



**\*RATLARDA KARBON TETRAKLORÜR İLE OLUŞTURULAN KRONİK KARACİĞER HASARI ÜZERİNE NAR ÇEKİRDEĞİ YAĞININ ETKİSİ VE KASP AZ AKTİVİTESİ İLE HEPATİK APOPTOZİSİN BELİRLENMESİ  
THE EFFECTS OF POMEGRANATE SEED OIL ON CHRONIC LIVER DAMAGE INDUCED CARBON TETRACHLORIDE IN RATS AND DETERMINATION OF HEPATIC APOPTOSIS AND CASPASE ACTIVITY**

**Görkem EKEBAŞ<sup>1</sup>, Ayhan ATASEVER<sup>1</sup>, Meryem ŞENTÜRK<sup>2</sup>, Duygu YAMAN GRAM<sup>1</sup>, Meryem EREN<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Kayseri

<sup>2</sup>Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Kayseri

**ÖZ**

Bu çalışmada, karbon tetraklorür (CCl<sub>4</sub>) ile kronik karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda nar çekirdeği yağının (NÇY) karaciğer dokusunda oluşabilecek lezyonlar üzerine koruyucu etkisi ve biyokimyasal değerleri araştırılmıştır. Çalışmada 32 adet, her grupta 8 rat olmak üzere 4 gruba ayrıldı. İlk grup kontrol olarak belirlendi. İkinci gruba 12 hafta her gün 2 ml/kg dozunda NÇY gavaj ile verildi. Üçüncü gruba dilüe edilen 0.2 ml/kg iki doz CCl<sub>4</sub> her hafta 3 gün ara ile intraperitoneal olarak enjekte edildi. Dördüncü gruba 2 ml/kg dozunda NÇY 12 hafta her gün, gavaj ile verilirken her hafta 3 gün ara ile 2 doz CCl<sub>4</sub> uygulandı. Kontrol gruplarında normal karaciğer doku yapısı gözlenirken; CCl<sub>4</sub>+NÇY grubu hepatositlerde CCl<sub>4</sub> grubuna göre daha az yoğunlukta makro ve mikroveziküler yağ vakuelleri görüldü. NÇY uygulamalarında histopatolojik değişiklikler kısmen CCl<sub>4</sub> grubuna göre kısmen azalırken, kaspaz 3 ve 9 aktivitesi de sınırlı sayıda azaldı. Kronik olarak CCl<sub>4</sub> uygulanan gruplarda serum ALT aktivitesi ve karaciğer MDA düzeyleri önemli düzeyde artış gösterirken, NÇY uygulamaları istatistikte önemde etkilenmedi. Kronik CCl<sub>4</sub> ile NÇY verilen deney gruplarında karaciğer hasarı üzerinde biyokimyasal veriler ve histopatolojik lezyonlar üzerine iyileştirici yönden anlamlı bir etkisi gözlenmedi.

**ABSTRACT**

In this study, the protective effect, and biochemical values of pomegranate seed oil (PSO) on liver tissue lesions in rats with a chronic liver injury caused by carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) were investigated. Thirty-two rats were divided into 4 groups as 8 rats in each group. The first group was determined as control. The second group received PSO gavage at 2 ml/kg daily for 12 weeks. In the third group, 0.2 ml/kg two doses of CCl<sub>4</sub> were injected intraperitoneally at 3-day intervals in each week. The fourth group received PSO at 2 ml/kg daily by gavage for 12 weeks, while 2 doses CCl<sub>4</sub> at 3 days intervals in each week. While normal liver tissue structure was observed in the control groups; Macro and microvesicular fat vacuoles were less common in CCl<sub>4</sub>+PSO groups hepatocytes than CCl<sub>4</sub> group. In PSO applications, histopathological changes were partially decreased compared to the CCl<sub>4</sub> group, while caspase 3 and 9 activity decreased to a limited number. Serum ALT activity and liver MDA levels were significantly increased in the chronic CCl<sub>4</sub> treated groups, while PSO applications were not significantly affected. In the experimental groups treated with chronic CCl<sub>4</sub> with PSO, no significant effect was observed on biochemical data and histopathological lesions on liver damage.

**Anahtar kelimeler:** Histopatoloji, immunhistokimya, karbon tetraklorür, nar çekirdeği yağı, rat.

**Keywords:** Carbon tetrachloride, histopathology, immunohistochemistry, pomegranate seed oil, rat.

\*Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TDK-2016-6790 kodlu proje ile desteklenmiş ve doktora tezinden üretilmiştir.

Makale Geliş Tarihi : 24.12.2019

Makale Kabul Tarihi: 03.05.2020

**Corresponding Author:** Dr. Görkem EKEBAŞ, ORCID-ID: 0000-0001-9094-677X, Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye  
E-mail: gekebas@erciyes.edu.tr  
Prof. Dr. Ayhan ATASEVER ORCID-ID: 0000-0002-6327-1604,  
Dr. Öğr. Üyesi Meryem ŞENTÜRK ORCID-ID: 0000-0002-3763-8310,  
Dr. Öğr. Üyesi Duygu YAMAN GRAM ORCID-ID: 0000-0003-2404-0384,  
Prof. Dr. Meryem EREN ORCID-ID: 0000-0003-1339-0493.

## GİRİŞ

Ratlara karbon tetraklorür'ün akut veyakronik olarak uygulanmasında karaciğerindeki hepatositler üzerine granülsüz endoplazmik retikulumda bulunan sitokrom P450 enzim sistemi aracılığıyla toksik karakterde ara metabolitleri olan triklorometil ( $CCl_3$ ) ve triklorometil peroksil ( $CCl_3O_2$ ) serbest radikal metabolitlerine dönüşmesi ile bunların da hücre membranındaki doymuş yağ asitleri ile reaksiyona girerek lipid peroksidasyonu başlatmak veya protein ve yağlara bağlanarak hücre membranlarını bozmak suretiyle karaciğer hasarını oluşturduğu bildirilmektedir (1-4).

Lipid peroksidasyon sürecini yavaşlatan antioksidan içeriği fenolik maddelerden (flavonoidler, sinamik asit türevleri, kumarinler, tokoferoller ve fenolik asitler) oluşan bitkilerden; biberiye, adaçayı, kekik, keten tohumu yağı, sarımsak, zeytin yaprağı, nar çekirdeği ekstraktı ve yağı; karaciğer koruyucu etkilerinin belirlenmesi amacıyla hayvan modellerinde yapılan deneysel çalışmalar kullanılmaktadır (5-10).

Bu çalışmada, karbon tetraklorür ( $CCl_4$ ) ile kronik karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda nar çekirdeği yağı (*Punica granatum oleum*)'nın (NÇY) karaciğer dokusunda oluşabilecek lezyonlar üzerine mümkün olan koruyucu etkisi, hücresel apoptozun immunhistokimyasal yöntemle [anti kaspaz 3 (aktif), 8 ve 9 antikoları] değerlendirilmesi ve serum Alanin Amino Transferaz (ALT) aktivitesi, trigliserit, total protein, albümin ve kolesterol analizleri, karaciğer Malondialdehit (MDA) ve Total Antioksidan Kapasitesi (TAK) düzeylerinin aktivitelere etkileri belirlenmesi amaçlandı.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi (DEKAM)'nden temin edilen 200-250g ağırlığında, 32 adet Wistar albino rat kullanıldı. Her grupta 8 hayvan olmak üzere 4 grup oluşturuldu. İlk grup kontrol olarak belirlendi ve %0.9 NaCl (0.2 ml/kg) haftada 2 kere; ikinci gruba 12 hafta boyunca her gün sırası ile 2 ml/kg/canlı ağırlık dozunda NÇY gavaj ile verildi. Üçüncü gruba 12 hafta boyunca intraperitoneal (ip) 0.2 ml/kg, 1:1 oranında mısır yağı ile dilüe edilen haftada iki doz  $CCl_4$  enjekte edildi. Dördüncü gruba 2 ml/kg dozunda NÇY 12 hafta her gün, gavaj ile verilirken, haftada 2 defa intraperitoneal (ip) 0.2 ml/kg dozunda, 1:1 oranında mısır yağı ile dilüe edilen  $CCl_4$  uygulandı. Araştırma için Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Komitesinden 13.01.2016 tarihinde 16/008 sayı ile onay alındı.

Çalışma gruplarındaki ratların son uygulamadan 24 saat sonra intraperitoneal olarak anestezi sağlandıktan sonra, intrakardiyak kan örnekleri antikoagülanlı ve antikoagülanlı tüplere alınarak nekropsileri yapıldı. Alınan kan örnekleri 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek plazma ve serumları ayrıldı. Alınan tüm doku örnekleri ışık mikroskopik incelemeler için %10'luk tamponlu nötral formalin solüsyonuna konuldu (11). Serum ALT aktivitesi, trigliserit, total protein, albümin ve kolesterol düzeyleri Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri Merkez Laboratuvarı, Klinik Biyokimya bölümünde Roche Cobas 8000 marka otoanalizatörde ticari kitler (Roche Cobas Kit-İsviçre) kullanılarak belirlendi.

Karaciğer dokusu MDA düzeyleri ticari kit (Cayman,

USA) kullanılarak ELISA cihazında ( $\mu$ Quant Bio-Tek) belirlendi. Karaciğer dokusu TAK (Total Antioksidan Kapasitesi) düzeyleri ticari kit (Rel Assay, Türkiye) kullanılarak ELISA cihazında ( $\mu$ Quant Bio-Tek) belirlendi.

Doku takip işlemleri tamamlanan karaciğer örnekleri parafine gömüldü. Hazırlanan parafin bloklardan mikrotom yardımıyla 5  $\mu$ m kalınlığında kesitler lamlara alındı. Daha sonra lamlara Hematoksilen-Eozin (HE) boyama yöntemleri (11) uygulandı. Dokulardaki kaspaz aktivitesini göstermek için Avidin Biotin Peroksidaz Kompleksi (ABC) tekniği, ticari kitte (Zymed, Histostain Plus Kit, California, USA) öngörülen standart prosedüre göre yapıldı. Primer antikor olarak anti caspase-3 (aktif) (Novus NB100-56113) (sulandırma oranı 1/2000), anti caspase-8 (Abcam ab25901) (sulandırma oranı 1/100) ile anti caspase-9 (Abcam ab25758) (sulandırma oranı 1/100) kullanıldı. Negatif kontrol olarak dokulara PBS (pH 7.4), pozitif kontrol olarak primer antikoların üretici firmalarının önerdiği kontrol dokularına primer antikolar uygulandı.

Yağ boyası için %10'luk tamponlu nötral formalin solüsyonunda saklanan karaciğer dokuları, Osmium tetroksit ( $OsO_4$ ) solüsyonuna aktarıldı. 8 saat bu solüsyonda bekletilerek yağ dokusunun tespit olması sağlandıktan sonra rutin doku takibi işlemlerinden geçirilerek HE boyama yapıldı (11).

Biyokimyasal verilerin istatistiksel analizleri ve karaciğer yangı, yağlanma, nekroz ve fibrozis skor değerleri gruplar arasında karşılaştırıldığında Kruskal Wall's test, farklılığı önemli çıktığı durumlarda Bonferoni düzeltmeli Mann Whitney U testi SPSS 20 paket programı ile yapıldı.

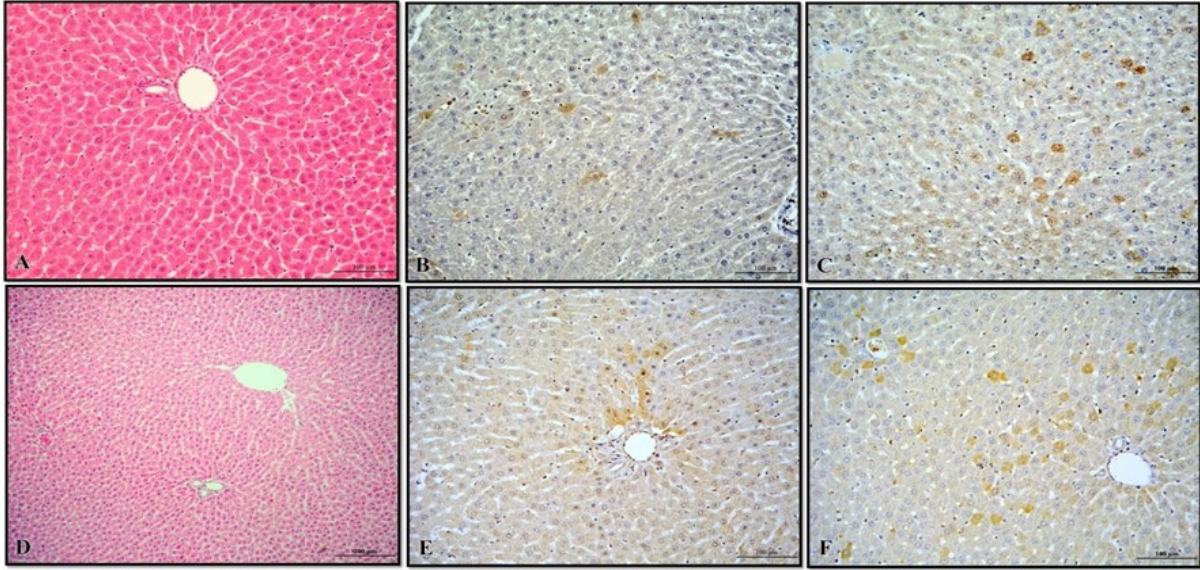
## BULGULAR

Kontrol (grup 1) ve NÇY (grup 2) gruplarında; ratların histopatolojik muayenesinde karaciğer doku örneklerinin normal yapıda oldukları görüldü (Şekil IA-D). Aynı doku kesitlerine  $OsO_4$  ile yapılan boyamada hepatositlerde yağ belirlenemedi. Gruplara ait karaciğer doku kesitlerinden yapılan histolojik hasar skorlamasında; fibrozis, yağlanma, yangı ve nekroz parametreleri açısından hasar skoru sıfırdı (Tablo I). Karaciğerlerinden hazırlanan doku kesitlerinde Kaspaz 8'de boyanma negatifti. Ancak normal apoptoza maruz kalan az sayıda hepatositte kaspaz 3 ve kaspaz 9'da pozitiflik tespit edildi. Pozitif hücrelerde sitoplazma kahverengi boyanmış olduğu görüldü (Şekil IB, C, E,F).

Karbon Tetraklorür Grubu (grup 3); karaciğer dokularının histolojik incelemesinde hepatositlerde makro ve mikroveziküler yağ vakuelleri görüldü. Damarlar hiperemik, sinuzoidler içerisinde eritrosit yığınlarının varlığı dikkati çekti. Parankimde yağ vakuelleri arasında ve periferinde lenfosit zengin mononükleer hücre infiltrasyon alanları görüldü (Şekil IIA). Yağ vakuellerinin olduğu hepatositlerin arasına uzanan, V. centralis periferinden yer yer artmış fibröz bağ doku dikkati çekti. Kesitlerin bazısında büyük yağ vakuelleri sayısı azalırken, yoğun şekilde mikroveziküler yağ vakuelleri gözlemlendi. Bu alanda Kupffer hücre hiperplazileri ile lenfosit hücre infiltrasyonları görüldü (Şekil IIB). Bu gruba ait hasar skorunun kontrol ve NÇY verilen gruplarından şiddetli ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (Tablo I).

Karaciğerden alınan kesitlerde yağ boyası ile yağ vaku-



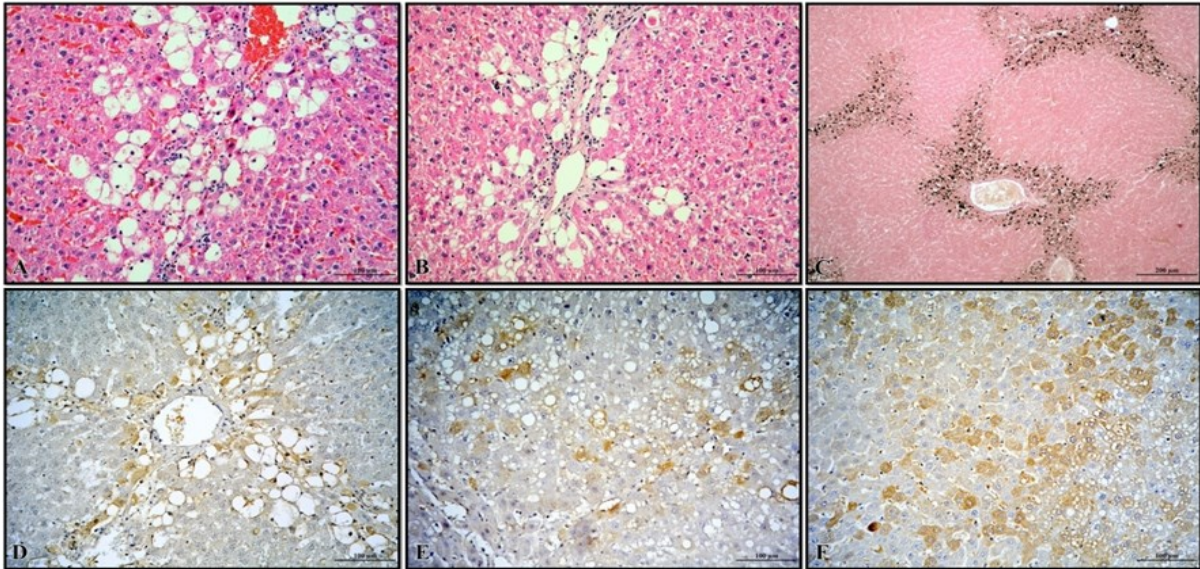


**şekil I.** A. Kontrol grubu, D.Nar çekirdeği yağı grubu, karaciğerlerin normal histolojik görünümü. Karaciğer, Hx E. B. Kontrol grubu, E.Nar çekirdeği yağı grubu, hepatositlerin kaspaz 3 pozitif görünümü. ABC-P. C. Kontrol grubu, F.Nar çekirdeği yağı grubu, hepatositlerin kaspaz 9 pozitif görünümü. ABC-P.

ollerinin siyah renkte boyandığı dikkati çekti (şekil IIC). Karaciğer kesitlerinin immunohistokimyasal incelemesinde; perivasküler, yağ vakuolleri bulunan hepatositler ve sentriasiner venlerin periferindeki hepatositlerde kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 boyamalarında pozitiflik tespit edildi. Pozitif hücrelerde sitoplazmanın kahverengi boyandığı dikkati çekti (şekil IID, E, F).

Karbon tetraklorür+Nar Çekirdeği Yağı Grubu (grup 4); karaciğer dokularının histolojik incelemesinde iki farklı

oluşturmuştu (şekil IIIA). Özellikle yağ vakuolleri arasında ve periferlerinde sınırlı fibröz doku artışı dikkati çekti (şekil IIIB). Fibröz doku tam olmayan pseudolobları şekillendirmişti. Bağ doku artış alanlarında lenfosit zengin mononükleer hücre infiltrasyonları görüldü (şekil IIIC). İkinci lezyonda ise parankimde net olarak sınıflandırılmayan geniş nekroz alanlarının varlığı dikkati çekti (şekil IIID). Bu alanlar içerisinde mikroveziküler yağ vakuolleri gözlenmekte olup, alan pembe homo-



**şekil II.** A. Karbon tetraklorür grubu ratların karaciğerinde makro-mikro yağ vakuollerinin, B.V. centralis periferinde artmış fibröz bağ dokunun görünümü. Karaciğer, Hx E. C.Hepatosit sitoplazmalarında makro mikro yağ vakuollerinin siyah renkte görünümü. Karaciğer, (OsO4 fikse edilmiş) Hx E. D. Hepatositlerde kaspaz 3 pozitif, E. Hepatositlerde kaspaz 8 pozitif, F. Hepatositlerde kaspaz 9 pozitif görünümü. ABC-P.

lezyonun varlığı dikkati çekti. İlk lezyonda hepatosit sitoplazmalarında CCl<sub>4</sub> grubuna göre daha az yoğunlukta makro ve mikroveziküler yağ vakuolleri görüldü. Bu bölgelerdeki yağ vakuolleri hepatosit çekirdeklerini periferine doğru itmiş, sayı olarak az fakat küçük gruplar

jen bir kitleye dönüşmüştü. Histopatolojik değerlendirmede lezyonların görünümü, ilk lezyonda CCl<sub>4</sub> grubuna göre daha hafiflemişti, ikinci lezyonda ise CCl<sub>4</sub> grubuna göre nekroz alanları çok daha belirgin olup, nekrotik alanlarda özellikle mikroveziküler yağ vakuollerinin



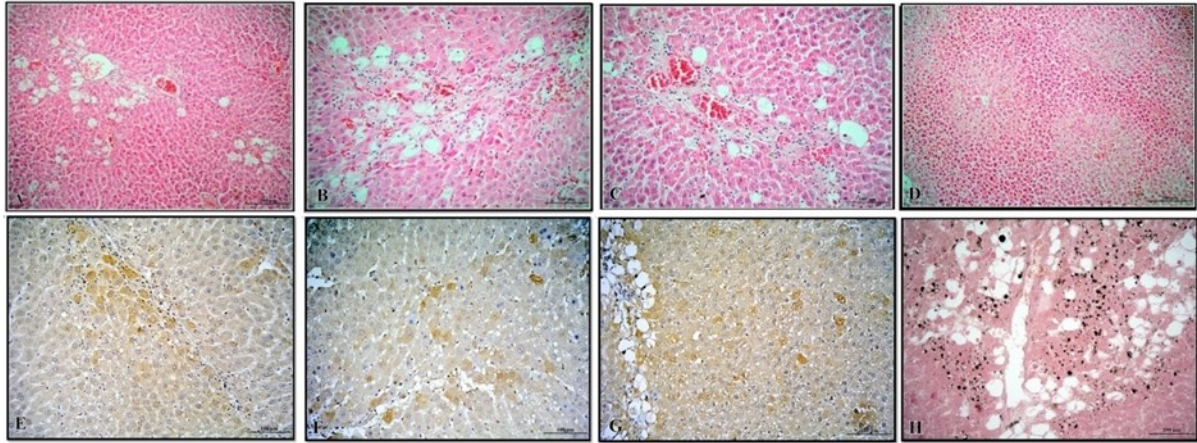
daha yoğun olduğu gözlemlendi. Bu gruba ait hasar skorunun kontrol ve NÇY gruplarından şiddetli ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (Tablo I).

Karaciğer dokularının immunhistokimyasal incelemesinde; perivasküler, yağ vakuollerini bulanan hepatositler ve sentriasiner venlerin periferindeki hepatositlerde kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 boyamalarında pozitiflik tespit edildi. Pozitif hücrelerde sitoplazmanın kahverengi boyandığı dikkati çekti (Şekil III E, F, G).

Karaciğer kesitlerine yağ boyası ile makro-mikro yağ vakuollerinin olduğu alanlarda yağın siyah renkte boyandığı dikkati çekti (Şekil III H). Karbon tetraklorür uygulanan tüm gruplarda serum ALT aktivitesi kontrol gruplarına göre oluşan karaciğer hasarına bağlı olarak önemli düzeyde artış ( $P<0.001$ ) gösterdi. Nar çekirdeği yağının  $CCl_4$ 'lü ratlara kronik olarak uygulanması, ALT

enziminin aktivitesindeki artışı düşürmedi.  $CCl_4$  uygulanan grupta, serum total protein ve albümin düzeyleri istatistiki önemde düşüş gösterdi ( $P<0.01$ ). Karbon tetraklorür'ü ratlara NÇY uygulaması, yukarıda belirtilen parametrelerde istatistiki anlamda bir değişikliğe neden olmadı. Kontrol grubuna göre diğer tüm deneme gruplarında serum total kolesterol düzeyleri istatistiki önemde yüksek bulundu ( $P<0.01$ ). Serum trigliserit düzeyleri yönünden gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark gözlenmedi ( $P>0.05$ ). (Tablo II).

Kontrol ve NÇY grupları arasında karaciğer MDA düzeyleri yönünden bir fark belirlenmedi. Karbon tetraklorür uygulaması ile görülen karaciğer toksisitesi sonucu karaciğer MDA düzeyleri önemli düzeyde artış ( $P<0.001$ ) gösterdi. Karbon tetraklorür'ü gruplara NÇY uygulanması, artmış olan MDA düzeylerini istatis-



**Şekil III.** A. Karbon tetraklorür+NÇY grubu ratlarının karaciğer kesitlerinde makro-mikro veziküler yağ vakuollerinin, B. Yağ vakuollerleri arasında ve periferlerinde sınırlı fibröz doku artışı C. Yağ doku artış alanlarında lenfosit zengin mononükleer hücre infiltrasyonları, D. mikroveziküler yağ vakuollerinin olduğu geniş nekroz alanlarının görünümü. Karaciğer, Hx E. Hepatositlerde kaspaz 3 pozitif, F. Hepatositlerde kaspaz 8 pozitif, G. Hepatositlerde kaspaz 9 pozitif görünümü. ABC-P.H. Hepatosit sitoplazmalarında makro mikro yağ vakuollerinin siyah renkte görünümü. Karaciğer, (OsO4 fikse edilmiş) Hx E.

**Tablo I.** Kronik deneme gruplarına ait doku hasar parametre skorlarının istatistiksel önem kontrolü.

Gruplar	Medyan (%25-%75 Yüzdellik)				İstatistik Önem Kontrolü (Kruskal Wallis Test)
	KONTROL (N=8)	NÇY (N=8)	$CCl_4$ (N=8)	NÇY+ $CCl_4$ (N=8)	
Yangı	0 <sup>a</sup> (0-0)	0 <sup>a</sup> (0-0)	1.5 <sup>b</sup> (1.0-2.0)	1.0 <sup>b</sup> (1.0-2.0)	<b>P&lt;0.001</b>
Yağlanma	0 <sup>a</sup> (0-0)	0 <sup>a</sup> (0-0)	3.0 <sup>b</sup> (2.0-3.25)	2.0 <sup>b</sup> (2.0-3.0)	<b>P&lt;0.001</b>
Nekroz	0 <sup>a</sup> (0-0)	0 <sup>a</sup> (0-0)	2.0 <sup>b</sup> (1.75-2.25)	2.0 <sup>b</sup> (2.0-3.0)	<b>P&lt;0.001</b>
Fibrozis	0 <sup>a</sup> (0-0)	0 <sup>a</sup> (0-0)	2.0 <sup>b</sup> (1.0-3.0)	3.0 <sup>b</sup> (2.0-4.0)	<b>P&lt;0.001</b>

<sup>a-b</sup>: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

tiki önemde etkilemedi, ancak sayısal olarak azalttı. NÇY'nın gerek tek başına gerekse CCl<sub>4</sub>'lü gruplara kronik olarak verilmesi karaciğer TAK'inde önemli artışlara neden oldu (P<0.001). (Tablo II).

#### TARTIŞMA

Ratlarda karaciğer hasarı oluşturmak amacıyla CCl<sub>4</sub>'ün kronik olarak uygulandığı çalışmalar da Lv ve ark. (12) ratlara sekiz hafta boyunca haftada üç kere, Yehia ve

turdukları bildirilmiştir (17).

Kronik karaciğer toksikasyonuna karşı nar çekirdeği yağının (19, 20), nar suyunun (13) ve nar ekstresinin (21) iyileştirici etkisi yönünde yapılmış sınırlı sayıda çalışmalarda; Yaman ve ark. (19) nar çekirdeği yağı kullanmış, CCl<sub>4</sub> grubu ratlarda oluşmuş ciddi mikromakro yağ vakuollerinin, mononükleer hücre infiltrasyonlarının şiddetinin değişmediğini bildirmiştir. Diğer

**Tablo II.** Kronik karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda kontrol ve deneme gruplarının serum biyokimyasal parametreleri.

Gruplar	Medyan (%25-%75 Yüzdellik)				İstatistik Önem Kontrolü (Kruskal Wallis Testi)
	KONTROL (N=8)	NÇY (N=8)	CCl <sub>4</sub> (N=8)	NÇY+CCl <sub>4</sub> (N=8)	
ALT (U/L)	70.5 <sup>a</sup> (66.0-72.5)	56.0 <sup>a</sup> (49.75-58.25)	262.0 <sup>b</sup> (159.75-348.25)	152.5 <sup>b</sup> (122.5-334.25)	P<0.001
Total Protein (g/dL)	6.83 <sup>b</sup> (6.8-6.9)	6.69 <sup>ab</sup> (6.61-6.84)	6.4 <sup>a</sup> (6.3-6.6)	6.49 <sup>a</sup> (6.2-6.6)	P<0.01
Albümin (g/dL)	4.4 <sup>b</sup> (4.2-4.5)	4.3 <sup>ab</sup> (4.2-4.4)	4.13 <sup>a</sup> (4.0-4.2)	4.16 <sup>a</sup> (4.0-4.2)	P<0.01
Total kolesterol (mg/dL)	58.0 <sup>a</sup> (56.5-60.0)	79.0 <sup>b</sup> (70.5-87.25)	72.0 <sup>b</sup> (66.75-88.75)	75.5 <sup>b</sup> (62.75-79.25)	P<0.01
Trigliserit (mg/dL)	103.5 (69.0-116.5)	102.5 (83.5-113.7)	139.5 (112.7-163.2)	119.5 (84.75-171.0)	P>0.05
MDA (nmol/mg protein)	16.1 <sup>a</sup> (14.8-18.0)	19.6 <sup>a</sup> (15.4-22.2)	29.6 <sup>b</sup> (23.0-43.1)	21.2 <sup>ab</sup> (18.0-22.4)	P<0.001
TAK (mmol/L)	1.4 <sup>ab</sup> (1.2-1.9)	2.5 <sup>b</sup> (2.2-2.8)	1.0 <sup>a</sup> (0.7-1.0)	2.0 <sup>b</sup> (1.8-2.3)	P<0.001

<sup>a-b</sup>: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farkistatistiksel olarak önemlidir.

ark. (13) on hafta boyunca haftada bir kere, Tasci ve ark. (14), Ochenashko ve ark. (15) on iki hafta boyunca haftada iki kere 0.2 ml/kg dozunda CCl<sub>4</sub>'ün, karaciğer dokusunda özellikle portal bölgeden gelişen fibrosit, fibroblast ve kollagen demetlerden oluşan fibröz dokunun çevrelediği şiddetli nekroz, hepatositlerde yağ dejenerasyonu ile yangısal hücre infiltrasyonlarının bulunduğu pseudolob oluşumlarına sebep olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmalarda ortak bulgu karaciğerde makromikroveziküler yağlanma, hepatositlerde nekroz, rejeneratif nodüller masif fibroz ve mononükleer hücre infiltrasyonudur. Sunulan çalışmada CCl<sub>4</sub> on iki hafta boyunca haftada 0.2 ml/kg dozunda uygulayan araştırmacıların (14, 15) karaciğer bulgularıyla paralellik göstermektedir. Karaciğer kesitlerinde özellikle dejenerasyonun ve yağ vakuollerinin olduğu hepatositlerin yoğun olduğu karaciğer parankiminde ortadan şiddetliye değişen çoğunluğu lenfositlerden oluşan yangısal hücre infiltrasyonu ile kısmi fibrozis oluşumları, bazı kesitlerde pembe homojen renkli içerisinde çok sayıda mikroveziküler yağ vakuollerinin olduğu nekroz alanları saptanmıştır.

Nar suyunun, kabuğunun ve yağının, değişik mekanizmalarla çok sayıda terapötik yarar sağladığı göstermiş olup, birçok araştırmacı yaptıkları çalışmalarda nar bileşiklerinin antioksidan ve anti-inflamatuvar özellikte olduğunu bildirmişlerdir (16-18). Bu etkilerden antioksidan olanların punisik asit, yağ asitleri, steroller ve ellagik asit etkileri ile anti-inflamatuvarların ise hücre bölünmesi, invazyon ve anjiyogenezi engelleyerek oluş-

çalışmalarda ise; Sodium Fluoride ile oluşturulan karaciğer toksikasyonuna karşı Ali ve ark. (20) nar çekirdeği yağını kullanarak hepatositlerin sitoplazmalarındaki yağ vakuollerinin, nekrotik odaklar içindeki lenfositik hücre infiltrasyonlarının ve kupffer hücrelerinin sayıca azalmasını sağlayarak, kontrol grubu ratların karaciğerlerine kısmen yaklaştırdığını bildirmişlerdir. Karbon tetraklorür ile oluşturulan karaciğer toksikasyonuna karşı Yehia ve ark. (13) nar suyunu kullanarak, CCl<sub>4</sub> grubu ratlarda oluşmuş ciddi yağ vakuollerinin, geniş nekroz odaklarının, mononükleer hücre infiltrasyonlarının şiddetini yüksek oranda azalttığını, El-Khadragy ve ark. (21) nar ekstraktını kullanarak, CCl<sub>4</sub>'ün neden olduğu mikroveziküler yağ vakuollerinin, mononükleer hücre infiltrasyonlarının ve fibrozis tamamen engellendiğini bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada ise nar çekirdeği yağının özellikle fibroz doku oluşumunu kısmen engellediği, hepatositlerdeki makro-mikro veziküler yağ vakuollerinden bazı kesitlerde makroların daha az sayıda ve topluluklar halinde, kesitlerden bazılarında ise mikroveziküllerin geniş nekroz alanları içerisinde sayısının arttığı şeklinde ve bu kesitlerin her ikisinde de özellikle lenfositlerden oluşan mononükleer hücre infiltrasyonlarında devamlılık ile sınırlı artmış fibröz dokuyla şekillenen pseudolob oluşumları CCl<sub>4</sub> grubundakine benzer şekilde görülmesi karaciğer hasarını iyileştirme yönünde çok sınırlı etki yaptığını ortaya çıkarmıştır.

Çalışmada CCl<sub>4</sub> verilen gruplarda kaspaz 3, 8, 9 aktiviteleri değerlendirilmiştir. Kaspaz 3 ve 8 sonuçları Aram

ve ark. (22), Chan ve ark. (23), Leu ve ark. (24), Lu ve ark. (25), Xie ve ark. (26) ve Parajuli ve ark. (27) çalışma verileri ile uyumlu olup, benzer şekilde artış tespit edilmiştir. Xie ve ark. (26) ve Parajuli ve ark. (27) çalışmalarında kaspaz 9 aktivitesinin arttığını bildirdikleri şekilde çalışmamızda da benzer şekilde artmıştır. Araştırmacıların ve araştırmanın sonuçlarında CCl<sub>4</sub>'ün neden olduğu aşırı reaktif oksijen türevleri oluşumu; endojen antioksidan enzimlerini tüketmekte ve kaspaz 3, 8 ve 9 gibi enzimlerin aktif olarak hepatosit apoptozisini tetiklediği (28, 29), bu durumun CCl<sub>4</sub> toksikasyonunda hem instrinsik hem de ekstrinsik yolu kullanarak hepatositlere apoptoza götürdüğü ve yıkımı gerçekleştirdiğini düşündürmektedir.

Karaciğer hasarı oluşturma da CCl<sub>4</sub>'ün ve farklı toksik maddelerin uygulandığı, nar çekirdeği ekstraktı (30, 31), nar suyu (32) ve nar ekstraktının (33) iyileştirme ve apoptozun tetiklenmesindeki engelleme etkisini araştıran çalışmalarda İbrahim ve ark. (30), CCl<sub>4</sub> uyguladığı gruplarda kaspaz 3 pozitif hepatositlerin kontrol grubuna göre sayısı yoğun şekilde artarken, CCl<sub>4</sub> ile birlikte nar çekirdeği ekstresi verilen gruptaki pozitif hepatosit sayısı yoğunluğu CCl<sub>4</sub> grubuna göre hafif bir azalma gösterdiğini, Çayır ve ark. (31), cisplatin uyguladığı grupta V. centralis çevresindeki hepatositlerde yoğun kaspaz 3 pozitifliği tespit ederken, cisplatinin neden olduğu yoğun kaspaz 3 aktivasyonunu nar çekirdeği ekstraktının önemli ölçüde azalttığını, Shaban ve ark. (32) diethylnitrosamine ve phenobarbital ile karaciğer hasarı oluşturup, iyileştirmek amacıyla nar suyu uyguladığı gruplardaki kaspaz 3 aktivitesini, kontrol grubu seviyelerine indirdiğini, Choudhury ve ark. (33) ise arsenik ile karaciğer hasarı oluşturup, hepatositlerde artmış kaspaz 3 aktivitesinin, arsenik+nar ekstraktı verdiği gruplarda ise azalttığını bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada ise CCl<sub>4</sub> toksikasyonu ile ilgili karaciğer yıkım aşamasında hepatositlerde gözlenen apoptoz kaspaz 3, 8, 9 da pozitif tespit edilirken, nar çekirdeği yağı uygulamasıyla apoptoza giden pozitif hepatosit yoğunluğunun kısmen azaldığı görülmüştür.

Karbon tetraklorür ile oluşturulan kronik çalışmalarda oluşan karaciğer hepatosit hasarına bağlı hücre membran permeabilitesinin bozulmasıyla kan dolaşımına geçişleri artan ALT enziminin, serum aktiviteleri artışı bildirilmektedir (34-36). Ayrıca karaciğer hasarının karakteristik bulgusu olan protein düzeylerindeki azalmaları çalışmalarında bildiren araştırmacılar vardır (37, 38). Özellikle CCl<sub>4</sub> ile karaciğer toksikasyonu oluşturan Gnanaprakash ve ark. (39) serum total protein, Abdelaiz ve ark. (40), Ahmed ve ark. (36) ise serum albümin düzeylerinin azaldığını bildirmişlerdir. Karbon tetraklorür ile karaciğer hasarı oluşturulan çalışmalarda (35, 41-43) karaciğer hücre hasarı sonrasında kolesterolün dolaşıma geçmesi sebebiyle serumdaki ve trigliserit düzeylerinin yükseldiğisaptanmıştır. Kronik CCl<sub>4</sub> uygulamasıyla oluşturulan karaciğer hasarında araştırmacılar karaciğer MDA düzeylerinin arttığını bildirmişlerdir (12, 13, 34).

Karbon tetraklorür ile ratlarda oluşturulan karaciğer hasarının iyileştirilmesi amacıyla nar çekirdeği yağı verilerek yapılan çalışmalarda toksisiteye bağlı olarak artan serum ALT aktivitesi ile MDA düzeylerinin anlamlı bir şekilde azaldığı (19, 44), azalan serum total protein düzeylerinin de arttığı (19) bildirilmiştir. Çeşitli toksik

maddeler (ethanol, cisplatin, arsenik, parasetamol, civa klörür, dimetilnitrozamin) ile karaciğer hasarı oluşturulan ve karaciğer hasarını iyileştirmek amacıyla nar çekirdeği yağı veren Boroushaki ve ark. (45) ile Ali ve ark. (46) yüksek olan ALT enzim aktivitesi ile MDA, Ali ve ark. (20) ALT aktivitesinin yanında total kolesterol düzeylerinin de azaldığını bildirmişlerdir. Diğer yandan Abozid ve ark. (47) ethanol ile karaciğer toksikasyonunda azalan serum total protein ve albümin düzeylerinin nar kabuğu ekstresi ile arttığını, yüksek seviyedeki kolesterol ve trigliserit düzeylerinin azaldığını tespit etmişlerdir. Sunulan çalışmada, CCl<sub>4</sub> (19, 44) ve diğer toksik maddeler (20, 45-47) ile karaciğer hasarı oluşturulan çeşitli araştırmacıların bulguları ile uyumlu olarak, CCl<sub>4</sub> ile oluşturulan karaciğer hasarına bağlı artış gösteren ALT enzim aktivitesi karaciğer MDA düzeyleri, NÇY uygulanması ile sayısal düzeyde düşmüştür. Ancak total protein, serum albümin, total kolesterol ve trigliserit düzeyleri NÇY uygulamasından etkilenmemiştir. NÇY'nun CCl<sub>4</sub>'lü gruplara verilmesi ile karaciğer TAK'inde önemli artışlar belirlenmiştir. Ancak bu artışlar karaciğer doku hasarını düzelterek düzeyde olamamıştır. Sonuç olarak, nar çekirdeği yağının CCl<sub>4</sub> ile oluşturulan karaciğer hasarına üzerine iyileştirici etkisi hem histopatolojik hemde biyokimyasal parametrelerde TAK düzeyi hariç herhangi bir değişikliğe neden olmaması; karaciğer dokusundaki hasarın düzelmediğini göstermektedir. Karbon tetraklorürün uzun süre kullanımına bağlı olarak karaciğerde geri dönüşümsüz bir hasarın gelişmesinin yanında, organizmanın uzun süre uygulanan nar çekirdeği yağına adaptasyonundan kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

#### KAYNAKLAR

1. Recknagel RO, Glende EA JR, Dolak JA, Waller RL. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol Therapeut* 1989; 43: 139-154.
2. Sun F, Hamagawa E, Tsutsui C, et al. Evaluation of oxidative stress during apoptosis and necrosis caused by carbon tetrachloride in rat liver. *Biochim et Biophys Acta* 2001; 1535(2): 186-191.
3. Weber LW, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: Carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crc Cr Rev Toxicol* 2003; 33: 105-136.
4. Shyur LF, Huang CC, Lo CP, et al. Hepatoprotective phytochemicals from *Cryptomeria japonica* are potent modulators of inflammatory mediators. *Phytochemistry* 2008; 69(6): 1348-1358.
5. Moure A, Cruz JM, Franco D, et al. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem*, 2001; 72 (2): 145-171.
6. Naczki M, Shahidi F. Extraction and analysis of phenolics in food. *J Chromatogr A* 2004; 1054(1): 95-111.
7. Namiki M. Antioxidants/antimutagens in food. *Food Sci Nutr* 1990; 29(4): 273-300.
8. Schinella G, Mosca S, Cienfuegos-Jovellanos E, et al. Antioxidant properties of polyphenol-rich cocoa products industrially processed. *Food Res Inter* 2010; 43(6): 1614-1623.
9. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47(5): 412-420.



10. Radi, R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proc Natl Acad Sci* 2018; 115(23): 5839-5848.
11. Manual of Histologic Staining Methods; of the Armed Forces Institute of Pathology, Luna LG (Edt), New York Blakiston Division, McGraw-Hill, 1968, 34-75.
12. Lv P, Luo HS, Zhou XP et al. Thalidomide prevents rat liver cirrhosis via inhibition of oxidative stress. *Pathol Res Pract* 2006; 202: 777-788.
13. Yehia HM, Al Olayan EM, Elkhadragey MF. Hepatoprotective role of the pomegranate (*Punica granatum*) juice on carbon tetrachloride induced oxidative stress in rats. *Life Sci J* 2013; 10: 1534-1544.
14. Tasci I, Mas N, Mas MR, Tuncer M, Comert B. Ultrastructural changes in hepatocytes after taurine treatment in CCl<sub>4</sub> induced liver injury. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4897-4902.
15. Ochenashko OV, Volkova NA, Mazur SP, et al. Cryopreserved fetal liver cell transplants support the chronic failing liver in rats with CCl<sub>4</sub>-induced cirrhosis. *Cell Transplant* 2006; 15(1): 23-33.
16. Gil MI, Tomás-Barberán FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem* 2000; 48(10): 4581-4589.
17. Ignarro LJ, Byrns RE, Sumi D, de Nigris F, Napoli C. Pomegranate juice protects nitric oxide against oxidative destruction and enhances the biological actions of nitric oxide. *Nitric oxide* 2006; 15(2): 93-102.
18. Lansky EP, Newman RA. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J Ethnopharmacol* 2007; 109(2): 177-206.
19. Gram Yaman D, Atasever A, Eren M. Effect of pomegranate (*Punica granatum*) seed oil on carbon tetrachloride-induced acute and chronic hepatotoxicity in rats. *Pharmacogn Res* 2018; 10(2): 124-129.
20. Ali EH, Al-Okaily BN. Role of Pomegranate Seed Oil (PSO) Against Hepatotoxicity Induced by Sodium Fluoride in Adult Female Rats. *J Kerbala Agric Sci* 2017; 10(3): 28-43.
21. El-Khadragy MF. Hepatoprotective role of the pomegranate (*Punica granatum*) juice on carbon tetrachloride-induced oxidative stress in rats. *Afr J Biol Sci* 2011; 7: 135-49.
22. Aram G, Potter JJ, Liu X, Torbenson MS, Mezey E. Lack of inducible nitric oxide synthase leads to increased hepatic apoptosis and decreased fibrosis in mice after chronic carbon tetrachloride administration. *Hepatology* 2008; 47(6): 2051-2058.
23. Chan CC, Lee KC, Huang YH, et al. Regulation by resveratrol of the cellular factors mediating liver damage and regeneration after acute toxic liver injury. *J Gastroenterol Hepatol* 2014; 29(3): 603-613.
24. Leu JI, Crissey MAS, Taub R. Massive hepatic apoptosis associated with TGF- $\beta$ 1 activation after Fas ligand treatment of IGF binding protein-1-deficient mice. *J Clinical Invest* 2003; 111(1): 129-139.
25. Lu B, Xu Y, Xu L, et al. Mechanism investigation of dioscin against CCl<sub>4</sub>-induced acute liver damage in mice. *Environl Toxicol Pharmacol* 2012; 34(2): 127-135.
26. Xie J, Liu J, Chen TM, et al. Dihydropyridinone alleviates carbon tetrachloride-induced acute liver injury via JNK-dependent mechanism in mice. *World J Gastroenterol* 2015; 21(18): 5473-5481.
27. Parajuli DR, Park EJ, Che XH, et al. PF2401-SF, standardized fraction of *Salvia miltiorrhiza*, induces apoptosis of activated hepatic stellate cells in vitro and in vivo. *Molecules* 2013; 18(2): 2122-2134.
28. Tao LL, Cheng YY, Ding D, et al. C/EBP- $\alpha$  ameliorates CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in mice through promoting apoptosis of hepatic stellate cells with little apoptotic effect on hepatocytes in vitro and in vivo. *Apoptosis* 2012; 17(5): 492-502.
29. Domitrović R, Škoda M, Marchesi VV, et al. Rosmarinic acid ameliorates acute liver damage and fibrogenesis in carbon tetrachloride-intoxicated mice. *Food Chem Toxicol* 2013; 51: 370-378.
30. Ibrahim MAR, Okail HAM, Emam NMM. Ameliorative effects of pomegranate peel extract on hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride in mice. *Int J Res Studies Bios (IJRSB)* 2016; 4(10): 23-31.
31. Çayır K, Karadeniz A, Şimşek N, et al. Pomegranate seed extract attenuates chemotherapy-induced acute nephrotoxicity and hepatotoxicity in rats. *J Med Food* 2011; 14(10): 1254-1262.
32. Shaban NZ, El-Kersh MA, Bader-Eldin MM, Kato SA, Hamoda AF. Effect of *Punica granatum* (pomegranate) juice extract on healthy liver and hepatotoxicity induced by diethylnitrosamine and phenobarbital in male rats. *J Med Food* 2014; 17: 339-349.
33. Choudhury S, Ghosh S, Mukherjee S, et al. Pomegranate protects against arsenic-induced p53-dependent ROS-mediated inflammation and apoptosis in liver cells. *J Nutr Biochem* 2016; 38: 25-40.
34. Tan H, He Q, Li R, Lei F, Lei X. Trillin reduces liver chronic inflammation and fibrosis in carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) induced liver injury in mice. *Immunol Invest* 2016; 45(5): 371-382.
35. Yim YK, Lee H, Hong KE, et al. Hepatoprotective effect of manual acupuncture at acupoint GB34 against CCl<sub>4</sub>-induced chronic liver damage in rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12(14): 2245-2249.
36. Ahmed SK, Mohammed SA, Khalaf G, Fikry H. Role of bone marrow mesenchymal stem cells in the treatment of CCl<sub>4</sub> induced liver fibrosis in albino rats: a histological and immunohistochemical study. *Int J Stem Cells* 2014; 7(2): 87-97.
37. Achliya GS, Wadodkar SG, Dorle AK. Evaluation of hepatoprotective effect of Amalkadi ghrita against carbon tetrachloride induced hepatic damage in rats. *J Ethnopharmacol* 2004; 90: 229-232.
38. Zeashan H, Amresh G, Singh S, Rao CV. Hepatoprotective activity of *Amaranthus spinosus* in experimental animals. *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 3417-3421.
39. Gnanaprakash K, Madhusudhana CC, Ramkanth S et al. Aqueous extract of *Flacourtia indica* pre-

- vents carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rat. Int J Biol Sci 2010; 6: 51-55.
40. Abdelaziz DH, Ali SA. The protective effect of Phoenix dactylifera L. seeds against CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity in rats. Journal of ethnopharmacology 2014; 155: 736-743.
  41. Botsoglou NA, Taitzoglou IA, Botsoglou E et al. Effect of long-term dietary administration of oregano and rosemary on the antioxidant status of rat serum, liver, kidney and heart after carbon tetrachloride-induced oxidative stress. J Sci Food Agric 2009; 89: 1397-1406.
  42. Ahsan R, Islam KM, Musaddik A, Haque E. Hepatoprotective activity of methanol extract of some medicinal plants against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in Albino rats. Global J Pharm 2009; 3: 116-122.
  43. Palaniswamy R, Raghunathan PP. Protective effect of *Bacopa monnieri* leaf extract against oxidative stress induced hepatotoxicity in rats. Int J Pharm Pharmac Sci 2013; 5: 555-558.
  44. Melo ILP, Silva AMO, Carvalho EBT, et al. Effect of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Seed Oil on Markers of Oxidative Stress Induced by Carbon Tetra-chloride in Wistar Rats. Int J Food Sci Nutr Diet 2015; 5, 1-8.
  45. Boroushaki MT, Mollazadeh H, Rajabian A, et al. Protective effect of pomegranate seed oil against mercuric chloride-induced nephrotoxicity in rat. RenFail 2014; 36(10), 1581-1586.
  46. Ali NA, Saeed SZ. Pomegranate seed oil ameliorates paracetamol induced hepato-and nephro-toxicity in rats. Middle East Journal of Internal Medicine 2013; 6(2): 1-9.
  47. Abozid MM, Farid HE. The anti-fatty liver effects of guava leaves and pomegranate peel extracts on ethanol-exposed rats. J Biol Chem Environ Sci 2013; 8(3): 83-104.