



Ratlarda Karbon Tetraklorür ile Oluşturulan Kronik Karaciğer Hasarı Üzerine Kabak Çekirdeği Yağının Etkisi ve Kaspaz Aktivitesi ile Hepatik Apoptozisin Belirlenmesi

Ayhan ATASEVER^{1,a}, Elife SAYAR^{1,b}, Görkem EKEBAŞ^{1,c,✉}, Meryem ŞENTÜRK^{2,d}, Meryem EREN^{2,e}

¹ Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

² Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

^aORCID: 0000-0002-6327-1604; ^bORCID: 0000-0002-9776-1572; ^cORCID: 0000-0001-9094-677X

^dORCID: 0000-0002-3763-8310; ^eORCID: 0000-0003-1339-0493

Geliş Tarihi/Received
05.03.2020

Kabul Tarihi/Accepted
07.05.2020

Yayın Tarihi/Published
30.06.2020

Öz

Karbon tetraklorür (CCl₄) ile kronik karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda kabak çekirdeği yağının (KÇY) lezyonlar üzerine koruyucu etkisi; hücrel apoptozda kaspaz 3 aktivasyonu, serum Alanin Amino Transferaz (ALT) aktivitesi, trigliserit, total protein, albümin, total kolesterol düzeyleri ile malondialdehit (MDA) ve total antioksidan kapasitesi (TAK) değerlendirildi. Çalışmada 48 adet rat, 12 hayvanlı 4 gruba ayrıldı. Grup I kontrol; II, III ve IV ise çalışma grubu olarak belirlendi. Grup II'ye intraperitoneal 0,2 ml/kg CCl₄, 8 hafta, haftada iki kere uygulandı. Grup III'e 4 ml/kg KÇY, 12 hafta gavajla verildi. Grup IV'e 4 hafta gavaj şeklinde KÇY verildi, takiben 8 hafta her gün 4 ml/kg KÇY ve intraperitoneal 0,2 ml/kg CCl₄, haftada iki kere uygulandı. Denene sonunda nekropsi yapılan ratlarda; Grup III'de normal karaciğer dokusu gözlenirken, Grup II'de hepatositlerde yoğun makro ve mikroveziküler yağlanma, parankimde mononükleer hücre infiltrasyonları, bağ doku artışına bağlı pseudolobulasyon formları görüldü. Grup IV'de oluşan lezyonların histopatolojisi Grup II ile benzerdi. Kontrol gruplarına göre çalışma gruplarındaki kaspaz 3 aktivitesi arttı. Grup II'de artan serum ALT aktivitesi (P<0,001), Grup IV'de değişiklik göstermedi. Grup II'de serum total protein ve albümin düzeyleri istatistikî önemde düşerken (P<0,001), Grup IV'de bu değerlerde sayısal azalma görüldü. Grup IV'de yüksek olan serum total kolesterol düzeyleri KÇY'dan etkilenmedi. Grup II'de serum trigliserit düzeyleri önemli düzeyde artarken (P<0,001), Grup IV'de sayısal olarak düştü. Grup IV'de KÇY uygulanması, MDA değerlerini önemli düzeyde düşürürken (P<0,001), total antioksidan kapasitesi yönünden ise gruplar arasında fark saptanamadı (P>0,05). Sonuç olarak; CCl₄ ile birlikte KÇY verilen Grup IV'de karaciğer hasarı üzerinde bitkinin antioksidan özelliklerinin biyokimyasal veriler ve histopatolojik lezyonlar üzerine iyileştirici yönden anlamlı bir etkisi gözlenmedi.

Anahtar Kelimeler: Histopatoloji, immunohistokimya, karbon tetraklorür, kabak çekirdeği yağı, rat

The Effects of Pumpkin Seed Oil on Chronic Liver Damage Induced Carbon Tetrachloride in Rats and Determination of Hepatic Apoptosis and Caspase Activity

Abstract

The protective effect of pumpkin seed oil (PSO) on lesions was evaluated by caspase 3 activation in cellular apoptosis, serum Alanine Amino Transferase (ALT) activity, triglyceride, total protein, albumin, total cholesterol levels, liver malondialdehyde (MDA) and total antioxidant capacity (TAC) in chronic liver damaged rats caused by carbon tetrachloride (CCl₄). In the study, 48 rats were divided into 4 groups with 12 animals. Group I control; II, III and IV were determined as the study group. Group II was administered intraperitoneal 0.2 ml/kg CCl₄, 8 weeks, twice a week. Group III was given 4 ml/kg PSO with 12 weeks gavage. Group IV was given 4 weeks gavage in the form of PSO, followed by 4 ml/kg PSO and intraperitoneal 0.2 ml/kg CCl₄ twice a week for 8 weeks. In rats that were necropsied at the end of the experiment; normal liver tissue was observed in Group III; in group II, intense macro and microvesicular steatosis in hepatocytes, mononuclear cell infiltrations in parenchyma, and pseudolobulation forms due to connective tissue increase were observed. The histopathology of the lesions in Group IV was similar to that in Group II. Caspase 3 activity in the treated groups increased compared to the control groups. Increased serum ALT activity (P <0.001) in Group II did not change in Group IV. While serum total protein and albumin levels decreased statistically in Group II (P <0.001), these values decreased numerically in Group IV. Serum total cholesterol levels in Group IV were not affected by PSO. Serum triglyceride levels increased significantly in Group II (P <0.001) and decreased numerically in Group IV. While the application of PSO in Group IV significantly decreased MDA values (P <0.001), no difference was found between the groups in total antioxidant capacity values (P > 0.05). As a result; In the group administered CCl₄ with PSO, no healing effect was observed on the biochemical data and histopathological lesions of the plant's antioxidant properties on liver damage.

Key Words: Carbon tetrachloride, histopathology, immunohistochemistry, pumpkin seed oil, rat

GİRİŞ

Anatomik lokalizasyonu ve önemli fonksiyonlar nedeniyle karaciğer, toksik maddelere en fazla maruz kalan ve pek çok etkenle hasara uğrayabilen bir organdır (1). Hepatotoksisite oluşturmak için kullanılan CCl₄ toksik etkisini biyokimyasal veriler ve hücre organelleri düzeyinde gösterir (2, 3). CCl₄ hasarına oksidatif stres ve takiben oluşan serbest radikaller neden olur. Serbest radikal ve türevleri, hepatosit hücre membranındaki doymamış yağ asitleriyle etkileşerek lipid peroksidasyonunu başlatarak bu yapıyı bozmak suretiyle etkisini göstermektedirler (4, 5).

Karaciğer yağlanması özellikle, karaciğerde protein sentezini bozan (açlık, şeker hastalığı, adrenalin salgısı bozukluğu ve özellikle esansiyel aminoasit yetersizliğinin yanında, alınan metiyonin, orotik asit, etanol, karbon tetraklorür, kloroform) durumlarda, apolipoprotein sentezi engellendiğinde meydana gelir (6).

Toksik ve yan etkilerinin az, ucuz ve kolay ulaşılabilir olması nedeniyle bitkisel orjinli antioksidanların karaciğer koruyucu etkilerinin belirlenmesi amacıyla hayvan modelli çeşitli kimyasal maddeler ile deneysel oluşturulan karaciğer hasarına karşı yapılan çalışmaları popüler hale getirmiştir. Yapılan çalışmalarda, antioksidan ve serbest radikalleri tutucu etkisi bildirilen kabak çekirdeği yağının CCl₄ ve diğer kimyasallar ile oluşan karaciğer hasarı üzerine koruyucu etkileri olabileceği bildirilmektedir (7).

Bu araştırmada; çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu bilinen kabak çekirdeği yağı (KÇY)'nin kullanıldığı karaciğer de oluşan lezyonların iyileşmesi yönünde histopatolojik olarak incelendiği çalışma sayısının sınırlı olması nedeniyle; karbon tetraklorür ile karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda, oluşabilecek lezyonlar üzerine kabak çekirdeği yağının muhtemel koruyucu etkisi; hücresel apoptozun immunohistokimyasal yöntemle değerlendirilmesi, ayrıca bazı serum biyokimyasal parametreleri (alanin aminotransferaz (ALT), trigliserid, total kolesterol, total protein, albümin) ile karaciğer malondialdehit (MDA) ve total antioksidan kapasitesi (TAK) düzeylerinin belirlenmesi ve araştırılması amaçlandı.

MATERYAL VE METOT

Çalışmada kullanılan KÇY ticari olarak Bükaş firmasından temin edilmiş olup, bileşenleri Tablo 1'de gösterildi.

Tablo 1. Kabak Çekirdeği Yağı yağ asitleri kompozisyonu

Kompozisyonu (%)	Doymuş Yağ Asitleri
	Miristik Asit 0.12
	Palmitik Asit 11.77
	Margarik Asit 0.09
	Stearik Asit 6.89
	Doymamış Yağ Asitleri
	Oleik Asit 33.64 (Omega 9)
	Linoleik Asit 46.51 (Omega 6)
	Linolenik Asit 0.18 (Omega 3)
	Araşidonik Asit 0.46
	Ekosenoik Asit 0.11
	Behenik Asit 0.12

Araştırma için Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Komitesinden 09.05.2018 tarihinde 18/062

sayı ile onay alındı. Çalışmada Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi (DEKAM)'nden temin edilen 200-250 g ağırlığında, 48 adet Wistar albino erkek rat kullanıldı. Her kafeste beş rat olacak şekilde, pelet yem ile *ad libitum* olarak beslenerek uygun şartlar altında [(kontrollü sıcaklık (21±2°C), nem (%50±5), hava değişimi (saatte 12 devir), sıcaklık (12 saat aydınlık, 12 saat karanlık)] barındırıldı.

Ratlarla kullanılan CCl₄'ün tek doz (8, 9, 10, 11), iki doz (12), haftada üç gün (13), elli gün ve üç ay süreyle haftada iki kez (14) gibi uygulandığı süre bakımından farklılıklar gösteren çalışmalar mevcuttur. CCl₄, deney hayvanlarına intragastrik sonda (9, 14), intraperitoneal (iP) (11, 12) veya subkutan (SK) (13, 14) enjeksiyon gibi farklı şekillerde uygulanmıştır. Bu uygulamalar; zeytinyağı (9, 12), ayçiçek yağı (14), mısırözü yağı (11, 15) gibi farklı çözücülerle yapılmıştır.

Karaciğer toksikasyonuna karşı kabak çekirdeği ile yapılan sınırlı sayıda makale bulunmaktadır. Nkosi ve ark. (7, 16)'da CCl₄ ile oluşturulan karaciğer hasarında, antioksidan etkiyi araştırırken, kabak çekirdeğinin izolatını kullanmıştır. Al-Zuhair ve ark. (17) kabak çekirdeği yağının günlük 50 mg/kg dozunda 4 hafta; Hashemi (18) günlük 40 mg/kg dozunda 8 hafta uygulamışlardır. Bu çalışmada bir örneklik teşkil etmesi için, diğer çalışmalarda kullanılan homojenat veya protein izolatı yerine kabak çekirdeğinin yağının kullanılması tercih edilmiştir. Riski ortadan kaldırmak için, kabak çekirdeği yağının miligram cinsi yerine mililitre cinsinden çalışma yapan Eraslan ve ark. (19) aflatoksin ile oluşturulan doku hasarına karşı dokulardaki lipid peroksidasyonu hafifleterek, iyileştirici olduğunu bildirdikleri, günlük 1,5 ml/kg/canlı ağırlık dozunda kabak çekirdeği yağının verildiği çalışma ve 1, 2 ve 3 ml/kg/canlı ağırlık dozu kullanan Atasever ve ark. (20)'ünün, yaptıkları çalışma referans alınmıştır. Sonuçta daha önceki kronik çalışmalarda kesin bir doz tespiti olmadığından, Atasever ark. (20)'deki 3 ml/kg/canlı ağırlık dozu 1 ml artırılarak 4 ml/kg/canlı ağırlık dozu bu çalışmada kullanılmıştır.

Oniki hayvanlı 4 grup oluşturuldu. Grup I kontrol, Grup II CCl₄ grubu olup Grup I'e % 0,9 NaCl 0,2 ml/kg/canlı ağırlık; Grup II'ye intraperitoneal 0,2 ml/kg/canlı ağırlık CCl₄, 8 hafta, haftada iki kere yapıldı. Kabak Çekirdeği yağı verilecek hayvanlardan kontrol grubu (Grup III) ve çalışma grubu (Grup IV) oluşturuldu. Grup III'e 4 ml/kg canlı ağırlık KÇY, 12 hafta boyunca gavajla; Grup IV'e ise 4 ml/kg canlı ağırlık KÇY 4 hafta günlük gavajla verildi, takiben 8 hafta boyunca Grup IV'e günlük 4 ml/kg canlı ağırlık kabak çekirdeği yağı ile birlikte intraperitoneal 0,2 ml/kg/canlı ağırlık CCl₄, haftada iki kere uygulandı.

Deneme sonunda anestezi altında intrakardiyak Vacutainer tüplerine alınan kan örnekleri 1 saat oda sıcaklığında bekletildi, 3000 devirde 10 dakika santrifüje edilerek serumlar ayrıldı ve -20 °C'de saklandı. Çalışma sonunda hayatta kalan tüm ratlar sedasyon sağlanıp, yüksek doz anestezi ile ötanazilerini takiben nekropsileri yapıldı. Makroskopik muayenesini takiben karaciğerden alınan numuneler histopatolojik inceleme için % 10 nötral formalinde tespit edildi. Rutin doku takibi sonunda kesitler 5-6 µm kesilerek hematoxilen-eosin ile boyandı.

Dokulardaki kaspaz aktivitesini göstermek için Avidin Biotin Peroksidaz Kompleks (ABC) tekniği, ticari kitle (Zymed, Histostain Plus Kit, California, USA) öngörülen standart prosedüre göre yapıldı. Primer antikor olarak anti-kaspaz 3 (aktif) (Novus NB100-56113) (sulandırma oranı 1/2000) kullanıldı.

Hematoksilen-Eozin ile boyanan kesitlerde hepatositlerde yağlanma, yangı, nekroz ve fibrozis semikantitatif olarak; iki patoloğ tarafından her bir kesitte 10 farklı alanda 10'luk ve 20'lik objektifte sayılıp her bir hasar parametresi ortalama değer alınarak skorlandı ve yüzdelik değerler hesaplandı. Yağlanma eğer karaciğer hücrelerinin % 33'ünden az ise 1 (hafif), % 33-66 arası ise 2 (orta) ve % 66'dan fazla ise 3 (şiddetli) olarak kabul edildi. İnflamasyon, nekroz ve fibrozis 0-3 arasında derecelendirildi (yok=0, hafif=1, orta=2, şiddetli=3). Gruplarda değerler istatistiksel olarak değerlendirildi ve gruplar arasındaki istatistiksel önem kaydedildi.

Erciyes Üniversitesi Merkez laboratuvarı Klinik Biyokimya bölümünde alanin aminotransferaz (ALT), total protein, albümin, trigliserit, total kolesterol analizleri yapıldı. Biyokimyasal parametreler ticari kitleler kullanılarak Tıp Fakültesi Merkez laboratuvarında hizmet alımı ile Roche Cobas 8000 marka otoanalizatörde ticari kitleler (Roche Cobas Kit-İsviçre) kullanılarak belirlendi.

Karaciğer dokusu MDA düzeyleri ticari kit (Cayman, USA) ve TAK (Total Antioksidan Kapasitesi) düzeyleri ticari kit (Rel Assay, Türkiye) kullanılarak ELISA cihazında (µQuant Bio-Tek) belirlendi.

Karaciğerde yangı, yağlanma, nekroz ve fibrozis skor değerleri gruplar arasında karşılaştırılmaları için Kruskal Wall's test, farklılığın önemli çıktığı gruplarda ikili karşılaştırmalar Dwans Steet Critchlow Fligner ikili karşılaştırma testi ile yapıldı. İstatistiksel analizlerde Jamovi paket programı kullanıldı.

Biyokimyasal (ALT, Total Protein, Albümin, Total kolesterol, Trigliserit) ve Malondialdehit (MDA) ile total antioksidan kapasitesi (TAK) verilerinin istatistiksel analizleri gruplar arasında karşılaştırıldığında Kruskal Wall's test, farklılığın önemli çıktığı durumlarda Bonferoni düzeltmeli Mann Whitney U testi ile yapıldı. İstatistiksel analizlerde SPSS 20 paket programı kullanıldı.

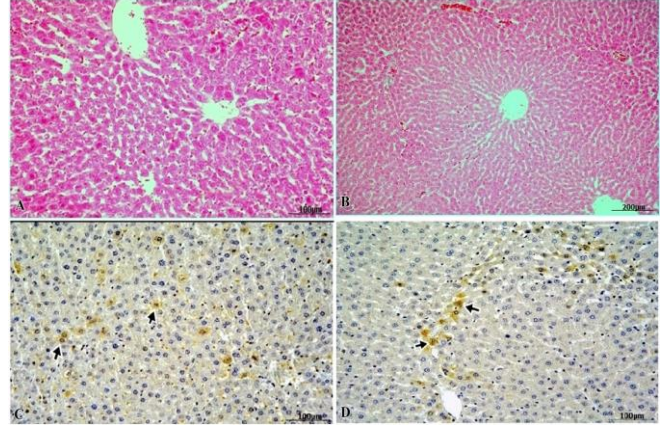
BULGULAR

Grup I ve III'deki ratlarda klinik bulgu görülmezken, Grup II ve IV'de halsizlik, sendeleyerek yürüme, iştahsızlık, aşırı tükürük salgısı ve kilo kaybı gibi klinik bulgular gözlemlendi. Grup I ve III'de ki ratlarda yapılan nekropsilerde makroskopik olarak karaciğer ve sistemik olarak alınan diğer organ numunelerinde patolojik lezyona rastlanılmadı. Grup II ve IV'de bazı hayvanların karaciğerlerinde koyu kırmızı veya beyaz sarımtırak renkte değişiklikler görüldü. Grup II ve IV'deki ratların karaciğerlerinde hacimce artış tespit edildi.

Histopatolojik ve İmmunohistokimyasal Bulgular

Kontrol Grubu (Grup I ve III); Grup I ve III'deki ratların karaciğer (Şekil 1 A, B) ve sistemik alınan diğer organ doku örneklerinin histolojisinde lezyon bulunmayıp normal yapıda oldukları göz-

lendi. Grup I ve III'deki ratların karaciğerlerine Kaspaz 3 antikorları ile yapılan immunohistokimyasal boyamada normal apoptoza maruz kalan az sayıda sitoplazmaları kahverenge boyanmış pozitif hücreler görüldü (Şekil 1 C, D).



Şekil 1. Grup I (A) ve Grup III'de (B) karaciğerlerin normal histolojik görünümü. Karaciğer, Hx E. Grup I (C) ve Grup III'de (D); immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 3 pozitif görünümü. ABC-P

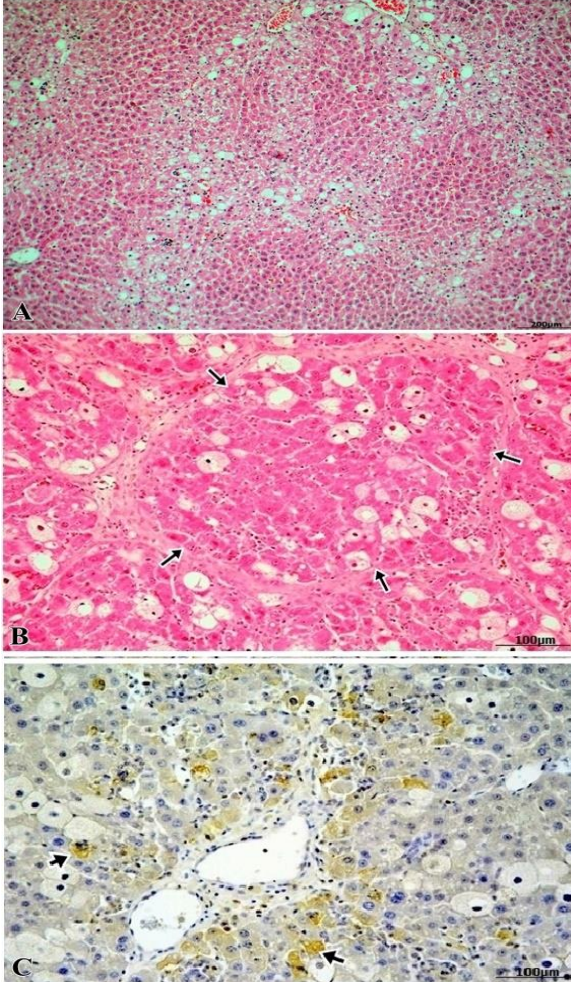
Karbon Tetraklorür Grubu (Grup II); Ratların karaciğerlerinden hazırlanan doku kesitlerinin histopatolojik incelemesinde hepatositlerde yoğun olarak büyüklükleri farklı makro ve mikroveziküler yağ vakuelleri parankimdeki geniş alanlarda dikkati çekti. Bu alanlarda remark kordonlarının yapısı bozulmuştu. Net yerleşim yeri klasik nekroz sınıflandırmasına benzemeyen pembe homojen renkli geniş nekrotik alanların tüm parankime yayıldığı ve bu alanların pembe homojen bir kitleye dönüştüğü, bu alandaki hepatositlerin sitoplazmalarında mikroveziküler yağ vakuelleri daha belirgin olarak görülmekteydi (Şekil 2 A). Parankimde lenfosit zengin mononükleer hücre infiltrasyonları ile Kupffer hücrelerinde sayıca artış ve fokal kanama alanlarının varlığı dikkati çekti. Portal bölgelerde daha belirgin olmak üzere ortadan şiddetliye ulaşan fibrozis, klasik lobül yapısını bölerek parankimde hepatosit gruplarından oluşan lobulasyon formasyonu meydana getirmişti (Şekil 2 B).

Bu gruptaki (Grup II) ratların karaciğerlerinden hazırlanan doku kesitlerine kaspaz 3 antikorları ile yapılan immunohistokimyasal boyamada; Grup I ve Grup III'e göre daha belirgin olarak, çok sayıda hepatositlerin sitoplazmasında kahverenginde pozitif reaksiyon görüldü (Şekil 2 C).

Karbon Tetraklorür+KÇY verilen Grup (Grup IV); Grup IV'de karaciğer dokularının histolojik incelemesinde Grup II'ye bağlı şekillenen hücresel nekroz ve yağ vakuol oluşumları ve hücre infiltrasyonu şiddeti büyük benzerlik gösterdi. Tüm parankim dokuda ve özellikle Vena centralis çevresinde yer alan hepatositlerde makro ve mikroveziküler olarak büyüklükleri farklı yağ vakuolizasyonu dikkati çekti (Şekil 3 A). Yerleşim yerleri spesifik özellik göstermediği için sınıflandırılmayan geniş nekrotik alanlar tüm parankime yayılmıştı. Bu alanlarda remark kordon yapıları tamamen bozulmuştu. Parankimde çoğunluğu lenfosit olan mononükleer hücre infiltrasyonları ve Kupffer hücre hiperplazileri, fokal kanama alanları görüldü. Ortadan şiddetliye kadar

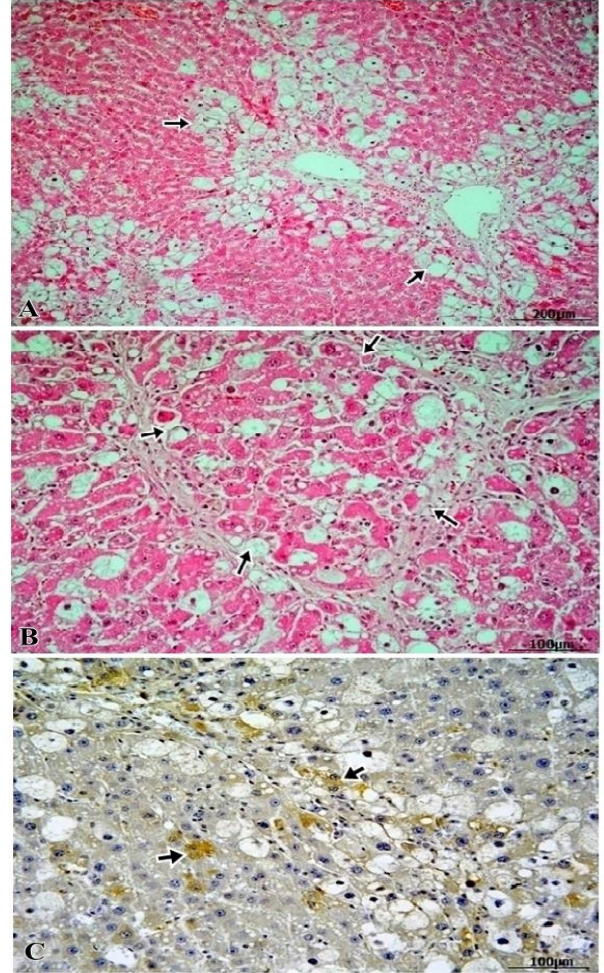
ulaşan fibrozis alanları klasik lobül yapısını bölerek parankimde hepatosit gruplarından oluşan lobulasyon formasyonuna yol açtığı görüldü (Şekil 3 B).

Grup III'de ki ratların karaciğerlerinden hazırlanan doku kesitlerine kaspaz 3 antikoru ile yapılan immunohistokimyasal boyamada Grup I ve Grup III'e göre daha belirgin olarak, çok sayıda hepatositlerin sitoplazmasında kahverenginde pozitif reaksiyon görüldü (Şekil 3 C).



Şekil 2. (A); Parankiminde pembe homojen renkli geniş nekroz-yağlanma alanları; **(B);** Karaciğer parankiminde fibröz doku ile şekillenen lobulasyon yapıları (okların sınırladığı alan)'nın görünümü, HxE. **(C);** Grup II'de immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 3 pozitif görünümü ABC-P

Karaciğer Hasar Skorlaması; Grup I ve III'de yangı, yağlanma, nekroz ve fibrozis skorları sıfır olup, Grup II ve Grup IV'de istatistiksel olarak anlamlı bir değişim tespit edildi ($P<0.001$). Karbon tetraklorür ile karaciğer toksikasyonu oluşturulan ratlara iyileştirmek amaçlı verilen KÇY'nin yangı, yağlanma, nekroz ve fibrozis skorları yönünden azaltıcı bir etkisi olmadığı görüldü (Tablo 2).



Şekil 3. (A); Parankiminde özellikle V. centralislar periferindeki hepatositlerde yoğun makro (oklar) ve mikro (ok başları) veziküler yağ vakuolleri **(B);** Karaciğer parankiminde fibröz doku ile şekillenen lobulasyon formlarının (okların sınırladığı alan) görünümü, Karaciğer, HxE. **(C)** Grup IV'de immunohistokimyasal boyama, az sayıda apoptotik hepatositlerin (oklar) kaspaz 3 pozitif görünümü. ABC-P

Tablo 2. Deneme gruplarına ait doku hasar parametre skorlarının istatistiksel önem kontrolü

Gruplar	KONTROL (Grup I) (n=12)	CCl ₄ (Grup II) (n=12)	KÇY (Grup III) (n=12)	KÇY+CCl ₄ (Grup IV) (n=12)	P değeri
Yangı	0 ^a (0-0)	2.0 ^b (1.0-2.0)	0 ^a (0-0)	2.0 ^b (1.0-2.0)	P<0.001
Yağlanma	0 ^a (0-0)	2.0 ^b (1.25-2.75)	0 ^a (0-0)	2.0 ^b (1.25-2.75)	P<0.001
Nekroz	0 ^a (0-0)	1.0 ^b (1.0-2.0)	0 ^a (0-0)	1.0 ^b (1.0-2.0)	P<0.001
Fibrozis	0 ^a (0-0)	2.0 ^b (2.0-2.75)	0 ^a (0-0)	2.0 ^b (2.0-2.75)	P<0.001

^{a-b}: Her satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark önemlidir.

Biyokimyasal Analiz Bulguları

Çalışmada gruplara ait serumdan ALT aktivitesi, trigliserit, total protein, albümin ve kolesterol düzeyleri ve karaciğer

dokusundan MDA ve TAK aktiviteleri belirlenmiş etkileri Tablo 3'de verildi.

Tablo 3. Grupların biyokimyasal parametreler

GRUPLAR	KONTROL (Grup I) (n=12)	CCl ₄ (Grup II) (n=12)	KÇY (Grup III) (n=12)	KÇY+CCl ₄ (Grup IV) (n=12)	P değeri
ALT(U/L)	63.00±8.018 ^a	2497.00±324.060 ^b	84.29±33.135 ^a	2284.20±248.955 ^b	P<0.001
Total Protein(g/dL)	6.15±0.294 ^b	5.68±0.224 ^a	6.82±0.441 ^b	5.95±0.188 ^a	P<0.001
Albümin(g/dL)	4.04±0.251 ^b	3.53±0.144 ^a	4.71±0.322 ^c	3.72±0.266 ^a	P<0.001
Total kolesterol (mg/dL)	44.08±10.723 ^b	66.14±8.591 ^a	46.80±7.598 ^b	61.38±4.596 ^a	P<0.001
Trigliserit (mg/dL)	34.10±9.814 ^b	139.00±22.211 ^a	41.92±8.939 ^b	79.75±15.545 ^{ab}	P<0.001
MDA (µmol/mg protein)	5.57±0.31 ^c	12.49±0.95 ^a	6.67±0.74 ^c	9.68±0.59 ^b	P<0.001
TAK (mmol/L)	2.49±0.01	2.53±0.01	2.52±0.01	2.52±0.01	P>0.05

^{a-b-ab-c}: Her satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark önemlidir. Ortalama±Std. Hata

Grup I ve Grup III arasında serum ALT aktivitesi yönünden istatistiki anlamda bir fark belirlenmedi. Grup II'de önemli düzeyde artan (P<0.001) serum ALT aktivitesi, Grup IV'deki hayvanlarda azalma göstermedi (Tablo 3). Sadece Grup II'de, serum total protein ve albümin düzeyleri istatistiki önemde düşüş gösterdi (P<0.001). Grup IV'de KÇY uygulaması serum total protein ve albümin değerlerinde sayısal olarak artışa neden oldu (Tablo 3). Grup II'de önemli düzeyde artış gösteren serum total kolesterol düzeyleri (P<0.001), Grup IV uygulamasından etkilenmedi (Tablo 3). Grup II'de serum trigliserit düzeyleri önemli düzeyde (P<0.001) artış gösterirken, Grup IV'de, artmış trigliserit düzeylerini sayısal olarak düşürdü. Ancak istatistiki olarak anlamlı olmayan bu düşüşler, Grup IV'de daha belirgindi (Tablo 3). Çalışmada en yüksek MDA düzeyi Grup II'de belirlenmiştir (P<0.001). Grup IV'de MDA değerlerinde önemli düzeyde düşüş tespit edilmiştir. Total antioksidan kapasitesi yönünden ise gruplar arasında fark saptanmamıştır (P>0.05) (Tablo 3).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Karbon tetraklorür'ün kronik olarak uygulanmasının rat karaciğerlerinde hepatitis, fibrozis ve siroz ile sonuçlanan karaciğer toksikasyonuna sebep olduğu bildirilmiştir (10, 21, 22).

Klasik bilgi olarak karbon tetraklorür hepatositlerdeki, granülsüz endoplazmik retikulumda bulunan sitokrom P₄₅₀ monoksinjenaz enzim sistemiyle daha toksik olan triklorometil (CCl₃) ve triklorometil peroksil (CCl₃O₂) serbest radikal ara metabolitlerine dönüşür. Bu metabolitler hücre membranındaki doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girmesiyle lipid peroksidasyonunu başlatır veya protein-yağlara bağlanarak hücre membranlarını bozmak suretiyle hepatosit yıkımı ve sonuçta karaciğer hasarını oluşturabildiği bilinmektedir (4, 5, 9).

Ratlarda karaciğer hasarı oluşturmak amacıyla CCl₄'ün kronik olarak uygulandığı çalışmalar mevcuttur (10, 21-25).

Ratlara sekiz hafta, haftada üç kere (24), on hafta, haftada bir kere (23), on iki hafta, haftada iki kere (25) uygulanan 0,2 ml/100 g CCl₄'ün, karaciğer dokusunda fibrosit, fibroblast ve kollagen demetlerden oluşan fibröz dokunun özellikle portal bölgeden gelişerek şiddetli nekroza maruz kalan alanları çevrelediği, yağ dejenerasyonuna uğramış hepatositler ile yangısal hücre infiltrasyonlarının bulunduğu pseudolob oluşumları histopatolojik lezyon olarak bildirilmiştir. Bu araştırmacılar dışında, haftada iki kere 1 ml/kg CCl₄ uygulayan Venukumar ve Latha, (22) ratlara sekiz hafta, haftada üç kere, Yehia ve ark. (10) on hafta, haftada bir kere, Tasci ve ark. (25) on iki hafta, haftada iki kere 0,2 ml/kg dozunda CCl₄'ün uygulanması ile de karaciğerde parankimde şiddetli nekroz ile birlikte hepatositlerde mikromakroveziküler yağlanma, balonumsu veya vakuoler dejenerasyon, lenfosit hücre infiltrasyonu, fibroz doku artışı ile şekillenen pseudolob oluşumlarını saptamışlardır.

Sunulan çalışmada da, karaciğer hasarı oluşturan araştırmacıların (10, 21-25) bulgularıyla paralel olarak, CCl₄'ün sekiz hafta boyunca 0,2 ml/kg dozunda uygulanmasıyla, ratların karaciğer kesitlerinde özellikle mikro-makro yağ vakuollerinin yoğun olduğu parankiminde ortadan şiddetliye değişen yangısal hücre infiltrasyonu ile fibrozis saptanmıştır. Bu çalışmada; CCl₄'e bağlı oluşan karaciğer toksikasyonu, dolayısıyla oluşan histopatolojik değişikliklerin, lipid peroksidasyonunun başlamasından sorumlu olan CCl₄'ün toksik metabolitlerinden (5, 9) ileri gelen serbest oksijen radikallerine bağlı olarak hücre zarından iyonların geçişi membran enzimlerinin aktivasyonu ve hücre içi sinyal iletimi gibi normal hücre fizyolojisinin devamlılığı için önemli olan membran akışkanlığının azalmasından ve ayrıca artan oksidatif stresin hepatositlerde mitokondriyal hasara neden olması sonucu oluşmuş olabilir.

Bitkisel kaynaklı antioksidan içerikli bileşiklerin ucuz ve kolay ulaşılabilir olmasından dolayı, toksik ve yan etkilerinin azlığından dolayı, değişik kimyasal maddeler ile oluşturulan karaciğer hasarına karşı koruyucu etkilerini belirlemek amaçlı, hayvan modellerinde yapılan deneysel çalışmalar popüler hale gelmiştir (26).

Kabak çekirdeği (*Cucurbita pepo L.*), anti-aterojenik ve hepatoprotektif etkili doymamış yağ asitleri, antioksidanlar, proteinler ve fitosterollerden zengin bir bitkidir (27- 29). Lazos ve ark. (30) kabak çekirdeğinin % 45,4 ham yağ, % 32,3 ham protein, % 12,1 ham lif ve % 4,65 kül içerdiğini aynı zamanda yağsız ununun ise % 55,4 oranında ham protein içerdiğini ayrıca tohumların Zn, K, Ca, Mg, Fe, Cu ve P gibi önemli mineraller bakımından zengin olduğunu bildirmişlerdir. Kabak çekirdeği, tıpta diyabet ve paraziter hastalık tedavilerinde kapsadığı fitosteroller nedeniyle kullanılmakta olduğu, ayrıca kabaktaki fitosterollerin prostat kanseri hücrelerinin gelişmesini engellediği rapor edilmiştir (17).

Karbon tetraklorürle ratlarda oluşturulan karaciğer hasarının iyileştirilmesi amacıyla kabak çekirdeği yağı kullanılmış çalışma sayısı çok sınırlı olup (7, 16, 20, 31), diğer toksik maddeler kullanılarak oluşturulan karaciğer hasarının kabak çekirdeği yağı ile iyileştirilmesi amacıyla yapılmış çalışma sayısı da sınırlıdır (32, 33).

Karbon tetraklorür ile ratlarda oluşturulan karaciğer toksikasyonuna karşı kabak çekirdeği kullanılan çalışmalardan; Nkosi ve ark. (16), CCl₄ ile oluşturulan karaciğer hasarında, kabak çekirdeğinin plazma enzimlerine etkisini araştırmış ve kabak çekirdeğinin izolatını kullanmıştır; CCl₄ uygulandıktan iki saat sonra 1 ml mide tüpü ile kabak çekirdeği proteini izolatu (20 g/100 ml) uygulaması sonrasında % 20 kabak çekirdeği protein izolatu diyetine geçilmiştir. Sonuçta kan serum analizlerinde CCl₄ toksikasyonu sonucu önemli artışlara neden olan enzimlerin; kabak çekirdeği proteini izolatının uygulanması ile önemli ölçüde azaldığını kaydetmişlerdir. Yine Nkosi ve ark. (7), CCl₄ ile ratlarda oluşturulan karaciğer hasarında, kabak çekirdeğinin antioksidan etkisini araştırırken, kabak çekirdeğinin izolatını kullanmış, 5 gün boyunca düşük proteinli bir diyete tabi tutulan ratlara CCl₄ uygulandıktan iki saat sonra 1 ml mide tüpü ile kabak çekirdeği proteini izolatını (20 g/100 ml) uygulamışlardır. Sonuçta kan serum analizlerinde tüm enzimlerin aktivite ve antioksidan seviyelerine bakıldığında, kabak çekirdeği proteini izolatu uygulamasının CCl₄ toksikasyonu ile ilişkili zararlı etkileri hafifletmede etkili olduğu sonucuna varıldığını rapor etmişlerdir. Mohamed ve ark. (31) da, kabak çekirdeği protein izolatının alkalik ekstraksiyonu (PSPI) ve CCl₄ verilen sıçanlarda serum karaciğer fonksiyon enzimleri, serum lipid ve antioksidan enzimler üzerindeki etkisini inceledikleri çalışmada; akut karaciğer toksisitesini oluşturmak için 1 ml/kg vücut ağırlığında iki kez CCl₄'ün subkutan enjektenden sonra % 25, 50, 75 ve 100 PSPI'li diyetlerle beslenmiş ratlarda; CCl₄ verilen gruptaki sıçanların karaciğerinin incelenmesinde hepatositlerde ciddi yağ dejenerasyonu ve hepatik sinüzoidlerde hücre infiltrasyonları görülürken, kabak çekirdeği protein izolatu içeren % 25 diyetle beslenen grupta hepatositlerde görülen vakuolar dejenerasyonunun

şiddetinin azaldığı, % 50, 75 ya da 100 kabak çekirdeği protein izolatu içeren diyetle beslenen ratlarda ise hepatik lobülün neredeyse normal karaciğer histolojisini gösterdiği, bu sonuçlardan, kabak çekirdeği protein izolatu'nun karaciğer hücrelerini CCl₄'den koruyabileceği bildirilmiştir. Bu çalışmalardan en kapsamlı olanı Atasever ve ark. (20) tarafından yapılmış olup; 1, 2, 3 ml/kg kabak çekirdeği yağının, CCl₄ ile ratların karaciğerlerinde oluşturulan histopatolojik değişiklikler üzerinde olumlu etkisi 1 ve 2 ml'lik grupta hiç gözlenmezken, 3 ml'lik gruptaki karaciğer dokularında sınırlı olduğu, özellikle 2 ve 3 ml/kg'lık gruplarda genel olarak incelenen biyokimyasal ve lipid peroksidasyon ile antioksidan değerlerini kontrol grubu değerlerine yaklaştırdığından, iyileştirici bir etkisinin olabileceği, ancak bu iyileşmenin karaciğer dokusundaki hasarı tamamen ortadan kaldırdığı bildirilmiştir.

Diğer toksik kimyasal maddelerle oluşturulan karaciğer hasarının kabak çekirdeği yağı ile iyileştirilmesi amacıyla yapılmış çalışmalar (19, 32-35) sınırlıdır. Bunlardan Aal (32), Azatioprin (AZ) ile ratlarda oluşturulan karaciğer hasarını iyileştirmek için dört hafta boyunca kabak çekirdeği yağı/azatioprin (4 ml/15mg/gün) uygulamış, ancak histolojik değişikliklerde kontrol grubuna göre önemli bir fark görmediğini; Seif (33), deneysel alkole bağlı hepatotoksisite üzerindeki kabak çekirdeği yağının koruyucu rolünü değerlendirmiş, ratlara üç hafta boyunca haftada üç kez kabak çekirdeği yağı (50 mg/kg vücut ağırlığı) ve haftada üç kez alkol (% 10) (deneyin ilk iki haftasında) uygulamış, alkol uygulanan ratlarda tüm hepatositlerde yaygın bir şekilde yağ dejenerasyonları tespit edilirken, kabak çekirdeği yağı+alkol verilen gruptaki ratların hepatositlerinde benzer şekilde yaygın yağ vakuollerinin olduğunu bildirmişlerdir. Nkosi ve ark. (35) kabak çekirdeği proteini izolatının, asetaminofen kaynaklı akut karaciğer hasarına karşı alanin transaminaz (ALT) ve aspartat transaminaz (AST) aktivite seviyeleri üzerindeki etkilerini araştırdıkları çalışmada; beş gün boyunca düşük proteinli bir diyete tabi tutulan ratlara intraperitoneal 10 ml/kg polyethylene glycol (PEG) ve deri altı 600 mg acetaminophen 10 ml PEG verilmiş, acetaminophen uygulandıktan iki saat sonra da mide tüpü ile 1 ml kabak çekirdeği proteini izolatu (20 g/100ml) verilmiştir. Deneme sonunda, incelenen iki enzimin aktivite seviyelerinde sadece acetaminophen verilen ratlarda önemli artışların meydana geldiği, asetaminofen toksikasyonu sonrasında kabak çekirdeği proteini izolatının uygulanması yapılan ratlarda ise iki enzimin aktivitesinde önemli ölçüde azalmanın olduğu, dolayısıyla; kabak çekirdeği protein izolatının umut verici antioksidatif özelliklere sahip olduğu, protein yetersiz beslenme ve asetaminofen zehirlenmesi ile ilişkili zararlı etkilerin hafifletilmesinde etkisinin olabileceği sonucuna varılmıştır. Fawzy ve ark. (34), erkek farelerde bisfenol-A'nın (BPA) olumsuz etkilerine karşı kabak çekirdeği yağının iyileştirici rolünü araştırdığı çalışmada; farelere, ardışık 28 gün boyunca günde bir kez 50 mg/kg vücut ağırlığında oral yoldan bisfenol-A uygulamış, kabak çekirdeği yağı, farelere oral olarak 1 ml/kg canlı ağırlıkta, bisfenol-A verilmeden önce ve sonrasında 28 gün boyunca verilmiştir. Deneme sonunda BPA kaynaklı DNA hasarının, karaciğer ve testisler-

de belirgin histopatolojik değişikliklerin olduğunu, kabak çekirdeği yağının verildiği gruplarda ise DNA hasarının hafiflediği, karaciğer ve testis dokularındaki histopatolojik değişikliklerin azaldığı rapor edilmiştir. Eraslan ve ark. (19), kabak çekirdeği yağının aflatoksinin oksidatif strese neden olma potansiyeline karşı antioksidan etkisini araştırmışlardır. Denemede, BALB/c farelere 1,5 ml/kg.ca/gün kabak çekirdeği yağı ve 625 µg/kg.ca/gün aflatoksin verilen gruplarda, aflatoksinin oksidatif stres belirteçlerinin kabak çekirdeği yağı uygulaması ile aflatoksin kaynaklı yan etkilerinin azaldığını bildirmişlerdir.

Kronik CCl₄ toksikasyonu ile oluşan karaciğer lezyonlarının iyileştirilmesi amacıyla kabak çekirdeği yağı ve protein izolatu uygulanmış çalışmalarda (7, 16, 31), CCl₄ ile oluşturulan karaciğer hasarının hafiflediği veya tamamen ortadan kalktığı bildirilirken, Atasever ve ark. (20)'ünün çalışmasında, ratlarda CCl₄ ile oluşturulan karaciğer hasarının düzeltilmesi amacıyla kullanılan (1, 2 ve 3 ml/kg) kabak çekirdeği yağının 1 ve 2 ml'lik dozlarında karaciğer hasarında hiçbir düzelme gözlenmezken, 3 ml/kg dozunda karaciğer hasarında hafif düzelme görüldüğü bildirilmiştir. Sunulan bu çalışmada ise kronik CCl₄ toksikasyonu ile ilgili oluşan karaciğer lezyonlarının iyileştirilmesi amacıyla kabak çekirdeği yağı uygulanmış gruptaki ratların hepatositlerinde makro-mikro yağ vakuol oluşumları, dejeneratif ve nekrotik değişiklikler, mononükleer hücre infiltrasyonları, remark kordonlarının yapısının bozulması, özellikle portal bölgede ve sentrilobüller olarak fibröz doku artışı ile parankimde pseudolob oluşumları gözlenmiştir. Bu bulguların sadece CCl₄ verilen (Grup II) ratların histopatolojik bulguları ile birebir örtüştüğü saptanmıştır. Bu bulgular doğrultusunda, CCl₄ ile birlikte 4 ml/kg kabak çekirdeği yağı uygulamasının histopatolojik yönden koruyucu hiçbir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır. Bu sonuç; kabak çekirdeği içerisindeki antioksidan bileşenlerin, CCl₄'ün toksik metabolitlerinin zararlı etkilerini ortadan kaldırmadığını düşündürmüştür.

Karbon tetraklorür karaciğerde nekrozu uyarsa da, hepatositlerdeki mitokondriyal fosfolipid tabakasını yok eder ve kaspaz 3'e bağlı apoptozu tetiklemektedir (36, 37). Ratlarda CCl₄'ün uygulandığı in vitro ve in vivo çalışmalarda, hepatositlerde apoptozu belirlemek için yapılan kaspaz aktivitesini içeren immunohistokimyasal sonuçlar mevcuttur (38-42). Kaspaz 3 aktivitesinin artışı bildiren, Aram ve ark. (39), Edfawy ve ark. (40), Lee ve ark. (41), Liu ve ark. (42) ile Parajuli ve ark. (38)'inin çalışmaları, bizim çalışmamızın sonuçları ile uyumludur. Araştırmacıların ve sunulan aratırmanın sonuçları; CCl₄'ün neden olduğu aşırı reaktif oksijen türevlerinin, endojen antioksidan enzimlerini tükettiği ve kaspaz 3, 8 ve 9 gibi enzimlerin aktif olarak hepatosit apoptozisini tetiklediği (37), bu durumun CCl₄ toksikasyonunda hem intrinsik hem de ekstrinsik yolu kullanarak hepatositleri apoptoza götürdüğü ve yıkımı gerçekleştirdiğini düşündürmektedir.

Karbon tetraklorür ile oluşturulan karaciğer hasarında, kabak çekirdeği yağının hepatositler üzerindeki kaspaz aktivitesi etkisine dair yeterli çalışmaya ulaşılamamıştır. Karaciğer hasarı oluşturan çeşitli kimyasallara karşı kabak çekirdeğinin uygulandığı çalışmalarda; kaspaz 3 aktivitesinde pozitif

kontrol gruplarına göre azalma bildirilmiştir (32, 43). Atasever ve ark. (20) tarafından yapılan çalışmada, 3 ml/kg KÇY'nin verildiği grupta kaspaz-3 aktivitesinin azalması KÇY'nin karaciğer dokusunda oluşan hasarı kısmen düzelterek koruyabileceği bildirilirken; sunulan bu çalışmada CCl₄ ile ratlarda oluşturulan karaciğer hasarına karşı verilen 4 ml/kg kabak çekirdeği yağının kaspaz 3 aktivitesi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı, aksine CCl₄ (Grup II) verilen gruptaki kaspaz 3 aktivitesi ile benzer bir görüntünün varlığı dikkati çekmiştir.

Karbon tetraklorür gibi nekroza sebep olan ajanların karaciğer parankiminde hasara yol açarak kandaki AST ve ALT aktivitelerinde artışa sebep olduğu bildirilmektedir (9, 12, 44-47). Sunulan çalışmada da araştırmacıların bulgularıyla uyumlu olarak ratlara CCl₄'ün kronik uygulanması sonucu, hepatosit yıkımına bağlı hücre membran permeabilitesinin bozulması nedeni ile kan dolaşımına geçen ALT enziminin serum aktivitelerinde anlamlı bir yükseliş olduğu dikkati çekmiştir.

Malondialdehit, lipid peroksidasyonunun son ürünü olarak membran denatürasyonu ve peroksidasyona yol açan hidrojen peroksit ve reaktif oksijen türlerinin ortaya çıkmasına yol açar (27, 48). Kronik (10, 24) CCl₄ uygulamasıyla oluşturulan karaciğer hasarında araştırmacılar, karaciğer MDA düzeylerinin arttığını bildirmişlerdir. Aynı şekilde sunulan çalışmada da kronik olarak CCl₄ verilen ratlarda belirlenen karaciğer MDA düzeylerindeki artışlar, klasik anlamda CCl₄'ün karaciğer endoplazmik retikulumunda bulunan sitokrom P₄₅₀ monooksijenaz enzimi aracılığıyla toksik karakterde triklorometil (CCl₃) ve triklorometilperoksil (CCl₃O₂) serbest radikallerine dönüşmesiyle oluşan lipid peroksidasyonunun sonucu şekillenen doku hasarı ve antioksidan savunma mekanizmasının yetersizliğinden (5, 9) ileri geldiği şeklindedir.

Ratlarda karbon tetraklorürle oluşturulan karaciğer hasarının iyileştirilmesi amacıyla kabak çekirdeği yağı verilerek biyokimyasal verilerin değerlendirildiği sınırlı sayıda çalışmaya (7, 16, 20) rastlanılmıştır. Bu çalışmalarda CCl₄ veya diğer kimyasallarla oluşturulan karaciğer hasarına karşı kabak çekirdeği yağı, kabak çekirdeği ekstresi ve kabak çekirdeği protein izolatu verilerek biyokimyasal verilerde oluşan değişiklikler bildirilmiştir. Bu çalışmalardan Nkosi ve ark. (35) kabak çekirdeği protein izolatu'nun alanin transaminaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) plazma aktivite seviyeleri üzerindeki etkilerini asetaminofen (parasetamol) kaynaklı karaciğer hasarına karşı değerlendirmiş, sonuçta ALT ve AST seviyelerinin önemli ölçüde düştüğünü; Nkosi ve ark. (7, 16) kabak çekirdeği protein izolatu vererek serum karaciğer fonksiyon enzimleri, serum lipid düzeyi ve antioksidan enzimler üzerindeki değişiklikleri incelemişler; ALT, AST ve ALP düzeylerinin etkili bir şekilde azaldığını, Atasever ve ark. (20)'ünün çalışmasında 1, 2, 3 ml/kg kabak çekirdeği yağının verilmesiyle ALT enzim aktivitesinde önemli düşüş olduğunu bildirilmişlerdir. Sunulan çalışmada; Grup IV'de serum ALT aktivitesi yönünden azalma görülmezken, serum total protein ve albümin değerlerinde sayısal olarak artışa neden oldu. Karbon tetraklorür uygulaması ile artış gösteren serum total kolesterol düzeyleri KÇY (Grup IV) uygulama-

sından etkilenmedi. Grup IV'de serum trigliserit değerleri artış göstermiş, ancak istatistiki anlamda önemli olmayan bu düşüşler, Grup IV'de daha belirgindi. Çalışmalarda (7, 16) bildirilen CCl₄ ve diğer kimyasal maddelerle oluşturulan karaciğer hasarına karşı kullanılan antioksidan özellikli KÇY'nın biyokimyasal verilerin üzerine iyileştirici etkisi bizim çalışmamızda görülmemiştir. Eraslan ve ark. (19), kabak çekirdeği yağı kullanımının MDA düzeylerinin kontrol gruplarına yaklaştırdığını bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada CCl₄'lü gruplara (Grup IV) kabak çekirdeği yağı ilavesinin MDA değerlerinde önemli düzeyde düşüşe sebep olduğu tespit edilmiştir. Kabak çekirdeği yağının kısmen de olsa Eraslan ve ark. (19)'ının, çalışmasındaki gibi MDA seviyesini azalttığı için iyileştirme özelliğinin olduğunu fakat karaciğer doku hasarını düzelterek seviyede olamadığı görülmüştür. Çeşitli kimyasal maddeler ile oluşturulan karaciğer toksikasyonuna karşı kabak çekirdeği yağı kullanımının, total oksidan kapasitesini (TAK) belirleyen çalışmalara literatür taramalarında rastlanılamamıştır. Bizim çalışmamızda da total antioksidan kapasitesi yönünden gruplar arasında fark saptanamamış, bu nedenle değerlendirme yapılamamıştır.

Sonuç olarak: 4 ml/kg kabak çekirdeği yağının, CCl₄ ile karaciğerde oluşturulan hasarla ilgili histopatolojik değişiklikler üzerinde olumlu etkisi gözlenmemesine karşın, genel olarak incelenen biyokimyasal ve lipid peroksidasyon değerlerini kısmen de olsa kontrol grubu değerlerine yaklaştırdığı, bu nedenle iyileştirici bir etkisinin olabileceği, ancak bu iyileşmenin karaciğer dokusundaki hasara yansımadığını göstermiştir. Kabak bitkisinin etkisinin; bu bitkilerin kullanılan kısımları (kabuk, meyve, çekirdek), elde edilen ürünlerin çeşidi (ekstrakt, yağ vb.) ile yetiştikleri toprağın yapısı gibi etkenlere bağlı olarak içeriklerinin farklılığına, farklı işleme teknikleri ile hayvanların bireysel duyarlılıkları gibi birçok faktöre bağlı olarak değişebileceği düşünülmektedir. Bu nedenle farklı sürelerde ve herhangi bir yan etki oluşturmaksızın en iyi sonucu verecek farklı dozlarda kullanılarak dokular üzerine etkilerinin belirlenmesine yönelik yeni araştırmalar yapılmasına ihtiyaç olduğu kanaatine bu çalışma sonuçları ile varılmıştır.

TEŞEKKÜR

Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TYL-2018-8449 kodlu proje ile desteklenmiş ve yüksek lisans tezinden üretilmiştir.

KAYNAKLAR

- Crawford JM (2003). Karaciğer ve safra yolları. (İçinde): Robbins Temel Patoloji. Robbins SL, Cotran RS, Kumar V (editörler). 7. Baskı, s. 591-630. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, Türkiye.
- Recknagel RO, Glende EA Jr, Dolak JA, Waller RL. (1989). Mechanisms of Carbon Tetrachloride Toxicity. *Pharmacol Ther.* 43: 139-154.
- Muriel P, Mourelle M. (1990). Prevention by Silymarin of Membrane Alterations in Acute CCl₄ Liver Damage. *J Appl Toxicol.* 10: 275-279.
- Basu S (2003). Carbon Tetrachloride-Induced Lipid Peroxidation: Eicosanoid Formation and Their Regulation by Antioxidant Nutrients. *Toxicology.* 189:113-127.
- Manibusan MK, Odin M, Eastmond DA. (2007). Postulated Carbon Tetrachloride Mode of Action: A Review. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 25: 185-209.
- Kalaycıoğlu L, Serpek B, Nizamlıoğlu M, Başpınar N, Tiftik AM (2000). *Biyokimya.* s. 450-496. Nobel Yayın Dağıtım Ltd. Şti, Ankara, Türkiye.
- Nkosi CZ, Opoku AR, Terblanche SE. (2006). Antioxidative Effects of Pumpkin Seed (*Cucurbita pepo*) Protein Isolate in CCl₄-Induced Liver Injury in Low-Protein Fed Rats. *Phytotherap Res.* 20(11): 935-940.
- Etim OE, Akpan EJ, Ushoh IF. (2008). Hepatotoxicity of Carbon Tetrachloride: Protective Effect of *Gongronema Latifolium*. *J Pharm Sci.* 21: 268-274.
- Gnanaprakash K, Madhusudhana CC, Ramkanth S, et al. (2010). Aqueous Extract of *Flacourtia Indica* Prevents Carbon Tetrachloride Induced Hepatotoxicity in Rat. *Int J Biol Sci.* 6: 51-55.
- Yehia HM, Al Olayan EM, Elkhadragy MF. (2013). Hepatoprotective Role of the Pomegranate (*Punica granatum*) Juice on Carbon Tetrachloride Induced Oxidative Stress in Rats. *Life Sci J.* 10: 1534-1544.
- Zuinen R, Yamaji K, Aoki M, Chikuma T, Hojo H. (2007). Early Induced, High-Level Interleukin-6 Expression in the Rat Peritoneal Cavity into Which a Hepatotoxicant Carbon Tetrachloride Was Administered. *Toxicol Lett.* 170: 42-48.
- Atasever A, Yaman D. (2014). The Effects of Grape Seed and Colchicine on Carbon Tetrachloride Induced Hepatic Damage in Rats. *Exp Toxicol Pathol.* 66: 361-365.
- Ilhan N, Seçkin D. (2005). Protective Effect of *Nigella sativa* Seeds on CCl₄-Induced Hepatotoxicity. *FÜ Sağ Bil Tıp Derg.* 19: 175-179.
- Khorshid HR, Azonov JA, Novitsky YA, Farzamfar B, Shahhosseiny MH. (2008). Hepatoprotective Effects of *Setarud* Against Carbon Tetrachloride-Induced Liver Injury in Rats. *Indian J Gastroenterol.* 27: 110-112.
- Balderas Renteria I, Camacho Corona M, Carranzo Rozales P. (2007). Hepatoprotective Effect of *Leucophyllum Frutescens* on Wistar albino Rats Intoxicated with Carbon Tetrachloride. *Ann Hepatol.* 6: 251-254.
- Nkosi CZ, Opoku AR, Terblanche SE. (2005). Effect of Pumpkin Seed (*Cucurbita pepo*) Protein Isolate on the Activity Levels of Certain Plasma Enzymes in CCl₄-Induced Liver Injury in Low-Protein Fed Rats. *Phytotherap Res.* 19(4): 341-345.
- Al Zuhair HANA, El-Fattah AAA, El-Sayed MI. (2000). Pumpkin-Seed Oil Modulates the Effect of Felodipine and Captopril in Spontaneously Hypertensive Rats. *Pharmacol Res.* 41(5): 555-563.
- Hashemi JM. (2013). Pumpkin Seed Oil and Vitamin E Improve Reproductive Function of Male Rats Inflicted by Testicular Injury. *World Appl Sci J.* 23(10): 1351-1359.
- Eraslan G, Kanbur M, Aslan Ö, Karabacak M. (2013). The Antioxidant Effects of Pumpkin Seed Oil on Subacute Aflatoxin Poisoning in Mice. *Environ Toxicol.* 28(12): 681-688.
- Atasever A, Sentürk M, Ekebaş G, Yaman Gram D, Eren M. (2017). Ratlarda Karbon Tetraklorür ile Oluşturulan Kronik Karaciğer Hasarı Üzerine Kabak Çekirdeği Yağının Etkisi ve Kaspaz Aktivitesi ile Hepatik Apoptozisin Belirlenmesi. ERÜ BAP, TCD-2016-6791 kodlu proje. <https://avesis.erciyes.edu.tr/dosya?id=ee2819ed-6991-48b6-9d03-2b4430764357>

21. Feroz Khan Z, Asdaq SMB, Prasanna Kumar SR. (2009). Effects of Few Indian Medicinal Herbs on Carbon Tetrachloride Induced Hepatic Injury in Animals. *International J Pharm Tech Res.* 1: 579-587.
22. Venukumar MR, Latha MS. (2002). Hepatoprotective Effect of the Methanolic Extract *Curculigo Orchioides* In CCl₄ Treated Male Rats. *Indian J Pharmacol.* 34: 269- 275.
23. Lida C, Fujii K, Koga E, et al. (2009). Effect of Alpha-Tocopherol on Carbon Tetrachloride Intoxication in the Rat Liver. *Arch Toxicol.* 83: 477-483.
24. Lv P, Luo HS, Zhou XP, et al. (2006). Thalidomide Prevents Rat Liver Cirrhosis via Inhibition of Oxidative Stress. *Pathol Res Pract.* 202: 777-788.
25. Tasci I, Mas N, Mas MR, Tuncer M, Comert B. (2008). Ultrastructural Changes in Hepatocytes After Taurine Treatment in CCl₄ Induced Liver Injury. *World J Gastroenterol.* 14: 4897-4902.
26. Radi R. (2018). Oxygen Radicals, Nitric Oxide, and Peroxynitrite: Redox Pathways in Molecular Medicine. *Proc Natl Acad Sci.* 115: 5839-5848.
27. Makni M, Fetoui H, Gargouri NK, et al. (2008). Hypolipidemic and Hepatoprotective Effects of Flax and Pumpkin Seed Mixture Rich in ω-3 and ω-6 Fatty Acids in Hypercholesterolemic Rats. *Food Chem Toxicol.* 46(12): 3714-3720.
28. Phillips KM, Ruggio DM, Ashraf- Khorassani M. (2005). Phytosterol Composition of Nuts and Seeds Commonly Consumed in the United States. *J Agric Food Chem.* 53: 9436-9445.
29. Ryan E, Galvin K, O'connor TP, Maguire AR, O'brien NM. (2007). Phytosterol, Squalene, Tocopherol Content and Fatty Acid Profile of Selected Seeds, Grains, and Legumes. *Plant Food Hum Nutr.* 62(3): 85-91.
30. Lazos ES. (1986). Nutritional, Fatty Acids and Oil Characteristics of Pumpkin and Melon Seeds. *J Food Sci.* 51(5): 1382-1383.
31. Mohamed RA, Ramadan RS, Ahmed LA. (2009). Effect of Substituting Pumpkin Seed Protein Isolate for Casein on Serum Liver Enzymes, Lipid Profile and Antioxidant Enzymes in CCl₄-Intoxicated Rats. *Adv Biol Res.* 3(1-2): 9-15.
32. Aal FSA. (2014). The Protective Effect of Pumpkin Seed Oil on Azathioprine-Induced Hepatic Toxicity in Adult Male Albino Rats: Histological and Immunohistochemical Study. *Basic Sci Med.* 3(4):85-100.
33. Seif HSA. (2014). Ameliorative Effect of Pumpkin Oil (*Cucurbita pepo* L.) Against Alcohol-Induced Hepatotoxicity and Oxidative Stress in Albino Rats. *Beni-Suef Univ J Basic Appl Sci.* 3(3): 178-185.
34. Fawzy EI, El Makawy AI, El-Bamby MM, Elhamalawy HO. (2018). Improved Effect of Pumpkin Seed Oil Against the Bisphenol-A Adverse Effects in Male Mice. *Toxicol Rep.* 5: 857-863.
35. Nkosi CZ, Opoku AR, Terblanche SE. (2006). In Vitro Antioxidative Activity of Pumpkin Seed (*Cucurbita pepo*) Protein Isolate and Its in Vivo Effect on Alanine Transaminase and Aspartate Transaminase in Acetaminophen Induced Liver Injury in Low Protein Fed Rats. *Phytother.* 20(9): 780-783.
36. Guo XL, Liang B, Wang XW, et al. (2013). Glycyrrhizic Acid Attenuates CCl₄-Induced Hepatocyte Apoptosis in Rats via a p53-mediated pathway. *World J Gastroenterol.* 19(24): 3781-3791.
37. Tao LL, Cheng YY, Ding D, et al. (2012). C/EBP-α Ameliorates CCl₄-Induced Liver Fibrosis in Mice Through Promoting Apoptosis of Hepatic Stellate Cells with Little Apoptotic Effect on Hepatocytes in Vitro and in Vivo. *Apoptosis.* 17(5): 492-502.
38. Parajuli DR, Park EJ, Che XH, et al. (2013). PF2401-SF, Standardized Fraction of *Salvia Miltiorrhiza*, Induces Apoptosis of Activated Hepatic Stellate Cells in Vitro and in Vivo. *Molecules.* 18(2): 2122-2134.
39. Aram G, Potter JJ, Liu X, Torbenson MS, Mezey E. (2008). Lack of Inducible Nitric Oxide Synthase Leads to Increased Hepatic Apoptosis and Decreased Fibrosis in Mice After Chronic Carbon Tetrachloride Administration. *Hepatology.* 47(6): 2051-2058.
40. Edfawy M, Hassan MH, Mansour A, Hamed AA, Amin HAA. (2012). Meloxicam Modulates Oxidative Stress Status, Inhibits Prostaglandin E2, and Abrogates Apoptosis in Carbon Tetrachloride-Induced Rat Hepatic Injury. *Int J Toxicol.* 31(3): 276-286.
41. Lee TY, Chang HH, Wang GJ, Chiu JH, Yang YY, Lin HC. (2006). Water-Soluble Extract of *Salvia Miltiorrhiza* Ameliorates Carbon Tetrachloride Mediated Hepatic Apoptosis in Rats. *J Pharm Pharmacol.* 58(5): 659-665.
42. Liu H, Wang Z, Nowicki MJ. (2014). Caspase-12 Mediates Carbon Tetrachloride-Induced Hepatocyte Apoptosis in Mice. *World J Gastroenterol.* 20(48): 18189-18198.
43. Ahmed FE, Selim AO, Selim SA, Mohamed A. (2015). Modulating Effect of the Aerial Parts of Pumpkin Methanol Extract in Liver and Pancreatic Islets on Experimental Diabetic Rat: Histological, Biochemical and Immunochemical Studies. *Cell Tissue Res.* 15(2): 4999-5011.
44. Evans GO. (2009). *Animal Clinical Biochemistry.* 2nd Ed. s. 1-344. Taylor & Francis Group, USA.
45. Endoh D, Okui T, Ozawa S, et al. (2002). Protective Effect of A Lignan-Containing Flaxseed Extract Against CCl₄-Induced Hepatic Injury. *J Vet Med Sci.* 64(9): 761-765.
46. Kasote DM, Badhe YS, Zanwar AA, Hegde MV, Deshmukh KK. (2012). Hepatoprotective Potential of Ether Insoluble Phenolic Components of N-Butanol Fraction (EPC-BF) of Flaxseed Against CCl₄-Induced Liver Damage in Rats. *J Pharm Bioallied Sci.* 4(3): 231-235.
47. Khanchandani R, Singh SP, Agarwal A. (2014). Role of Omega-3 Fatty Acid in Hepatoprotection Against Carbon Tetrachloride Induced Liver Injury in Albino Rabbits. *J Biomed Pharm Res.* 3(6): 131-135.
48. Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N. (2005). Lipid Peroxidation: Mechanisms, Inhibition, and Biological Effects. *Biochem Biophys Res Commun.* 338: 668-676.

✉ **Yazışma adresi:**

Dr. Görkem EKEBAŞ
 Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Kayseri, TÜRKİYE
 E-mail: gekebas@erciyes.edu.tr