

**T.C.**  
**PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**

**DENEYSEL KARACİĞER FİBROZİSİNDE CAPPARİS OVATA,  
RUTİN, KAEMPFEROL VE N –ASETİLSİSTEİNİN KORUYUCU  
ETKİLERİ İLE İNFLAMATUAR GEN EKSPRESYONLARININ  
İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**DR. ŞAFAK PELEK**

**DANIŞMAN**

**DR. ÖĞR. ÜYESİ HALİL KOCAMAZ**

**DENİZLİ - 2019**

**T.C.**  
**PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**

**DENEYSEL KARACİĞER FİBROZİSİNDE CAPPARİS OVATA,  
RUTİN, KAEMPFEROL VE N –ASETİLSİSTEİNİN KORUYUCU  
ETKİLERİ İLE İNFLAMATUAR GEN EKSPRESYONLARININ  
İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

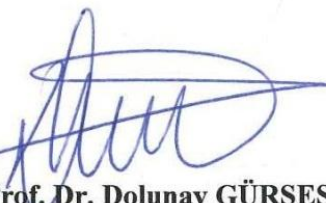
**UZMANLIK TEZİ**  
**DR. ŞAFAK PELEK**

**DANIŞMAN**  
**DR. ÖĞR. ÜYESİ HALİL KOCAMAZ**

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma  
Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 2017 TIPF 010 numaralı  
kararı ile desteklenmiştir.


**DENİZLİ – 2019**

Dr. Öğr. Üyesi Halil KOCAMAZ danışmanlığında Dr. Şafak PELEK tarafından yapılan “Deneysel Karaciğer Fibrozisinde Capparis Ovata, Rutin, Kaempferol ve N-Asetilsisteinin Koruyucu Etkileri ile İnflamatuar Gen Ekspresyonlarının İlişkisinin İncelenmesi” başlıklı tez çalışması 13/03/2019 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı’nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

  
BAŞKAN : Prof. Dr. Dolunay GÜRSES

  
ÜYE : Prof. Dr. Mustafa AKÇAM

ÜYE : Dr. Öğr. Üyesi Halil KOCAMAZ

  
Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.  
12/03/2019.

Prof. Dr.   
Pamukkale Üniversitesi  
Tıp Fakültesi Dekanı

## TEŞEKKÜR

Çalışmanın planlanmasında ve yürütülmesinde klinik bilgi ve deneyimleriyle çalışmayı yönlendiren, uzmanlık eğitimim süresince mesleki bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Halil KOCAMAZ'a,

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleri ile katkı sağlayan Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Dolunay GÜRSES ve değerli bölüm hocalarım Prof. Dr. Hacer ERGİN, Prof. Dr. Selçuk YÜKSEL, Prof. Dr. Özmert M.A. ÖZDEMİR, Doç. Dr. Bayram ÖZHAN, Doç. Dr. Yılmaz AY, Doç. Dr. Selda Ayça ALTINCIK, Doç. Dr. Ebru Arık YILMAZ, Doç. Dr. Meltem POLAT, Dr. Öğr. Üyesi İlknur GİRİŞGEN, ve Dr. Öğr. Üyesi Münevver YILMAZ'a,

Tez hazırlık aşamasında desteğini gördüğüm PAÜ Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Alaattin ŞEN, PAÜ Histoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE'ye, PAÜ Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Yaşar ENLİ, Dr. Öğr. Üyesi Esin AVCI, ,

Bu zorlu eğitim sürecinde dostluklarıyla yanımda olan birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, eğitim süresince birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarım ve yandal uzmanlarımıza,

Hayatımın her döneminde sevgi ve sabırlarıyla yanımda olan ve varlıklarından güç aldığım aileme içtenlikle TEŞEKKÜR EDERİM.

Dr. Şafak PELEK

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
SİMGELER VE KISALTMALAR	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
TABLolar DİZİNİ	X
ÖZET	XI
İNGİLİZCE ÖZET	XII
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1. Karaciğerin Anatomisi ve Histolojisi	3
2.2. Karaciğerin Fonksiyonları	5
2.3. Karaciğerin Hasara Karşı Yanıtı	6
2.4. Karaciğer Fibrozisi	9
2.4.1. Karaciğer fibrozisinin patogeneğinde yer alan hücre tipleri	10
2.4.2. Karaciğer fibrozisinin moleküler patogenezi	12
2.4.3. Karaciğer Fibrozisini Belirlemede Kullanılan Yöntemler	15
2.4.3.1 İnvaziv Yöntem (Karaciğer iğne biyopsisi)	16
2.4.3.2. Noninvaziv Yöntemler (görüntüleme yöntemleri, biyokimyasal yöntemler)	16
2.5. Karbontetraklorür Toksikitesi	17
2.6. Deneysel Modelde Kullanılan Ajanlar	18
2.6.1. N-Asetilsistein	18
2.6.2. Capparis Ovata	19
2.6.3. Kaempferol	19
2.6.4. Rutin	20
2.7. Karaciğer Fibrozisinde Kemokinler ve İlişkili Genler	20
GEREÇ-YÖNTEM	23
BULGULAR	29
TARTIŞMA	41

<b>SONUÇLAR</b>	51
<b>KAYNAKLAR</b>	52

## SİMGELER VE KISALTMALAR

- ALDOA:** Aldolaz A geni
- ASMA:**  $\alpha$ -düz kas aktini
- AST:** Aspartat aminotransferaz
- ALT:** Alanin aminotransferaz
- BT:** Bilgisayarlı tomografi
- CCL:** Kemokin (c-c motif) ligand
- CCL4:** Karbon tetraklorür
- CCR:** Kemokin (c-c motif) reseptör
- COWE:** Capparis ovata sıvı ekstraktı
- CT:** Eşik devri (=Threshold cycle)
- CXC:** C-X-C motif kemokin reseptör
- ESM:** Ekstaselüler matriks
- HAI:** Histolojik aktivite indeksi
- HSH:** Hepatik stellat hücreler
- IL:** İnterlökin
- IFN:** İnterferon
- iNOS:** indüklenbilir nitrik oksit sentaz
- MMP:** Matriks metalloproteinaz
- MRG:** Magnetik rezonans görüntüleme
- NAC:** N-asetil sistein
- ROÜ:** Reaktif oksijen ürünleri

**TGF:** Doku büyüme faktörü

**TIMP:** Matriks metalloproteinaz doku inhibitörü

**TLR:** Toll-like reseptör

**TNF:** Doku nekrozis faktör

**USG:** Ultrasonografi

**VEGF:** Vasküler endotelyal büyüme faktörü

**WHO:** Dünya Sağlık Örgütü

.



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1.</b> Karaciğer hasarını takiben HSH aktivasyonu	11
<b>Şekil 2.2.</b> Karbon tetraklorürün yol açtığı düşünülen patolojik süreç	18
<b>Şekil 3.1.</b> Deneyin sonlandırılması ile kan ve doku alım süreci	26
<b>Şekil 4.1.</b> Hematoksilenle ve eosin ile boyanmış karaciğer dokusu kesitleri	31
<b>Şekil 4.2.</b> İmmunohistokimya yönteminin (immunoperoksidaz) uygulandığı karaciğer dokusu	32
<b>Şekil 4.3.</b> Masson trikrom ile boyanmış karaciğer dokusu kesitleri	32
<b>Şekil 4.4.</b> Gruplar arasında sitokin ölçümleri	36
<b>Şekil 4.5.</b> Gruplar arasında kemokin ve kemokin reseptörleri (CCR3, CCL2, CCL5, CXCR1, CXCL9, CXCL10) genlerinin ekspresyon oranları	38
<b>Şekil 4.6.</b> Gruplar arasında inflamasyon ilişkili genler (INFG, TNFa, TGFb-1, TGFb-2, IL2, IL6, IL10) genlerinin ekspresyon oranları	38
<b>Şekil 4.7.</b> Gruplar arasında TIMP1, CoL3a1, TLR4, ASMA, INOS, c-MYC ve ALDOA genlerinin ekspresyon oranları	39

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 2.1.</b> Vücutun endojen antioksidanları	14
<b>Tablo 3.1.</b> Çalışma sonunda değerlendirmeye dahil edilen ratların gruplara göre sayısal dağılımı ve deneysel modelde uygulanan dozlar	24
<b>Tablo 4.1.</b> Ratların gruplarına göre steatotik hücre ve fibrozis sınıflamaları	30
<b>Tablo 4.2.</b> Gruplar arasında AST, ALT, total ve direkt bilirubin düzeyleri	34
<b>Tablo 4.3.</b> Gruplar arasında AST, ALT, total ve direkt bilirubin p değeri dağılımı düzeyleri	35
<b>Tablo 4.4.</b> Gruplar arasında sitokin ölçümleri	37
<b>Tablo 4.5.</b> İnflamatuar genlerden CT değerlerine göre anlamlı saptanan sonuçlar ve gruplar arasında ilişkisi	40

## ÖZET

### **Deneyisel karaciğer fibrozisinde capparis ovata, rutin, kaempferol ve n-asetilsisteinin koruyucu etkileri ile inflamatuvar gen ekspresyonlarının ilişkisinin incelenmesi**

**Dr. Şafak PELEK**

Karaciğer fibrozisi, farklı nedenlerle karaciğerdeki kronik stimülasyon sonucu ortaya çıkan patolojik bir durumdur. Çalışmamızda karbon tetraklorür (CCL<sub>4</sub>) ile ratlarda oluşturulan karaciğer fibrozisi modelinde, Capparis ovata, rutin, kaempferol ve N-asetilsistein koruyucu etkilerinin olup olmadığını belirlemek ve bu üç ajanın etkilerinin birbirleri ve inflamatuvar gen ekspresyonları ile karşılaştırılması amaçlandı. Çalışmamızda wistar albino erişkin erkek ratlar kullanılmış olup her grupta 8 tane olmak üzere toplam altı gruba ayrıldı. Kontrol (Grup 1), CCL<sub>4</sub> (Grup 2), CCL<sub>4</sub> + Capparis ovata (Grup 3), CCL<sub>4</sub> + Rutin (Grup 4), CCL<sub>4</sub> + Kaempferol (Grup 5), CCL<sub>4</sub> + NAC (Grup 6) olarak düzenlendi. Karaciğer fibrozis modeli oluşturmak için dört hafta boyunca haftada 2 kez intraperitoneal olarak 2 ml/kg %20 lik CCL<sub>4</sub> zeytin yağı içinde verildi. Capparis ovata 500mg/kg/gün, rutin 25mg/kg/gün, kaempferol 20mg/kg/gün ve NAC 50mg/kg/gün dozunda intraperitoneal yolla çözücü olarak zeytin yağı kullanılarak hergün verildi. Dört hafta sonunda ötenazi yapılarak ratların kan ve karaciğer doku örnekleri alındı. Toplamda 48 rat üzerinde histopatolojik, biyokimyasal (AST, ALT, total ve direk bilirubin), inflamasyon belirteçleri ve inflamatuvar gen düzeyleri bakıldı.

C. ovata(Grup 3), rutin(Grup 4), kaempferol(Grup 5) ve NAC(Grup 6) gruplarında fibrozis skorunun CCL<sub>4</sub>(Grup 2) grubundan düşük olduğu izlendi (p<0.05). Ancak biyokimyasal ve inflamasyon belirteçlerinde anlamlı bir fark saptanmadı (p>0.05).

Sonuç olarak, histopatolojik incelemelerde C.ovata, rutin, kaempferol ve NAC'ın fibrozisi tam olarak geriletmese de yararlı olabileceği, özellikle rutin'in TNF alfa, IL-10, TGF-beta1 ve IL-2'nin gen ekspresyonlarında gerileme yaptığı saptandı.

**Anahtar kelimeler:** Karaciğer sirozu, Capparis ovata, Kaempferols, Rutin, N-asetilsistein

## SUMMARY

### **Investigation of the protective effects of capparid ovata, rutin, kaempferol, n-acetylcysteine and their relationship between inflammatory gene expression in experimental liver fibrosis**

**Dr. Şafak PELEK**

Liver fibrosis is a pathological condition resulting from chronic stimulation in the liver for different reasons. In our study, it was aimed to determine whether or not protective effects of Capparis ovata, rutin, kaempferol and N-acetylcysteine were found in the model of liver fibrosis in rats with carbon tetrachloride (CCL4).

In our study, male rats of wistar albino adult were divided into six groups as 8 in each group. Groups were regulated as Control (Group 1), CCL4 (Group 2), CCL4 + Capparis ovata (Group 3), CCL4 + Rutin (Group 4), CCL4 + Kaempferol (Group 5), CCL4 + NAC (Group 6). The liver was given 2 ml / kg 20% CCL4 (with olive oil) intraperitoneally twice a week for four weeks to form the fibrosis model.

Capparis ovata 500mg / kg / day, rutin 25mg / kg / day, kaempferol 20mg / kg / day and NAC 50mg / kg / day were administered intraperitoneally daily by using olive oil as solvent. Blood and liver tissue samples were collected at the end of four weeks. In total, 48 rats were examined histopathologically, biochemical (AST, ALT, total and direct bilirubin), inflammation markers and inflammatory gene levels.

In the C. ovata (Group 3), rutin (Group 4), kaempferol (Group 5) and NAC (Group 6) groups, the fibrosis score was lower than the CCL4 (Group 2) group ( $p < 0.05$ ). However, there was no significant difference in biochemical and inflammatory markers ( $p > 0.05$ ).

In conclusion, histopathological examinations showed that C.ovata, rutin, kaempferol and NAC can be useful even if they do not stop fibrosis. Especially the rutin regressed gene expression of TNF alpha, IL-10, TGF-beta1 and IL-2.

**Key words:** Hepatic cirrhosis, Capparis ovata, Kaempferol, Rutin, N-acetylcysteine

# 1. GİRİŞ

Karaciğer fibrozisi, viral, otoimmün, ilaç ilişkili, kolestatik ve metabolik hastalıklar gibi nedenlerle kronik stimülasyon sonucu ortaya çıkan patolojik bir durumdur. Karaciğer fibrozisi, ekstrasellüler matriksin (ESM) azalmış remodellingi ve progresif birikiminin sonucu olarak tanımlanabilir. Bu patolojik durum karaciğerin normal yapısını bozar. Tedavi edilmezse fibrosis, karaciğer sirozuna ilerleyebilir, sonuç olarak organ yetmezliği ve ölüme yol açar (1).

Karaciğer fibrozisi ve sirozu kronik karaciğer hastalıklarının çoğunda kaçınılmaz son olmaktadır. Siroz, karaciğer yapısındaki anatomik anormalliklerin varlığıdır (2). Amerikan Karaciğer Hastalıkları Çalışma Birliği'ne göre siroz tek bir evreden sonra oluşmayıp, aşama aşama gelişme gösteren, kontrol edilmezse sonuçta dekompensasyon dönemine giren karakterdedir (3). Farklı sebeplerle gelişen kronik karaciğer hastalıkları günümüzde oldukça yaygın olup morbidite ve mortalitesi yüksektir. Tedavi yöntemleri ve süreci durdurmada kullanılacak ilaçlar ise görece olarak kısıtlı sayıdadır. Hepatolojideki gelişmeler sirozun statik bir durum olmaktan çok, dinamik bir süreç olduğunu ve farklı aşamalarda geri dönüşümlü olabileceğini göstermiştir. Dolayısıyla karaciğer fibrozisi ve sirozda; tedavilerle geri dönüşün sağlanabileceği düşünülmektedir. Karaciğer fibrozisini engellemek, geciktirmek ve iyileştirmek kronik karaciğer hastalıklarının tedavisinde hedeflenen amaçlardır. Bu amaca yönelik olarak yapılan deneysel çalışmalar gittikçe artmaktadır. Bu noktadan hareketle, birçok ajan karaciğer fibrozisini azaltmaya veya geri döndürmeye yardımcı olmak üzere denenmiş olup, bazılarının faydalı olduğu görülmüştür. Son yıllarda, bu konu deneysel modeller üzerine yapılan çalışmalarla popüler bir konu haline gelmiştir.

Capparis ovata (capari) bitkisi halk arasında analjezik, diüretik, yara iyileştirici ve hücre yenileyici olarak kullanılan bir bitkidir. Yapılan çalışmalarda, capari ekstrelerinin hidrojen donörü olarak görev yaptığı, lipid radikallerle reaksiyon vererek antioksidan özellik gösterdiği kanıtlanmıştır. Rutin ve kaempferol ise caparinin içinde en sık rastlanan flavonoidlerdir. Literatürde Capparis ovata türü veya Capparis cinsi ile ilgili deneysel model çalışmalar olsa da literatürdeki çalışma sayısı kısıtlıdır.

Bu çalışmada; karbon tetraklorürü (CCL4) ile ratlarda oluşturulan karaciğer fibrozisi modelinde, Capparis ovata, rutin, kaempferol ve N-asetilsistein koruyucu etkilerinin olup olmadığını belirlemek ve bu üç ajanın etkilerinin birbirleriyle karşılaştırılması amaçlandı. Bu sayede mortalite ve morbiditesi yüksek olan karaciğer fibrozisini durdurucu ya da geri döndürebilecek potansiyel bir ajan bulmayı hedefledik.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Karaciğerin Anatomisi ve Histolojisi

Karaciğer, deriden sonra vücudun en büyük organı ve en büyük bezidir. Ağırlığı yaklaşık 1,5-2 kg'dır. Kollajen ve elastik lif içeren Glisson kapsülü ile sarılı olarak sağ 7.-11. kaburgaların arkasına yerleşen karaciğer, hipokondrium ve epigastrium bölgesinde yer alarak sol hipokondrium bölgesine doğru uzanır (4-6). Normal uzunluğu 20-25 cm, yüksekliği 14-17 cm, önden arkaya doğru genişliği 10-14 cm'dir (7). Sağ ve sol olmak üzere iki lobtan oluşan karaciğere akan kan, kalp debisinin yaklaşık %25'i kadardır ve vücudun toplam kanının %15'ini içerir. Karaciğer, arteria hepatica propria (%20 - %30) ve v. portae hepatis (%70 - %80) olmak üzere iki kaynaktan beslenir. Venöz drenajı hepatica venüller ile sağlanır. Santral venüllerin birleşmesi ile oluşan hepatica venüller genelde üç tane olup diafragmanın hemen aşağısında vena cava inferiora açılırlar.

Karaciğer intraperitoneal bir organ olup diafragma komşu olan area nuda kısmı hariç neredeyse tamamı periton ile kaplıdır (8). Diafragma aracılığı ile akciğer, plevra, fibröz perikardiyum ve kalbin ventriküler bölümünden ayrılır. Karaciğer içinde safra kesesi ve vena cava inferiorun olduğu çukurlar ile sağ ve sol loblara ayrılır. Sağ lob büyük ve tek parça olup, sol lob lobus quadratus ile lobus caudatusun büyük kısmını kapsar. Sağ ve sol loblar kanlanma ve safra drenajı yönünden bağımsızdır, buna göre karaciğer sekiz segmente ayrılmıştır; ayrıca lobus caudatus %80 olguda her iki loblada bağlantılıdır. Segmentasyon, sağ ve sol a. hepatica propria dextra ve sinistra, v. portae hepatis ve duktus hepaticusun ana dalları göz önüne alınarak yapılır.

Karaciğerin innervasyonu plexus hepaticus ile sağlanır. Plexus hepaticus, plexus coeliacusdan köken alan en büyük sekonder otonom plexustur. Sempatik lifler vazokonstriktördür. Diğer liflerin karaciğerdeki fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir (5). Hepatik arterin vazokonstriktör sinirleri, karaciğerin sempatik plexusundan geldiği bilinmekte ise de karaciğere vazodilatatör liflerin geldiğine dair bir bilgi yoktur (9).

Hilus portal ven ve hepatic arterin giriş, sağ ve sol hepatic kanallar ve lenfatiklerin çıkış yeridir (10). Karaciğerin fonksiyonel ünitesi birkaç mm

uzunluğunda 0,8-2 mm çapında ve silindirik yapıda olan 50.000-100.000 adet bulunan karaciğer lobülüdür (11). Karaciğer parankimini oluşturan hepatositler 1-2 nükleolusu olan, polihedral hücrelerdir. Hepatositler, mikroskopta karaciğer lobulu olarak isimlendirilen poligonal, gruplaşmış yapısal birimler halinde görülebilir. Karaciğerin, endokrin ve ekzokrin görev yapan fonksiyonel hücresi ise hepatositlerdir. Hepatositler, sinüzoid boşluklar ile çevrili, birbirleriyle anastomoz yapan hücre dizileri oluştururlar. Işık mikroskopik olarak hepatositler; çok köşeli olup çekirdekleri yuvarlak ve merkezde yer alır. Hepatositler karaciğer lobülü içinde bir-iki hücre kalınlığında tabakalar oluşturacak şekilde lobülün periferinden merkezine doğru ışımsal olarak dizilmişlerdir. Bu hücre dizileri arasındaki boşluklarda bulunan kapillerlere karaciğer sinuzoidleri denir. Sinuzoidler, fenestralı endotelyal hücre tabakasından oluşan düzensiz olarak genişlemiş damarsal yapılardır. Endotelyal hücreler hepatositlerden Disse aralığı adı verilen subendotelyal bir boşlukla ayrılırlar. Sinüzoidlerde endotelyal hücrelerin lümene bakan yüzeyinde Kupffer hücreleri adı verilen makrofajlar bulunur (10).

Lobüller, portal alan denilen ve lobüllerin köşelerinde bulunan bazı bölgelerde safra kanalları, lenfatikler, sinirler ve kan damarları içeren bağ dokusuyla sınırlanmıştır. Karaciğer lobülü birbirleriyle anastomoz yapan ve sinüzoid boşlukları ile çevrili hepatosit plaklarından oluşmaktadır. Karaciğer lobülünün ortasında; hepatik arterin ve portal venin dallarından gelen ve sinüzoidlerde birbirine karışan kanı toplayan merkezi bir ven - venül yer alır. Hepatik arterin ve portal venin dalları, safra kanalı ile birlikte altıgen karaciğer lobülünü çevreleyen portal alanda yer alan klasik portal triadı oluşturur (4). Her lobulde 3-6 portal triad, portal triadların da herbirinde portal venden gelen bir venül, hepatik arterden gelen bir arteriol, bir safra kanalı ve lenfatik damarlar bulunur. Safra kanalcıkları, karaciğerin ekzokrin salgısı olan safra hücreleri arası iletildiği kanalcıklardır. Bu kanalcıklar, karaciğer lobülünün plakları boyunca anastomoz yapan kompleks bir ağ oluşturur ve portal alanda sonlanır. Bu nedenle safra, kan akışının tersi yönünde, yani klasik lobul merkezinden periferine doğru akar. Safra, safra kanalcıklarından lob içi safra kanalcıklarına oradan da lobül dışındaki Hering kanalını geçerek portal alandaki safra kanallarına veya kanalcıklarına boşalır. Safra kanalcıkları karaciğer içi safra



kanallarında birleşirler. Bu kanallar giderek genişleyip, birleşerek sağ ve sol hepatik kanalları oluşturarak karaciğeri terk eder ve duodenum lümenine açılır (4).

Safra kesesi (vesica biliaris); karaciğerin visseral yüzündeki fossa vesicae biliarise yerleşmiş, 7-10 cm uzunluğunda, armut şekline benzeyen ve safranın konsantre hale getirilip depolandığı bir organdır. Fundus, collum ve corpus olmak üzere üç kısma ayrılır (12). Safra kesesinin boşalma mekanizması sinirsel kontrolden çok hormonaldir. Ağıza yiyecek alındığında ve yağ içeren besinlerin duodnuma teması ile salgılanan kolesistokinin; safra kesesindeki düz kasların kasılmasına neden olur, oddi sfinkteri gevşer ve safra duodnuma akar (8,9).

Karaciğer dokusunda dört tip hücre bulunur: Karaciğer hücresi (hepatosit) aktif metabolizması sebebiyle organel bakımından zengindir. Karaciğer hücreleri normalde yenilenir ve yenilenmenin 50-75 günde olduğu tahmin edilmektedir. Kupffer hücreleri, dinlenme halinde partiküler elemanları fagosite ederler, çözünen materyali reseptörleri ile hücre içine alırlar ve vücudun immün sistemi içine katarlar (13). Ito hücresi (adiposit, yıldız hücresi) hepatositler arasında yerleşir. Ito hücresi, pozisyonu ve lipid vakuolleri içermesi ile tanınır. Pit hücreleri, içinde nöroendokrin granüller içerir fakat karaciğer dokusundaki önemi bilinmemektedir (14).

## **2.2. Karaciğerin Fonksiyonları**

Karaciğer, yaşamsal birçok işlev yapar. Karaciğer metabolizmanın düzenlenmesi, plazma proteinlerin, büyüme faktörü, hormon ve vitamin üretimi, A, D, B12 gibi vitaminlerin ve demirin depolanması; hormonların, ilaçların ve toksik maddelerin parçalanarak inaktif metabolitlere dönüştürülmesinde görev alır. Karaciğer ayrıca protein metabolizmasında, esansiyel olmayan aminoasit yapımında da görev alır (11).

Karaciğer, gastrointestinal sistemden emilen besinlerin metabolize edildiği ve depolandığı organdır. Karaciğer kendisi için gerekli proteinlere ek olarak çeşitli plazma proteinlerini (albumin, protrombin, fibrinojen ve lipoproteinler) sentezler. Büyük kısmı kan hücrelerinin ve bileşenlerinin metabolizması sonucu oluşan safranın, safra kanalikülleri içine salgılanması ise karaciğerin ekzokrin fonksiyonudur.

Lipidler ve karbonhidratlar, vücudun öğünler arasındaki enerji gereksinimini karşılamak üzere trigliserit ve glikojen halinde karaciğerde depolanır. Karaciğer, vitaminler için büyük bir depo görevi görür. Bunlara ilaveten, karaciğerde lipidler ve aminoasitlerden glukoneogenez adı verilen glikoz sentezi yapılmaktadır. Ayrıca üre de aminoasitlerin deaminasyonu sonucu karaciğerde üretilmektedir.

Çeşitli ilaçlar ve maddeler hepatositlerin granülsüz endoplazmik retikulumunda oksidasyon, metilasyon ve konjugasyonla metabolize edilebilir. Glukuronil transferaz, glukuronik asidin bilirubine bağlanması haricinde steroidler, barbitüratlar ve antikonvülzanlar gibi çeşitli ilaçların konjugasyonuna ve bu yolla atılmasına yardımcı olur (15).

Karaciğerin büyük bir fonksiyonel rezervi ve rejenerasyon kapasitesi vardır ve fulminan hepatik hastalıklar dışında bütün hastalıklarda rejenerasyon gerçekleşebilir. Rejenerasyon sayesinde karaciğer hacmi bir-iki hafta içinde yenilenir. Eğer bağ dokusu çatısı sağlam kalmışsa masif hepatosellüler nekroz meydana gelse bile karaciğer tam veya tama yakın olarak iyileşebilir (15).

Karaciğerin bir diğer görevi de metabolizmaya katılan safranın yapımıdır. Karaciğer hepatositlerinde üretilen safranın iki önemli işlevi vardır. Birincisi, yağların sindirimi ve emilimi, diğeri ise kandan bilirubin ve kolesterol gibi çeşitli önemli yıkım ürünlerinin atılmasıdır (20). Safra kolesterolün dışarı atılmasının tek yoludur. Bu şekilde karaciğer hücreleri serum kolesterol düzeyinin düzenlenmesinde önemli görev alır. Her gün duodenuma, 250 – 1500 ml arasında safra girer (11). Safra üretimi sürekli olurken safra sekresyonu gıda alınımı ile uyarılan barsaklardan salınan kolesistokinin hormonunun safra kesesini kasma ve oddi sfinkterini gevşetmesi ile gerçekleşir. Fizyolojik koşullarda yiyecek alımı olmazken, Oddi sfinkteri kapalıdır.

### **2.3. Karaciğerin Hasara Karşı Yanıtı**

Karaciğer çeşitli mikrobiyolojik, toksik, metabolik, neoplastik hastalıklar ile dolaşım bozukluklarından zarar görebilir. Karaciğerin depo özelliği nedeniyle, karaciğer bozukluklarının kliniğe yansımaları bir süre belirgin olmayabilir. Bununla birlikte hasarın kronikleştiği durumlarda karaciğer parankiminin ilerleyici kaybı ve

safranın akışının çeşitli sebeplerle engellenmesi sonucu karaciğer fonksiyonları ciddi derecede azalabilir.

Karaciğerin hasar verici nitelikteki olaylara karşı, nedene bakılmaksızın, beş adet genel cevap şekli vardır:

- a) İnflamasyon
- b) Dejenerasyon
- c) Nekroz
- d) Fibrozis
- e) Siroz

Akut veya kronik olaylarda, inflamatuvar hücrelerin karaciğere gelmesi ile ilişkili hepatosit hasarı ile birlikte olan inflamasyon varlığına hepatit denir. İnflamasyonu hepatosit nekrozu veya apoptozisi izleyebilir veya inflamasyona sebep olan durumun düzelmesi ile iyileşme olabilir. İnflamasyon lökositlerin parankime giriş bölgesi olan portal alanda sınırlı olabileceği gibi tüm parankime de yayılabilir (15).

Karaciğer hasarının diğer bir tipi de ödem veya yağ ve diğer maddelerin hepatosit sitoplazmalarında birikmesi sonucu oluşan balonlaşma veya şişme dejenerasyonudur. Bakır, demir, safra materyali gibi bazı maddeler hepatosit sitoplazmasında birikebilir. Lipitlerin hepatosit sitoplazması içinde birikmesine steatoz denir. Nükleusun yerini değiştirmeyen çok sayıda küçük yağ damlacığının varlığına mikroveziküler steatoz denilir. Alkolik karaciğer hastalığı, Reye sendromu ve gebeliğin akut yağlı karaciğeri gibi bazı durumlarda görülür. Nükleusun yerini değiştiren tek büyük yağ damlacığının varlığına ise makroveziküler steatoz adı verilir. Makroveziküler steatoz ise alkolik karaciğer hastalığında, diabette ve obezite varlığında görülebilir (15).

Karaciğerde hasara yol açan herhangi bir olay hepatosit nekrozuna yol açabilir. İskemik nekrozda, soluk boyanan mumyalaşmış hepatositler gözlenir (koagülasyon nekrozu). Eğer hepatositler ozmotik etkiyle şişip parçalanırsa buna litik nekroz adı verilir. Nekroz genellikle bölgesel bir yayılım gösterir. Bu durum santral venin hemen çevresindeki hepatositlerin nekrozunda oldukça belirgindir (sentrilobüler nekroz). Bu tip nekrozda inflamasyon bulgusu yoksa iskemi, ilaçlar ve toksik

ajanların yol açtığı hasar düşünülmelidir. Hepatosit nekrozu, hepatik lobüller içinde tek tek hücrelerde görülebilir (odaksal nekroz), ya da periportal parankim ile inflamasyonlu portal bölgeler arasında izlenebilir (güve yeniği nekrozu). Daha ağır iltihabi hasar oluşursa; hepatosit gruplarının nekrozu, birbirlerine komşu lobülleri, portal-portal, portal-santral veya santral-santral bağlantılar ile birleştirebilir (köprüleşme nekrozu). Tüm lobülün nekrozu (submasif nekroz) ya da karaciğerin büyük bir kısmının nekrozu da (masif nekroz) gözlenebilir.

Serum alanin amino transferaz (ALT) hepatosellüler nekrozun ölçümünde kullanılan özel ve en yaygın testtir. Beslenme durumu iyi ve yeterli intrasellüler enzim deposuna sahip bir kişide yüzde bir kadar küçük oranda karaciğer hücresi harabiyeti ALT'nin serum seviyesini yükseltir. Serum aspartat aminotransferaz (AST) da benzer şekilde davranır, fakat her çeşit çizgili kas bu enzimi içerdiği için hepatosit nekrozu için daha az özeldir (13).

Kronikleşen inflamasyonun veya toksik hasara yanıt olarak fibrotik doku birikimi olabilir. Başlangıç döneminde fibrozis portal bölgenin içinde, çevresinde veya santral venler çevresinde gelişebilir veya sinüzoidler içinde depolanabilir. Zamanla fibröz bantlar karaciğerin çeşitli bölgelerini birleştirir (porto-portal, porto-santral, santro-santral) ve bu olaya köprüleşme fibrozisi denir. Geri dönüşümü mümkün olan diğer bütün lezyonlardan farklı olarak ilerlemiş fibrozisin genelde geri dönüşü zordur (15).

Karaciğerde, fibrotik süreç ve parankimal hasar nedeni ile rejenere hepatositlerden oluşan ve skar dokusu ile çevrelenmiş nodüller oluşur ve bu duruma siroz denir. Sirotik bir karaciğer kontrakte olup küçülmekte, şekli bozulmakta, soluklaşmakta ve adeta bir skar dokusunu andırır hale gelmektedir (15).

Karaciğer sirozu çeşitli etyolojik faktörlerle oluşan karaciğer hastalıklarının nihai bir evresidir. Bu evrede etyolojiye bağlı olarak gelişen klinik tabloda çok karaciğer yetersizliği ve portal hipertansiyonun sebep olduğu belirti ve klinik bulgular ön plandadır (16). Erişkinde etyolojik ajanların başında hepatit B virüsü, alkol ve hepatit C virüsü gelmektedir. Çocuklarda ise en sık nedenler, hepatitler, bilier atrez, kistik fibrozis ve metabolik hastalıklara bağlı biriken toksinlerdir.

Karaciğer sirozu tanısı, morfolojik bir tanıdır. Morfolojik olarak ayırım mikronodüler, makronodüler ile mikro ve makronodüllerin birlikte bulunduğu miks tip olmak üzere üç şekilde yapılmaktadır (17).

Sirozun tüm tipleri, klinik olarak sessiz gidebilir. Semptomatik olduklarında ise, sadece siroza özel olmayan belirtiler verirler. Bu belirtiler; anoreksi, kilo kaybı, halsizlik ve ileri evrelerde ağır derecede güçsüzlüktür. Sirozlu birçok hastada ölüm programlanmış karaciğer yetmezliği, portal hipertansiyon ile ilişkili komplikasyonlar ve sonucunda hepatosellüler karsinom gelişimi ile olur (18).

#### **2.4. Karaciğer Fibrozisi**

Karaciğer fibrozisi, farklı etiyojilerdeki karaciğer hastalıklarına yanıt olarak gelişen yara iyileşmesinin sonucudur. Akut veya kronik hasara yanıt olarak hücre dışı matriks proteinlerinin birikimi ve karaciğer yapısının bozulması ile karakterize bir durumdur. Karaciğer fibrozisine neden olan etkenin önüne geçilemezse nodül, septa oluşumu ve siroz ile sonuçlanır. Fibrozis değişik tipte hasarlar sonucunda oluşabilir.

Fibrozis, hasarlı bölgelerin ekstrasellüler matriks (ESM) veya skar ile doldurulduğu bir iyileşme cevabıdır. Hasarı tamir etmeye yönelik bir yara iyileşmesi süreci olarak da tanımlanabilen karaciğer fibrozisi, ESM artması (fibrojeniz) ile bilinen dinamik bir süreçtir. Kronik karaciğer hasarlı tüm hastalarda, hastalığın nedenine ve kişisel faktörlere bağlı değişik derecelerde meydana gelir (19,20).

Karaciğer parenkimi, epitelyal hücreler (hepatositler), endotelyal hücreler ve nonparenkimal hücreler olan hepatik stellat hücreler (HSH) ve Kupffer hücrelerinden meydana gelir. Sinüzoidler karaciğerin mikrovasküler ünitesidir.

Karaciğer fibrozisi, karaciğer parenkim hasarını takiben ESM birikimi ile karakterize bir reversibl yara iyileşmesi cevabıdır. Ancak hasarlanma devam ederse, kronik inflamasyon ve ESM birikimi kalıcı olarak karaciğer parenkiminin yerini alır ve skar dokusu gelişir (21).

Karaciğer fibrozisi yetersiz remodeling (yeniden şekillenme) boyunca fibriller kollajen sentez ve depolanmasındaki artışa bağlı olarak gelişir. Fibrozis ve skarlaşma yapısal ve metabolik anormalliklere yol açan pek çok patolojik ve biyokimyasal değişikliklerin olduğu karmaşık bir süreçtir. Fibrozis öncelikle hasarın en fazla olduğu

bölgeden başlamaktadır (22). Fibrozis genellikle aylar, yıllar boyu süregelen hasar sonucu gelişmektedir.

ESM proteinlerinin aşırı birikimi karaciğerin normal yapısını bozar ve organın normal fonksiyonunu bozarak sonunda patofizyolojik hasara yol açar. Normal karaciğerde ESM üretim ile yıkım oranları eşittir ve bunun sonucunda matriks oluşmaz. Fibrojen, ESM oluşumu ve yıkımı arasında bir dengesizlik olduğu süreç söz konusudur. Matriks metalloproteinazlarını (MMP) da içeren proteinazlar matriks yıkımından sorumludur. Bunlar; interstitial kollajenler (MMP-1-8-13), jelatinazlar (MMP-2-9), stromelinler (MMP-3-7-10-11), membran tipi (MMP-14-15-16-17-24-25) ve metalloelastazlar (MMP-12) şeklinde beş kategoride toplanırlar (23). İlerleyen fibrozis artan TIMP-1 ve TIMP-2 ile ilişkilidir ki bu MMP aktivitesini net bir düşüşe götürür ve böylece matriks birikimi oluşur (24).

Kollajenin özellikle de kollajen fibrilin artan birikimi fibrozisin en yaygın özelliğidir. Karaciğer hastalığında yapılan birkaç deneysel hayvan modeli HSH'nin fibrozis oluşumu sırasında aşırı kollajen üretiminden sorumlu birincil hücre olduğunu desteklemektedir (25,26). Karaciğerde tanımlanan farklı kollajenlerin sayısı artmaya devam ediyorsa da en yaygın görülen ve geniş alanda artan kollajenler tip I ve tip III kollajenlerdir. Karaciğer fibrozisi esnasında hem mRNA hem de protein düzeyinde değişen kollajen sentezi incelenmiş ve tip I kollajende dramatik bir artış ve tip III kollajen düzeyinde de yine anlamlı ama nispeten daha az bir artış görülmüştür (27).

#### **2.4.1. Karaciğer fibrozisinin patogenezinde yer alan hücre tipleri**

Karaciğer fibrozisinin patogenezinde bir kaç hücre tipi görev almaktadır:

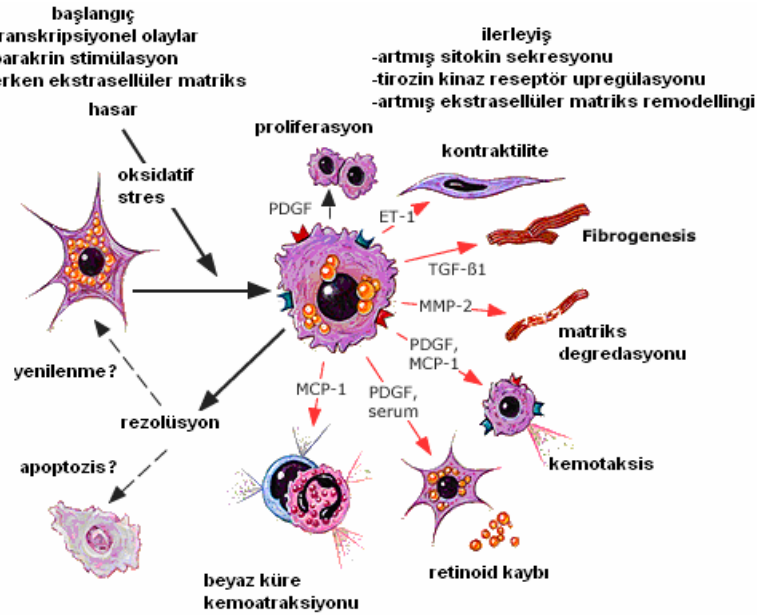
##### **1. Hepatik stellat hücreler**

HSH'ler hepatositler ve sinüzoidal endotelial hücreler arasındaki Disse boşluğunda yer alır (28). Karaciğer hasarlanmasını takiben  $\alpha$ -düz kas aktin ( $\alpha$ -SMA) salınımı artar. Bu hücreler, tipik yıldız şekillerini kaybederek myofibroblast görünümü kazanır. Böylece proliferatif, hareket edebilen, kontraktil ve profibrojenik hale gelirler (29).

HSH aktivasyonuna katkıda bulunan pek çok faktör tanımlanmıştır. HSH aktivasyonunu sürdüren primer etmenler hepatositlerin hasarı ve Kupffer hücre aktivasyonudur. Hepatosit harabiyeti ile açığa çıkan mediatörler (lipid peroksidasyon

ürünleri, ilaç ve hepatotoksinlerin ara metabolitleri, asetaldehit, hidrojen peroksit, süperoksit radikali gibi) HSH aktivasyonunun güçlü indükleyicileridirler. Özellikle iki profibrojenik sitokin, TGF- $\beta$  ve PDGF'dır. Ayrıca Kupffer hücrelerin fagositik aktivitesi çok miktarlarda radikal oksijen ürünleri (ROÜ) doğurur. ROÜ'lerinin HSH'leri aktive edip fibrojenik potansiyellerini indükleme özellikleri vardır (28).

Aktive HSH'lerin karaciğer hasarını artırabileceği düşünülen, TGF beta-1, PDGF-BB, fibroblast büyüme faktörü, hepatosit büyüme faktörü, trombosit aktive edici faktör, ET-1 ve nötrofilleri salgıladığı düşünülmektedir. HSH'ler ayrıca interlökin-10 gibi antiinflamatuvar sitokinleri de salgılamaktadır ve bunlar direkt olarak hasar bölgesine gitmektedir (30) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Karaciğer hasarını takiben HSH aktivasyonu (27).

## 2. Portal fibroblastlar

Sağlıklı karaciğerde portal konnektif doku portal fibroblastlarla çevrilidir. Bu hücreler küçük portal damarlardan kaynaklanırlar.

## 3. Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler

Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin hepatositlere, biliyer epitelyal hücrelere, sinüzoidal endotelyal hücrelere ve hatta Kupffer hücrelerine dönüşebilme kapasiteleri mevcuttur. Karaciğer fibrozisinin hem ilerleme, hem de

gerileme sürecinde arttıklarına dair kanıtlar vardır. CCL4 ile indükte edilmiş karaciğer fibrozisinin gerilemesi sırasında kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler fibrotik karaciğere girer (31). Hepatositler ve biliyer epitel hücreleri mezenkimal hücrelerle birlikte olan hasarlanmanın muhtemel kaynağı olan epitelin mezenkime dönüşümü ya kalan hepatositlerden ya da biliyer epitelyal hücrelerden kaynaklanır (31). Bu dönüşümün ana molekülleri TGF- $\beta$ , epidermal growth faktör, insulin-like growth faktör-2 ve fibroblast growth faktör-2'dir. Hepatositler in vivo CCL4'e ve in vitro TGF- $\beta$ 'ya cevap olarak albumin ve fibroblast-spesifik protein-1 açığa çıkarır (32).

#### 4. Fibrositler

Fibrositler subkutan yaralarda doku tamiri için fibroblast benzeri özellikleri olan dolaşan kemik iliği kaynaklı CD34+'leri oluşturur. CCL4 ile çalışılan bir fare modelinde fibrojenik hücre popülasyonunun kemik iliği kaynağı ortaya konmuştur (32).

#### **2.4.2. Karaciğer fibrozisinin moleküler patogenezi**

Hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimleri, normal hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerindeki değişiklikler karaciğer fibrozisinin patogenezinde önemli bir rol oynar. Fibrotik karaciğerde periportal ve perisinüzoidal alanlardaki ESM'nin kompozisyonunda kantitatif ve kalitatif önemli değişiklikler olur.

##### a) Oksidatif stres

Serbest radikal mekanizmaları in vivo olarak hem yararlı, hem de zararlı etkilere sahiptir. Serbest radikaller aerobik hücre metabolizmasının bir ürünü olarak sürekli üretilmekte olup, protein, lipid ve nükleik asit gibi makro moleküllerle etkileşmeleri sonucu, hücre yapı ve fonksiyonlarında önemli değişikliklere neden olmaktadır. Serbest radikaller antioksidan savunma mekanizmaları ile dengede tutulur ve normal şartlar altında organizma kendini antioksidan mekanizmalarla korur. Oksidan-antioksidan dengenin oksidan lehine bozulmasına oksidatif stres denir (33).



Oksidatif stres, mitokondriyal geçirgenliği kolaylaştırarak hepatosit nekrozunu ve/veya apoptozisi ilerletir. Reaktif oksijen ürünleri (ROÜ) asıl olarak mitokondriyal elektron transport zinciri, NADPH oksidaz, ksantin oksidaz aracılığıyla veya mitokondriyal harabiyet yoluyla açığa çıkararak metabolik durumu değiştirir.

Serbest radikaller, insan plazmasında in vitro olarak kemotaktik faktör oluşturur veya aktive ederler ve dokulara fagositlerin toplanmasına sebep olurlar. Trombosit agregasyonunu artırır. İn vitro olarak, serbest oksijen radikalleri, lipid peroksidazların oluşumundan dolayı, indirekt olarak araşıdonik asit metabolizmasını uyararak prostaglandin, tromboksan ve lökotrien konsantrasyonlarını artırır. Bunun sonucu, permeabilite değişimleri ile mikro ve makro dolaşım bozuklukları gözlenir. Bunlara ek olarak mitokondriyal oksidasyon, hemoglobin tarafından oksijen transportu ve sitokrom P450 aktivitesi gibi birçok fizyolojik reaksiyonlarda serbest radikal mekanizmalarının temel rol oynadığı düşünölmektedir (33-35).

ROÜ'leri; sinyal iletim yolakları ve transkripsiyon faktörleri (JNK, aktivatör protein-1, NFκB) yolu ile fibrozisle birlikteliği söz konusu olan genleri (COL1A1, COL1A2, MCP1 ve TIMP1) up-regüle eder. ROÜ'lerinin HSH ve myofibroblastlarda oluşması, profibrojenik mediatörlere (anjiotensin-II, PDGF, TGF-β ve leptin) cevap olarak meydana gelir (31).

Serbest radikallerin sebep olduğu hasar sonucunda bazı enzimler inaktive, bazı enzimler ise uygun inhibitörün inaktivasyonu ile aktive olurlar. Fazla miktarda disülfid bağı içeren ekstrasellöler proteinler hidroksil ve peroksil radikal saldırısına daha hassastırlar. Serbest radikal (özellikle hidroksil) saldırısı sonrası DNA'da hasar oluşur. Bunun sonucu, sitotoksisite, mutasyon ve malign transformasyon potansiyeli meydana gelir.

Oksijen radikallerinin miktarını ve sebep oldukları hasarı azaltmak üzere fonksiyon gösteren maddelere antioksidanlar denir. Radikallerin aşırı reaktif yapılarına bağlı olarak, hücrenel komponentlerdeki karbonhidrat, protein ve lipidlerin oksidasyonu ile sonuçlanacak zararın önlenmesi antioksidanların görevidir (33). Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirme, serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekile dönüştürme, serbest oksijen

radikallerini kendilerine bağlayarak reaksiyon zincirini kırma gibi etkileri vardır (35).

Vücutun endojen antioksidanları Tablo 2.1’de görülmektedir (33-35).

**Tablo 2.1.** Vücutun endojen antioksidanları

<b>Enzimatik antioksidanlar</b>	<b>Enzimatik olmayan antioksidanlar</b>
Sitokrom oksidaz sistemi	$\alpha$ - tokoferol
Süperoksit dismutaz	$\beta$ - karoten
Katalaz	Askorbik asit
Glutatyon peroksidaz	Ürat
	Sistein
	Albümin
	Bilirubin
	Seruloplazmin
	Transferrin
	Laktoferrin
	Ferritin
	Glutatyon
	Melatonin

b) Matriks metalloproteinaz (MMP) ve matriks metalloproteinaz doku inhibitörlerin (TIMP) rolü

Ekstraselüler matriksin yeniden şekillenmesi fazla ve kontrolsüz olursa hayatı tehdit eden patolojik durumlar ortaya çıkar. MMP’ler ESM’nin yıkımından sorumlu ana enzimlerdir. TIMP’lerin MMP’leri inhibe edici etkisi vardır. Bu nedenle MMP-TIMP dengesinin kurulması, güvenli bir ESM yeniden şekillenmesi için kritik önemdedir (31).

Sağlıklı bir karaciğerde ESM homeostazisi MMP ailesi ve onların spesifik inhibitörleri olan TIMP ailesi arasındaki dengeye bağlı olarak hassas bir biçimde düzenlenmektedir. Karaciğerde kronik bir hasar varlığında HSH’ ler aktive olmakta

ve myofibroblast benzeri bir şekle dönüşerek ESM sentezlemektedir. Bu durumda yeni sentezlenen ESM normal ESM'den bir takım farklılıklar göstermektedir. Örneğin yeni ESM'de fibriller kollajenler, özellikle tip 1 kollajen, normalden 10 kat fazla bulunmaktadır. Bu da ESM yıkımını zorlaştırmaktadır. Diğer yandan HSH'ler tarafından üretilen büyük miktarlardaki TIMP ailesi nedeniyle, -özellikle TIMP1-MMP'lerin aktivitesi inhibe edilmekte ve ESM yıkımı engellenmektedir (36).

Matriks metalloproteinaz ailesinin bilinen 22 üyesi vardır (37). Bu MMP'lerin hepsi de geniş bir etki spektrumuna sahip olmakla birlikte ana substratlarına göre; kollajenazlar, gelatinazlar, stromelizinler, matrilizinler, metalloelastazlar ve membran tip MMP'ler şeklinde sınıflandırılabilirler. MMP'ler zimojen moleküller halinde sekrete edilirler ve enzimatik olarak propeptitlerinin ayrılmasıyla aktif enzim haline dönüşürler. Sekrete edildikten sonra MMP'lerin aktiviteleri TIMP'ler bağlanması ile düzenlenir. TIMP1, TIMP2, TIMP3 ve TIMP4 olmak üzere TIMP ailesinin 4 üyesi vardır. Bunlar içinde hepatik fibrozis mekanizmasında en önemli yeri olanı TIMP1'dir (38). Bilinen MMP'ler içinde birkaç tanesi karaciğer dokusunda bulunmaktadır ve türlere göre farklılık gösterebilmektedir. Örneğin MMP1 insan karaciğerinde bulunurken, bu enzimin yapısal ve fonksiyonel açıdan rat ve farelerdeki benzerinin MMP13 olduğu belirlenmiştir. Hepatik fibrozis sürecinde en belirgin özellik olarak MMP'ler ve TIMP'ler arasındaki dengenin bozulması kabul edildiğinde, MMP'lerin aktivitesini artıran veya TIMP'lerin aktivitesini baskılayan stratejiler tedavide başarılı olabilir (36).

### **2.4.3. Karaciğer Fibrozisini Belirlemede Kullanılan Yöntemler**

Karaciğer fibrozisinin tanı metodları arasında;

1. İnvaziv (karaciğer iğne biyopsisi)
2. Noninvaziv (görüntüleme yöntemleri, biyokimyasal yöntemler) metodlar yer almaktadır.

#### **2.4.3.1 İnvaziv Yöntem (Karaciğer iğne biyopsisi)**

Karaciğer biyopsisi enflamasyon, fibrozis, yağlanma, demir birikimi ve karaciğer neoplazisinde bilgi verir (39). 1883'te Paul Ehrlich tarafından ilk karaciğer biyopsisi yapılmıştır. İnsanda yaklaşık 125 yıldır yapılmakta olup, Menghini tarafından 1958'de bu yöntem modifiye edilmiş olup bugünkü tekniğe yakın teknik elde edilmiştir. Biyopsi, karaciğer hastalıklarında, fibrozisin değerlendirilmesinde altın standart yöntemdir (40). Karaciğerden perkütan, transjuguler, laparoskopik ve peroperatuar alınan doku örneğinin histopatolojik incelenmesiyle; çoğu zaman karaciğer patolojisine yol açan etyolojik faktör ve karaciğer hasarının derecesi belirlenebilmektedir. Ayrıca tekrarlanan biyopsiler ile tedaviye yanıtın değerlendirilmesi de söz konusudur.

Nekroenflamasyon ve fibrozisi değerlendirmede evreleme (staging) ve derecelendirme (grading) sistemleri kullanılır. Basit sistemler hafif, ilerlemiş ve şiddetli gibi tanımlayıcı terimler kullanırken, kompleks sistemler daha kalitatif sonuçlar verirler. Grade; her nekroenflamatuar lezyon için verilen skorlar toplamında hastalığın şiddeti ve ilerleme hızı hakkında bilgi vermektedir. Stage ise fibrozisin yaygınlığı, yerleşimi ve karaciğer yapısında yaptığı değişikliğe göre tanımlanır. Bu amaçla kullanılan çok sayıda kompleks sistem mevcuttur (41).

Bu sistemlerden yaygın kullanıma giren Knodell skorudur (42). Orijinal Knodell skoru, periferik nekroz, intralobüler hasar, portal inflamasyon ve fibrozun toplamı olarak 0-22'lik bir aralık verecek şekilde hesaplanır. İlk üç kategori genellikle nekroinflamatuvar skor (0-18) vermek için toplanırken, fibrozis skoru (0-4) ayrı olarak rapor edilir(41). Knodell skora sisteminin modifiye şekli Ishak skorudur (43). Ishak skoru, nekroinflamatuvar bileşenlerine ayırarak total skoru vermektedir (41).

#### **2.4.3.2. Noninvaziv Yöntemler (görüntüleme yöntemleri, biyokimyasal yöntemler)**

Görüntüleme yöntemleri noninvaziv metodlardır ve temel olarak, karaciğerde oluşan yapısal değişikliği gösterirler. Ultrasonografi (USG), bilgisayarlı tomografi (BT) ve magnetik rezonans görüntüleme (MRG) klinikte rutin olarak kullanılan yöntemlerdir ancak splenomegali, portal hipertansiyon ve düzensiz karaciğer

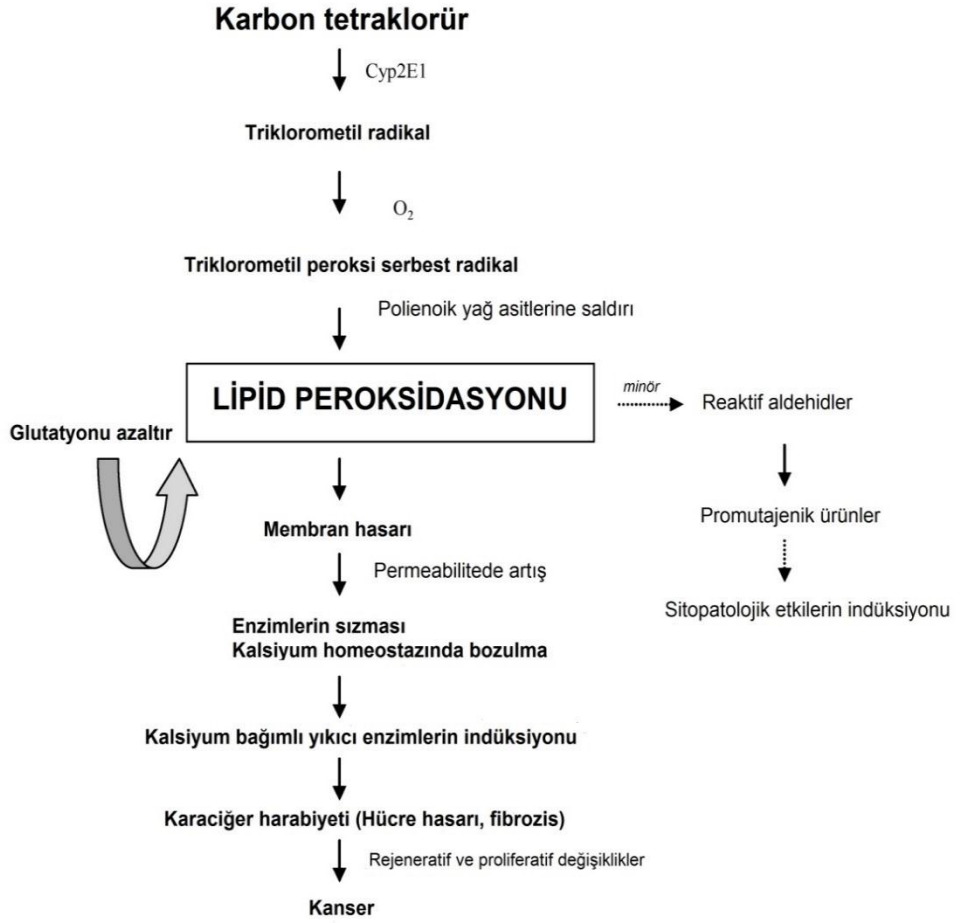
konturları gibi ileri evre karaciğer hasar bulgularını gösterirler. Dolayısıyla hafif ve orta şiddette fibrozis varlığını gösteremezler. İleri evre fibrotik karaciğerde meydana gelen anatomik değişikliklerden (kaudat lob hipertrofisi, yüzey nodülaritesi) tanıda yararlanılabilmektedir. Bir başka duyarlı yöntem ise fibroelastografi (FibroScan)dir. Bu yöntem karaciğerin sertliğini (esnekliğini) invaziv olmayan bir şekilde hızlı, ağrısız olarak ultrason dalgaları kullanarak ölçer. Karaciğer hasarını (özellikle ileri evre fibrozisi) yüksek bir doğrulukla tahmin eder.

## **2.5. Karbontetraklorür Toksisitesi**

Karbontetraklorür temizlik maddelerinin ve solventlerin yapımında, tahılların ilaçlanmasında ve kloroflorokarbonların sentezinde ara ürün olarak yaygın bir şekilde kullanılmakta iken, toksisitesinin keşfedilmesi ve florokarbon kullanımının azalmasıyla üretimi azalmıştır. İlaçlanmış tahıllarda en yüksek seviyede bulunurlar ve bunlardan yapılan yemeklerle insanlar etkilenebilir. CCL4'ten en fazla etkilenen organlar karaciğer ve böbreklerdir.

CCL4'ün hepatotoksik etkisi, kısa yaşam süreli reaktif ara ürünlerinin metabolik aktivasyonu ile yakından ilişkilidir. CCL4 ile oluşan hücre hasarı lipid peroksidasyonundaki artışa bağlıdır. Bu artış reaktif ara ürünlerin hücresel komponentlere kovalent bağlanmasına veya doymamış yağ asitlerinin de artmasına sebep olan, serbest radikal ara ürünlerin oksijenle birleşmesi sonunda meydana gelir. Bunun sonucunda da intrasellüler membranlarda ve plazma membranında hasar gözlenir. Parçalanma ürünleri (en çok reaktif aldehitler), hücrede birikerek hasarın daha da ağırlaşmasına sebep olurlar (44).

Düşük parsiyel oksijen basıncı varlığında kovalent metabolit bağlanması ve CCL3 ile CHCL2 radikalleri meydana gelirken, yüksek oksijen basıncında CCL3-OO radikali oluşur. Bu radikallerin etkileşimleri sonucunda sıklıkla lipid metabolizması etkilenir ve hücrede steatozisten apopitozise kadar olan değişiklikler gerçekleşebilir. CCL4 ile oluşan karaciğer hasarının gelişim basamakları şöyledir; redüktif dehalojenasyon, radikallerin kovalent bağlanması, protein sentezinin (özellikle de apolipoproteinlerin) inhibisyonu, yağ birikimi, kalsiyum sekestrasyonunda kayıp, apopitosis ve fibrozis (44) (şekil 2.2).



**Şekil 2.2.** Karbon tetraklorürün yol açtığı düşünülen patolojik süreç

## 2.6. Deneysel Modelde Kullanılan Ajanlar

### 2.6.1. N-Asetilsistein

N-Asetilsistein hem bir aminoasit olan L-sistein'in, hem de indirgenmiş glutatyonun asetile prekürsörüdür. Uzun yıllardır mukolitik bir ajan olarak kullanılmaktadır ve yüksek doz asetaminofenin hepatotoksitesisi için bir antidottur (45).

N-Asetilsisteinin asetaminofen zehirlenmesindeki primer koruyucu rolü, intraselüler karaciğer indirgenmiş glutatyonun yerine konmasıdır. N-Asetilsisteinin hücre membranından kolaylıkla penetre olarak intraselüler indirgenmiş glutatyon biyosentezini hem in vivo, hem in vitro olarak artırdığı, bunu selüler indirgenmiş

glutasyon biyosentezi için gerekli sistin alımını artırarak yaptığı kültür ortamında gösterilmiştir.

İn vivo test edildiğinde antioksidan etkilerinin, muhtemelen lipid solubilitésinin ve doku dağılımının düşüklüğü nedeniyle azaldığı görülmüştür. Asetilsisteinin, CCL4 ile akut olarak oluşturulmuş hepatotoksisitede hepatik hasarı azaltıcı etkilerine dair bazı çalışmalar mevcuttur. N-Asetilsisteinin farklı moleküler aşamalarda kültüre-aktive HSH'lerde TGF- $\beta$ 'yı suprese ettiği bulunmuştur(45). Bu nedenle N-asetilsisteinin deneysel karaciğer fibrozisinde antioksidan ve anti-TGF- $\beta$  özellikleriyle koruyucu etkisinin olduğu düşünülmektedir.

### **2.6.2. Capparis Ovata**

*C. ovata*, Capparidaceae familyasının bir üyesidir ve antioksidatif, antihiperlipidemik, anti-enflamatuar ve antihepatotoksik özelliklere sahiptir (46). Akdeniz havzasında bulunan uzun ömürlü bir çalılık bitkisidir. *Capparis*'in çeşitli tipleri vardır (350'den fazla) ve dünya çapında birçok farklı bölgede doğal olarak yetişir. Yüzyıllar boyunca, diüretik, antihipertansif, hipoglisemik, antihepatotoksik, analjezik ve hipolipidemik için geleneksel bir bitkisel ilaç olarak bilinir (47). Önceki kimyasal çalışmalar, bitkinin yapısında alkaloidler, lipidler, polifenoller, flavonoidler ve glukozinolatların bulunduğunu bildirmiştir.

Ayrıca *Capparis ovata* ekstresinin a-tokoferol, P-tokoferol ve sitosterol gibi antioksidanlar ile kaempferol, rutosid kuersetin (rutin) ve kuersetin türevleri gibi flavonoidler bakımından zengin olduğu bildirilmiştir (47).

### **2.6.3. Kaempferol**

Bir flavonoid olarak Kaempferol (3,4,5,7-tetrahidroksiflavon), birçok şifalı bitki, sebze ve meyvelerde yaygın olarak bulunmaktadır. Kaempferol içeren bitkiler, hepatoprotektif aktivite ile sağlıklı fonksiyonel gıda olarak önerilmiştir. Elma, üzüm, domates, yeşil çay, patates, soğan, brokoli ve çeşitli bitkilerde bulunmaktadır. Oksidatif stresi azaltarak antioksidan etki yapar. Hidroksil grubunu bağlar. Kaempferol, hem in vitro hem de in vivo olarak anti-oksidan, anti-inflamatuar ve immüno-modülatör özellikleri ile birlikte CYP2E1 ekspresyonunun bir substratı ve inhibitörü olarak bildirilmiştir. Kaempferol, INH ve RIF gibi ilaçların neden olduğu

CYP2E1 aracılı hepatotoksisteyi önlemek için yeni bir adjuvan olarak kullanılmıştır (48).

#### **2.6.4. Rutin**

Rutin (3, 30, 40, 5, 7-pentahidroksflavon-3-ramnokosid), ayrıca kuersetin-3-rutinosid, rutosit ve sophorin olarak da adlandırılan bir flavonoldür. Portakal, greycourt, limon, yeşil çay ve birçok bitkide bulunan anti oksidan bir maddedir. Rutin +2 değerlikli demiri bağlayarak, demirin hidrojen peroksiti bağlamasını önler ve böylece yüksek güçlü oksijen radikallerinin oluşması engel olur.

Bitki kökenli doğal, güçlü bir antioksidan olan rutin yaygın olarak diabetes mellitus, kanser, oksidatif stres, mikrobiyal kontaminasyon ve kardiyovasküler bozukluklar gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılır. Bir antikanser ajanı olan rutin, tümör nekroz faktörü alfanın apoptozun indüklenmesi ve glikojen sentaz kinaz -3β ekspresyonunun düzenlenmesi gibi A549 insan akciğer karsinom hücrelerinin çoğalması yoluyla çoğalmasını önler. Ayrıca, farelerde diyetle indüklenen obezite modelinde adipozitede azalma, enerji harcamalarında artış ve glukoz homeostazında düzelmeye neden olur. Ayrıca, çalışmalar, rutin farelerde stres hasarından korunmada etkisinin olduğunu göstermiştir. Rutinin inflamasyon, oksidatif stres ve nitrik oksit üretimini düzenlediği kanıtlanmış olmasına rağmen, kesin mekanizması hala belirsizdir(49).

### **2.7. Karaciğer Fibrozisinde Kemokinler ve İlişkili Genler**

İnflamasyonla seyreden hastalıklarda kemokinlerin çok önemli görevleri vardır. İnflamasyonda kemokinler lökositlerin kandan dokuya geçişine ve inflamasyonun bulunduğu yerde birikimine ve aktivasyonuna yol açar. Örnekler şöyle özetlenebilir (50);

- Transforme edici büyüme faktörü-β (TGF-β): Hepatik fibrozis mekanizmalarındaki en potent sitokinlerden biridir. TGF-β hepatosit proliferasyonunu baskılamakta, HSH aktivasyonunu ve ESM üretimini uyarmakta ve hepatosit apoptozisine aracılık etmektedir. Normal karaciğerde HSH'ler az miktarda TGF-β geni eksprese ederken, sinüzoidal endotel hücreler ve Kupffer hücreleri



göreceli olarak daha fazla eksprese etmektedir. Fibrojenik stimulus varlığında ise HSH'ler artmış TGF- $\beta$  üretiminin en büyük kaynağı olmaktadır. Bu yüzden aktive HSH'ler ürettikleri TGF- $\beta$ 'nın otokrin ve parakrin etkileri aracılığı ile tip 1 kollajen üreten esas hücreler olmakta ve bu nedenle fibrozisin en önde gelen sorumlusu olmaktadır (108).

- Karaciğer hasarlanmasının tüm tiplerinde anahtar konumunda olan TNF- $\alpha$ 'nın ve HSH aktivasyonunda çok önemli rolü vardır. Karaciğerde TNF- $\alpha$  üretiminin en büyük kaynağı Kuppfer hücreleridir. Hasarlanmış hepatositlerden salınan çeşitli faktörler veya ROÜ tarafından uyarıldıklarında, Kuppfer hücreleri büyük miktarda TNF- $\alpha$  üretmektedir. TNF- $\alpha$  hepatosellüler hasara ve TRAIL reseptörleri aracılığı ile hepatosit apoptozisine katkıda bulunmaktadır (51). Bir çalışmada, TNF- $\alpha$  üretiminden sorumlu gen baskılandığında, karaciğer hasarının daha az olduğu karaciğer enzimleri ile ve histolojik olarak gösterilmiştir (52).

- Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF): HSH proliferasyonu için en potent mitojendir. PDGF reseptörleri tirozin kinaz aktivitesi göstermektedir. PDGF etkileri antikorlar veya reseptör inhibitörleri ile bloke edildiğinde, fibrosis progresyonunun engellendiği çalışmalarla gösterilmiştir (53).

- CCL2 ( The chemokine (C-C motif) ligand 2) (monocyte chemoattractant protein 1): Monosit, T hücreleri ve dendritik hücreleri çağıran doku hasarında artan bir kemokindir. Nöroinflamatuvar hastalıklarda, diyabetik böbrek hasarında ve kronik böbrek yetmezliğinin ortaya çıkışında rol alan patogenetik mekanizmalarda rol alır (84).

- CCL10/9 Chemokine (C-C motif) ligand 9- macrophage inflammatory protein-1 gamma (MIP-1 $\gamma$ )– CXC alt familya üyesi bir kemokin kodlar ve CXCR3 reseptörünün bir ligandıdır. Bu proteinin CXCR3 reseptörüne bağlanması doğal öldürücü (NK) ve T-hücrelerinin göçü, adezyon moleküllerinin ifadelerinin modülasyonu monositlerin aktivasyonu gibi etkiler ile sonuçlanır (87).

- CXCL9 Chemokine (C-X-C motif) ligand 9 – IFN- gama ile uyarılan T hücre çekici kemokin. CXCL9, son zamanlarda esas olarak immün hücre göçünü, farklılaşmasını ve aktivasyonunu düzenlediği için araştırmaların ana odağı haline gelmiştir (87).

- CCR3 -- C-C chemokine receptor type 3– Eozinofil, Th1 ve Th2 hücrelerinde olan ve inflamatuvar sitokinleri bağlayarak bu hücreleri aktiveştiren bir reseptördür.

- CXCR1--CXC chemokine receptor– IL-8 in reseptörüdür. IL-8 nötrofil kemotaksisi ve aktivasyonunu yönetir (84).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Deney hayvanları

Çalışmada kullanılan deney hayvanlarının üretimi, barınması, beslenmesi ve deneysel çalışma Pamukkale Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde gerçekleştirildi. Ratlar (wistar albino erişkin erkek ortalama 250 gr ağırlığında) sekizerli olacak şekilde toplam altı gruba ayrıldı: Kontrol grubu (grup 1) ile birlikte, CCL4 uygulanan grup(grup 2), CCL4+Capparis ovata uygulanan grup, CCL4+Rutin uygulanan grup, CCL4+Kaempferol uygulanan grup, CCL4+NAC uygulanan grup. CCL4+Rutin+Kaempferol grubunda altı rat kaybedildiği için çalışma sonuçlarına dâhil edilmedi. 4 hafta boyunca grup 1 hariç diğer gruplara haftada 2 kez intraperitoneal olarak 2ml/kg dan %20 lik CCL4 (zeytinyağı içinde) verildi. Tedavi edici olarak kullanılan capparıs ovata ekstresi 500mg/kg/gün, rutin 25mg/kg/gün, kaempferol 20mg/kg/gün ve NAC 50mg/kg/gün dozunda intraperitoneal yolla hergün verildi. Capparıs ovata, rutin ve kaempferolde çözücü olarak zeytinyağı kullanıldı. Ratların sayısal dağılımı ve deneysel modelde uygulanan dozlar tablo 3.1'de verilmiştir.

**Tablo 3.1.** Çalışma sonunda değerlendirmeye dâhil edilen ratların gruplara göre sayısal dağılımı ve deneysel modelde uygulanan dozlar

Grup	Madde	Rat sayısı (n)	Doz	Veriliş yolu/süre
Grup 1	Kontrol	8	-	-
Grup 2	CCL4(zeytinyağı içinde)	8	2ml/kg	İP (haftada 2 kez)
Grup 3	CCL4+Capparis ovata (zeytinyağı içinde)	8	500mg/kg/gün	İP*
Grup 4	CCL4+Rutin(zeytinyağı içinde)	8	25mg/kg/gün	İP*
Grup 5	CCL4+Kaempferol(zeytinyağı içinde)	8	20mg/kg/gün	İP*
Grup 6	CCL4+NAC	8	50mg/kg/gün	İP*

\*CCL4 haftada 2 kere İP (intraperitoneal) ancak antioksidan maddeler hergün verildi.

Ratlar deney boyunca 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık, 22 °C ısı, %55-65 nem ve rahatça su ve standart pellet yeme ulaşabilecekleri metal kafeslerde barındırıldığı kontrollü çevresel şartlarda tutuldular. Ratlar için özel bir diyet uygulanmadı.

Çalışmaya başlamadan önce Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleti Etik Kurulu'na başvurularak; PAUHADYK-2016/15 no'lu çalışmamıza 20.07.2016 tarih ve 2016/05 sayılı toplantıda izin alınmıştır. Çalışmamız için gerekli ödenek Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 18/07/2017 tarihinde yapılan toplantıda 2017TIPF010 nolu projemize onay verilmesi ile sağlanmıştır.

### 3.2. Deneyde kullanılan kimyasallar

Karbon tetraklorür için %99,5 saflıkta ticari ürün (Gül Laboratuvar, İstanbul, Türkiye) ve N-asetilsistein için Asist ampul 100 mg/ml (Hüsnü Arsan, İstanbul, Türkiye) kullanıldı.

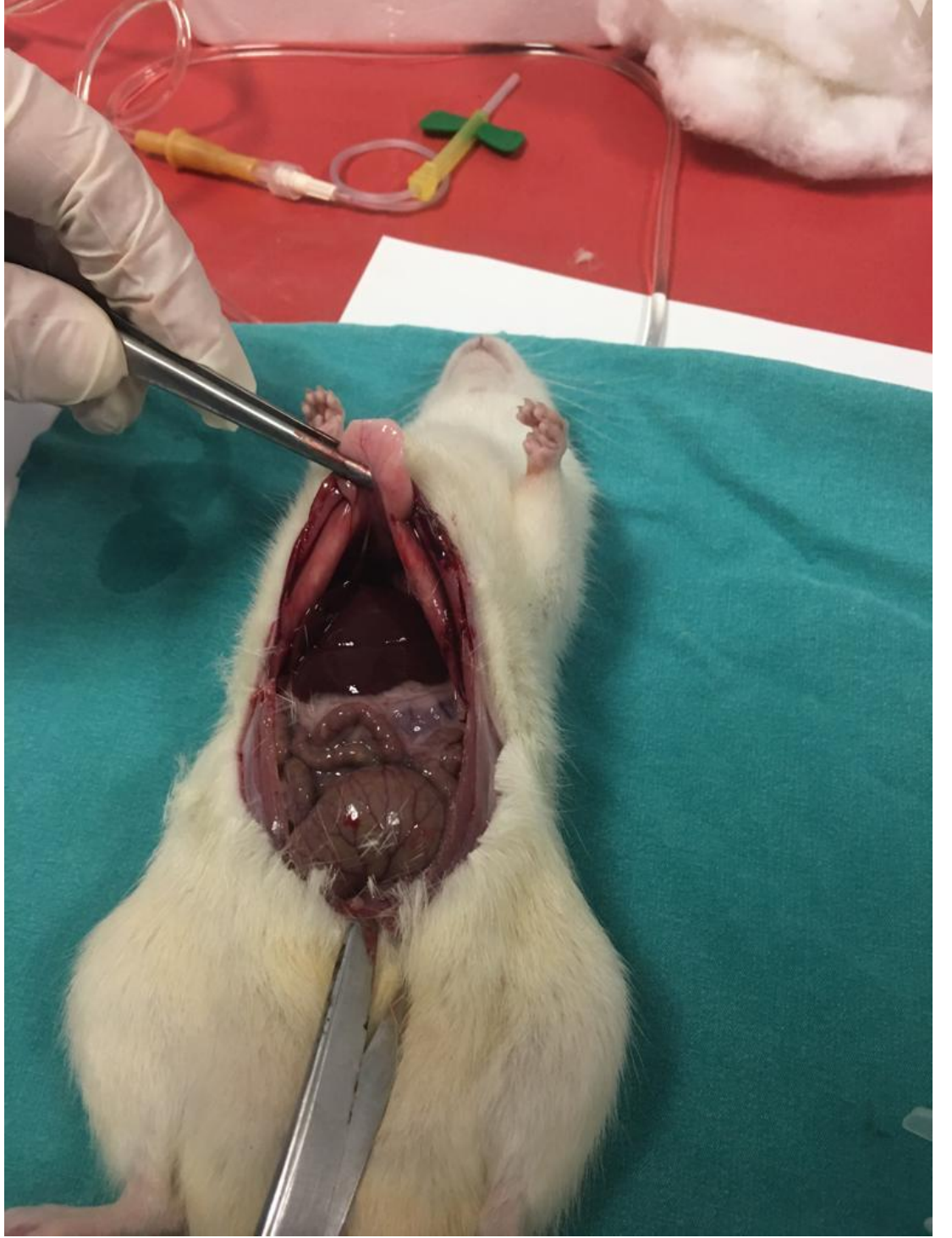
Deney modelinde kullanılacak Capparis ovata meyve, tomurcuk ve çiçek materyali ticari ürün olarak (Aşçı Murat Kapari Tatlı Dondurma Turşu İml. Ve İhr. Ltd.) sağlandı. Kaempferol %98 min HPLC, CN Lab Nutrition Asian Group tarafından; Rutin hydrate, >%94 (HPLC), Boğa Medikal Kimya Elektronik tarafından sağlandı.

Kapari sulu ekstresinin hazırlanması için karaciğer fibrozisi hastalarının bir günde tükettiği miktar olan miktarlar dikkate alınarak Pamukkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Laboratuvarı'nda gölgede kuruttuğumuz kapari meyvesi (salamura karpuz), kapari çiçeği (çay) ve kapari tomurcuğu (salamura tomurcuk) karışımı Gerhardt ekstrasyon cihazı kullanılarak 130 °C'de ekstre edildi. Ekstraksiyon işleminden sonra ekstre doğrudan Labconco Freze Dryer (liyofilizatör) kullanılarak liyofilize edildi ve COWE ekstresi elde edildi.

### **3.3. Deneyin sonlandırılması**

Çalışma 4 hafta boyunca sürdürüldü. Karaciğer fibrozis modeli oluşturmak için dört hafta boyunca haftada 2 kez intraperitoneal olarak 2 ml/kg %20 lik CCL4 seyreltilmiş olarak verildi. Son enjeksiyondan üç gün sonra 60 mg/kg ketamin ve 50 mg/kg midazolam anestezisi altında servikal dislokasyon ile ratlara ötenazi uygulandı. Kan ve karaciğer dokuları biyokimyasal ve histolojik çalışmalar için elde edildi.

Kan örnekleri 4000 devirde 5-10 dakika santrifüj edilerek serum örnekleri ayrıldı. Örnekler tetkik anına kadar -20°C'de saklandı. Karaciğer doku örnekleri iki örnek için kesilerek birisi %10 formalin içinde fikse edildi ve diğer örnek parafin bloklara alındı.



**Şekil 3.1.** Deneyin sonlandırılması ile kan ve doku alım süreci

### **3.4. Biyokimyasal analizler**

Rutin biyokimyasal analizler (aspartat aminotransferaz, AST; alanin aminotransferaz, ALT; total ve direkt bilirubin) Roche Cobas E701 otoanalizöründe (Roche Diagnostics, Germany®) Cobas rutin kitleri kullanılarak enzimatik ve kolorimetrik yöntemlerle çalışıldı. Çalışma içi ve çalışmalar arası CV <5% iken, Biorad EQAS Dış Kalite Değerlendirme programı ile doğruluk çalışmaları Z Skor<2 SD olarak sağlandı.

Dokuda TNF-alfa, TGF-beta1 ve 2, CCL2, CCL5 CCL10, CCL11, CXCL9, CXCL11, IL-2, IL-1beta, IL-6, IL-10, IFN-gama, VEGF, CCR3, CXCR1, sitokin düzeyleri ELISA kitleri (GENBİOTEK BİOSİSTEM LAB. MALZ) ile çalışıldı. Dokudan RNA izole edilerek PCR metoduyla gen ekspresyon tayini yapıldı. Değerlendirmede eşik devirleri (CT) kullanıldı.

### **3.5. Karaciğerin histopatolojik ve immünohistokimyasal incelemeleri**

Parafin bloklardan dört mikrometre kalınlığında kesitler elde edilerek hematoksilin–eosin (H&E), Masson trikrom (MT) ve immün boyama(Alfa SMA) ile boyandı ve Olympus BX51 mikroskop ile ×40, ×100, ×200 ve ×400 merceklerle ışık mikroskopunda inceleme yapıldı. Histopatolojik değerlendirme uzman bir histolog tarafından çalışma gruplarına kör olarak yapıldı.

Steatotik hücrelerin yüzdesi belirlendi. Steatotik hücreler %5’den az ise evre 0, %5-25 ise evre I, %25-50 ise evre II, %50-75 ise evre III steatoz olarak değerlendirildi.

Fibrozisin derecesi semikantitatif bir skora göre belirlendi. Bu sisteme göre fibrozis şu şekilde değerlendirildi:

0: Fibrozis olmayan normal karaciğer

I: Kalın perivenüler kollajen ve birkaç kollajen septa

II: İnce septa ile inkomple köprüleşmeler

III: İnce septa ve yoğun köprüleşmeler

IV: Kalın septa ile portal bölgeleri çaprazlayan komple köprüleşmeler ve nodüler görünüm

### **3.6. İstatistiksel analiz**

Elde edilen veriler ortalama  $\pm$  standart sapma (SS) olarak belirtildi. İstatistiksel analizler SPSS 17 paket program (SPSS Inc., Software Chicago, IL, USA®) kullanılarak yapıldı. Bağımsız gruplarda, gruplar arasındaki farklılıklar Kruskal Wallis, farklılıkların önemi Mann–Whitney U, bağımlı gruplardaki farklılıklar Wilcoxon signed rank testleri ile değerlendirildi. Gerekli yerlerde grup oran karşılaştırmaları için ki kare testi kullanıldı.  $p < 0,05$  değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



## 4. BULGULAR

### 4.1. Histolojik değerlendirme

Tüm ratlar toplam altı gruba ayrılmıştı. Bu grupların steatotik hücre ve fibrozis sınıflamaları tablo 4.1'de sunulmuştur. Kontrol grupta steatotik hücre ve fibrozis sınıflamaları evre 0'ı işaret ederken, tek başına CCL4 kullanılan grupta steatotik hücre sınıflaması tüm ratlarda evre 2 iken, fibrozis sınıflaması ise bir rat dışında evre 2 olarak saptandı. Diğer ratta ise fibrozis sınıflaması evre 3 olarak bulundu. Kontrol ve CCL4 grupları kıyaslandığında, CCL4 grubunda steatotik hücre ve fibrozis sınıflamaları kontrol grubuna göre daha yüksek bulundu ( $p=0,001$  ve  $p=0,041$ ). Kontrol grubu dışında, CCL4 grubunda fibrozis ve steatotik evre diğer tüm gruplardan yüksek saptandı ( $p=0,001$ ). Diğer grupların ise fibrosis ve steatotik evreleri benzer ( $p>0,05$ ).

Karbon tetraklorürün kullanıldığı tüm gruplardaki ratlarda fibrozis sınıfı kontrol grubundan yüksek idi (evre 1-2 vs evre 0;  $p=0,044$ ). Capparis ovata, rutin, kaempferol ve NAC kullanılan gruplarda steatotik hücre ve fibrozis sınıflaması benzer ve evre 1 olarak bulundu ( $p>0,05$ ).

**Tablo 4.1.** Ratların gruplarına göre steatotik hücre ve fibrozis sınıflamaları

Verilen madde	n	Sınıflama		P	
		Steatotik hücre	Fibrozis		
<b>Grup 1 Kontrol</b>	8	Evre 0 (tümü) <sup>a</sup>	Evre 0 (tümü) <sup>d</sup>	P<0.05	P<0.05*
<b>Grup 2 CCL4</b>	8	Evre 2 (tümü) <sup>b</sup>	Yedisi evre 2,biri evre 3 <sup>e</sup>		
<b>Grup 3 CCL4+Capparis ovata</b>	8	Evre 1 (tümü) <sup>c</sup>	Evre 1 (tümü) <sup>f</sup>	p>0.05	P<0.05
<b>Grup 4 CCL4+rutin</b>	8	Evre 1 (tümü) <sup>c</sup>	Evre 1 (tümü) <sup>f</sup>		
<b>Grup 5 CCL4+Kaempferol</b>	8	Evre 1 (tümü) <sup>c</sup>	Evre 1 (tümü) <sup>f</sup>		
<b>Grup 6 CCL4+NAC</b>	8	Evre 1 (tümü) <sup>c</sup>	Evre 1 (tümü) <sup>f</sup>		

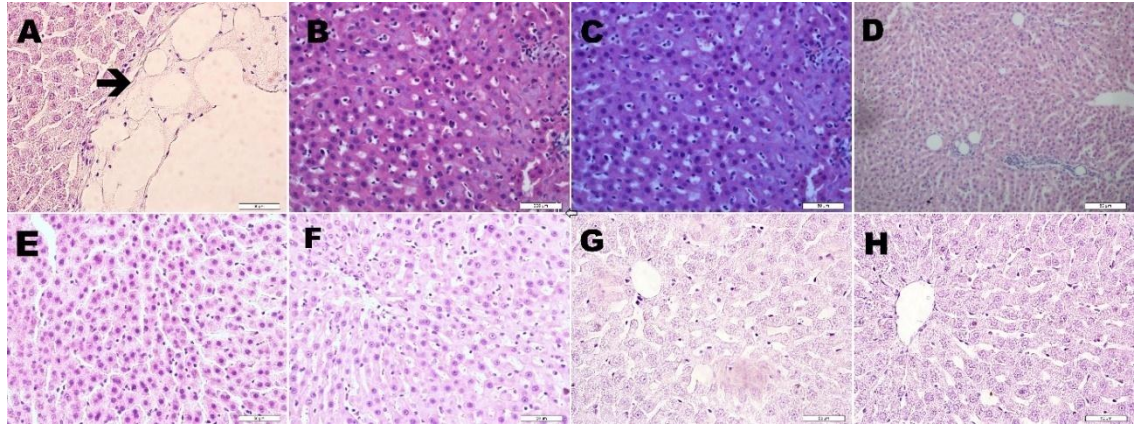
a ve b için b>a ve p<0.05, d ve e için e>d ve p<0.05, c grup içi için p>0.05, f grup içi için p>0.05

\*Grup 1 ile Grup 3,4,5,6 nın karşılaştırması için p<0.05

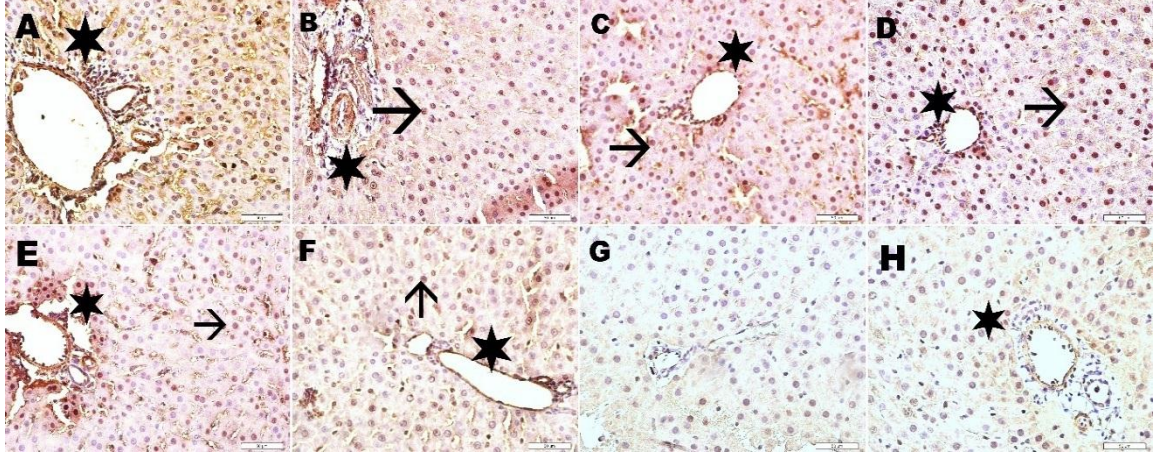
Sadece CCL4 kullanılan ratların karaciğerlerinin histolojik değerlendirmesinde, yağ hücreleri çoğu alanda küçük çaplı az bir alanda büyük çaplı olarak izlendi. Karaciğer hücreleri ışınal dizilimlerini kaybetmiş ve birbirlerinden ayrılmış şekildeydi. Bazı hücrelerin iyice küçüldüğü işsi bir hal aldığı ve hepatositlerin çoğunda sitoplazmanın homojen görüntüsünü kaybettiği ve nokta şeklindeki açılmaların pürüzlü bir görüntü sergilediği izlendi. Sinuzoidlerde dilatasyon oldukça belirgindi. İnflamasyon yaygındı. Diğer gruplarda küçük çaplı yağ hücreleri az olmakla birlikte varlığını devam ettirmekteydi. Normal görünümlü hepatositlerle birlikte pürüzlü sitoplazmalı hepatositlerin de halen var olduğu belirlendi. İnflamasyon ve dilate sinuzoidler CCL4 grubundan daha az olmakla birlikte halen devam etmekteydi. Kontrol grubunda ise histoloji normal görünümdeydi.

Histokimyasal değerlendirmede, immün boyamada hepatosit sitoplazması ve çekirdeği, sinuzoidler, portal alan yapıları arter, ven ve safra kanalı değerlendirildi. İmmün boyanmanın derecesi ‘kuvvetli +++, orta++, zayıf + ‘ olarak belirlendiğinde kontrol grubunda tüm yapılar zayıf pozitif saptandı. Sadece CCL4 kullanılan grupta hepatosit çekirdekleri kuvvetli pozitif reaksiyon gösterdi. Bunların arasında negatif reaksiyon gösteren çekirdeklere rastlandı. Sitoplazma çoğunlukla negatif ancak damarlara yakın bölgede kuvvetli pozitif reaksiyon gösteren hepatositlere de rastlandı. Portal alanda tüm yapılar ve dilate sinuzoidlerde reaksiyon kuvvetli pozitif. Sadece CCL4+NAC kullanılan grupta hepatosit çekirdekleri zayıftan ortaya değişen derecelerde reaksiyon göstermişti.

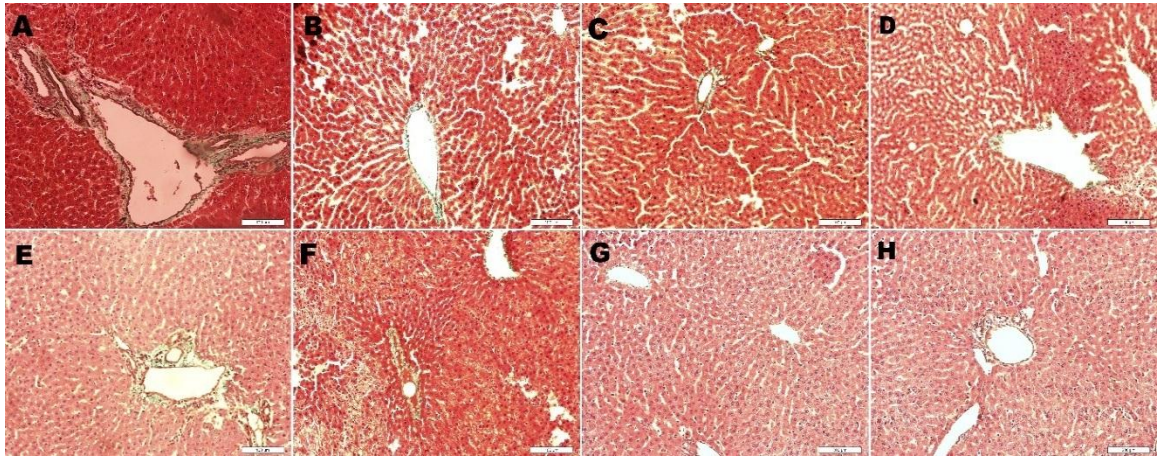
Karaciğer histolojik preparatlarının hemotoksilen eozin, massan trikrom ve immünohistokimyasal boyanma özellikleri şekil 4.1, 4.2 ve 4.3’te gösterilmektedir.



**Şekil 4.1.** Hematoksilenle ve eosin ile boyanmış karaciğer dokusu kesitleri. A: Grup 2 (CCL4), B; Grup 4 (CCL4+R), C; Grup 5 (CCL4+ K), E; Grup 3 (CCL4+C), F; Grup 6 (CCL4+NAC), G ve H; Grup 1 (Kontrol). Ok ile işaretli alanda büyük yağ hücreleri gösterilmekte.



**Şekil 4.2.** İmmunohistokimya yönteminin (immunoperoksidaz) uygulandığı karaciğer dokusu. A: Grup 2 (CCL4), B;Grup 4 (CCL4+R), C; Grup 5 (CCL4+ K), E;Grup 3 (CCL4+C), F; Grup 6 (CCL4+NAC), G ve H; Grup 1 (Kontrol). Ok ile işaretli alanlar immunpozitif boyanan karaciğer hücre çekirdekleri. Yıldız portal alanı göstermektedir.



**Şekil 4.3.** Masson trikrom ile boyanmış karaciğer dokusu kesitleri. A: Grup 2 (CCL4), B;Grup 4 (CCL4+R), C; Grup 5 (CCL4+ K), E;Grup 3 (CCL4+C), F; Grup 6 (CCL4+NAC), G ve H; Grup 1 (Kontrol). Yeşil boyalı bölgeler kollajen liflerinin yoğun olduğu bölgeler.

#### 4.2. Biyokimyasal değerlendirme

Kontrol grubu ve diğer gruplarda AST, ALT, total bilirubin ve direkt bilirubin ortalama değerleri tablo 4.2’de verilmiştir. En yüksek AST ve ALT değerleri CCL4 grubunda saptanırken, diğer gruplarda daha düşük ve kontrol grubu ile benzer düzeyde idi. Tüm gruplar arasında ALT ve total bilirubin değerleri benzerken ( $p>0.05$ ); AST ve direkt bilirubin değerleri gruplar arasında karşılaştırıldığında bu parametrelerin CCL4 grubunda diğer gruplara ve kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu saptandı. Ancak anlamlı bir yükseklik saptanmadı ( $p>0.05$ ). Gruplar arasındaki dağılıma bakıldığında AST için Grup 2 (CCL4) ile Grup 3 (CCL4 + C. Ovata) ve Grup 6 (CCL4 + NAC) ile Grup 3 (CCL4 + C. Ovata) ; direk bilirubin için Grup 1 (Kontrol) ile Grup 6 (CCL4 + NAC) , Grup 1 (Kontrol) ile Grup 4 (CCL4 + Rutin) ve Grup 1 (Kontrol) ile Grup 5 (CCL4 + Kaempferol) karşılaştırmalarında anlamlı fark ( $p<0.05$ ) saptansa da genel karşılaştırmaya bakıldığında tutarsızlık olmasından dolayı anlamlı kabul edilmedi.

**Tablo 4.2.** Gruplar arasında AST, ALT, total ve direkt bilirubin düzeyleri

Grup		AST	ALT	T. BİL	D. BİL
<b>Grup 1 (Kontrol)</b>	n	8	8	8	8
	Ortalama	76,1	45,4	0,05	0,02
	Ortanca	72,0	45,5	0,05	0,02
	Standart deviasyon (SD)	8,6	5,6	0,01	0,01
	Minimum	70,0	37,0	0,02	0,01
	Maksimum	95,0	56,0	0,06	0,04
<b>Grup 2 (CCL4)</b>	n	8	8	8	8
	Ortalama	100,5	50,5	0,05	0,03
	Ortanca	80,0	50,5	0,05	0,04
	Standart deviasyon (SD)	20,1	10,5	0,02	0,01
	Minimum	78,0	35,0	0,00	0,01
	Maksimum	120,0	80,0	0,08	0,04
<b>Grup 3 (CCL4 + C. Ovata)</b>	n	8	8	8	8
	Ortalama	69,5	37,3	1,0	0,06
	Ortanca	70,0	35,0	0,08	0,05
	Standart deviasyon (SD)	17,3	15,2	0,07	0,05
	Minimum	47,0	23,0	0,05	0,02
	Maksimum	106,0	74,0	0,28	0,17
<b>Grup 4 (CCL4 + R)</b>	n	8	8	8	8
	Ortalama	76,1	44,5	0,08	0,05
	Ortanca	77,0	44,0	0,07	0,05
	Standart deviasyon (SD)	13,9	7,5	0,02	0,01
	Minimum	58,0	32,0	0,04	0,03
	Maksimum	99,0	55,0	0,12	0,08
<b>Grup 5 (CCL4 + K)</b>	n	8	8	8	8
	Ortalama	74,6	42,0	0,1	0,1
	Ortanca	73,5	35,5	0,1	0,04
	Standart deviasyon (SD)	11,5	14,3	0,1	0,1
	Minimum	59,0	32,0	0,1	0,04
	Maksimum	96,0	72,0	0,3	0,26
<b>Grup 6 (CCL4 + NAC)</b>	n	8	8	8	8
	Ortalama	103,2	42,4	0,07	0,05
	Ortanca	90,5	43,5	0,07	0,05
	Standart deviasyon (SD)	32,7	8,7	0,02	0,01
	Minimum	74,0	28,0	0,04	0,03
	Maksimum	165,0	55,0	0,09	0,08

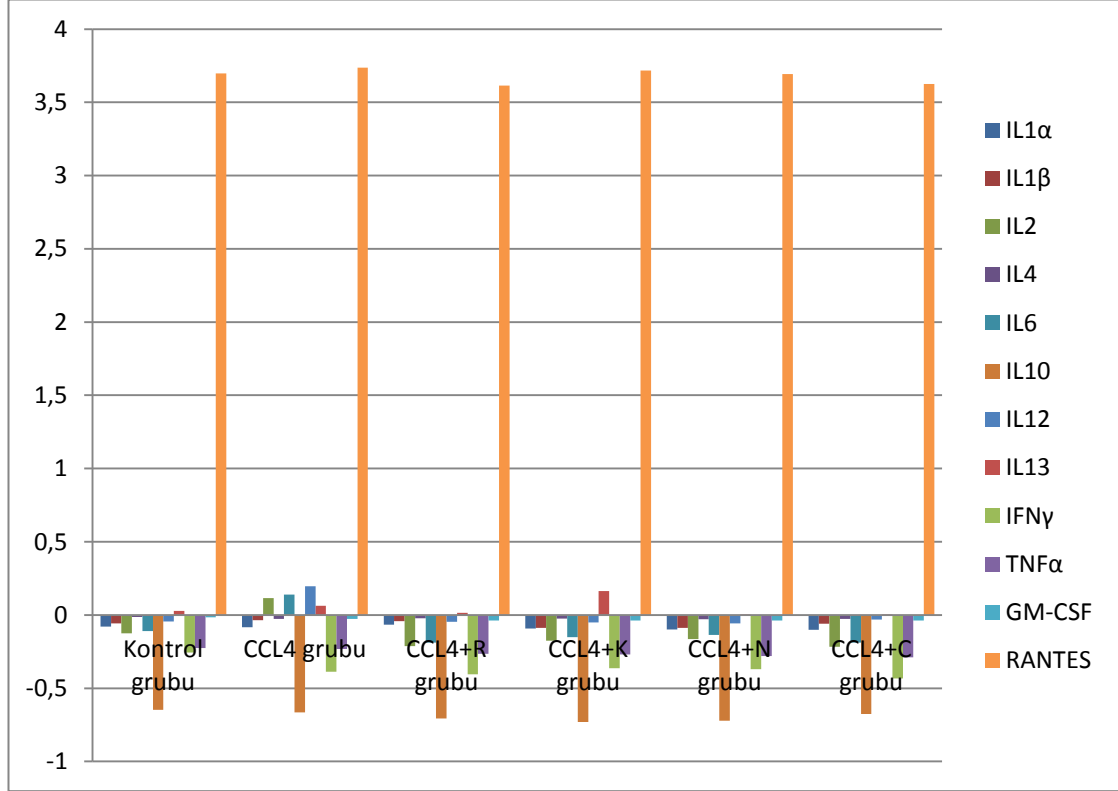
**Tablo 4.3.** Gruplar arasında AST, ALT, total ve direkt bilirubin p değeri dağılımı düzeyleri

Grupların Karşılaştırması	AST	ALT	Total Biluribin	Direk Biluribin
Grup 1 (Kontrol) – Grup 2 (CCL4)	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05
Grup 1 (Kontrol) – Grup 6 (CCL4+NAC)	p>0.05	p>0.05	p>0.05	P<0.05*
Grup 1 (Kontrol) – Grup 4 (CCL4+Rutin)	p>0.05	p>0.05	p>0.05	P<0.05*
Grup 1 (Kontrol) – Grup 3 (CCL4+C.Ovata)	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05
Grup 1 (Kontrol) – Grup 5 (CCL4+Kaempferol)	P>0.05	p>0.05	p>0.05	P<0.05*
Grup 2 (CCL4) – Grup 6 (CCL4+NAC)	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05
Grup 2 (CCL4) – Grup 4 (CCL4+Rutin)	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05
Grup 2 (CCL4) – Grup 3 (CCL4+C.Ovata)	P<0.05*	p>0.05	p>0.05	p>0.05
Grup 2 (CCL4) – Grup 5 (CCL4+Kaempferol)	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05
Grup 6 (CCL4+NAC) – Grup 4 (CCL4+Rutin)	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05
Grup 6 (CCL4+NAC) – Grup 3 (CCL4+C.Ovata)	P<0.05*	p>0.05	p>0.05	p>0.05
Grup 6 (CCL4+NAC) – Grup 5 (CCL4+Kaempferol)	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05
Grup 4 (CCL4+Rutin) – Grup 3 (CCL4+C.Ovata)	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05
Grup 4 (CCL4+Rutin) – Grup 5 (CCL4+Kaempferol)	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05
Grup 3 (CCL4+C.Ovata) – Grup 5 (CCL4+ Kaempferol)	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05

#### 4.3. Sitokin ölçümleri ve Ekspresyon Değişimleri

Şekil 4.4'te tüm gruplarda sitokin ölçüm değerlerinin negatif kontrol değerinden çıkarılması sonucu elde edilen değerlerin karşılaştırmaları sunulmuştur. Ayrıca gruptaki sitokin ölçümleri tablo 4.4'te 'absolü değeri- negatif kontrol değeri' olarak verilmiştir. Kontrol ve diğer gruplar arasında sitokin (IL-1 alfa ve

beta, IL-4, IL-10, IL-13, IFN gama, TNF alfa, GM-CSF ve RANTES ölçümleri) ölçümleri karşılaştırmaları sonucu anlamlı fark saptanmadı ( $p>0,05$ ).



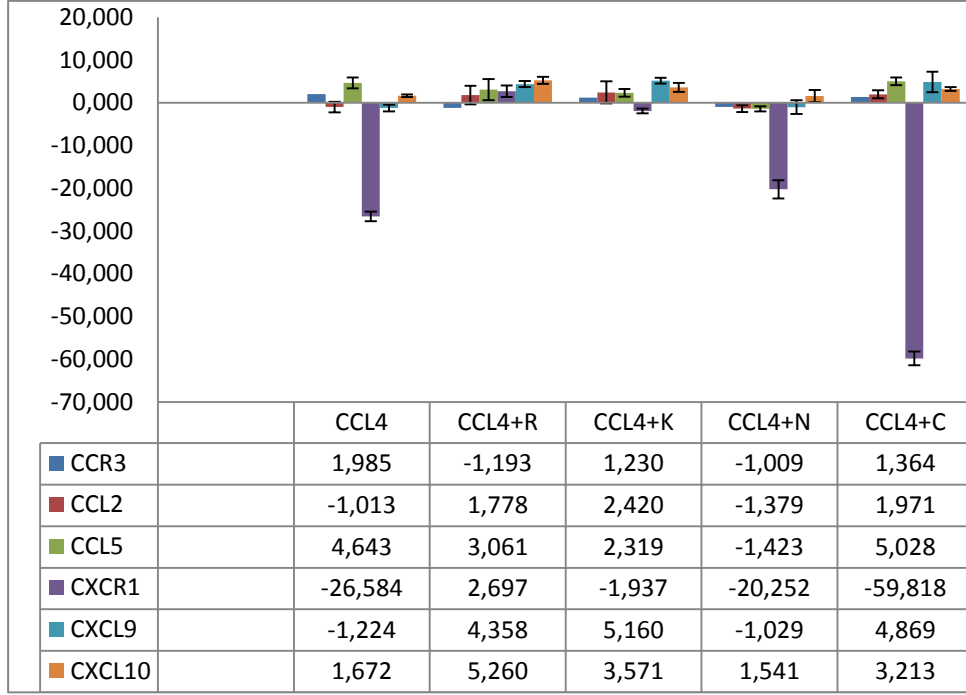
**Şekil 4.4.** Gruplar arasında sitokin ölçümleri

Gruplar arasında kemokin ve kemokin reseptörleri (CCR3, CCL2, CCL5, CXCR1, CXCL9, CXCL10), inflamasyon ilişkili genler (INFG, TNFα, TGFb-1, TGFb-2, IL2, IL6, IL10) ve TIMP1, CoL3a1, TLR4, ASMA, INOS, c-MYC ve ALDOA genlerinin ekspresyon oranları karşılaştırıldı (Şekil 4.5, 4.6 ve 4.7).

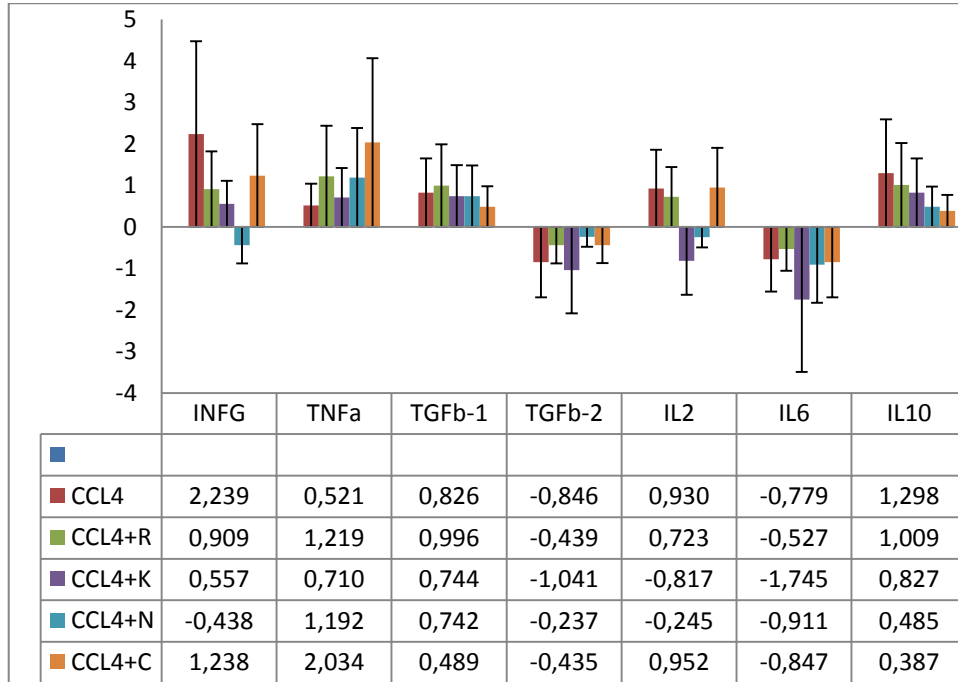


Absolü değer- negatif kontrol değeri	IL1 $\alpha$	IL1 $\beta$	IL2	IL4	IL6	IL10	IL12	IL13	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$	GM-CSF	RANTES	P
<b>Grup 1</b> (Kontrol grubu)	-0,0787	-0,0569	-0,124	-0,0141	-0,1099	-0,6472	-0,0432	0,0291	-0,2566	-0,2257	-0,0152	3,698	>0.05
<b>Grup 2</b> (CCL4 grubu)	-0,0832	-0,0357	0,1144	-0,0257	0,1401	-0,6637	0,1962	0,0619	-0,3871	-0,2312	-0,0271	3,735	>0.05
<b>Grup 3</b> (CCL4+C ovata grubu)	-0,1003	-0,0586	-0,2162	-0,027	-0,1892	-0,6752	-0,0299	0,0043	-0,4336	-0,2896	-0,0366	3,625	>0.05
<b>Grup 4</b> (CCL4+R grubu)	-0,0664	-0,0412	-0,2117	-0,0224	-0,1893	-0,7059	-0,0456	0,0142	-0,404	-0,2656	-0,0381	3,615	>0.05
<b>Grup 5</b> (CCL4+K grubu)	-0,0926	-0,0881	-0,1753	-0,0244	-0,1509	-0,7294	-0,0517	0,1633	-0,3623	-0,2686	-0,038	3,717	>0.05
<b>Grup 6</b> (CCL4+NAC grubu)	-0,0987	-0,087	-0,1641	-0,0283	-0,1358	-0,721	-0,0582	0,0037	-0,3696	-0,2795	-0,0385	3,692	>0.05
<b>Pozitif kontrol</b>	3,2056	2,932	3,2404	3,1356	3,145	2,5028	2,3066	3,4343	3,1944	3,3032	2,2311	3,4786	>0.05

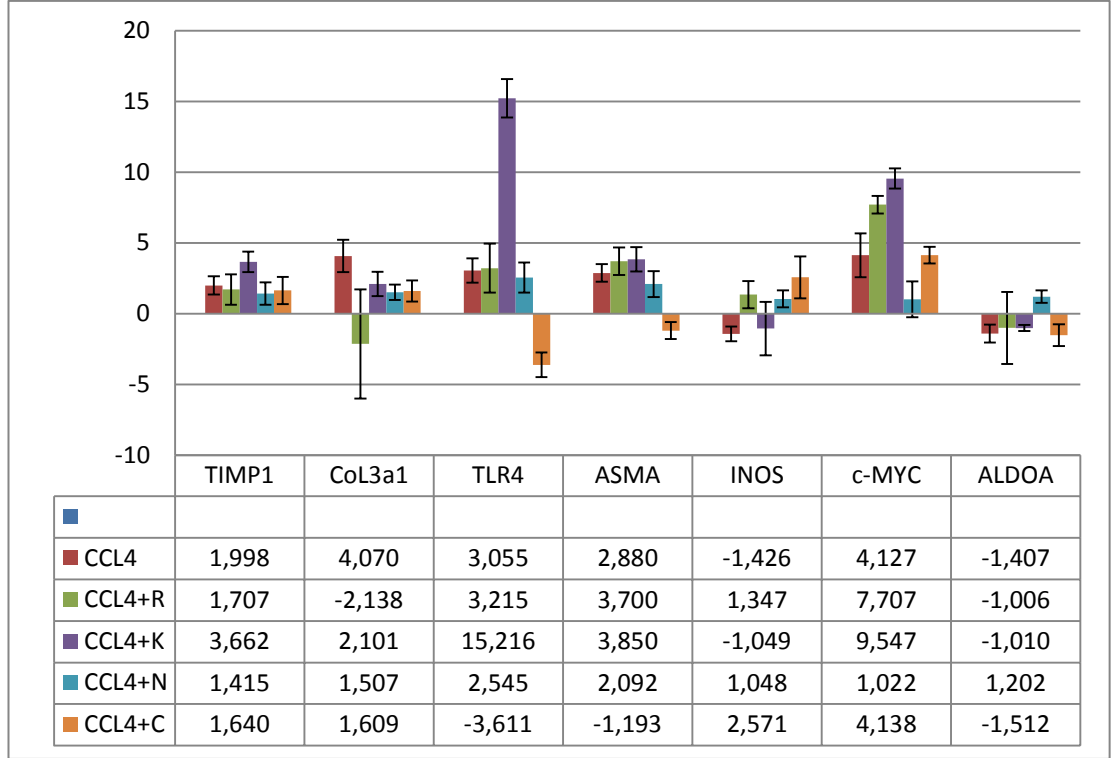
**Tablo 4.4.** Gruplar arasında sitokin ölçümleri(Tüm sonuçlar ‘absolü değer- negatif kontrol değeri’ olarak verilmiştir. Tüm sitokin değerleri açısından gruplar arası karşılaştırmalarda  $p>0,05$ ). (IL: interlökin, IFN: interferon TNF: tümör nekrozis faktör GM-CSF: Granülosit makrofaj koloni stimulan faktör RANTES: ‘regulated on activation, normal T cell expressed and secreted’)



**Şekil 4.5.** Gruplar arasında kemokin ve kemokin reseptörleri (CCR3, CCL2, CCL5, CXCR1, CXCL9, CXCL10) genlerinin ekspresyon oranları



**Şekil 4.6.** Gruplar arasında inflamasyon ilişkili genler (INFG, TNFa, TGFb-1, TGFb-2, IL2, IL6, IL10) genlerinin ekspresyon oranları



**Şekil 4.7.** Gruplar arasında TIMP1, CoL3a1, TLR4, ASMA, INOS, c-MYC ve ALDOA genlerinin ekspresyon oranları

Bu gen ekspresyonları CT değerlerine göre değerlendirildiğinde, CLL2, CXCL 9, CXCL 10 ekspresyon düzeylerinde gruplar arasında anlamlı fark saptanmazken, kemokin ve kemokin reseptörü ilişkili genlerden CCR3 ekspresyonunun rutin grubunda diğer tüm gruplara göre azaldığı, NAC grubunda ise CCL5 ve CXCR1 ekspresyonlarının CCL4 grubuna göre azaldığı görüldü. Ayrıca, inflamasyonla ilişkili genlerde, NAC grubu CCL4 grubu ile kıyaslandığında, INF gama, INF-alfa, IL 2 ve IL 10 ve TGF-beta ekspresyon düzeylerinin NAC grubunda azalma olduğu saptandı. Rutin grubunda TNF-alfa, TGF-beta, IL 2 ve IL 10, Kaempferol grubunda IL 2 ekspresyon düzeylerinin CCL4 grubundan belirgin iyi olduğu görüldü ( $p < 0.05$ ). Ayrıca, rutin grubunda TIMP1, Col3a, ASMA, INOS, ACTB ve ALDOA ekspresyon düzeyleri CCL4 grubundan düşüktü. C. ovata grubunda ise TLR4 ve ASMA ekspresyon düzeyleri CCL4 grubuna göre azalmıştı. Ancak anlamlı düzeyde değildi. Genel tabloda hasta(CCL4 grubu) , tedavi(CCL4 + NAC grubu) ve kontrol grubuna göre anlamlı olabilecek sonuç CCL4 + Rutin grubunun TNF alfa, IL-10, TGF-beta1 ve IL-2 genlerindeki; CCL4 + kaempferol grubunun da IL-2 geninde sağladığı azalma sayılabilir. Anlamlı sonuçlar ayrılarak tablo 4.5 de gösterilmiştir.

**Tablo 4.5** İnflamatuar genlerden CT değerlerine göre anlamlı saptanan sonuçlar ve gruplar arasında ilişkisi

Gruplar	TNF- Alfa	IL-10	TGF-Beta1	IL-2
Kontrol (1)	32.32 ± 1.6	29.17 ± 0.46	23.16 ± 0.65	34.41 ± 0.31
CCL4 (2)	29.31 ± 0.24	27.49 ± 0.79	21.46 ± 0.83	29.5 ± 0.31
CCL4 + Capari(3)	29.33 ± 0.25	26.79 ± 0.36	22.38 ± 0.46	29.88 ± 0.39
CCL4 + Rutin (4)	33.66 ± 1.14	29.28 ± 0.94	23.82 ± 0.93	34.66 ± 0.68
CCL4 + Kaempferol (5)	32.33 ± 0.32	27.25 ± 0.38	22.42 ± 0.3	35.2 ± 0.82
CCL4 + NAC (6)	32.66 ± 0.32	28.63 ± 0.48	23.18 ± 0.74	35.34 ± 0.25
P	<0.05 (Grup 1 > Grup 2, Grup 2 < Grup 6, Grup 2 < Grup 4, Grup 1 > Grup 3, Grup 3 < Grup 6, Grup 3 < Grup 4)	<0.05 (Grup 1 > Grup 2, Grup 1 > Grup 3, Grup 1 > Grup 5, Grup 2 < Grup 6, Grup 3 < Grup 6, Grup 5 < Grup 6, Grup 2 < Grup 4, Grup 3 < Grup 4, Grup 2 < Grup 5)	<0.05 (Grup 1 > Grup 2, Grup 2 < Grup 6, Grup 2 < Grup 4, Grup 3 < Grup 4, Grup 4 > Grup 5)	<0.05 (Grup 1 < Grup 6, Grup 1 > Grup 2, Grup 1 > Grup 3, Grup 2 < Grup 6, Grup 3 < Grup 6, Grup 2 < Grup 4, Grup 2 < Grup 5, Grup 3 < Grup 4, Grup 3 < Grup 5)

Dört haftalık deney süresi sonunda yalnızca CCL4 verilen model gruptaki ratlar daha hareketsiz ve tüyleri kısmen dökülmüş durumdaydı. Buna karşılık C.ovata, rutin, kaempferol ve NAC ile tedavi edilen gruptaki ratlar ise kontrol grubuna benzer şekilde daha sağlıklı görünüyorlardı. Bu durum laboratuvar bulgularının, ratların genel durumlarına olumlu yansımaları olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca çalışmaya ilk başta Grup 7 olarak dahil edilen CCL4 + rutin + kaempferol grubundaki ratlardan altı rat eksitus olması nedeniyle bu grup çalışma verilerinin değerlendirilmesi aşamasında değelendirmeye alınmadı.

## 5. TARTIŞMA

Karaciğerde birçok ilaç ve kimyasal madde hasar yaratmaktadır. Bunun nedeni karaciğerin birçok ilacı ve kimyasalı metabolize etmede temel organ olmasıdır (54). Kronik karaciğer hastası olanlarda fibrozis varlığını belirlemek, genel tedavi prensiplerini ve antiviral tedaviyi planlamak için önemlidir. Günümüzde fibrozisin belirlenmesi için altın standart olan yöntem histopatolojik incelemedir. Ancak olası komplikasyonlar ve getirdiği ekonomik yük bakımından bunun yerine uygulanabilecek farklı non-invaziv tanı metodları araştırılmaktadır. Bunlar arasında yaygın olarak kullanılanlar; biyokimyasal veriler ve görüntüleme yöntemleridir (55). Birçok non-invaziv testin tanısal değeri, ilerlemiş vakalar için çok yüksek iken, sınırdaki vakalar için çok düşüktür. Bu da bu yöntemlerin kullanımını sınırlamaktadır.

Karaciğer fibrozisi yapısal ve metabolik bozukluklara bağlı olarak ortaya çıkan patolojik bir tablodur ve çok sayıda faktör buna neden olabilmektedir. Hepatik stellat hücreler, fibrozisin oluşmasında anahtar rol oynamaktadır. Aktifleşen bu hücreler miyofibroblast özelliği kazanmakta, kollajen tip I ve tip III artışı yanında ekstra sellüler matriks artışı da ortaya çıkmaktadır (56,57). Genel olarak, hepatik fibrozisin, karaciğer parenkim dokusunun geri dönüşümsüz olarak yıkılması ve kollajenden zengin dokunun hakimiyetine bağlı olarak ortaya çıktığı bilinmektedir (58,59). Halen kronik karaciğer zedelenmelerinde yara iyileşmesi cevabının bu şekilde geliştiği kabul edilmektedir (60). Hepatik fibrozis, geri döndürülebilir dönemde tedavi edilirse başarı oranı yüksektir ve siroza gidiş önlenir. Sirozun önlenmesi veya ilerleyişinin kontrol edilmesi hala bir sorun olarak durmaktadır. Etkili ilaçların veya maddelerin bulunması için ise çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Son birkaç dekad içinde yapılmış olan birçok çalışma sayesinde karaciğer fibrozisinin hücresel ve moleküler mekanizmaları ayrıntılı olarak anlaşılabilmiştir (61). Karaciğer fibrozisinin progresyonunun yavaşlatılması ile kronik karaciğer hastalarında beklenen yaşam süresinin artması ve karaciğer transplantasyonu ihtiyacının azalması beklenebilir.

Gelişen veya gelişmiş olan fibrozisi engellemek için çeşitli ilaçlar, antioksidan maddeler, antimitojenik faktörler, bitki ekstratları kullanılmasına rağmen fibrozis

tedavisinde belli bir standart bulunmamaktadır. Çalışmalar sonucunda interferon, malotilat, halofuginon, deksametazon, ACE inhibitörleri, kolşisin, sarımsak ekstresi ve Tiazolidinedion grubu antidiyabetiklerin fibroziste kısmen olumlu etkileri görülmüştür. Alloprunol, NAC, A, E ve C vitaminleri ise antioksidan olarak etki ederek, HSC aktivasyonunu engellemektedir. Antioksidan etkili resveratrolün safra kanal proliferasyonu ve lenfosit infiltrasyonunu azalttığı, plazma AST, ALT, bilirubin değerlerini ve İnterlökin-1, İnterlökin-6 ve TNF-  $\alpha$  düzeylerini düşürdüğü tespit edilmiştir(62).

Deneysel olarak karaciğer fibrozisini oluşturmak için uygulanan çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Bu yöntemlerden birisi safra kanalı ligasyonudur. Diğer bir etkili yöntem ise CCL4 uygulanması ardından meydana gelen hepatik fibrozis modelidir. Deneysel çalışmalarda, kloroform, CCL4, arsenik, fosfor gibi pek çok maddenin karaciğerde ciddi patolojik durumların oluşturulmasında kullanıldığı görülmektedir (63-66). Bunların içerisinde CCL4 oldukça yüksek kullanım alanına sahiptir (44). CCL4 uzun yıllardan beri temizleyici, yağ uzaklaştırıcı, çözücü ve endüstride temel madde olarak kullanılmaktadır. CCL4 alev almayan bir çözücüdür ve havadan ağırdır. Özgül ağırlığı 1,589 (25° C'de) ve kaynama noktası 76,7°C 'dir. Üretilen CCL4 önemli miktarı freon gazı ve soğutucularda kullanılır (67). CCL4'ün oluşturduğu karaciğer dejenerasyonu, insandaki siroz gelişim sürecine benzerlik gösterdiği için, kemirgenlerde deneysel çalışmalarda en çok kullanılan kimyasal ajanlardan biri olarak öne çıkmıştır. Daha önce yapılan çalışmalar göstermiştir ki CCL4 karaciğerde dejenerasyon, yağlanma ve sentrilobüler (zone 3) fibrozis ve nekroz oluşturmaktadır. CCL4 hasarında fibrozis ve nekrozun yoğun olarak sentrilobüler alanda izlenmesinin nedeni bu maddenin karaciğer hasarına sebep olan metabolitlerine dönüşmesinde sorumlu olan sitokrom p-450 sistemindeki enzimlerin önemli oranda bu bölgede bulunmasıdır. Bazen daha ağır hasar durumunda zone 3'te başlayan nekrozun zone 2'ye de ilerlemesi halinde oluşan durum birleşik nekroz adını alır (68). Karbontetraklorür'ün neden olduğu karaciğer hasarının gelişim basamakları şu şekilde özetlenebilir; redüktif dehalojenasyon, radikallerin kovalent bağlanması, protein sentezinin inhibisyonu, yağ birikimi, kalsiyum sekestrasyonunda kayıp, apoptozis ve son olarak fibrozis şeklindedir (69).

CCL4'ün ratlarda deneysel olarak hepatik fibrozis oluşturmak amacıyla yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir (66). Sarhan ve arkadaşları (70), sekiz hafta boyunca, Eidi ve arkadaşları (71), yirmi sekiz gün boyunca, Lee ve arkadaşları (72), dokuz hafta boyunca, Kus ve arkadaşları (73), bir ay boyunca, Sung-Hwa ve arkadaşları (74), sekiz hafta boyunca haftada iki kere, 0,5 ml/kg dozunda CCL4 uyguladıkları ratların karaciğerlerinde sinuzoidlerin yapısında bozulma, disse aralıklarında genişleme, hepatositlerde farklı büyüklüklerde yağ vakuelleri (yağ dejenerasyonu), hiperemik kan damarları çevresinde çoğunluğunu lenfositlerin oluşturduğu mononükleer hücre infiltrasyon alanları, santral venaların distorsiyonu, özellikle portal bölgeden parankime doğru gelişen fibröz doku artışı (rejeneratif alanlar), bazı hepatositlerde nükleer pleomorfizm, Kupffer hücre hiperplazisinin gerçekleştiğini saptamışlardır. Çalışmamızda da, ratlarda hepatik fibrozis oluşturmak için CCL4 modeli literatürde uygulanmasına benzer şekilde kullanılmıştır.

Karbon tetraklorür ile indüklenmiş karaciğer harabiyetinde L-karnitin, N-asetilsistein ve genisteinin hepatoprotektif ve antioksidatif etkileri daha önce yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (75-77). Demirdağ ve arkadaşları (76) gerçekleştirdikleri çalışmada, deney gruplarından en uzun süreli olan grupta, CCL4 yedi gün ve L-karnitin sekiz gün verilmiş, Annudurai ve arkadaşları (78) gerçekleştirdikleri çalışmada CCL4 ve L-karnitin ikişer gün verilmiş, Kuzu ve arkadaşları (77) gerçekleştirdikleri çalışmada CCL4 yedi gün ve genistein sekiz gün verilmiş, Ali ve arkadaşları (75) gerçekleştirdikleri çalışmada CCL4 tek doz, L-karnitin dört gün verilmiş, Maksimchik ve arkadaşları (79) gerçekleştirdikleri çalışmada CCL4 tek doz, N-asetilsistein üç doz verilmiş ve oluşacak akut karaciğer hasarında L-karnitin, N-asetilsistein ve genisteinin kısa süreli etkileri gözlenmiş ve bu maddelerin oksidatif hasarı ve membran lipid peroksidasyonunu azalttığı ve plazma triaçilgliserolleri parsiyel olarak normalleştirdiği bildirilmiştir. Bizim gerçekleştirdiğimiz çalışmada ise CCL4, bu çalışmalara göre daha uzun süreli (dört hafta) verilerek daha ciddi düzeyde fibrozis gerçekleşmesi ve bununla birlikte C.ovata, rutin, kaempherol ve NAC etkilerinin fibrozisi gerilemede pozitif etkileri olup olmadığının test edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla da, ratların karaciğeri fibrozis gerçekleştirildikten sonra histopatolojik olarak incelenmiş, ilgili karaciğer testleri ve ilişkili olabilecek kemokin, kemokin reseptörleri ve inflamasyonla ilişkili

genler ve karaciğer fibrozisinde ekspresyonlarında artış beklenen genler değerlendirmeye alınmıştır.

Karaciğer fibrozisinin, inflamatuvar sürecin kronikleşmesinin bir sonucu olduğu düşünülürse, inflamasyonun baskılanması ile fibrozisin de önlenebileceği beklenebilir. Bizim çalışmamızda, CCL4 grupta fibrozis skoru kontrol grubuna göre yüksek bulundu. C. ovata, rutin, kaempferol ve NAC gruplarında ise fibrozis skorunun CCL4 grubundan düşük olduğu izlendi. Ancak, fibrozisin histopatolojik incelemede, tedavi grubunda CCL4 grubuna göre bir miktar daha az olduğu görülse de, hepatik fibrozisin engellenemediği görülmüştür. Bu durumda, inflamatuvar sürecin azalmasından etkilenmeyen çeşitli sitokin ve/veya medyatörlerin fibrotik süreci devam ettirmesi etkili olabilir. Tedavi grubunda kullanılan ajanların hepatik fibrozisin gelişimini ortadan kaldırmaya da azaltabileceği veya süreci yavaşlatarak hastaların prognozunu iyileştirebileceği sonucunun çıkarılabilir. Ancak bu sonuca ulaşabilmek için çalışmamızın daha geniş ve moleküler düzeyde çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

N-Asetilsistein hem bir aminoasit olan L-sistein'in, hem de indirgenmiş glutatyonun asetile prekürsörüdür. Uzun yıllardır mukolitik bir ajan olarak kullanılmaktadır ve yüksek doz asetaminofenin hepatotoksitesisi için bir antidottur. N-Asetilsisteinin asetaminofen zehirlenmesindeki primer koruyucu rolü, intraselüler karaciğer indirgenmiş glutatyonun yerine konmasıdır. N-Asetilsisteinin hücre membranından kolaylıkla penetre olarak intraselüler indirgenmiş glutatyon biyosentezini hem in vivo, hem in vitro olarak artırdığı, bunu selüler indirgenmiş glutatyon biyosentezi için gerekli sistin alımını artırarak yaptığı kültür ortamında gösterilmiştir. İn vivo test edildiğinde antioksidan etkilerinin, muhtemelen lipid solubilitésinin ve doku dağılımının düşüklüğü nedeniyle azaldığı görülmüştür. Asetilsisteinin, CCL4 ile akut olarak oluşturulmuş hepatotoksitede hepatik hasarı azaltıcı etkilerine dair bazı çalışmalar mevcuttur. N-Asetilsisteinin farklı moleküler aşamalarda aktive HSH'lerde TGF- $\beta$ 'yı suprese ettiği bulunmuştur (45). Bu nedenle N-asetilsisteinin deneysel karaciğer fibrozisinde antioksidan ve anti-TGF- $\beta$  özellikleriyle koruyucu etkisinin olduğu düşünülmektedir. Hücre kültür ortamında NAC'ın fibroziste rol oynayan hücrelerin aktivasyonunu önleyici etkileri



tanımlanmıştır. Ligasyon oluşturulup NAC ile tedavi edilen deneklerin glutatyon düzeylerinin yükseldiği, AST ve ALT değerlerinin düştüğü ancak oksidatif stres değerlerinin değişmediği, histopatolojik bulguları ve inflamasyonu azalttığı saptanmıştır. Bu sonuçların aksine bizim çalışmamızda NAC uygulanan grupta, karaciğer enzimlerinin çok az düzeyde azaldığı, histolojik olarak fibrozisin CCL4 grubundan daha geride olmasına rağmen, belirli bir durdurucu etkisi olmadığı gösterilmiştir.

Hücre hasarı ve hücre ölümü sadece kimyasallarla değil, aynı zamanda bireyin gen ekspresyon profili, antioksidan durumu ve rejenerasyon kapasitesi gibi faktörlerle de belirlenir. Karaciğerde kimyasallarla oluşturulan doğrudan ve dolaylı birçok mekanizma sebebiyle, bu kimyasallara karşı koyacak farmakolojik gelişimi ve klinik kullanımı olan bir madde hepatotoksisiteyi önleyebilir (80). Çalışmamızda, kemokin ve reseptörleri ile inflamasyonda rol oynayan kemokinlerin düzeylerinin fibrosis modelinde nasıl değiştiği de gözlenmek istenmiştir. Örneğin, TNF- $\alpha$ 'nın karaciğer fibrozisindeki ana rolü HSH aktivasyonunu başlatmasıdır (81). Kupffer hücrelerinin aktivasyonunda TNF- $\alpha$ , indirgenmiş glutatyon ve TGF- $\beta$  yer alır (82). İL-6 ise karaciğerde HSH'ler tarafından üretilir ve sirotik karaciğerde TGF- $\beta$ 'nin fibrojenik etkisini artırır (83). CCL4'ün hücrelerde TNF- $\alpha$  ve TGF- $\beta$ 'yi aktive ederek fibrozise yol açtığı bilinmektedir. TNF- $\alpha$  apoptozisle, TGF- $\beta$  fibrozisle ilişkilidir. Vücuttaki diğer organlarla karşılaştırıldığında karaciğer doğuştan gelen immün sistemin lenfosit bileşenlerinden de oldukça zengindir ve kemokinler karaciğer hastalıklarında temel patogenetik yapı içinde yer alırlar. Birçok sitokin veya kemokin karaciğer fibrozisinde görev almaktadır. Kupffer hücreleri, akut faz cevabını başlatan proinflamatuvar sitokinleri (TNF, IL-1) ve kemokinleri (CXCL1, CXCL2, CXCL8, CXCL16, CCL2) sitotoksik ve antimikrobiyal oksijen salgılayan nötrofilleri (CXCR1 /CXCR2 yoluyla) serbest bırakır. Sonrasında bunu reaktif oksijen ürünleri ve proinflamatuvar sitokinler (TNF, IFN- $\gamma$ ) yoluyla enflamatuvar tepkileri ve proinflamatuvar hepatik makrofajlara farklılaşan enflamatuvar monositler yoluyla devam ettirir. Hepatik fibrogenez sırasında en iyi karakterize edilmiş kemokinlerden biri CCL2'dir. Kronik olarak enfekte olmuş karaciğerde CCL2, hepatositler, biliyer epitel hücreleri, Kupffer hücreleri ve HSC'ler tarafından salgılanır. CCL2'nin ekspresyonu, CCR2'yi eksprese eden monositlerin o alana gelmesi ile ilişkilidir.

CCL2-CCR2 yolağının fonksiyonel önemi, CCL2 veya CCR2 eksikliği olan fareler kullanılarak çeşitli deneysel karaciğer fibroz modellerinde doğrulanmıştır (84). Karaciğer fibrozisindeki fonksiyonel olarak önemli bir diğer kemokin yolu ise CCL5'tir (RANTES); RANTES'in reseptörleri CCR1 ve CCR5'tir. CCL5 ve ilgili CCR5 ligandları CCL3 ve CCL4, fibrozisli hastaların karaciğerlerinde artar (85). İşlevsel bir seviyede, CCL5 veya CCL3'ün genetik olarak silinmesi farelerde deneysel hepatik fibrozisi ortadan kaldırdığı deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (86). IFN- $\gamma$  ile indüklenebilir kemokinler olan CXCL9, CXCL10 ve CXCL11'in kronik karaciğer hastalığı olan hastalarda ekspresyonları ve serum seviyeleri hepatik fibrozisin derecesi ile yakından ilişkili olarak artar (87). Bu 3 kemokin, reseptör CXCR3'ü paylaşır. Örneğin, fibrozisin geri dönüşü aşamasında, hücre dışı matrisi matris metaloproteinazlar yoluyla degrade eden ve ayrıca HSC / myofibroblastların kontrollü deaktivasyonunu sağlayan restoratif makrofajlar önemli bir yer tutar. Örneğin çalışmalarda, CCL2'nin fibrozisin geri dönüşümü sırasındaki inhibisyonu, fibroz regresyonunda belirgin bir iyileşmeye yol açmaktadır. Bu da CCL2'nin karaciğer fibrozisinde patogeneze ne kadar önemli bir molekül olduğunu ortaya koymaktadır (88,89). Bunun aksine, fibrozisin geri dönüşümü aşamasında CCL5'in inhibe edilmesi, muhtemelen profibrojenik HSC fonksiyonlarının inhibe edilmesi yoluyla fibroziste regresyonu hızlandırdığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (90). Çalışmamızda, hasta(CCL4 grubu) , tedavi(CCL4 + NAC grubu) ve kontrol grubuna göre anlamlı olabilecek sonuç CCL4 + Rutin grubunun TNF alfa, IL-10, TGF-beta1 ve IL-2 genlerindeki; CCL4 + kaempferol grubunun da IL-2 geninde sağladığı azalma sayılabilir. Ancak aynı şekilde diğer çalışılan kemokin ve inflamasyonla ilişkili genlerin ekspresyonlarının tüm gruplarda tutarlı bir dağılımı saptanmamıştır. Bu sebeple, çalışmamızdan elde edilen veriler tutarlık göstermemesi nedeniyle, çalışmamızda bu genlerin ekspresyon düzeyleri ve kemokin düzeyleri ve biyokimyasal belirteçler ile histopatolojik yanıt arasında bir ilişki olduğunu gösterebilecek anlamlı ilişki saptanmamıştır.

CCL4'ün vücutta değişime uğradığı ve işlendiği en önemli organın karaciğer olduğu ve bu yüzden CCL4'den en fazla karaciğerin etkilendiği birçok literatür bilgisiyle desteklenmektedir (91). Karaciğerde CCL4 ile aktif hale gelen sitokrom P450 enziminin etkisiyle triklormetil radikalinin oluştuğu ve oluşan triklormetil

radikalinde oksijen ile reaksiyona girerek yüksek toksisiteye sahip ve karaciğer dokusuna zarar veren bir madde olan reaktif triklorometil peroksil radikaline dönüşerek etkiler oluşturduğu belirtilmiştir (92). Karaciğer dejenerasyonunun değişik şekilleri, oksidatif stres ve buna bağlı oluşan serbest radikallerle oluşmaktadır (93,94). Oluşan bu zararlı maddelerin lipid peroksidasyonu artırdığı ve bu yolla hepatositlerin hücre membranlarının yıkımlanmasına sebep oldukları bilinmektedir (95). Çalışmamızda karaciğerin histolojik kesitleri incelendiğinde CCL4'ün etkileri diğer gruplardan daha yüksek dereceli olan fibrozis bulguları ile saptanmıştır. Elde ettiğimiz bu bulgular CCL4 uygulaması sonrası akut karaciğer toksisitesine ait literatür bildirimleriyle paralellik göstermektedir (96,97).

ALT enziminde yükselme, karaciğerde oluşan inflamasyonun ve hepatosit hasarının oldukça hassas ve değerli bir bulgusudur. Deney sonunda ratlardan alınan kan örneklerinden çalıştığımız serum ALT düzeyleri, daha önce yapılmış çalışmalarla uyumlu olarak, CCL4 grubunda yüksek bulundu. Buna karşılık tedavi gruplarındaki ALT düzeyleri CCL4 grubuna göre düşük bulundu. ALT düzeylerinin CCL4 grubunda yüksek olması bu grupta inflamasyonunun yoğun olarak devam ettiğini göstermektedir. Diğer gruplardaki ALT düzeyleri, inflamasyonun CCL4 grubuna göre baskılandığını ancak hafif derecede inflamasyonun mevcut olduğunu düşündürmektedir. Ancak çalışmamızda gerçekleşen AST ve ALT yükseklikleri ve düşüşleri yapılan istatistiksel analizde anlamlı olarak bulunmadı ( $p>0.05$ )

C. ovata, Cappariaceae familyasının bir üyesidir (46). Akdeniz havzasında bulunan uzun ömürlü bir çalılık bitkisidir. Diüretik, anti-oksidatif, anti-enflamatuar anti-hipertansif, hipoglisemik, anti-hepatotoksik, analjezik ve lipolipidemik etkileri olan geleneksel bir bitkisel ilaç olarak bilinir (47). Önceki kimyasal çalışmalar, bitkinin yapısında alkaloidler, lipidler, polifenoller, flavonoidler ve glukozinolatların bulunduğunu bildirmiştir. Ayrıca Capparis ekstresinin a-tokoferol, P-tokoferol ve sitosterol gibi antioksidanlar ile kaempferol, rutosid kuersetin (rutin) ve kuersetin türevleri gibi flavonoidler bakımından zengin olduğu bildirilmiştir (47). Bir çalışmada, metanolik asit ekstresinin antioksidan aktivitesinin içerdiği fenole bağlı olduğu gösterilmiştir (47). Capparis spinosa özündeki p-metoksibenzoik asidin, karbon tetraklorür ve parasetamol ile in vivo ve tioasetamid ve galaktozemi ile in

vivo hazırlandığında hepatotoksisite üzerinde koruyucu bir etkiye sahip olduğunu bildirmiştir (47).

Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) (98) göre dünyadaki nüfusun %80'i geleneksel ilaca inanmaktadır. Çin'de, genel tıbbi tüketimin % 30-50'sinin geleneksel tıp preparatlarından olduğu tahmin edilmektedir (99). Almanya'daki nüfusun yaklaşık % 90'ı, bazı sağlık amaçları için doğal ilaçlar kullandıklarını bildirmektedir (102). Bu nedenle, hem gelişmekte olan hem de sanayileşmiş ülkelerde geleneksel tıbbın kullanımı ve popülerliği giderek artmaktadır (100). Bu nedenle, *Capparis spinosa* gibi şifalı bitkiler sağlık sistemlerinde önemli bir rol oynamaya devam etmektedir. *C. spinosa*'nın kimyasal bileşimini ve sağlığa yararlarını ortaya koyan makale sayısı az olsa da geçmiş zamandan beri *C. Spinosa*'nın farklı amaçlarla kullanıldığı görülmektedir. Örneğin; *C. Spinosa*, Eski Mısır ve Araplarda karaciğer ve böbrek hastalıklarını tedavi etmek için, eski Romalılarda paraliz tedavisinde, Fas'ta ise diyabet tedavisinde kullanıldı. Rodrigo ve ark (101), taze *C. spinosa*'nın rutin ve kaempferol içerdiğini göstermişlerdir. Bu flavonoidler arasında ise rutin en bol olanıdır. Bu sebeple, *C. Spinosa* kolesterol düşürücü, anti-kanser ve anti-enflamatuar olarak kullanılmaktadır. Her ne kadar *C. spinosa*'nın çeşitli kısımlarını kullanan birçok çalışma, anti-diyabetik ve anti-hipertansif dahil olmak üzere çeşitli farmakolojik aktiviteler bildirmiş olsa da, *C. spinosa* ve sağlık yararları arasındaki ilişki hakkında kesin bir bilgi yoktur. Bunun nedeni, insan denekleri içeren çok az sayıda çalışmanın, *C. spinosa* tüketiminin insan sağlığı üzerindeki etkisini incelemesidir. Huseini ve ark nın çalışmasına göre (102) 2 ay boyunca günde 1200 mg *C spinosa* meyve özü alan hastaların kontrol grubundan anlamlı derecede düşük glikozile hemoglobin ve açlık kan glikoz seviyesine sahip oldukları bulunmuştur. Eddouks ve ark (103), toz halindeki *C. spinosa*'nın (20 mg / kg) meyvelerinin sulu özütü ile beslenen diyabetik sıçanlarda 2 hafta sonunda önemli bir ağırlık kaybı olduğunu göstermiştir. Başka bir çalışmada, Huseini ve ark. (102) 2 ay boyunca günde 1200 mg *C spinosa* meyve özleri ile desteklenmiş tip 2 diyabet hastalarının trigliserit düzeylerinde önemli bir azalma olduğunu bildirmişlerdir. Bu nedenle, *C. spinosa*, yağlı karaciğer hastalığı ve metabolik sendromun tedavisi için karaciğerde glukoneogenezin inhibisyonunda önemli bir rol oynadığından dolayı yararlı olabilir. Bazı çalışmalar da, *C. spinosa* yaprağı ekstraktlarının, pro-enflamatuar sitokin

ekspresyonunu ve immün hücre infiltrasyonunu inhibe ederek antinflamatuar aktivite sergilediğini göstermiştir (104,105). Goyal ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *Capparis decidua* ekstreleri kullanılmış ve plazma trigliseritleri, total lipid ve fosfolipid konsantrasyonlarında azalma saptanmıştır (106). Gadgoli ve Mishra (107) tarafından yapılan bir çalışmada, *C. spinosa*'nın parasetamol ve karbon tetraklorür kaynaklı toksisiteye karşı sıçanlar üzerindeki etkisini *in vivo* olarak değerlendirmiştir. Çalışmalarında, *C. spinosa*'nın sulu ekstraktının metanolde çözünen fraksiyonunun, sıçanlarda parasetamol ve karbantetraklorür kaynaklı hepatotoksistide serum AST, ALT, alkalın fosfataz ve total bilirubinde önemli azalmalar gösterdiği bildirilmiştir (107). Çalışmamızda ise, CCL4'e göre *C. Ovata* ekstresi alan ratlarda fibrozis derecesi daha düşük saptanmıştır.

Bir flavonoid olarak Kaempferol (3,4,5,7-tetrahidroksiflavon), birçok şifalı bitki, sebze ve meyvelerde yaygın olarak bulunmaktadır. Kaempferol içeren bitkiler, hepatoprotektif aktivite ile sağlıklı fonksiyonel gıda olarak önerilmiştir. Elma, üzüm, domates, yeşil çay, patates, soğan, brokoli ve çeşitli bitkilerde bulunmaktadır. Oksidatif stresi azaltarak antioksidan etki yapar. Hidroksil grubunu bağlar. (48) Kaempferol, hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak anti-oksidan, antinflamatuar ve immüno-modülatör özellikleri ile birlikte CYP2E1 ekspresyonunun bir substratı ve inhibitörü olarak bildirilmiştir (48). Kaempferol, INH ve RIF gibi ilaçların neden olduğu CYP2E1 aracılı hepatotoksisteyi önlemek için yeni bir adjuvan olarak kullanılmıştır (48). Çalışmamızda, karaciğer fibrozinde belirgin iyileşmeye neden olmamakla birlikte, CCL4 grubu ile kıyaslandığında, CXCL1 ve IL2 gibi inflamatuvar ve kemokin ekspresyon düzeylerini azalttığı gösterilmiştir.

Rutin ise, Portakal, greyfurt, limon, yeşil çay ve birçok bitkide bulunan anti oksidan bir maddedir. +2 değerlikli demiri bağlayarak, demirin hidrojen peroksiti bağlamasını önler ve böylece yüksek güçlü oksijen radikallerinin oluşması engel olur. Çalışmamızda, rutin grubunun fibrozis derecesi, CCL4 grubundan daha düşük saptanmıştır, ayrıca rutin grubunda, CCL4 grubuyla kıyaslandığında TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-2 ve IL-10 ekspresyon düzeylerinin azalmış olması her ne kadar fibrozisi tam olarak durduramasa da inflamasyon üzerinde azaltıcı bir etkisi olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda, Tüm gruplar arasında ALT ve total bilirubin değerleri benzerken( $p>0.05$ ); AST ve direkt bilirubin değerleri gruplar arasında karşılaştırıldığında bu parametrelerin CCL4 grubunda diğer gruplara ve kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu saptandı. Ancak anlamlı bir yükseklik saptanmadı ( $p>0.05$ ). Gruplar arasındaki dağılıma bakıldığında AST ve direk bilirubin için bazı grup karşılaştırmalarında anlamlı fark ( $p<0.05$ ) saptansa da genel karşılaştırmaya bakıldığında tutarsızlık olmasından dolayı anlamlı kabul edilmedi.

Sonuç olarak, CCL4 ile oluşturulan karaciğer fibrozis modelinde, C.ovata, rutin, kaempferol ve NAC'ın fibrozisi tam olarak geriletmese de yararlı olabileceği, bunun histopatolojik tetkiklere yansıdığı ve özellikle rutin'in inflamasyonla ilişkili genlerin ekspresyonlarında belirgin gerileme yaptığı saptanmıştır. Ancak bu bilgilerin daha geniş kapsamlı çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

## SONUÇLAR

- Tüm ratlar toplam altı gruba ayrılmıştı. Kontrol grupta steatotik hücre ve fibrozis sınıflamaları evre 0'ı işaret ederken, tek başına CCL4 kullanılan grupta steatotik hücre sınıflaması tüm ratlarda evre 2 iken, fibrozis sınıflaması ise bir rat dışında evre 2 olarak saptandı. Diğer ratta ise fibrozis sınıflaması evre 3 olarak bulundu. Karbon tetraklorürün kullanıldığı tüm gruplardaki ratlarda fibrozis sınıfı kontrol grubundan yüksek idi (evre 1-2 vs evre 0). Capparis ovata, rutin, kaempferol ve NAC kullanılan gruplarda steatotik hücre ve fibrozis sınıflaması benzer ve evre 1 olarak bulundu.
- Biyokimyasal değerlendirmede, en yüksek AST ve ALT değerleri CCL4 grubunda saptanırken, diğer gruplarda daha düşük ve kontrol grubu ile benzer düzeyde idi. Tüm gruplar arasında ALT değerleri benzerken, AST, total bilirubin ve direkt bilirubin değerleri gruplar arasında karşılaştırıldığında bu parametrelerin CCL4 grubunda diğer gruplara ve kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu saptandı. Ancak anlamlı fark saptanmadı ( $p>0,05$ ).
- Kontrol ve diğer gruplar arasında sitokin (IL-1 alfa ve beta, IL-4, IL-10, IL-13, IFN gama, TNF alfa, GM-CSF ve RANTES ölçümleri) ölçümleri karşılaştırmaları sonucu anlamlı fark saptanmadı ( $p>0,05$ ).
- CLL2, CXCL 9, CXCL 10, CCR3, CCL5 ve CXCR1 ekspresyon düzeylerinde gruplar arasında anlamlı fark saptanmazken, inflamasyonla ilişkili genlerde, NAC grubu CCL4 grubu ile kıyaslandığında, INF gama, INF alfa, IL 2 ve IL 10, TGF-alfa ve TGF-beta ekspresyon düzeylerinin NAC grubunda azalma olduğu saptandı. Genel tabloda hasta(CCL4 grubu) , tedavi(CCL4 + NAC grubu) ve kontrol grubuna göre anlamlı olabilecek sonucun CCL4 + Rutin grubunun TNF alfa, IL-10, TGF-beta1 ve IL-2 genlerindeki; CCL4 + kaempferol grubunun da IL-2 geninde sağladığı azalma olduğu görüldü.

## KAYNAKLAR

- 1- Sohrabpour AA, Mohamadnejad M, Malekzadeh R. Review article: the reversibility of cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2012;11:111-21.
- 2- Tülemen T, Ayata A, Özen M, Sütçü R, Canatan D. The Protective Effect of *Capparis ovata* on 6-Mercaptopurine-induced Hepatotoxicity and Oxidative Stress in Rats. *J Pediatr Hematol Oncol* 2015;37:290-4.
- 3- Dogan N, Akçam M, Koca T, Kumbul Doğuç D, Özgöçmen M. The protective effect of *Capparis ovata* in acute hepatotoxicity induced by paracetamol. *Turk J Med Sci* 2016;46:561-6.
- 4- Abraham L. Kierszenbaum. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş*. Prof. Dr. Ramazan Demir (Çeviri Editörü) Palme, Ankara, 2006; 17:467-9.
- 5- Williams P, Warwick R, Dyson M, Bannister LH: *Gray's Anatomy*. 37th, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1992;1384-96.
- 6- Drake RL, Vogl W, Mitchell AWM: *Gray's Anatomy for Student*. Yıldırım M (çeviri editörü), Ankara: Güneş Kitapevi, 2007; 4: 285-306.
- 7- Süzen LB. *İnsan Anatomisine Giriş*, Akademi Yayın 2006, 314-9.
- 8- Yıldırım M. *Topografik Anatomi*, baskı, İstanbul: Nobel, 2000; 5:251-5.
- 9- Ganong WF, *Tıbbi Fizyoloji*, Çeviri Türk Fizyolojik Bilimler Derneği, 20.baskı, İstanbul: Nobel, 2002; 26: 483-9.
- 10- Rappaport AM, Borowy ZJ, Loughheed WM. Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit; role in hepatic physiology and pathology. *Anat Rec* 1954;119:11-33.
- 11- Guyton, Hall, *Tıbbi Fizyoloji*, Çavuşoğlu H (Çeviri editörü), 10. baskı, İstanbul: Nobel, 2011; 724;749-52.
- 12- Moore KL, Agur AMR. *Temel Klinik Anatomi*, Elban A (çeviri editörü), 2. Baskı, Ankara: Güneş, 2006; 3:168-80.



- 13- William A. Sodeman, JR, Thomas M. Sodeman, MD. Sodeman's Fizyopatoloji, 1. Baskı, 2. Cilt. Çeviri: Hekimler Birliği Vakfı, Türkiye Klinikler Yayınevi, Ankara, , 1992;954 - 6.
- 14- Kumar V, Ramzi S. Cotran, MD, Stanley L. Robbins. Temel Patoloji, 6. Baskı. Çeviri: Uğur Çevikbaş, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 2000;517-20,
- 15- Barrett KE, Boitano S, Barman SM. Transport and metabolic functions of the liver. In Barrett K.E, Boitano S., Barman S.M, (eds): Ganong's review of medical physiology, ed 24. New York: McGraw-Hill, 2012.
- 16- Sonsuz A, Caner M, Giirakar M. Fibrojenin hücreler ve karaciğer sirozu. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dergisi 1992; 23:79-85.
- 17- Scheuer PJ, Lefkowitz JH. The normal liver. In: Scheuer PJ, Lefkowitz JH. (Editors). Liver Biopsy interpretation. 5th Edition, London: WB Saunders 2000; 36-50.
- 18- Jarnagin, WR, Rockey DC, Koteliensky VE, Wang SS. Expression of variant fibronectins in wound healing: cellular source and biological activity of the EIIIA segment in rat hepatic fibrogenesis. Cell Biol. 1994;127:2037-48.
- 19- Poynard T, Mathurin P, Lai CL. A comparison of fibrosis progression in chronic liver diseases. J Hepatol 2003;38:257-65.
- 20- In Mushlin P.S., and Gelman S. (eds): Hepatic physiology and pathophysiology, ed 7. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2010.
- 21- Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis. Annu Rev Pathol.2011;28; 6: 425-56.
- 22- Ismail MG, Stieger B, Cattori V. Hepatic uptake of cholecystokinin octapeptide by organic anion-transporting polypeptides OATP4 and OATP8 of rat and human liver. Gastroenterology 2001;121:1185-90.
- 23- Bonis PA, Friedman SL, Kaplan MM. Is liver fibrosis reversible? N Engl J Med 2001;344:452-4.

- 24- Iredale JP, Benyon RC, Pickering J. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest* 1998;102:538-49.
- 25- Mak KM, Leo MA, Lieber CS. Alcoholic liver injury in baboon: transformation of lipocytes to transitional cells. *Gastroenterology* 1994;87:188– 200.
- 26- Schuppan D. Structure of the extracellular matrix in normal and fibrotic liver: collagens and glycoproteins. *Semin Liver Dis* 2000;10;;1– 10.
- 27- Friedman SL. Evolving challenges in hepatic fibrosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;7:425-36.
- 28- Mormone E, George J, Nieto N. Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches. *Chem Biol Interact*; 2011;193:225-31.
- 29- Gressner AM. Transdifferentiation of hepatic stellate cells (Ito cells) to myofibroblasts: a key event in hepatic fibrogenesis. *Kidney Int Suppl.* 1996;54:39-45.
- 30- Gentilini A, Marra F, Gentilini P, Pinzani M. Phosphatidylinositol-3 kinase and extracellular signal-regulated kinase mediate the chemotactic and mitogenic effects of insulin-like growth factor-I in human hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2000;32: 227–34.
- 31- Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115:1100-15.
- 32- Zeisberg M, Yang C, Martino M, Duncan MB, Rieder F, Tanjore H, Kalluri R. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* 2007;10; 282: 23337-47.
- 33- Sinclair AJ, Barnett AH, Lunec J. Free radicals and antioxidant systems in health and disease. *Br J Hosp Med* 1990;43: 334-44.
- 34- Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ. Formation of unique biologically active prostaglandins in vivo by a non-cyclooxygenase free radical and catalyzed mechanism. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 1991;21:125-8.

- 35-Thomas MJ. The role of free radicals and antioxidants: How do we know that they are working. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1995;35(182): 21-39.
- 36- Hemmann S, Graf J, Roderfeld M, Roeb E. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis A systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. *J Hepatol* 2007;46(5):955-75.
- 37- Somerville RP, Oblander SA, Apte SS. Matrix metalloproteinases: old dogs with newtricks. *Genome Biol* 2003;4(6):216-9.
- 38- Iredale JP. Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver fibrosis. *Int J Biochem Cel Biol* 1997;29(1):43-54.
- 39- Cadranel JF, Rugat P, Degos F. Practices of liver biopsy in France: results of a prospective nationwide survey. *Hepatology*. 2000;32:477-81.
- 40- Bravo A, Sheth SG, Chopra S. Liver biopsy. *N Eng J Med*. 2001;344:495-500.
- 41- Goodman ZD. Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases. *J Hepatol* 2007;47:598-607.
- 42- Knodell RG, Ishak KG, Black WC. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981;1:431-5.
- 43- Ishak K, Baptista A, Bianchi L. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995;22:696-9.
- 44- Boll M, Weber LWD, Becker E, Stampfl A. Mechanism of Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity. *Hepatocellular Damage by Reactive Carbon Tetrachloride Metabolites*. *Z Naturforsch* 2001;56:649-59.
- 45- Galicia-Moreno M, Rodríguez-Rivera A, Reyes-Gordillo K, Segovia J, Shibayama M, Tsutsumi V. N-acetylcysteine prevents carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis: role of liver transforming growth factor-beta and oxidative stress. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009; 21:908-914.
- 46- Al Said MS, Abdelsattar EA, Khalifa S. Isolation and Identification of an anti-inflammatory principle from *Capparis spinosa*. *Pharmazie* 1988;43:640-1.

- 47- Duman E, Ozcan MM. Physicochemical properties of seeds of Capparis species growing wild in Turkey. *Environ. Monit. Assess.* 2014;186:2393-8.
- 48- Shih TY, Young, HS. Hu. Protective effects of kaempferol on isoniazid- and rifampicin-induced hepatotoxicity. *AAPS J* 2013;15:753–62.
- 49- Lauro MR, Torre ML, Maggi L, De Simone F, Conte U, Aquino RP. Fast- and slow-release tablets for oral administration of flavonoids: rutin and quercetin. *Drug Dev. Ind. Pha.* 2002;28:371-9.
- 50- Rot A, Massberg S, Khandoga AG, von Andrian UH. Chemokines and Hematopoietic Cell Trafficking (In)Hematology: Basic Principles and Practice, Chapter 13, 135-144.e6
- 51- Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessayre D, Lemasters JJ. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol Sci* 2002;65(2):166-76.
- 52- Ponnappa BC, Dey I, Tu GC, Zhou F, Aini M, Cao QN, Israel Y. In vivo delivery of antisense ligo-nucleotides in pH-sensitive liposomes inhibits lipopolysaccharide-induced production of tumor necrosis factor-alpha in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;297(3):1129-36.
- 53- Beljaars L, Weert B, Geerts A, Meijer DK, Poelstra K. The preferential homing of a platelet derived growth factor receptor-recognizing macromolecule to fibroblast-like cells in fibrotic tissue. *Biochem Pharmacol* 2003;66(7):1307-17.
- 54- Arıcı, S. Toksik Hepatit. *Pamukkale Tıp Dergisi* 2008; 1(2):113-119.
- 55- Oberti F, Valsesia E, Pilette C, Roussellet MC, Bedossa P, Aube C, Gallois Y, et al. Noninvasive diagnosis of hepatic fibrosis or cirrhosis. *Gastroenterology* 1997 Nov; 113(5):1609-16.
- 56- Li CH, Pan LH, Yang ZW, Li CY, Xu WX. Preventive effect of Qianggan-Rongxian Decoction on rat liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2008;14:3569-73.
- 57- Benyon RC, Iredale JP. Is liver fibrosis reversible? *Gut* 2000; 46:443-6.
- 58- Popper H, Uenfriend S. Hepatic fibrosis. Correlation of biochemical and morphologic investigations. *Am J Med* 1970;49:707-21.

- 59- Schaffner F, Klion FM. Chronic hepatitis. *Annu Rev Med* 1968;19:25-38.
- 60- Friedman SL. Liver fibrosis-from bench to bedside. *J Hepatol* 2003;38:38-53.
- 61- Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005;115: 209–31.
- 62- Lee CW, Yen FL, Huang HW, Wu TH, Ko HH, Tzeng WS, Lin CC. Resveratrol nanoparticle system improves dissolution properties and enhances the hepatoprotective effect of resveratrol through antioxidant and anti-inflammatory pathways. *J Agric Food Chem*. 2012;60:4662-71.
- 63- Shimizu I. Antifibrogenic therapies in chronic HCV infection. *Curr DrugTargets Infect Disord* 2001; 1: 227-40.
- 64- Hagerman AE, Riedl KM, Jones GA et al. High molecular weight plantpolyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *J Agric Food Chem* 1998; 46:1887-92.
- 65- Fu Y, Zheng S, Lin J et al. Curcumin protects the rat liver from CCl<sub>4</sub> caused injury and fibrogenesis by attenuating oxidative stress and suppressing inflammation. *Mol Pharmacol* 2008; 73: 399-409.
- 66- Kevin PA, Mahmoud AS. Free radical scavenging and antioxidant activities of silymarin components. *Antioxidants* 2013; 2: 398-407.
- 67- Nevin VURAL. Toksikoloji; Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No:73 Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi 2005:176-82.
- 68- Parola M, Lenarduzzi G, Biasi F, Albano E, Biocca ME, Poli G, Dianzani MU, Vitamin E dietary supplementation protects against carbon tetrachloride-induced chronic liver damage and cirrhosis. *Hepatology* 1992;16:1014-21.
- 69- Hong RT, Xu JM, Mei Q. Melatonin ameliorates experimental hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *World J Gastroenterol* 2009;15:1452-8.
- 70- Sarhan NAZ, El-Denshary ES, Hassan NS, Abu-Salem FM, Abdel-Wahhab MA. Isoflavones enriched soy protein prevents CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity in rats. *ISRN Pharmacol* 2012; 8.
- 71- Akram E, Pejman M, Khodabakhsh B et al. Hepatoprotective effect of manganese chloride against CCl<sub>4</sub>-induced liver injury in rats. *Biol Trace Elem Res* DOI 10.1007/s12011-013-9784-7.

- 72- Lee TY, Wang GJ, Chiu JH et al. Long-term administration of *Salvia miltiorrhiza* ameliorates carbon tetrachloride induced hepatic fibrosis in rats. *J Pharm Pharmacol* 2003; 55: 1561-1568.
- 73- Kus I, Ogeturk M, Oner H et al. Protective effects of melatonin against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats: A light microscopic and biochemical study. *Cell Biochem Funct* 2005; 23: 169-174.
- 74- Sung-Hwa K, Ho JC, Nari Y et al. Protective effect of a mixture of *Aloe vera* and *Silybum marianum* against carbon tetrachloride induced acute hepatotoxicity and liver fibrosis. *J Pharmacol Sci* 2009; 109: 119-127.
- 75- Ali SA, Faddah L, Abdel-Baky A, Bayoumi A. Protective effect of L-carnitine and coenzyme Q10 on CCl<sub>4</sub>-induced liver injury in rats. *Sci Pharm* 2010; 23;78:881-96.
- 76- Demirdag K, Bahcecioglu IH, Ozercan IH, Ozden M, Yilmaz S, Kalkan A. Role of L-carnitine in the prevention of acute liver damage induced by carbon tetrachloride in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19:333-8.
- 77- Kuzu N, Metin K, Dagli AF, Akdemir F, Orhan C, Yalniz M. Protective role of genistein in acute liver damage induced by carbon tetrachloride. *Mediators Inflamm* 2007;11:121-9.
- 78- Annadurai T, Vigneshwari S, Thirukumaran R, Thomas PA, Geraldine P. Acetyl-L-carnitine prevents carbon tetrachloride-induced oxidative stress in various tissues of Wistar rats. *J Physiol Biochem* 2011; 67: 519–530.
- 79- Maksimchik YZ, Lapshina EA, Sudnikovich EY, Zbrodskaya SV, Zavodnik IB. Protective effects of N-acetyl-L-cysteine against acute carbon tetrachloride hepatotoxicity in rats. *Cell Biochem Funct* 2008; 26:11-8.
- 80- Hartmut J, Gregory JG, Arthur IC. Mechanisms of Hepatotoxicity. *Toxicological Sciences* 2002;65:166-76.
- 81- Reeves HL, Friedman SL. Activation of hepatic stellate cells -a key issue in liver fibrosis. *Front Biosci* 2002; 1; 7:808-26.
- 82- Cubero FJ, Nieto N. Ethanol and arachidonic acid synergize to activate Kupffer cells and modulate the fibrogenic response via tumor necrosis factor alpha, reduced

glutathione, and transforming growth factor beta-dependent mechanisms. *Hepatology* 2008; 48:2027-39.

83- Kershenovich Stalnikowitz D, Weissbrod AB. Liver fibrosis and inflammation. A review. *Ann Hepatol* 2003; 2:159-63.

84- Marra F, DeFranco R, Grappone C. Increased expression of monocyte chemoattractant protein-1 during active hepatic fibrogenesis: correlation with monocyte infiltration. *Am J Pathol* 1998; 152:423-30.

85- Seki E, De Minicis S, Gwak GY. CCR1 and CCR5 promote hepatic fibrosis in mice. *J Clin Invest* 2009; 119:1858-70.

86- Berres ML, Koenen RR, Rueland A. Antagonism of the chemokine Ccl5 ameliorates experimental liver fibrosis in mice. *J Clin Invest* 2010; 120:4129-40.

87- Wasmuth HE, Lammert F, Zaldivar MM. Antifibrotic effects of CXCL9 and its receptor CXCR3 in livers of mice and humans. *Gastroenterology* 2009; 137:309-19.

88- Troeger JS, Mederacke I, Gwak GY. Deactivation of hepatic stellate cells during liver fibrosis resolution in mice. *Gastroenterology* 2012; 143:1073-83.

89- Baeck C, Wei X, Bartneck M. Pharmacological inhibition of the chemokine C-C motif chemokine ligand 2 (monocyte chemoattractant protein 1) accelerates liver fibrosis regression by suppressing Ly-6C macrophage infiltration in mice. *Hepatology* 2014; 59:1060-72.

90- Stock MK, Hammerich L, do ON. Met-CCL5 modifies monocyte subpopulations during liver fibrosis regression. *Int J Clin Exp Pathol* 2013; 6:678-85.

91- Allison JM. Microbiology of rumen and small and large intestines. In: Swenson MJ. (Editor). *Dukes' Physiology of Domestic Animals*. 10th Edition. Vail-Ballow: USA 1984: 262- 398.

92- Arnesen E, Refsum H, Bonna KH. Serum total homocysteine and coronary heart disease. *Int J Epidemiol* 1995; 24:704-9.

93- Brattin WJ, Glende EA, Recknagel RO. Pathological mechanisms in carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Free Radic Biol Med* 1985; 1: 27-8.

94- Comporti M. Lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Lab Invest* 1985; 53: 599-623.

- 95- Halliwell B, Gutteridge J. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transitions metals and disease. *Biochem J* 1984; 219:1-14.
- 96- Hu YY, Liu P, Liu C. Actions of salvianolic acid A on CCl<sub>4</sub>-poisoned liver injury and fibrosis in rats. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 1997;18: 478-80.
- 97- Natsume M, Tsuji H, Harada A. Attenuated liver fibrosis and depressed serum albumin levels in carbon tetrachloride-treated IL-6-deficient mice. *J Leukoc Biol* 1999;66:601-8.
- 98-. World Health Organization (WHO). *Regulatory Situation of Herbal Medicines: A Worldwide Review*; World Health Organization (WHO): Geneva, Switzerland, 2013.
- 99- Locatelli M, Zengin G, Uysal A, Carradori S. Multicomponent pattern and biological activities of seven asphodeline taxa: Potential sources of natural-functional ingredients for bioactive formulations. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2017;32:60–7.
- 100- Gunjan M, Naing TW, Saini R.S, Ahmad A. Marketing trends & future prospects of herbal medicine in the treatment of various disease. *World J. Pharm. Res.* 2015;4:132–55.
- 101- Rodrigo M, Lazaro MJ, Alvarruiz A, Giner V. Composition of capers (*Capparis spinosa*): Influence of cultivar, size and harvest date. *J. Food Sci.* 1992;57:1152–4.
- 102- Huseini H, Hasani-Rnjbar S, Nayebi N, Heshmat R. *Capparis spinosa* L. (caper) fruit extract in treatment of type 2 diabetic patients: A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Complement. Ther. Med.* 2013;21:447–52.
- 103- Eddouks M, Lemhadri A, Michel JB. Hypolipidemic activity of aqueous extract of *Capparis spinosa* L. Innormal and diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 2005;98:345–50.
- 104- El Azhary K, Tahiri Jouti N, El Khachibi M. Anti-inflammatory potential of *Capparis spinosa* L. in vivo in mice through inhibition of cell infiltration and cytokine gene expression. *BMC Complement. Altern. Med.* 2017;17:81-7.
- 105- Moutia M, Azhary K, Elouaddari A. *Capparis spinosa* L. promotes anti-inflammatory response in vitro through the control of cytokine gene expression in human peripheral blood mononuclear cells. *BMC Immunol.* 2016;17:26-34.



- 106- Goyal R, Grewal RB. The influence of teent (*Capparis decidua*) on human plasma triglycerides, total lipids and phospholipids. *Nutr Health* 2003;7:71–6.
- 107- Gadgoli C, Mishra SH. Antihepatotoxic activity of p-methoxy benzoic acid from *Capparis spinosa*. *J. Ethnopharmacol.* 1999;66:187–92.
- 108- Inagaki Y, Okazaki I. Emerging insights into Transforming growth factor beta Smad signal in hepatic fibrogenesis. *Gut* 2007;56(2):284-92.