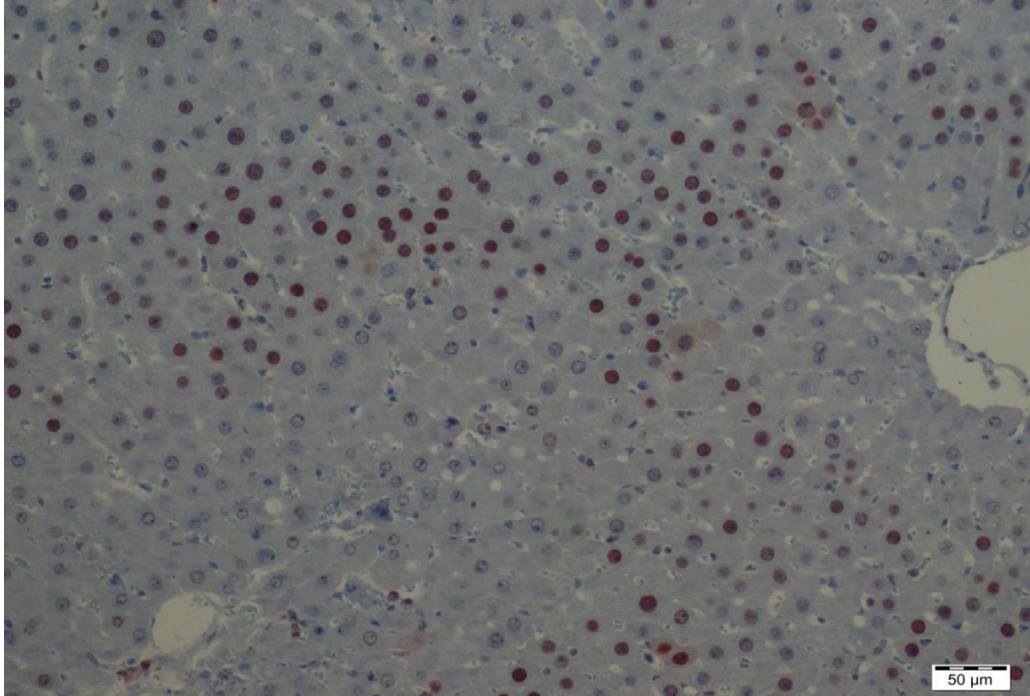
**Şekil 22. Karaciğerde Bcl-2 pozitif boyama gösteren hepatositler, 18. saat sonu (IV. grup), IHC**



**Şekil 23. Karaciğerde Bcl-2 pozitif boyama gösteren hepatositler, 6. hafta sonu (II. grup), IHC**



**Şekil 24. Karaciğerde PCNA pozitif boyama gösteren hepatositler, 18. saat sonu (IV. grup), IHC**



**Şekil 25. Karaciğerde PCNA pozitif boyama gösteren hepatositler, 18. saat sonu (I. grup), IHC**

## 6. TARTIŞMA

Pirolizidin Alkaloid'lerinden (PA) olan ve yaygın model olarak da kullanılan monocrotalin, *Crotalaria spectabilis* bitkisinden elde edilen 11 üyeli makrosiklik bir PA'dir (17).

Bu çalışmada 50 mg/kg,100 mg/kg,150 mg/kg, 200 mg/kg monocrotalin içeren dozlarda i.p. olarak yapılan enjeksiyon denemesinde, ratlarda gözlenen; makroskobik, mikroskobik, immunohistokimyasal ve biyokimyasal bulgular ortaya konulmuştur.

Çalışmada ratlarda gözlenen ( özellikle III. ve IV. gruplar) kilo kaybı, yeme karşı ilgisizlik, yürümede zorluk, duyarsızlık ve halsizlik, bazı hayvanlarda yapılan çalışmalarda (5, 20, 26, 45, 80) deneysel olarak kronik PA toksikasyonların genel bulguları olarak ta bildirilmiştir. Kilo kaybı, yem tüketiminin az olması, karaciğerde ki hepatotoksisiteye bağlı olarak protein ve karbonhidrat sentezindeki bozulmayla ilişkilendirilebilir.

Çalışmada ortaya konulan makroskobik bulgulardan asites, karaciğerde aşırı konjesion, kıvamında yumuşama, kenarlarında kütleşme, hindistan cevizi görünüm, viseral lopta milier tarzda boz beyaz renkli odaklar, bağırsak mukozasında yaygın ve orta şiddette konjesion, hidrotraks, akciğerde ödem ve konjesion gibi bulgular daha önce bu konularda yapılan çalışmalarda (26-28, 42, 43, 49) gözlenen bulgular ile paralellik göstermiştir.

Farelerde yapılan monocrotalin toksikasyonlarında ilk olarak megalositozis tespit edilmiştir (36, 44). Sitoplazma ve çekirdeğin büyümesi olarak tanımlanan megalositozis, tüm hayvan türlerinde PA toksikasyonu için spesifik bir bulgu olarak değerlendirilmiştir (18, 26, 36, 44). Bu çalışmada da kontrol grubu

hariç tüm deneme gruplarında 6. hafta sonunda ötanazi edilen ratlarda megalositozis saptanmıştır. Megalositik lezyonların derecesi hafif, orta ya da şiddetli olduğu görülmüştür. Bu farklılıklar gruplara verilen monocrotalin miktarıyla paralel seyretmiştir. Lezyonlar I. grupta hafif, II. grup da orta, III. ve IV. grupta şiddetli olduğu, III. ve IV. gruplardaki hayvanların dejenere ve nekroze olan hepatositler yerini post-nekrotik fibrotik değişikliklere bıraktığı izlenmiştir. Bu durum kronik toksikasyon olarak değerlendirilmiştir. Bununla birlikte bazı çalışmalarda gözlenen (27, 28, 43) karaciğerde safra kanalı proliferasyonu, sinozoidal konjesyon, parankim dejenerasyonu ve nekroz, mononükleer hücre infiltrasyonları bu çalışmada gözlenmiştir.

Yapılan bu çalışmada akciğerlerde en yaygın bulgu şiddetli konjesyon, interalveoller septumda kalınlaşma ve alveoller ödem olarak ortaya konuldu. Bunun yanısıra şiddetli kanamalar ve bu bölgedeki damarlarda belirgin trombozların varlığı saptandı. Ayrıca arterlerde kas hipertrofisi ve kapillar damar endotel hücrelerinde zedelenmeler birçok çalışma (9, 11, 15, 22) ile benzer bulgulardı.

PA'lerinde monocrotalin başta olmak üzere akciğer lezyonlarına bağlı olarak kalpte bazı değişiklikleri tetiklediği bilinmektedir (22, 40). Monocrotalin ile yapılan çalışmalar da, kalpteki sağ ventriküler hipertrofinin, akciğer hipertansiyonun bir sonucu olarak meydana geldiği sonucuna varılmıştır (40, 47). Ayrıca kalpde dejenerasyon, mononükleer hücre infiltrasyonu ve endokardial fibrozisin meydana geldiği ortaya konulmuştur (21, 22, 40). Yapılan çalışmada ortaya konulan kalpteki bulguları (şiddetli doza bağlı olarak değişen ) bu çalışmalar ile desteklenmiştir.

Bu çalışma ile böbreklerde şiddeti gruplar arasında farklılık gösteren intertubuler alanlardaki damarlarda şiddetli konjesyon, tubulus epitel hücrelerinde yaygın nekrotik değişiklikler, hidropik dejenerasyon intertubuler kanamalar bir çok çalışmada (11, 15, 26 ) görülen bulgularla paralellik göstermiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada elde edilen bulgulara göre monocrotalin doz ve süreye bağlı olarak farklı organ ve dokularda farklı etkiler göstermiştir. Apoptotik değişimlerin inokulasyon sonrası ilk 18. saat sonunda en yüksek değere ulaştığı TUNEL ve Bax boyamaları ile ortaya konulmuştur. Altıncı hafta sonunda apoptotik hücrelerde azalmanın olduğu ise PCNA ve Bcl-2 boyamalarıyla ortaya konuldu. Altıncı hafta sonundaki PCNA boyamalarındaki artış, değişikliğe uğramayan hepatositlerde rejenerasyon işleminin devam etmesiyle açıklanabilir. Kronik toksikasyonlarda apoptozisin azalmasının yanı sıra, bazı hücrelerde ( verilen doza bağlı olarak artan) anti-mitotik etkinin baskılandığı ve megalositosizin oluşmasına yol açtığı sonucuna varılmıştır.

Ratlara intraperitoneal olarak 50 mg/kg (I. grup), 100 mg/kg (II. grup), 150mg/kg (III. grup), 200 mg/kg (IV. grup) dozlarında verilen monocrotalin akut ve kronik olarak karaciğer dokusunda histopatolojik ve apoptotik değişikliklere neden olduğu, kanaatine varılmıştır.

## 7. KAYNAKLAR

1. Stegelmeir BL, Edgar JA, Colegate SM, Gardner DR, Schoch TK, Coulombe RA, Molyneux R J. Pyrrolizidine alkaloid plants, metabolism and toxicity. *J Nat Toxins* 1999; 8: 95-115
2. Jago MV. The development of the hepatic megalocytosis of chronic pyrrolizidine alkaloid poisoning. *Am J Pathol* 1969; 56: 405-422
3. Mattocks AR. Toxicity of pyrrolizidine alkaloids. *Nature* 1968; 217: 723-728
4. Baker DC, Pfister JA, Molyneux R J, Kechele P. *Cynoglossum officinale* toxicity in calves *J Comp Pathol* 1991; 104: 403-410
5. Honório JE Jr, Vasconcelos GS, Rodrigues FT, Sena Filho JG, Barbosa-Filho JM, Aguiar CC, Leal LK, Soares PM, Woods DJ, Fonteles MM, Vasconcelos SM. Monocrotaline: histological damage and oxidant activity in brain areas of mice. *Oxid Med Cell Longev* 697541. 2012; doi:10.1155/2012/697541
6. Copple BL, Ganey PE, Roth RA. Liver inflammation during monocrotaline hepatotoxicity. *Toxicol Sci* 2003; 190(3): 155-69.
7. Chesney CF, Allen JR. Endocardial fibrosis associated with monocrotaline induced pulmonary hypertension in non-human primates ( *Macaca arctoides*) *Am J Vet Res* 1973; 34: 1577-1581
8. Bryan L. Copple, Amy Banes, Patricia E. Ganey Robert A. Roth. Endothelial Cell Injury and Fibrin Deposition in Rat Liver after Monocrotaline Exposure. *Toxicological Sciences* 2002; 65: 309-318
9. McLean EK. The toxic actions of pyrrolizidine (Scenio)alkaloids. *Pharmacol Rev* 1970; 22: 429-484
10. Roger A. Coulombe JR. Pyrrolizidine Alkaloids in Foods. Graduate Program in Toxicology and Department of Veterinary Sciences Utah State University
11. Anonim. IPCS International Program of Chemical Society: Criteria 80, Pyrrolizidine alkaloids, World Health Organisation, Geneva, 1988.
12. Cheeke PR. A review of the functional and evolutionary roles of the liver in the detoxification of poisonous plants, with special reference to pyrrolizidine alkaloids. *Vet Hum Toxicol* 1994; 36: 240-247
13. Cheeke PR, Pierson-Goerger ML. Toxicity of *Senecio jacobaea* and pyrrolizidine alkaloids in various laboratory animals and avian species. *Toxicol Lett* 1983; 18: 343-349
14. Stewart MJ, Steenkamp V. Pyrrolizidine poisoning: a neglected area in human toxicology. *Ther Drug Moint. Dec* 2001; 23(6): 698-708
15. Huxtable RJ. Activation and pulmonary toxicity of pyrrolizidine alkaloids. *Pharmacol Ther* 1990; 47: 371-389
16. Mattocks AR. Chemistry and toxicology of pyrrolizidine alkaloids. Academic Press, London, New-York, 1986.
17. Anonim. ANZFA Pyrrolizidine alkaloids in food. A Toxicological Review and Risk Assessment Technical Report Series 2001; No:2
18. Peter Pf, Qingsu X, Ge L, Ming WC. Pyrrolizidine alkaloids-genotoxicity, metabolism enzymes, metabolic activation, and mechanisms. *Drug Metab Rev* 2004; 36:1-55
19. Prakash AS, Pereira TN, Reilly PEB, Seawright AA Pyrrolizidine alkaloids in human diet. *Mut Res* 1999; 443: 53-67.
20. Nolan JP, Scheig RL, Klatskin G. Delayed hepatitis and cirrhosis in weanling rats following a single small dose of the *Senecio* alkaloid, lasiocarpine. *Am J Pathol* 1966; 49: 129-151
21. Cheeke PR, Garman GR. Toxicity and metabolism of pyrrolizidine alkaloids. *J Anim Sci* 1988; 66: 2343-2350.
22. Jones RT, Drummond GR, Chatham RO. *Heliotropium europaeum* poisoning of pigs. *Aust Vet J* 1981; 57: 396
23. Prakash AS, Pereria TN, Reilly PEB, Seawright AA. Pyrrolizidine alkaloids in human diet. *Mut. Res* 1999; 443:53-67
24. Wilson DW, Segall HJ, Pan LC, Lame MW ve ark. Mechanisms and pathology of monocrotaline pulmonary toxicity. *Critical Reviews in Toxicology*. 1992 22(5/6):307- 325.
25. Anonim. IPCS International Program of Chemical Society: Criteria 80, Pyrrolizidine alkaloids, World Health Organisation, Geneva 1988.
26. Eröksüz Y, Eröksüz H, Özer H, Canatan H, Yaman I, Çevik A. Toxicity of dietary *Heliotropium dolosum* seed to broiler chickens. *Vet. Hum Toxicol* 2001; 43:334-338
27. Johnson AE. Changes in calves and rats consuming milk from cows fed chronic lethal doses of

- Senecio jacobea ( tansy ragwort). Am J Vet Res 1976;37:107-110
28. Milli ÜH, Hazıroğlu R. Veteriner Patoloji. 1. Cilt, Tamer Matbacılık Ankara. 1997; 151-176, 195-204
  29. Coulombe R A, Jr Drew GL, Stermitz FR. Pyrrolizidine alkaloids cross-link DNA with actin. Toxicol Appl Pharmacol 1999; 154:198-202
  30. Peterson JE, Effects of pyrrolizidine alkaloid lasiocarpine N-oxide on nuclear and cell division in the liver of rats. J. Pathol Bacteriol 1965; 89:153-171.
  31. Peterson JE, Samuel A, Jago MV. Pathological effects of dehydroheliotridine, a metabolite of heliotridine-based pyrrolizidine alkaloids, in young rats. J Pathol 1972;107:171-186
  32. Stewart MJ, Steenkamp V. Pyrrolizidine poisoning: A neglected area in human toxicology. Therap Drug Mon 2001;23:698-708
  33. Stegelmeier BL, Edgar JA, Colegatae SM, Grander DR, Schoch TK, Coulombe RA, Molyneux RJ. Pyrrolizidine alkaloid plants, metabolism and toxicity. J Nat Toxins 1999; 8:95-115.
  34. Afzelius BA, Scholental R. The ultrastructure of the enlarged hepatocyte induced in rats with a single oral dose of retrorsine, a pyrrolizidine (Senecio) alkaloid. J. Ultrastructure Research 1976;20:328-345
  35. Schoental R, Magee PN. Further observations on the subacute and chronic liver changes in rats after a single dose of various pyrrolizidine ( Seneco) alkaloids. J Pathol Bacteriol 1959;78: 471-483
  36. Bull LB, Dick AT. The chronic pathological effects on the liver of the rat of the pyrrolizidine alkaloids heliotrine, lasiocarpine, and their N-oxides. J. Pathol. Bacteriol 1959; 78:483-502
  37. Dickinson JO, Cooke MP, King RR, Mohamed PA. Milk transfer of pyrrolizidine alkaloids in cattle. JAVMA 1976; 169:1192-1196
  38. Geoger DE, Cheeke PR, Schmitz JA, Buhler DR. Effect of feeding milk from goats fed tansy ragwort (senecio jacobaea) to rats in calves. Am J. Vet Res 1982;43:1631-1633
  39. Howell McCJ, Deol HS, Dorling PR, Thomas JB. Experimental copper and Heliotropium intoxication in sheep: Morphological changes. J Comp Path 1991; 105:49-74
  40. Hayashi Y, Lalich JJ. Renal and pulmonary alterations induced by a single injection of monocrotaline. Proc Soc. Exp Biol Med 1967;124:392-396
  41. Johnson AE, Molyneux RJ, Stuart LD. Toxicity of riddell's groundsel (Senecio riddellii) to cattle. Am J Vet Res 1985; 46:577-582
  42. Barros CSL, Driemeier D, Pilati C, Barros SS and Castilhas LML. Senecio spp. Poisoning in cattle in Southern Brasil. Vet. Hum. Toxicol 1992; 34:241-246
  43. Braun U, Linggi T, Pospishil A. Ultrasonographic findings in three cows with chronic ragwort (senecio alpinus) poisoning. Vet. Rec. 1999;144:122-126
  44. Bull LB. The histologic evidence of liver damage from pyrrolizidine alkaloids. Aust Vet J 1955;31:33-42
  45. Ünver Ö. Ratlarda diyetel Heliotropium europaeum toksikasyonu üzerine patolojik incelemeler. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Entitüsü, Doktora Tezi, Elazığ. 2004
  46. Thorpe E, Ford EJ. Development of hepatic lesions in calves fed with ragwort (Senecio jacobea). J Comp Pathol 1968; 78:195-205
  47. Kay JM, Gillund TD, Health D. Mast cells in the lungs of rats fed on Crotalaria spectabilis seeds. Am J Pathol 1976;51:1031-1044
  48. Ketterer PJ, Glover PE, Smith LW. Blue heliotrope (Heliotropium amplexicaule) poisoning in cattle. Aust Vet J 1987;64:115-117
  49. Odriozola E, Compero C, Casaro A, Lopez T, Olivieriz G, Melucci O. Pyrrolizidine alkaloidosis in Argentina cattle caused by Senecio seloi. Vet Hum Toxicol 1994;36:205-208
  50. Ameisen J S. The origin of programmed cell death. Science 1996; 272: 1278
  51. Thompson C B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science 1995;267: 1456-1462
  52. Kiess W, Gallaher B. Hormonal control of programmed cell death apoptosis. Eur J Endocrin 1988;18: 482-491.
  53. Kerr J F R, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis. A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972; 26: 239-245
  54. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972;26: 239-57
  55. Öztürk F. Apoptoz. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2002; 9: 143- 8
  56. Sastry PS, Rao KS. Apoptosis and the nervous system. J Neurochem 2000;74: 1-20

- 57.Öktem S, Özhan MH, Özol D. Apoptozisin önemi. *Toraks Dergisi* 2001;2: 91-5
- 58.Bjelakovic G, Nagorni A, Bjelakovic M, Stamenkovic I, Arsic R, Katic V. Apoptosis: programmed cell death and its clinical implications. *Medicine and Biology* 2005;12: 6-11
- 59.Ergin M, Alkan S. Apoptozis. *Arsiv* 2002; 11: 495
- 60.Cummings MC, Winterford MC, Walker NI, eds. *Apoptosis, Vols. Second Edition: Lipincott-Raven Publishers. 1997; 3-21 pp.*
- 61.Meagher LC, Savill JS, Baker A, Fuller RW, Haslet C. Phagocytosis of apoptotic neutrophils does not induce macrophage release of thromboxane B2. *J Leukoc Biol* 1992;52: 269-73
- 62.Wyllie AH, Kerr JF, Macaskill IA, Currie AR. Adrenocortical cell deletion: the role of ACTH. *J Pathol* 1973;111: 85-94
- 63.Padosch SA, Vogel P, Bottiger BW. [Neuronal apoptosis following cerebral ischemia. Basis, physiopathology and treatment strategies]. *Anaesthetist* 2001;50: 905-20
- 64.Schandalik R, Gatti G, Perucca E. Pharmacokinetics of silybin in bile following administration of silipide and silymarin in cholecystectomy patients. *Arzneimittelforschung* 1992; 42: 964-8.
- 65.Agarwal R. Silybinin decreases prostate-specific antigen with cell growth inhibition via G1 arrest, leading to differentiation of prostate carcinoma cells: implications for prostate cancer intervention. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 7490-7495.
- 66.Goping IS, Gross A, Lavoie JN, et al. Regulated targeting of BAX to mitochondria *J Cell Biol* 1998;143: 207-15.
- 67.Oltvai ZN, Miliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, BAX, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74: 609- 19.
68. Kelman Z. PCNA: Structure, function and interactions. London, Review Oncogene Stockton Press, 1997; 14: 629-40.
- 69.Avunduk MC, Tavlı Ş, Yol S, Tavlı L, Yavuz A, Güngör S, Yılmaz O. Mide kansinomlarında hücre proliferasyon belirleyicisi olarak PCNA Ki-67 ve AgNOR kullanımı. *Ankara Üniversitesi Tıp Mecmuası. 2000; 53(1): 11-5.*
- 70.Özaydın T. Kuluçkada deneysel olarak oluşturulan ısı stresinin boylarlerde ince bağırsağın embriyonik gelişimi üzerindeki etkilerinin histokimyasal, immünohistokimyasal ve histometrik metotlarla belirlenmesi. *Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı, Doktora Tezi. 2009.*
- 71.Foley JF, Dietrich DR, Swenberg JA, Maronpot RR. Detection and evaluation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in rat tissue by an improved immunohistochemical procedure. *Journal of Histotech. 1991; 14(4): 237-41.*
- 72.Sağol Ö. Akciğer kanserlerinde heterojenite nöroendokrin ayırılma P53 proteini ve PCNA olumluluğunun tümör evresi ile ilişkisinin araştırılması. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi. Patoloji Ana Bilim Dalı, Uzmanlık Tezi. 1996.*
- 73.Loor G, Zhang SJ, Zhang P, Toomey NL, Lee MY. Identification of DNA replication and cell cycle proteins that interact with PCNA. *Nucleic Acids Research. 1997; 25(24): 5041-6.*
- 74.Wang L, Li J, Li O, Zhang J, Duan XL. Morphological changes of cell proliferation and apoptosis in rat jejunal mucosa at different ages. *World Journal of Gastroenterology. 2003; 9(9): 2060-4.*
- 75.Essers J, Theil AF, Baldeyron C, Cappellen VA, Houtsmuller AB, Kanar R, Vermeulen W. Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair. *Molecular and Cellular Bio. 2005; 25(21): 9350-69.*
- 76.Hall P, Levison D, Woods A. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol. 1990; 62: 285-94.*
- 77.Soyuer I, Canöz Ö, Er Ö, Deniz K, Soyuer S. Malign mezotelyomada proliferating nuclear cell antijen (PCNA) immünreaktivitesinin ve mitotik indeksin prognoza etkisi. *Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Derg. 2002; 24(3): 115-9.*
- 78.Maga G, Hübscher U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) a dancer with many partners. *Journal of Cell Sci. 2003; 116: 3051-60.*
- 79.Şen O, Kayaselçuk F, Zorludemir S, Aydın MV, Erdogan B. Meningiomlarda histopatolojik tanının flovsitometrik DNA analizi, PCNA ve KI-67 ile korelasyonu. *Türk Nöroşürürji Derg. 2002; 12: 48-53.*
80. Matsumoto K, Moriuchi T, Koji T, Nakane PK. Molecular cloning of c-DNA coding for rat proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin. *The Emb Journal. 1987; 6(3): 637-42*

## 8. ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında Pertek'te doğumdum. İlk ve orta öğretimi Elazığ'da tamamladım. Fırat Üniversitesi Veteriner fakültesinden 2001 yılında mezun oldum. İlaç sektöründe bir müddet çalıştıktan sonra 2011 yılında Bitlis Eren Üniversitesi Hizan Meslek Yüksekokulunda çalışmaya başladım. 2012 yılında Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Patoloji programında yüksek lisans eğitimime başladım ve halen devam etmekteyim.

