

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TRİFLURALİNİN SIÇAN KARACİĞER VE
DUODENUMU ÜZERİNE ETKİSİNİN
BİYOKİMYASAL ve HİSTOLOJİK
İNCELENMESİ**

Soner ATMACA

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANA BİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

İZMİR-2010

HİS YL

DEÜ. HSI. MSc-2006970161

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TRİFLURALİNİN SIÇAN KARACİĞER VE
DUODENUMU ÜZERİNE ETKİSİNİN
BİYOKİMYASAL ve HİSTOLOJİK
İNCELENMESİ**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANA BİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Soner ATMACA

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
Doç. Dr. H. Alper BAĞRIYANIK

(Bu proje DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 200937 sayı ile desteklenmiştir.)

HİS YL

DEÜ. HSI. MSc-2006970161

Histoloji & Embriyoloji Anabilim Dalı Histoloji & Embriyoloji yüksek lisans programı öğrencisi Soner ATMACA'nın "Trifluralin'in sıçan karaciğer ve duodenumu üzerine etkisinin biyokimyasal ve histolojik incelenmesi" konulu yüksek lisans tezi tarafımızdan değerlendirilerek başarılı/başarısız bulunmuştur.

Doç. Dr. H. Alper BAĞRIYANIK

BAŞKAN

Prof. Dr. Özgül SAĞOL

ÜYE

Yrd. Doç. Dr. Güven ERBİL

ÜYE

İÇİNDEKİLER

Sayfa

Şekil Listesi	i
Kısaltmalar	iii
Teşekkür	iv
1. ÖZET	1
2. GİRİŞ VE AMAÇ	5
3. GENEL BİLGİLER	7
3.1. Karaciğer	7
3.1.1. <i>Karaciğer Anatomisi</i>	7
3.1.2. <i>Karaciğer Histolojisi</i>	8
3.1.3. <i>Karaciğer Histofizyolojisi</i>	14
3.1.4. <i>Karaciğere Patolojik Yaklaşım</i>	14
3.2. Duodenum	16
3.2.1. <i>Duodenum Anatomisi</i>	16
3.2.2. <i>Duodenum Histolojisi</i>	18
3.2.3. <i>Duodenum Histofizyolojisi</i>	23
3.2.4. <i>Duodenuma Patolojik Yaklaşım</i>	24
3.3. Pestisitler	24
3.3.1. <i>Herbisitler</i>	26
3.3.2. <i>Trifluralin</i>	27
3.4. Apoptoz	31
3.5. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türevleri.....	34
3.6. Antioksidanlar ve Savunma Sistemleri.....	39
4. GEREÇ VE YÖNTEM	41
4.1. Işık Mikroskopik İncelemeler	41
4.1.1. <i>Hemotoksilen-Eozin Boyaması</i>	42
4.1.2. <i>Masson-Trikrom boyaması</i>	44
4.1.3. <i>Peryodik Asit Schiff Boyaması (PAS)</i>	44
4.2. İmmünohistokimyasal İncelemeler	46
4.2.1. <i>TUNEL Boyama</i>	46
4.2.2. <i>Aktif Kaspaz 3 Boyama</i>	49
4.3. Hayvan Ağırlıkları Değerlendirmesi	50

4.4. Biyokimyasal Analizler	50
4.4.1. Doku homojenatlarının hazırlanması	50
4.4.2. MDA ölçümü	50
4.4.3. SOD ölçümü	52
4.4.4. GPx ölçümü	52
4.4.5. Kan Analizleri	52
4.4.6. Etik Kurul onayı	52
4.4.7. Verilerin Değerlendirilmesi	52
5. BULGULAR	53
5.1. Işık Mikroskopik Bulgular	53
5.2. İmmünohistokimyasal Bulgular	60
5.2.1. TUNEL Boyama	60
5.2.2. Aktif Kaspaz 3 Boyama	64
5.3. Hayvan Ağırlıkları	68
5.4. Biyokimyasal Bulgular	70
6. TARTIŞMA	80
7. SONUÇ VE ÖNERİLER	84
8. KAYNAKLAR	86

Şekil Listesi

Sayfa No

Şekil 1. TRF'nin kimyasal yapısı.....	28
Şekil 2. TRF'in bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	28
Şekil 3. 1999-2002 yıllarında Türkiye'de en yoğun kullanılan herbisitler ve genel herbisitlerin tüketimindeki payları.....	29
Şekil 4. Reseptör aracılı Kaspaz aktivasyonu.....	33
Şekil 5. Reaktif Oksijen Türevleri.....	35
Şekil 6. Rutin Doku Takibi.....	42
Şekil 7. Hematoksilen-Eozin boyama protokolü.....	43
Şekil 8. Masson Trikrom boyama Protokolü.....	45
Şekil 9. Periyodik Asit Schiff (PAS) Protokolü.....	46
Şekil 10. TUNEL boyama protokolü.....	48
Şekil 11. Kaspaz 3 boyama protokolü.....	51
Şekil 12. Karaciğer dokusu Kontrol (A) , Sham (B), YD (C) ve DD (D) gruplarına ait genel görüntüler.(H&E).....	54
Şekil 13. Karaciğer dokusu YD grubuna ait H&E ile boyanmış kesitte mononükleer hücre infiltrasyonu görüntüsü.....	55
Şekil 14. Karaciğer dokusu DD grubuna ait H&E ile boyanmış kesitte mononükleer hücre infiltrasyonu görüntüsü.....	55
Şekil 15. Karaciğer dokusu Kontrol (A) , Sham (B), YD (C) ve DD (D) gruplarına ait genel görüntüler.(Masson-Trikrom).....	56
Şekil 16. Karaciğer dokusu Kontrol (A) , Sham (B), YD (C) ve DD (D) gruplarına ait genel görüntüler.(PAS).....	56
Şekil 17. Duodenum dokusu Kontrol (A) , Sham (B), YD (C) ve DD (D) gruplarına ait genel görüntüler.(H&E).....	57
Şekil 18. Duodenum dokusu Kontrol (A) , Sham (B), YD (C) ve DD (D) gruplarına ait genel görüntüler.(Masson-Trikrom).....	58
Şekil 19. Duodenum dokusu Kontrol (A) , Sham (B), YD (C) ve DD (D) gruplarına ait genel görüntüler. (PAS).....	58
Şekil 20. Duodenum dokusunda gruplar arası lökosit infiltrasyonu.....	59

Şekil 21. Duodenum dokusu gruplar arası Lamina Propria çap değerleri.....	59
Şekil 22. Karaciğer dokusu TUNEL Değerlendirmesi.....	61
Şekil 23. Karaciğer dokusu Kontrol (A) , Sham (B), YD (C) ve DD (D) gruplarına ait TUNEL pozitif boyanmış hücre görüntüleri, (TUNEL) boyaması.....	62
Şekil 24. Duodenum Dokusu TUNEL değerlendirme.....	63
Şekil 25. Duodenum dokusu Kontrol (A) , Sham (B), YD (C) ve DD (D) gruplarına ait TUNEL pozitif boyanmış hücre görüntüleri, (TUNEL) boyaması.....	64
Şekil 26. Karaciğer dokusu Kaspaz 3 Değerlendirmesi.....	65
Şekil 27. Karaciğer dokusu Kontrol (A) , Sham (B), YD (C) ve DD (D) gruplarına ait Kaspaz 3 pozitif boyanmış hücre görüntüleri, Aktif Kaspaz 3 IHC boyaması.....	66
Şekil 28. Duodenum Dokusu kaspaz 3 Değerlendirmesi.....	67
Şekil 29. Duodenum dokusu Kontrol (A) , Sham (B), YD (C) ve DD (D) gruplarına ait kaspaz 3 pozitif boyanmış hücre görüntüleri, (kaspaz 3 boyaması).....	68
Şekil 30. Grupların deney başlangıcı ve deney sonundaki ağırlıkları.....	69
Şekil 31. Karaciğer MDA Değerleri.....	70
Şekil 32. Karaciğer SOD Değerleri.....	71
Şekil 33. Karaciğer GPX Değerleri.....	72
Şekil 34. ALT değerleri Değerleri.....	73
Şekil 35. AST değerleri Değerleri.....	74
Şekil 36. ALP Değerleri Değerleri.....	75
Şekil 37. Albümin Değerleri.....	76
Şekil 38. Duodenum MDA Değerleri.....	77
Şekil 39. Duodenum SOD Değerleri.....	78
Şekil 40. Duodenum GPX Değerleri.....	79

KISALTMALAR

a	:	arteriol
Aff	:	afferent
DD	:	Düşük Doz
DDT	:	Dikloro Difenol Trikloroethan
EM	:	Elektron mikroskobu
Eff	:	Efferent
EPA	:	Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı
GPx	:	Glutasyon Perokidaz
H&E	:	Hematoksilen- Eozin
IM	:	Işık mikroskobu
L.	:	Lamina
m	:	muskularis
MDA	:	Malondialdehit
PES	:	Pestisit
SOD	:	Süperoxide Dismutase
T	:	Tunika
TRF	:	Trifluralin
YD	:	Yüksek Doz
ROS	:	Reaktif oksijen

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince, Histoloji ve Embriyoloji Biliminde yetişmemde büyük emekleri olan, öğrencileri olma şansı bulduğum engin bilgi ve tecrübeleriyle Sayın Prof. Dr. Candan Özoğul' a, gerek bilimsel gerekse sosyal olarak çok şeyler öğrendiğim, zor anlarımda yanımda olan, beni her an destekleyen ve doğruya yönlendiren, bilimsel gelişimimde en büyük role sahip, çok sevdiğim ve aynı zamanda çok değerli bir hocam olan danışmanım ve Anabilim Dalı Başkanı olan Sayın Doç. Dr. Alper BAĞRIYANIK'a ve Anabilim dalındaki bütün hocalarıma bana verdikleri destek ve katkıları için sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda çalışmalarımın her aşamasında laboratuvar bilgilerini esirgmeden bana sunan Bio. Sedef MENKÜ, Bio. Özcan ÜSTÜN ve Anabilim Dalının Uzmanlarına ve Araştırma Görevlilerine en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Birlikte olmaktan huzur ve mutluluk duyduğum fikirlerini ve desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım Bio. Nazlı KARAGÖZ, Bio. Ziya DENEK ve tüm yüksek lisans arkadaşlarıma sonsuz şükranlarımı sunuyorum.

Hayatım boyunca yanımda olan beni sevgiyle, özveriyle büyüten, tüm eğitimim boyunca maddi, manevi her türlü desteği sağlayan aileme.

Beni bu yoğun günlerimde yalnız bırakmayan umudumun ve direncimin kırıldığı zamanlarda desteğiyle bana moral olan sevgili eşim Bio. İlke Uzel ATMACA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

1. ÖZET

TRİFLURALİNİN SIÇAN KARACİĞER VE DUODENUMU ÜZERİNE ETKİSİNİN BİYOKİMYASAL ve HİSTOLOJİK İNCELENMESİ

SONER ATMACA

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı

Çalışmamızda tarım alanlarında yoğun bir şekilde kullanılan dinitroanniline türevi bir herbisit, Trifluralin'in (TRF) karaciğer ve duodenum üzerine olası toksik etkileri histolojik ve biyokimyasal olarak incelendi.

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurulu'nun 21.11.2008 gün ve 128 sayılı kararı ile çalışmaya başlandı.

Araştırmamızda yaklaşık 200-250 gr ağırlığında 30 adet Wistar suşu erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar her grupta 7 hayvan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Birinci grup herhangi bir şey uygulanmamış Kontrol grubu. İkinci grup mısır yağı verilen Sham grubu. Üçüncü grup 2 g/kg/gün TRF+mısır yağı verilen Yüksek Doz(YD) grubu. Dördüncü grup 0.8 g/kg/gün TRF+mısır yağı verilen Düşük Doz (DD) grubu. Uygulanan maddeler 21 gün süreyle intragastrik gavaj yoluyla verildi. Deney sonunda sıçanlar sakrifiye edildi. Deneklerin karaciğer ve duodenumları rutin histolojik doku takibinden sonra immunhistokimya TUNNEL pozitif hücre sayımı ve H&E ile boyanarak histolojik değerlendirme ve morfometrik ölçümler yapıldı. Diğer kısım doku örnekleri ise MDA, GPx ve SOD değerlendirmeleri için ayrıldı. Deney sonu alınmış olan kan örnekleriyle, AST, ALT, ALP ve Albumin seviyeleri değerlendirildi. Ayrıca sıçanların deney başında ve deney sonundaki vücut ağırlıkları da ölçülüp değerlendirildi.

Histolojik ve morfometrik değerlendirmeye göre, TRF uygulanmış YD ve DD gruplarının, kontrol ve sham gruplarına göre karaciğer ve duodenum dokularında hasarın olduğu, Tunel pozitif hücrelerin YD ve DD gruplarında Kontrol ve Sham gruplarına göre fazla sayıda olduğu gözlemlendi. Gruplar arası MDA, SOD ve GPx değerleri kıyaslandığında karaciğer dokusunda YD ve DD grubunda Kontrol ve Sham grubuna oranla MDA düzeyinin arttığı ve GPx düzeyinin ise azaldığı gözlenirken SOD değeri sadece YD grubunda anlamlı düzeyde azalma göstermiştir. Duodenum dokusunda MDA ve SOD değerleri YD grubunda

anlamli düzeyde değişiklik gösterirken diğer gruplarda farklılığa rastlanmamıştır. Ancak GPx düzeyleri değerlendirildiğinde gruplar arası bulunan fark istatistiksel olarak anlamli değildir. Elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda TRF' nin karaciğer ve duodenum dokularında oksidatif stresi arttırdığı, histolojik hasar oluşturduğu ve biyokimyasal değişikliklere neden olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: Trifluralin, Karaciğer, Duodenum, Apoptoz, Oksidatif stres

SUMMARY

HISTOLOGIC AND BIOCHEMICAL RESEARCH OF TRIFLURALINE EFFECTS ON RAT DUEDONUM AND LİVER

Soner ATMACA

Dokuz Eylül Medical Sciences Institute Histology and Emriyology Department.

In our study, we examined toxicologic effects of Trifluralin, a dinitroanniline derive which has a wide usage area in agriculture worldwide, on duedonum and liver tissues histologically and biochemically.

Study started with the decision of Dokuz Eylül Medical Sciences Institute Ethics Commission dated on 21.11.2008, no. 128.

In our investigation, approximately 200-250 grams were used 30 Wistar strain male rats. Rats in each group to be 7 animals were divided into 4 groups. Anything applied to the first group, the control group. The second group given corn oil Sham group. The third group, 2 g / kg / day given TRF + corn oil, High-Dose (HD) group. The fourth group, 0.8 g / kg / day given TRF + corn oil, low-dose (LD) group. Applied substances for a period of 21 days was given by intragastrik gavaj. Rats were sacrificed after the application. Fragments of collected tissues from duedonum and liver were embedded in paraffin blocks and sectioned after routine histologic technics for counting TUNEL positive cells and stained for histologic and morfometric examining with H&E. Other parts of tissues were used for MDA, GPx and SOD examination. Blood samples were collected at the end of the experiment for examining AST, ALT, ALP and Albumin levels. And body weights of rats were recorded before and after the experimental process.

According to histologic and morfometric assesment; HD and LD group liver and duedonum tissues were found damaged than sham and control groups. In HD and LD groups TUNEL positive cell numbers were comperatively more than sham and control groups. According to MDA, SOD and GPx assesment; HD and LD groups' MDA rates were found higher and GPx levels were found lower than sham and control groups in liver tissue. SOD levels were found significantly lower in only LD group. In duedonum tissue; MDA and SOD

levels showed differences significantly only in LD grup. GPx level assesment didn't give significant statistical datas. According to our study results; we can say that TRF induces oxidative stress, causes histological damages and biochemical changes in liver and duedonum tissues.

Key words: Trifluraline, Liver, Duodenum, Apoptosis, Oksidative stress

2. GİRİŞ VE AMAC

Pestisit(PES)'ler tarımda zararlı böcekleri ve yabancı otları öldürmek amacıyla kullanılan kimyasal maddelerdir. Tarımsal savaşta kullanılan PES'lerin, zararlılarda direnç gelişimi, hedef dışı organizmalara etkileri ve doğal dengeyi bozma gibi birçok olumsuz etkileri vardır. Bu ilaçların önemli olumsuz etkilerinden bir tanesi de tüketilen ürünlerdeki kalıntı problemidir. Üreticilerin tarım ilaçlarını uyguladıktan sonra bekleme süresine uymamaları ve sık aralıklarla yüksek dozlarda ilaç kullanmaları gibi nedenlerden dolayı ürünlerde ilaç kalıntısına rastlanmaktadır. Kontrolsüz kullanılan PES'lerin yol açtığı birçok zehirlenme vakasının yanı sıra toksik ve karsinojenik etkileri de bilinmektedir⁽¹⁾.

PES kullanımının tartışılmaz yararlarına karşın etkin denetimden yoksun ve aşırı miktarlarda uygulanması insan dahil hedef olmayan diğer canlılarda zehirlenmelere ve ölümlere neden olmakta, ekosistemlerin ve besinlerin kirlenmesine yol açmaktadır. PES'lerin yaygın olarak kullanılmasından kısa süre sonra 1950' li yıllarda önce DDT'nin daha sonra da kullanılan diğer ilaçların^{(2),(3)} insanlar ve yabanıl yaşamda hedef olmayan canlılara zararlı etkileri ortaya konmaya başlanmıştır. Tarım ilaçlarının canlılar üzerindeki etkileri fetal yaşamdan itibaren başlamaktadır⁽⁴⁾. Bu ilaçlar plasentadan fetusa geçmekte, bunun sonucunda düşükler, hiperpigmente ve hiperkeratitik çocuk doğumları görülmektedir. Yapılan hayvan deneylerinde ise radyoaktif işaretli ilaç verilmesinden 5 saat sonra ilacın plasentaya geçtiği, fetusun göz, sinir sistemi ve karaciğerinde yerleştiği gözlenmiştir⁽⁴⁾. PES'lerden bir bölümü (Organofosfatlı ve karbamatlı insektisitler) de etkilerini doğrudan doğruya periferik ve merkezi sinir sistemi üzerinde göstererek organizmanın yaşamını tehdit etmektedir. Tarım ilaçlarının kanın şekilli elementlerine yani eritrosit ve lökositlere olan zararlı etkileri de yapılan hayvan deneylerinde gözlenmiştir. Eritrositlerde in vitro koşullarda yapılan bir deneyde ise eritrosit antioksidan sistem enzimlerinin aktivitelerinin değiştiği de gözlenmiştir.⁽⁵⁾

Diğer taraftan PES'ler asetilkolinesteraz enzimini inhibe etmekte, alt beyin kökünde solunum kontrol merkezlerinin baskılanması ile canlının ölümüne neden olmaktadır.⁽⁶⁾ Yine PES'lerle yapılan deneylerde Trikarboksilik asit (TCA) enzimlerinin (malat dehidrogenaz, süksinat dehidrogenaz) inaktive olduğu bulunmuştur.⁽⁷⁾

Yapılan diğer bir çalışmada da PES'lerin karaciğer ve kas bozulmalarına neden olduğu saptanmıştır⁽⁸⁾. PES'lerin, kullanıldığı tarım alanlarında insanlar üzerine toksik etkileri ile ilgili çalışmalarda renal ve hepatik toksisiteyi arttırdığı saptanmıştır⁽⁹⁾. Türkiye'de 2002 yılı

sonu itibariyle 2109'a yakın ruhsatlı ilaç olup bunlar içinde yer alan etken madde 358 çeşittir.
(10)

Bu denli çok tüketilen toksik PES'lerin kullanımı, özellikle bilinçsiz kullanımı hem tarımla uğraşan çiftçilerimizi hem de bu besinleri tüketen halkı tehdit etmektedir.

TRF'nin karaciğer ve duodenum üzerine vermiş olduğu etkileri histolojik ve biyokimyasal açıdan inceleyen çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Bu nedenle deneysel modelimizde TRF'nin karaciğer ve duodenum üzerine etkilerini histolojik ve biyokimyasal olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

3. GENEL BİLGİLER

3.1. Karaciğer

3.1.1. Karaciğer Anatomisi

Karaciğer erişkinde yaklaşık olarak 1,5 kg ağırlığında olup, hem karın boşluğunda yer alan organların, hem de vücuttaki bezlerin en büyüğüdür. Epigastriumun ve sol hipokondriumun üst medial bölümünü kaplayıp, sağ hipokondriumda yer alır. Lobus hepatis sinister, lobus quadratus, lobus caudatus ve lobus hepatis dexter olmak üzere dört lobu vardır. Facies diaphragmatica ve facies visceralis olmak üzere iki yüzü vardır. Ligamentum teres hepatis, ligamentum falciforme hepatis, ligamentum coronarium önemli ligamentleridir. Fissura ligamenti teretis, fissura ligamenti venosi, visseral yüzdeki fissuralardır. Porta hepatis de (hilus) bu yüzde bulunur. Visseral yüzde komşu olduğu organlara ait izler vardır. Safra kesesi karaciğerin visseral yüzünde bulunur. Fundus, korpus ve kollum bölgelerinden oluşur. Karaciğer hücreleri tarafından yapılan safra ductus hepaticus communis ile taşınır. Ductus hepaticus communis safra kesesinin, kanalı ductus cysticus ile birleşerek ductus choledocusu oluşturur. Bu kanal Duodenumun ikinci parçasına açılır. Karaciğerin sempatik ve parasempatik innervasyonu plexus coeliacustan gelir. Karaciğer ikili kanlanması nedeniyle sindirim sisteminin fonksiyonel açıdan çok önemli bir organdır.⁽¹¹⁾

Diaframla ve arka yüzünde abdomen duvarıyla temas eden kısımları dışında karaciğer çepeçevre peritonla örtülüdür.⁽¹²⁾

Peritonun altında elastik fibrillerden zengin, sıkı bağ dokusu yapısında Glisson kapsülü bulunur ve organı dıştan kuşatır.⁽¹²⁾

Glisson kapsülü hilus bölgesinde içeriye doğru girer ve organı parankim ağırlıklı lobüller'e ayırır. Dört lob'dan oluşan karaciğeri lobüllere ayıran bağ dokusu insanlarda çok az geliştiğinden lobül sınırları kolayca seçilemez.⁽¹²⁾ Birçok hayvanda ise interlobüler bağ dokusu çok belirgindir.

Kanlanması

Karaciğerin yapı ve görevini anlayabilmek için kan dolaşımının iyi bilinmesi gerekir. Karaciğer bağırsaklar ile genel dolaşım arasına yerleşmiştir. Karaciğere gelen kanın %25'ini sağlayan arterler arteria hepatica propria'nın, gelen kanın % 75'ini sağlayan venler ise vena porta hepatis'in dallarıdır. Karaciğere %25 oranında kan getiren arteria hepatica oksijence zengin besleyici bir damardır. Vena porta ile gelen venöz kan ise pankreas, dalak ve

bağırsaklardan taşınan sindirilmiş besin maddelerini ve hemoglobin yıkım ürünlerini içermektedir (lipidler lenfatiklerle taşınır).

Karaciğer lobül ve kanal yapısı ile diğer tüm bezlerden farklıdır. Portal ven karaciğere porta hepatisten girer. Sonra interlobar venlere ayrılır. Bunlar da incelerek interlobuler venler şeklinde lobüller arasında ilerler ve lobüller arasındaki sinüzoidlerle devam eder. Portal ven ve hepatik arter karaciğere porta hepatisten girerler ve karaciğer içinde interlobar, segmental ve interlobüler dallara ayrılırlar. Ayrıca lobüllerin kenarında birlikte seyreden portal ven ve hepatik arterin terminal dalları ve bu terminal dalların lateral yan dalları bulunmaktadır. Kanın büyük kısmı portal alan stromasındaki kapillerlerde akar. Sadece çok az bir kısmı terminal hepatik arteriyollerden akar. Safra kanalları etrafında yoğun bir kapiller ağ oluşur. Bu ağa periduktal pleksus adı verilir.

Klasik lobülün ortasında yerleşmiş olan santral ven ise lobül boyunca ilerledikçe büyür ve taşıdığı kanı sublobuler vene boşaltır. Büyük sublobüler venler ise taşıdıkları kanı daha geniş olan sublobar venlere, oradan da vena cava inferiora boşaltırlar. Böylece karaciğeri terk eden kan sağ atriuma geri döner.⁽¹¹⁾

3.1.2. Karaciğer Histolojisi

Karaciğer; en geniş hacimli ve en ağır iç organdır. Yoğun bir damar ağına sahiptir ve birçok yönden hayati önem taşır. Karın boşluğunda, sağ üst kısımda ve diyaframın hemen altında bulunur. Birbirine neredeyse eşit büyüklükte sağ ve sol lobları vardır. Bu lobların etrafını sıkı bağ dokusu yapısında olan **Glisson** kapsülü denen yapı sarar. Embriyonik dönemde ön barsağın endoderminden gelişen hepatik (karaciğer) divertikülden köken alır. Bu divertikülden çoğalan parankim hücreleri, transvers septumun mezenkimine geçiş yapar ve burada , vitellin ve umbilikal venlerle bağlantılı bir kapiller ağ oluşturur. Karaciğer hem endokrin hem de ekzokrin işlevselliği ile sindirim açısından çok önemli bir organdır.⁽¹³⁾

Karaciğerin yapısal organizasyonunu ve bu yapı elemanlarının birbirleriyle olan fonksiyonel ilişkilerini açıklamak için 3 farklı karaciğer birimi (karaciğer lobülü) tanımlanmıştır ve bu birimler aşağıda sırasıyla özetlenmiştir.⁽¹²⁾

Klasik Karaciğer Lobülü:

Silindirik ya da prizmatik biçimlidir. Tam kapsül altındakiler dışında kalan lobüllerin çoğunun apeksi hilusa yöneliktir. Lobüllerin sayısı yaklaşık 1 milyon olup 2 mm boyunda ve 700 mikron çapındadırlar.⁽¹⁴⁾

Enine kesitlerde lobül altıgen şeklinde seçilir. Her köşesinde portal alan, ortasında vena sentralis (terminal hepatik venül) denen ve sinüzoidlerden gelen kanın toplandığı bir damar bulunur. Vena sentralis'den periferine doğru ışınal tarzda uzanan ve birbirleriyle anastomozlaşan karaciğer hücre kordonları (hepatosit plakları) bir epitelyal ağ oluştururlar. Bu hepatosit kordonları arasında ise sinüzoidler yer alır. Sinüzoid duvarında endotel hücrelerinin yanısıra Kupffer hücreleri de bulunur.

Klasik lobülün en dışında yer alan ve sınırlayıcı hücre plaklarını oluşturan hepatositler ile interlobüler bağ dokusu arasında **Mall aralığı** adı verilen, lenfatik damarlara açılmadan önceki bölge olup ancak elektron mikroskopik düzeyde görülen bir alan yer alır.⁽¹⁴⁾

Portal Lobül:

Bu adlandırma, safranın salgılanışı göz önüne alınarak yapılmıştır. Portal aralık içindeki bir safra duktusuna safra veren komşu karaciğer hücreleri (değişik klasik lobüle aittirler) portal lobül olarak gruplanır. Üç klasik karaciğer lobülünün v. santralilerinin birleştirilmesiyle portal lobülün sınırları çizilir. Enine kesitte üçgen şeklindedir.⁽¹¹⁾

Hepatik Asinüs (Rappaport Asinüsü):

İki komşu klasik lobül içinde aynı interlobüler venden kanlanan hücre grupları hepatik asinüs olarak tanımlanır. Lobüller arasında ilerleyen interlobüler ven komşu iki lobüle dağılmaktadır. Enine kesitte baklava dilimi biçimindedir. Vene yakınlığı dikkate alınarak asinus hücreleri 3 zona ayrılır¹¹. Klasik lobül içi zon ayırımı da bu esasa dayanarak yapılır. Buna göre her hepatik asinüsdeki hepatositer kısa bir eksen etrafında yerleşmiş konsantrik eliptik zonlar halinde tanımlanır: Böylece,

- Zon 1 (santral zon= hepatik zon): Bu, eksene en yakın ve oksijen açısından en zengin bölgedir.
- Zon 2 (intermediate zon): Keskin sınırlarla ayrılmamakla birlikte zon 3 ve zon 1 arasında yerleşmiştir.
- Zon 3 (portal zon): Bu, eksenden en uzak ve santral vene en yakın kısımdır, yani asinüsün merkezidir. Aynı zamanda oksijen açısından en fakir zondur.

Zon 1 hücreleri karaciğere gelen kanda bulunan besin ve toksinlerle ilk olarak karşılaşan, safra kanalı tıkanmalarını takiben ortaya çıkan değişikliklerin ilk olarak gözlemlendiği hücrelerdir. Kan dolaşımı bozulduğunda bu hücreler en son ölür, aynı zamanda da ilk olarak bu hücreler yenilenir.

Zon 2 hücrelerinin fonksiyonel ve morfolojik özellikleri zon 1 ve zon 3 hücreleri arasında bulunmaktadır.⁽¹⁴⁾

Zon 3 te yerleşen hücreler ise sentrilobüler iskemik nekrozdan ilk olarak etkilenen hücrelerdir. İlk yağ birikiminin bu hücrelerde gözleendiği ve toksik maddelere cevabın en son bu zonda geliştiği bildirilmektedir.

❖ Hepatositler: Karaciğer parankim hücresi olan hepatositlerin yapısal özellikleri fonksiyonel çeşitliliğine yönelik çok farklı özellikler gösterir.⁽¹⁵⁾ Organellerin sitoplazmadaki dağılımı da hücrenin lobül içindeki yerine ve işlevine bağlı olarak değişiklik gösterebilir.

Hepatositler çapları 20-30 mikron olan geniş poligonal hücrelerdir. Karaciğerdeki hücrelerin yaklaşık %80'ini oluştururlar. Hücrelerin merkezinde 1 ya da 2 adet oval, ökromatik ve çoğunlukla poliploid kromatin içeren nükleus bulunur¹⁶. Nükleuslar içerisinde iki ya da daha fazla nükleolus belirgin olarak gözlenebilir. Düz ve granüllü endoplazmik retikulumların vezikül ve tübülleri, golgi kompleksi ile devamlılık gösterir. Sitozolde bol miktarda serbest ribozom bulunur. Glikojen içeriği sıklıkla düz yüzlü endoplazmik retikuluma ve golgi kompleksi'ne bağlı olarak bulunur¹⁶. Lizozomlar çeşitli boyutlarda ve bol miktarda gözlenir. Bunlardan bazıları lipofuskin ve lamelli proteinler içerir. Genellikle kanaliküler yüze yakın konumdadırlar. Her bir hepatosit temel işlevi toksik H₂O₂'nin yıkımı olan 200-300 adet peroksizom içerir. Mitokondriler her hücrede ortalama 100 adet ve sitoplazma içinde dağınık halde bulunurlar. Hepatositlerin içerdiği mitokondri sayısı bazen 2000'e kadar çıkabilir. Mitokondriler Hematoksilen eosin (H&E) kesitlerde eozinofil boyanan alanlar şeklinde gözlenirler.⁽¹⁵⁾

❖ Hepatositlerin Yüzleri

Hepatositler üç önemli yüze sahiptirler. Bunlar, sinüzoidal, kanaliküler ve intersellüler yüzlerdir.

I. Sinüzoidal Yüz: Disse aralığıyla hepatositlerin sinüzoidlerden ayrıldığı yüzüdür, hepatositlerin bu aralığa bakan kısımları kısa ve düzensiz mikrovilluslar içerir ve böylece hepatositlerin bu yüzleri 6 kat genişletilerek, sekresyon ve absorpsiyon için geniş bir yüzey alanı oluşmuş olur. Bu yüz bir hepatositin toplam yüzünün %70'ini oluşturur ve bu yüz ile sinüzoidler ve hepatositler arasındaki madde alış verişi gerçekleşir.⁽¹⁷⁾

II. Kanaliküler Yüz: Bu yüz aracılığıyla hepatositlerde yapılan safra, kanaliküllere boşaltılır, bu yüz toplam hepatosit yüzünün %15'ini oluşturur, hepatosit sitoplazmasının bu yüze yakın sitoplazma kısımları aktin filamentlerinden zengindir. Bu filamentler muhtemelen

kanalikulün çapını artırıp safra akış hızını arttırmaktadır. Kanaliküler lümenin etrafındaki hücre zarı ise alkalın fosfataz, adozin trifosfataz enzimlerince zengindir.

III. Intersellüler Yüz: Bu yüz iki komşu hepatositin birbirine bakan yüzleridir.

Hepatosit sitoplazmaları genelde asidofil olmakla birlikte; H&E ile boyanan parafin kesitlerde, sitoplazmada, granüllü endoplazmik retikulum ve serbest ribozomlardan kaynaklanan bazofil boyanan alanlar gözlenir. Bu alanlar ergasitoplazma olarak adlandırılır. Düz yüzlü endoplazmik retikulum özellikle periportal hepatositlerde bol miktarda bulunur. Bu organelin sisternalarında detoksifikasyon işlemi gerçekleşir. Bazı ilaç ve toksinlere maruz kalma, hepatositlerin düz yüzlü endoplazmik retikulum içeriğinin artmasına neden olur. Ayrıca Hepatositler glikojen içeriği bakımından zenginlerdir ve elektron mikroskopuyla rozetler şeklinde gözlenen bu içerik ışık mikroskopik olarak Periyodik Asit Shift (PAS) tekniği ile gösterilebilir.⁽¹⁸⁾ Yağ boyaları ile sitoplazmada çeşitli boyutlarda lipid damlacıkları da görülebilir.⁽¹⁹⁾ Özel boyalarla hepatositlerde oldukça aktif olan golgi komplekslerini de tesbit etmek mümkündür.

❖ Sinüzoidler

Hepatosit kordonları arasında yerleşmiş olan hepatik sinüzoidler, ince ve kesintili bir endotel ile örtülüdür. Bu kesintili sinüzoidal endotelin altında yer alan bazal membran da kesintilidir. Hepatik sinüzoidlerin duvarında bir çeşit makrofaj olan Kupffer hücreleri bulunur. Sinüzoidler, portal ven ve hepatik arterin terminal dallarından kanlanırlar. Kan içeriği hepatositlerde modifiye edildikten sonra bu kanı terminal hepatik, venüllere boşaltırlar. Sinüzoidler kapillerlerden daha geniştir ve daha düzensiz bir yapıya sahiptir.

❖ Sinüzoidlerde Yer Alan Hücreler ve Yapılar.

I. Endotelyal Hücreler

Sinüzoid duvarını döşeyen yassı epitel (endotel) hücreleridir. Pinositoz aktivitelerinden dolayı vital boyalarla boyanabilirler. Bu aktiviteden dolayı elektron mikroskopunda hem abluminal hem de abluminal yüzeylerde pinositotik veziküller gözlenir. Hücreler arasında sitoplazmik açıklıklar bulunmakla birlikte elektron mikroskopik olarak bazal lamina içeriğinin miktar açısından farklılık gösterdiği tesbit edilmiştir. Örneğin bazı hücrelerde kesintili sinüzoidal epitel hiç bazal lamina içermez. Özetle bazı hücreler tamamen birbirinden ayrı bulunabildiği gibi bazı hücreler de sitoplazmik delikler yardımıyla başka endotel hücrelerine tutunmuş halde bulunabilirler.⁽²⁰⁾

II.Kupffer Hücreleri

Bu hücreler Kupffer tarafından 1898'de altın impregnasyon metoduyla boyanarak tanımlanmıştır. Mononukleer fagositer sistemin bir üyesi olan Kupffer hücreleri hepatik sinüzoidlerin duvarına tutunmuş ve lümenine doğru sarkmış şekilde bulunurlar. Bu hücreler sıklıkla yıkılmış eritrositleri içerirler ve demir pigmentlerini depolarlar. Fagosite ettikleri materyali ise kana verirler. Lityum karmin ya da tripan blue gibi vital boyalarla iyi boyanırlar. Aynı zamanda karbon ve toryumdioksit partiküllerini de fagosite ettikleri için bu maddelerle de gösterilebilirler. Sinüzoid endoteline bağlanmak için herhangi bir bağlantı kompleksi oluşturmazlar. Düzensiz hücre yüzeyleri ile sinüzoid lümeninde bulunan kan ile temas halindedirler. İnce bir glikokalikse sahip oldukları belirlenmiştir. Hücre membranları sitoplazmik invaginasyonlar gösterir.⁽¹⁷⁾ Sitoplâzmaları organel açısından zengin olup endotel hücrelerine göre daha heterojen yapıdadır. Çeşitli boyut ve yoğunlukta bol miktarda lizozom içerirler. Jukstanukleer bir sentrozom ve Golgi kompleksine sahiptirler. Kısa sisternalı granüler endoplazmik retikulum sitoplâzma içerisinde dağınık halde bulunur. Peroksidaz enzimi bu GER'ların perinukleer sisternalarının lümenlerinde bulunur. Kupffer hücreleri mitozla çoğalabilirler⁽¹⁴⁾.

III.Perisinüzoidal (Disse Aralığı) Aralık

Karaciğerde tanımlanan yapılardan bir diğeri de perisinüzoidal aralıktır (Disse aralığı). Bu yapı ancak elektron mikroskopik olarak gözlenebilir ve sinüzoidlerdeki kan ile karaciğer hücreleri arasında materyal değişim yeridir. Bu değişimin etkinliği önemli ölçüde hepatositlerin bu aralığa bakan yüzlerinde bulunan mikrovilluslara bağlıdır. Bu bölgede miyelinsiz aksonlar bulunur. Ayrıca yine bu bölgede mikroskopistler tarafından kollagen ve retiküler fibriller olduğu bildirilmiştir. Bu boşluk ayrıca lenf dolaşımı açısından da önemlidir. Perisinüzoidal boşlukta kalan plazma, periportal bağ dokusu ile klasik lobülü en dıştan çevreleyen hepatosit dizisi arasında kalan ve ancak elektron mikroskopuyla görülebilen **Mall aralığına** boşalır.⁽²¹⁾

❖ Perisinüzoidal (Disse Aralığı) Aralıkta Yer Alan Hücreler

LİTO Hücreleri (Stellate hücreler, Liposit, Interstisiyel hücre)

Bu hücreler de Kupffer hücreleri gibi gold klorid tekniği ile gösterilebilirler. Fagositik aktiviteleri yoktur. Bazı sitolojik özellikleri fibroblastlara benzerdir. Periferik ve ara zonda santral zondan daha fazla miktarlarda bulunurlar. Bu hücrelerin orijinleri ve fonksiyonel

önemi tam olarak anlaşılamamıştır. Yağ depolanması ve A vitamini metabolizmasında rol oynadıkları bilinmektedir. Ayrıca toksin artışına cevap olarak gelişen perisinüzoidal stromanın arttığı durumlarda bu hücreler kollagen sentezleyerek fibrozise neden olabilir. Bu özellikleri dolayısıyla miyofibroblastlar olarak adlandırılabilirler.⁽²²⁾

II.Pit Hücreleri

Perisinüzoidal aralıkta bulunan bu hücreler bu bölgedeki endotel hücrelerine tutunurlar. Kısa psödopodlar ve sitoplazmik granüller taşıyan bu hücrelerin natural killer hücreleri olabilecekleri düşünülmektedir. Taşıdıkları bu sitoplazmik granüller açısından gastrointestinal epitelin enteroendokrin hücrelerine benzemektedirler. Fare ve sıçanlarda tanımlanan bu hücrelerin insan karaciğerinde bulunup bulunmadığı da henüz bilinmemektedir.⁽²²⁾

❖ Safra Yolları

Safra yollarının en küçük dalı hepatositlerin özelleşmiş yan yüzleri arasında kalan ve safra salgısını içine boşalttıkları safra kanalikülüdür. Kanalikül duvarını hepatositler oluşturur ve kanalikül içine hepatositlerden düzensiz mikrovilluslar uzanır. Bu kanalcıklarla safra lobülün periferindeki küçük, terminal safra kanallarına (Hering kanalı) akar ve bu kanallar da portal alanda bulunan interlobüler safra kanallarına boşalır. Portal alanlardaki safra kanalları sağ ve sol lob içinde lobar safra kanallarını oluştururlar. Bu lobar kanallar da hilusta birleşerek ductus hepaticus communis'i oluşturur. Ductus hepaticus communis ve ductus cysticus birleşerek ductus choledocus'u oluştururlar. Ductus choledocus da safrayı duodenuma götürür. Bu kanal duodenumun ampulla bölgesine açılır. Bu bölgede duodenumun muskularis eksternasının kalınlaşarak oluşturduğu bir yapı olan Oddi sfinkteri bulunur ve bu yapı Ductus choledoctus ve pankreatik kanalı çevreleyerek safranın ve pankreatik sıvının duodenuma akmasında kapak vazifesi görür.

❖ Lenf Boşlukları

Karaciğer vücutta üretilen tüm lenf miktarının yaklaşık 1/4'ünü üretir. Hepatik lenf, içerdiği yüksek orandaki albumin ve globulin gibi plazma proteinleri açısından vücuttaki diğer lenf sıvılarından farklıdır. Lenf damarları histolojik olarak gözlenmez. Lenf sıvısının Disse aralığından lobülün periferine iletiildiği düşünülmektedir.⁽²³⁾

3.1.3. Karaciğerin Histofizyolojisi

Hem ekzokrin hem de endokrin fonksiyonlarıyla bir bez görevi yapan karaciğerin 100 den fazla fonksiyonu vardır. Bu fonksiyonların çoğu hepatositler tarafından yerine getirilir. Bu fonksiyonlardan bazıları; safra ve çeşitli endokrin salgıları üretmek, sindirim kanalından gelen son ürünleri metabolize etmek, glikojen lipid gibi paraplazmatik inklüzyonları depolamak, hormonal ve sinirsel uyarılara cevap oluşturmak, ilaç ve toksinlerin detoksifiye etmek, IgA'yla Disse aralığından safraya taşımak, yaşlı eritrositleri yıkmak ve Kupffer hücreleri ile immünolojik fonksiyon görmektir. Karaciğer yüksek oranda kanlanan bir organdır. Dakikada yaklaşık 400 ml portal venden, 100 ml hepatik arterden karaciğere kan gelir ve bu kan sinüzoidlerden geçerken karaciğerin her gramında 1,2 milyar adet bulunan Kupffer hücreleri tarafından süzülür. Laktik asit, gliserol ve pirüvik asit gibi metabolitler karaciğerde önce glikoza ve daha sonra glikojene dönüştürülür. Glikoza ihtiyaç olduğu durumlarda glikojen fosforilaz enzimi yardımıyla glikoza dönüştürülerek kana verilir. Fosforilaz enzimi karaciğerde normalde pasif formda bulunur ve ihtiyaç olduğunda epinefrin ve glukagonla aktifleştirilir. Diyetle alınan yağın fazlası karaciğerde kolesterole dönüştürülerek depolanır. Kolesterol ise hepatositlerde agranüler endoplazmik retikulumlarda asetata dönüştürülür. Ayrıca karaciğerde albümin (günde yaklaşık 13 mg.) ve kan pıhtılaşmasında görev alan fibrinojen, protrombin ve faktör III, immunglobulinler, transferrin gibi önemli proteinler de üretilir.⁽²⁴⁾

3.1.4. Karaciğere Patolojik Yaklaşım

Karaciğerde mikroskobik olarak gözlenebilecek bazı patolojik durumlar şunlardır:

Fokal nekroz: Birkaç hepatositten oluşan bir hücre kümesinin nekrozu olarak tanımlanır. Bu alanlarda lenfositler ve makrofajlar da bulunur. Nekrotik hepatositler hızla ortadan kaldırıldıkları için, nekroz alanında genellikle seçilemezler. Fokal nekroz çok sık görülür ve hiç bir hastalığa özgü değildir. Zonal nekrozları da fokal nekrozların biraz daha belirgin biçimleri olarak görmek mümkündür. Karaciğer asinuslarını seçici biçimde etkileyen nekrozlar, **perivenüler**, **periportal** ve **zonal** nekrozlar olarak adlandırılabilirler.⁽²⁵⁾

Fibrozis: Yara iyileşmesinin doğal bir sonucu olan fibrozis, karaciğerde de değişik zedelenmeleri izleyerek oluşabilir. Fibrozis, asinus yapısını bozacak ve karaciğerin özel kan akımını etkileyecek biçimde olduğunda, ağır bir patolojik durumdur. Köprüleşme nekrozunu izleyerek oluşan fibrozis, rejenerasyonla birlikte olduğunda hastalık süreci siroza doğru ilerler.

Alkolik karaciğer hastalığında ise, enflamasyon hafif ve fibrozis az sayılabilecek miktarda olmasına rağmen, kollagen üretimi (fibrozis) Disse aralığında olduğu için, hepatositlerin kanla ilişkisi belirgin olarak azalabilir. Karaciğer fibrozisi, çoğu olguda geri dönüşsüzdür.⁽²⁶⁾ Obezite hiperleptinemi ile ilgili olup ciddi kronik karaciğer hastalıklarında fibrozis ve fibrozisin şiddetinin belirlenmesinde önemlidir. Obezitenin karaciğer üzerinde profibrogenik etkileri olduğu düşünülmektedir.⁽²⁶⁾ Fakat bu etkilerin mekanizması ve etiyojisi bilinmemektedir.⁽²⁶⁾

Yağlı Değişiklik: Hepatositlerin sitoplazmalarında histolojik olarak kolayca seçilebilen vakuoller halinde nötral yağ birikmesine makroveziküler yağlı değişiklik adı verilir. Işık mikroskobu çözünürlüğünde ancak seçilebilen vakuoller halindeki birikim daha seyrek görülür ve mikroveziküler yağlı değişiklik olarak adlandırılır. Makroveziküler yağlı değişiklikte hepatosit çekirdeği yağ vakuolü tarafından bir kenara itilmiştir; mikroveziküler olanda ise, küçük vakuoller ile çevrili çekirdek ortada yer alır. Rutin histopatolojik inceleme sırasında kullanılan alkol yağ moleküllerini parçaladığı için, yağ içeriğini göstermek için oil red o, sudan B ve Nile anilin mavisi gibi özel boya yöntemleri kullanmak gerekir.⁽²⁷⁾

Karaciğer yağlanması başlıca nedenleri şunlardır:

- Akut yağlanma: Gebelikte ve Reye sendromlu hastalarda gözlenen karaciğer yağlanması genellikle bu tiptir. İlaçlar, karbon tetraklorür tetrasiklin, valproik asit, amiodarone ve kortikosteroidler bu tip yağlanmaya neden olabilirler.⁽²⁸⁾

- Kronik yağlanma: Karaciğerde görülen kronik yağlanmanın temel nedenleri arasında alkol alımı, obezite, diyabet, hiperlipidemi, jejunoileal by-pass, protein kalori malnütrisyonu, total parantral beslenme, kronik hepatit C, Wilson hastalığı, inflamatuvar bağırsak hastalıkları ve AIDS sayılabilir.⁽²⁹⁾

Uzun süre ve aşırı miktarlarda etil alkol alanların bir kısmında karaciğerde hasara yönelik bulgular ortaya çıkar. Bunların en hafif biçimi **yağlı değişiklik**, daha ağır **steatohepatitis** ve en ağır **alkolik sirozdur**.⁽³⁰⁾ Ancak, alkolizm ile birlikte olan kötü beslenmenin karaciğer hasarı olasılığını daha çok artırdığı, hatta hasardan aslında bu beslenme bozukluğunun sorumlu olduğu düşünülmektedir. Aynı miktar ve sürede alkol kullanan kadınlarda, karaciğerde hasarlanma olasılığı erkeklerden daha yüksek ve hastalığın seyri de biraz daha ağırdır.

Siroz: Hepatositlerin ölümüne yol açan ve uzun süren etkenler, fibrozis ve rejenerasyonla birlikte olduklarında siroz ortaya çıkar. Siroz, karaciğerin diffüz olarak fibrozis, nodül oluşumu ve rejenerasyon göstermesi ile karakterli geri dönüşsüz bir lezyondur. Sirozun oluşma hızı ve seyri, etiyojisiye göre değişiklik gösterir³¹. Ölüm, hepatosellüler yetmezliğe ve/veya portal

hipertansiyona bağlı olabilir. Bu hastalarda hepatosellüler karsinom riski de artmıştır. Siroza neden olan durumlar şöyle sıralanabilir:

- Kronik viral hepatitler
- Alkolik karaciğer hastalığı
- Safra yolu hastalıkları
- Primer hemokromatozis
- Wilson hastalığı
- Alfa-1 antitripsin eksikliği ve İdiyopatik (kriptojenik) siroz

Nodüller, milimetrik boyuttan santimetrelerce çapa kadar ulaşabilirler. Nodüllerin içinde terminal ven benzeri yapılar ve anormal portal alanlar bulunabilir.

Son yıllarda önemi gittikçe artan non-alkolik karaciğer yağlanmasına toplumda sık olarak rastlanmaktadır.⁽³²⁾ Genellikle iyi bir seyir gösteren karaciğer yağlanması, küünsemeyecek bir oranda histolojik ilerleme göstererek karaciğerde fibrozis ve siroza yol açabilmektedir. Yapılan çalışmalarda non alkolik karaciğer yağlanmasının kriptojenik sirozun önemli bir nedeni olabileceği gösterilmiştir.⁽³³⁾

Yağlı karaciğer konusunda yapılan çalışmalar karaciğer yağlanmalarının genelinin makroveziküler düzeyde olduğunu göstermiştir. Yağlanma dereceleri ise diffüz olabileceği gibi tek bir zonda da görülebilir.⁽³⁴⁾ Bu hastalığın klinikte adı steatozdur. Bunun bir sonraki aşaması ise steatohepatit olarak adlandırılır.⁽³⁵⁾ Steatohepatit, steatoz ya da farklı karaciğer hasarlarına bağlı olarak gelişebilir. Bu hastalığın başlıca karakteristik özelliği nekroz ve enflamasyondur.⁽³⁶⁾ Bununla birlikte apoptotik cisimler, hepatositlerde şişme, Mallory hiyalinleri ve fibrozis de rapor edilmiştir.⁽³⁷⁾ Ayrıca yine bu hastalıkta hepatosit sitoplazmasında elektron mikroskopik olarak kristalleri kaybolmuş anormal, dev mitokondriler gözlenmektedir.⁽³⁸⁾

3.2. Duodenum

3.2.1. Duodenum Anatomisi

İnce bağırsağın birinci bölümü olan duodenum'un, ampulla (bulbus) kısmı intraperitoneal olup mide ile birlikte hareket edebilir. Geri kalan kısmı, sekonder retroperitoneal olup karın arka duvarına yapıştır. İnce bağırsağın geri kalan bölümü ise, bir mezo vasıtasıyla karın arka duvarına asılı olup hareketlidir. Ortalama 25 cm uzunluğunda olan duodenum, ince bağırsağın en kısa, en geniş çaplı, en kalın duvarlı ve en az hareketli olan bölümüdür. Bulbus'u hariç, arka yüzü peritonsuz olduğu için karın arka duvarına yapıştır.

Bu nedenle de az hareketlidir. Normalde bir U veya yarım halka şeklinde olan duodenum'un kavisi içine caput pancreatis oturur. Duodenum'un tümü, göbek seviyesinin yukarısında bulunur. Duodenum'un ilk bölümüne pars superior denir. Midenin pylorundan başlayan bu bölüm arkaya, yukarıya ve sağa doğru 5 cm uzanır. Bu seyri esnasında, karacigerin lobus quadratus'u altında safra kesesinin boynu ile komşuluk yapar. Bu bölümün pozisyonu, midenin doluluk derecesine göre değişir. Pars superior, flexura duodeni superior denilen bir kıvrım yaparak aşağı doğru ikinci bölüm olarak uzanır. Pars descendens denilen bu ikinci bölüm, sağ böbreğin ön yüzünün medial bölümünde veya sağ medioclavicular hattın hemen medialinde, 3. lumbal omur gövdesinin alt kenarı hizasına kadar 8-10 cm iner. Duodenum, 3. lumbal omur gövdesinin alt kenarı hizasında flexura duodeni inferior denilen ikinci bir kıvrım yaparak sol tarafa geçer. Hemen hemen horizontal olan bu 3. bölüme pars horizontalis denilir ve göbek hizasının hemen yukarısında bulunur. Uzunluğu da yaklaşık 7,5 cm kadardır. Duodenum'un pars ascendens denilen dördüncü bölümü, sol tarafta aorta'nın önünde 2,5 cm yukarı çıkar ve 2. lumbal omur hizasında flexura duodenojejunalis'de jejunum ile birleşir. Flexura duodenojejunalis, orta hattın 2,5 cm sol tarafında ve planum transpyloricum'un da 1 cm aşağısında bulunur.^(39,40)

Kanlanması

A. gastrica dextra, a. supraduodenalis, a. gastromentalis dextra, a. pancreaticoduodenalis superior ve inferior'dan gelir. Duodenum'un üst bölümü, a. hepatica propria'dan da dallar alır. Bu dallar omentum minus'un sağ bölümünde seyrederek. Yine a. gastroduodenalis'ten de dallar alır. Bu dallar pyloru da besler, fakat pylor ile duodenum arasında anastomoz yapmazlar.

Duodenum venleri v. splenica (lienalis), v. mesenterica superior ve v. portae'ye açılır. Duodenum'un ön ve arka yüzlerinde bulunan lenf damarları kendi aralarında bolca anastomoz yaparlar. Ön taraftaki lenf damarları arterleri takip eder ve nodi lymphatici pancreaticoduodenales superiores ile nodi lymphatici pylorici'ye açılırlar. Bu nodüllerden çıkan lenf damarları da nodi lymphatici coeliaci'ye açılır. Duodenum'un arka yüzündeki lenf damarları pankreas basınının arka yüzüne geçer ve aşağıda nodi lymphatici mesenterici inferiores'e açılırlar.^(39,40)

3.2.2. Duodenum Histolojisi

Ortalama 25 cm uzunluğunda olan duodenum, ince bağırsağın en kısa, en geniş çaplı, en kalın duvarlı ve en az hareketli olan bölümüdür. Histolojik olarak ince bağırsağın diğer bölümleriyle farklılık göstermesine rağmen birkaç yönüyle ayrılır.

Dört tabakadan oluşur.

I. Tunika Mukoza

Kalın damardan zengin bölümdür. Makroskopik olarak seçilen iki yapı dikkati çeker bunlar

❖ Plika sirkulares(Kerkring valvülleri)

Mukoza ve submukozanın bağırsak lümenini çevreleyen kalıcı katlantısıdır. Plikalar midenin ağızlandığı bölgenin uç kısmından 5 cm sonra oluşmaya başlarlar ve duodenumun jejunum ile birleştiği bölgede belirgin hale gelirler. İleumun yarı kısmından itibaren de giderek yok olacak şekilde azalır.⁽⁴¹⁾

❖ Villus

İnce barsağın tüm yüzeyini kaplayan mukozanın (plika sirkularislerin üzerinde de bulunan) ortalama yükseklikleri 1mm olan, küçük parmak ya da yaprak biçimindeki uzantılarıdır. Bu kabartıya mukozanın sadece 2 tabakası katılır. Lamina epitelyalis ve lamina propria. Villuslar, muskularis mukozada sonlanacak şekilde oluşan kriptaları oluşturmak üzere mukozanın derinliklerine dek uzanırlar. Villusların boyu, bağırsak duvarının gerilimine ve villusların en iç yapısındaki düz kas liflerinin kasılmasına bağlıdır.⁽⁴¹⁾

Villusun histolojisine bakacak olursak kalisiform ve silindirik çizgili kenarlı hücre olmak üzere epitelde 2 tip hücre gözlenir. Epitel altındaki lamina propria değişik sayıda lenfosit içeren gevşek bağ dokusu yapısındadır. Muskullaris mukozadan. lamina propria içine giren düz kas fibrilleri villusun apeksinde bazal membrana ve ortada sentral lakteala tutunurlar. Böylece kas kasılması hem lenf damarlarında lenf hareketine hem de villusun şeklinin değişmesine yol açar (villöz pompa).

Tunika Mukoza Duodenumda üç laminalıdır.

Lamina Epitelyalis:

Tek katlı silindirik tipte epitel tabakasında iki tip hücre görülür.

- Absorbsiyon yapan silindirik çizgili kenarlı hücre (Enterosit).

Esas olarak emilimle görevli bu hücrelerin apikal kısımlarında 300 civarında mikrovillus bulunur. Mikrovilluslar ince bağırsak epitelinin çizgili kenarlı görünmesine sebep olur. Emilim dışında sindirime yardımcı olan bazı enzimler de salgırlar. Örneğin mikrovilluslar, laktaz, maltaz ve sürozun dâhil olduğu membran içi enzimler içerirler. Bu oligosakkaridler, karbonhidratları hekzoslara indirgerler ve hekzoslar taşıyıcı proteinler ile enterositlerin içine taşınabilirler. Böylece fırçamsı kenar enterositlerin yüzey alanını arttırmakla kalmaz, aynı zamanda, proteinler ve karbonhidratların sindirimindeki son aşamada gerekli enzimler için bir yerleşim alanı oluşturur.⁽⁴¹⁾

- Kalisiform Hücre- Goblet Hücre- Mukus Hücre

Goblet hücreleri ince ve kalın bağırsak mukozasını kaplayan bol miktarda koruyucu mukus üretir. Protein ve karbonhidrattan oluşan yüksek molekül ağırlıklı *glikoprotein* yapıdaki mukus son derece yoğun yüzey kayganlaştırıcıdır ve aynı zamanda bakterilerin epitele bağlanmasını önler. Goblet hücreleri apikal sitoplazmalarındaki sıkıca paketlenmiş büyük (1-3 µm) salgı vezikülleri (musin granülleri) tarafından gerildikleri için matara ya da kadeh şeklinde izlenirler. Orta derecede elektron yoğun salgı granülleri supranükleer yerleşimli golgi kompleksinden köken alır. Bazal sitoplazmadaki granüllü endoplazma retikulumu birbirine paralel, yassı sisternalar içerir. Çentikli ya da fincan şekilli çekirdek hücrenin incelmış bazal kısmına doğru itilmiştir. Goblet hücreleri 2-4 günlük yaşam döngülerinde bir veya iki salgılama döngüsüne sahiptirler. Mukusu sentezler, depolar ve boşaltırlar. Mukus, boşalmadan önce birbirinden ayrı duran veziküllerin boşalma sırasında birleşmesiyle oluşan birleşik ekzositoz yoluyla boşalırlar. İnsanlarda yeni sentezlenmiş musin granülleri yüzeye 12-24 saatte ulaşır. Epitelde goblet hücreleri ve enterositler birlikte bulunurlar ve lateral kenarlarından hücrelerarası bağlantılarla bağlıdırlar. Apikal hücre membranları lümene uzanan kısa mikrovilluslara sahiptirler. Goblet hücrelerin öncülleri hücre bölünmesi yeteneğine sahip, kriptaların dibinde yer alıp yüzeye göç eden farklanmamış kök hücrelerdir. Goblet hücreleri değişik tipte mukus salgırlar. Sialomüsinler daha çok ince bağırsaklardan, sülfomüsinler ise kalın bağırsaklardan salınırlar. Kolinerjik uyarının yanı sıra bakteriye ve endotoksine maruz kalma goblet hücresinden yoğun musin salınımına yol açar. H&E boyamalarında mukus kaybolduğundan, hücrenin apikal bölümü boş olarak seçilir.⁽¹³⁾ Asit mukopollisakkarit yapıdaki mukus ancak özel boyalarla gösterilebilir. PAS ile parlak

kırmızı, alsian mavisi, toluidin mavisi ile mavi renkte (asit mukopolisakkarit boyaları) boyanır. Mukus bağırsak mukozasını kayganlaştırır ve koruyucu bir yüzey oluşturur.

Lamina Propria

İnce bağırsak bezlerinin gömülü olduğu gevşek bağ dokusu lamina propria villüslerin merkezi bölümlerinde doldurmaktadır. Retiküler hücreler, eosinofil lökosit, plazma hücreleri nadir mast hücresi, fibrosit, makrofaj ve çok sayıda lenfosit, retiküler fibril, çok miktarda elastik fibril ve ince kollagen fibriller bunun yanı sıra muskularis mukozadan gelen ince düz kas fibrilleri bulunur. Lamina propria içinde yer alan çok farklı hücreleri barındıran ince bağırsak bezleri (Lieberkühn Kriptaları) bulunur. Bunlar muskularis mukozaya kadar uzanırlar. Bazal membran altında zengin kapiller ağı bu bezleri çevreler. Enterositler ve goblet hücrelerinin dışındaki hücelere bakılacak olursa:

❖ İndifferensiye epitel hücresi (kök hücre)

Bezin bazal bölümünde bulunan düzensiz kübik biçimli, bezdeki diğer tip hücrelerin kaynağını oluşturan hücrelerdir. Mitoz ile çoğalan kök hücreler farklılaşarak diğer hücreleri oluştururlar. Bezlerin alt yarısında bulunan bu hücreler yenileşme bölgesinden olgunlaşma alanına doğru hareket ederler. Bu alanda yapısal ve enzimatik olgunlaşma sonucunda işlevsel hücre topluluğu oluştururlar. Villüs ucunda, hücreler apoptoza uğrayarak ölürler.⁽⁴²⁾

❖ Paneth Hücresi

Paneth hücreleri, ince bağırsakta bezlerin tabanında yerleşmiş çok az sayıdaki piramidal biçimli seröz hücrelerdir. İleumda sayıları çoktur ve aynı zamanda apendikte de bulunurlar. Farklanmamış kök hücrelerden köken alırlar. Diğer bağırsak epitel hücrelerine göre uzun sayılabilecek 20-30 günlük yaşam süreleri vardır. Bakteri veya bakteriyel antijenle karşılaşan paneth hücresi kriptaların bakteriyel mikroçerçevesini düzenleyen lizozim üretmeye başlar. Aynı zamanda bünyelerinde bir lizozim aktivatörü ve stabilizörü olan çinko ihtiva ederler. Paneth hücreleri bakteri ve immunoglobülinleri fagosite ederler ve aynı zamanda T hücrelerine antijen sunucu hücre olarak konak hücre savunmasında görev alırlar. Paneth hücreleri tıpkı diğer protein salgılayan hücreler gibi büyük ve göze çarpan elektron yoğun salgı vezikülleri (veya granüller) ile dolu apikal sitoplazmaya sahiptirler. Herbiri 5-20 nm çapındaki bu yuvarlak veziküller apikal yüzeye yaklaştıkça yoğunlukları artar. Vezikülün membranı hücre apikal plazma membranı ile birleşince vezikül içeriği ekzositoz yoluyla kriptaları lümenine boşalır.

Her hücre Golgi kompleksi, birçok yassı sisternadan oluşan granüllü endoplazma retikulum ve lizozom içerir. Kısa kalın mikrovillusları apikal hücre membranından kripta lümenine uzanır. Paneth hücreleri sürekli bir sekresyona sahiplerdir bununla birlikte beslenme salgılamayı arttırır.⁽¹³⁾

❖ Enteroendokrin (APUD) Hücreler.

Gastrointestinal sistemin hormon üreten hücreleri olan enteroendokrin hücreler, özefagustan kolona kadar epitel içinde yoğun olarak bulunan küçük piramidal hücrelerdir. Bu hücreler nöral kristadan köken alırlar.⁽⁴³⁾ Mide bezlerinde, intestinal bezlerde ve villuslarda yaygın olarak bulunan enteroendokrin hücrelerin yerleşimi mukozayla sınırlıdır. Metabolik ve boyanına özellikleri baz alınarak arjentaffin, arjirofil veya APUD (amin prekursor uptake and dekarboksilasyon) hücreleri olarak da adlandırılırlar. Rutin kesitlerde görülmeleri zor olsa da immunositokimyasal ve elektron mikroskopik olarak görülebilirler. Bu hücreler diffuz nöroendokrin sisteme (DNES) ait bir aile olup birlikte grup olduklarında vücuttaki en geniş endokrin organını oluştururlar. Hücre tipleri özel salgı ürünlerine göre sınıflandırılırlar fakat hepsi aynı ince yapıya sahiptir. Hepsisi lamina propriyaya bitişik bazal laminaya oturmasına karşın ancak bazıları lümene ulaşabilir çoğu ise yüzeye ulaşamaz. Enteroendokrin hücreler küçük ve membranla çevrili olup, hücrenin bazal alanında yoğunlaşmış, elektron yoğun salgı veziküllerine sahiptirler. Oval çekirdek genellikle ökromatiktir. Sitoplazmada küçük bir golgi kompleksi, birkaç mitokondriyon ve yaygın olarak izlenen granüllü endoplazma retikulumu bulunur. Hücreler, hedef hücreler üzerinde güçlü bir etkiye sahip, kan dolaşımına giren veya lokal olarak etkili çeşitli peptit ve arninleri üretirler.⁽¹³⁾ Gastrin, motilin, kolesistokinin, somatostain, sekretin ve vasoaktif intestinal polipeptit gibi otuzdan fazla gastrointestinal hormon üretirler.⁽¹⁴⁾

Lamina Muskularis Mukoza

Lamina propria ve submukoza arasında bulunan ve içte sirküler dışta longitudinal seyirli ince düz kas tabakasıdır. Bu tabakadan uzanan küçük kas fibril grupları villüs içine uzanır. Kaslar arasında elastik fibriller de bulunur.

II. Tunika Submukoza

Tunika mukozadan tunika muskularise kadar olan bölgedir ve kaba areolar bağ dokusu yapısında bol kan damarı, elastik lifler, lenfatikler ve yer yer yağ hücreleri bulunur. Submukoza mukozanın hareketliliğine müsaade eder ve geniş kan damarları yanı sıra sinir

pleksuslarına sahiptir. Birkaç ganglion hücrede içeren sinir pleksuslarının tamamı parasempatiktir. Sinir lifleri çoğunlukla postganglionik sempatik liflerdir. Bununla birlikte N.Vagustan köken alan ve miyelinsiz olan bazı parasempatik liflerde bulunmaktadır. Postganglionik lifler lamina muskularis mukoza ve mukozal bezleri innerve ederler. Burada yer alan sinir pleksusu submukozal pleksus veya Meissner pleksusu adını alır. Bu yapı az sayıda ganglion hücresi içerdiğinden rutin kesitlerde kolaylıkla ayırt edilemez.

Duodenuma özgü olan Brunner bezleride submukozada bulunan başka yapılardır. Bu bezler bileşik tubuloalveoler tiptedir. Basit silindirik epitelle döşeli boşaltma kanalları lamina muskularis mukozayı geçerek liberkühn kriptalarına açılır. Bu nedenle lamina muskularis mukoza bezlerin üzerinde kesintili bir tabaka olarak seçilir. Bu bezler polipeptid hormonu urogastron (epidermal büyüme faktörü) 'u yapar. Bez asinuslarında silindirik biçimli müköz hücreler arasında birçok DNES hücrede yer alır. Bu hücrelerin salgıladıkları salgı 8.1 ve 9.3 arası pH'ya sahip olup nötral ve alkali glikoproteinler ve bikarbonat iyonlarını barındırır.⁽⁴³⁾ Salgı midenin asit salgısına karşı duodenum mukozasını korur. Duodenuma boşalan pankreas enzimleri için uygun bir pH ortamı sağlar.. Ayrıca Meissner yani submukozal pleksus bulunur.

III.Tunika Muskularis (Muskularis Eksterna)

İçte sirküler dışta longitudinal seyirli uzanan düz kas tabakasıdır. Her iki tabaka da gerçekte spiral şekilde düzenlenmiştir. İçte sıkı bir heliks oluştururken dıştaki gevşek bir heliks halindedir. Bu iki tabaka arasında bir vasküler pleksus ve pek çok küçük ganglionlar ile ilişkili olan bir sinir pleksusu Auerbach myenterik pleksusu adını alır ve başlıca parasempatik olup birkaç postganglionik sempatetik lif ile birlikte dir. Bu tabaka gıda maddelerinin lümen içerisinde ileriye doğru hareket etmesini sağlar. Bu olaya peristaltizm denir. Peristaltik dalgalar myenterik pleksustan kaynaklanan efferent impulslarla koordine edilir. Yavaş ve hızlı olmak üzere iki tip peristaltik dalga vardır. Bunlara peristaltik itici güçler denir.⁽⁴³⁾

IV.Tunika Seroza veya Adventisya

En dış tabaka olan tunika seroza veya adventisya ince, gevşek bağ dokusundan meydana gelmiştir. Bu bağ dokusu çoğunlukla çevre oluşumların bağ dokusu ile kaynaşır. Bu şekildeki en dış tabaka adventisya olarak adlandırılır. Pek çok bölgede adventisya periton ile örtülüdür (Mesotelyal hücrelerden oluşan tek bir tabaka). Bu gibi yerlerde adventisya yerine seroza terimi kullanılır. Burada lenfatikler, kan damarları ve sinirler yer almaktadır.

3.2.3. *Duodenum Histofizyolojisi*

Plika, villus ve mikrovilluslar emilim yüzeyini artıran önemli yapılardır. Sindirim ince bağırsakta tamamlanır ve emilim ince bağırsakta gerçekleşir. Lipid, protein ve karbonhidratların sindirimi ve emilimi barsaklarda gerçekleşir.

Proteinin sindirimi, esas hücreler tarafından sentezlenen öncü bir yapı olan pepsinojenden kaynaklanan pepsinin varlığında midede başlamaktadır. Pepsinin etkisi duodenumun alkali ortamında sona erer. Pankreatik proteazlardan olan endopeptidazlar ve karboksipeptidazlar proteolizise devam eder. Tripsinojen, mikrovillusların üzerinde yerleşmiş olan enterokinaz aracılığı ile aktif hali olan tripsine dönüşür. Aktif hale gelen tripsin, daha sonra tripsinojen topluluğunu aktive eder. Kimotripsin ve proelastaz sırası ile aktif halleri olan kimotripsin ve elastaza dönüşür. Karboksipeptidaz A ve B, öncü yapıları olan prokarboksipeptidaz A ve B'ye kaynaklanır. Tripsin, pankreatik proenzimlerin aktivasyon ve inaktivasyon süreçlerinde önemli bir rol oynamaktadır. Sitosoldeki tripeptidler, sitoplazmik peptidazlara sindirilerek aminoasitlere dönüşürler.

Nişasta, sükroz, laktoz ve maltoz gibi günlük alınan gıdalarda bulunan belli başlı karbonhidratlardır. Nişasta amilozdan ve amilopektinden oluşmaktadır. Sükroz, glikoz ve früktozdan oluşan bir disakkariddir. Laktoz, galaktoz ve glikozdan oluşmuş bir disakkariddir. Maltoz, bir glikoz dimeridir. Tükürükte bulunan α -amilaz, nişastanın sindirimini ağızda başlatırken pankreastaki α -amilaz ince bağırsakta sindirimi sonlandırır. Günlük alınan gıdada buluna belli başlı şekerler, mikrovilluslerin plazma membranında yer alan oligosakkaridazlarla yıkılırlar. Selüloz, selülaz içermemesinden dolayı insan ince bağırsağında sindirilemez. Selüloz alınan besinde bulunan sindirilmemiş liften sorumludur.

Bağırsak lümenindeki yağ damlacıklarının emülsiyonu, safra tuzlarının varlığında pankreatik lipaz etkisiyle yağ asitlerine ve monogliseridlere yıkılır. Miselleri (2nm çapında) oluşturmak üzere, yağ yıkımı ürünleri safra tuzlarıyla birleşir. Villusların hareketi, yağ emilim sürecinde önemli bir kısmı oluşturmaktadır. Villusların hareketi submukozadaki Meissner'in sinir pleksusu ile tetiklenen uyarılmış bir kasılma ile oluşmaktadır. Yağ asitleri ve monogliseridler, mikrovillusların içerisine ve enterositlerin apikal sitoplazmalarına, yağ asiti bağlayıcı proteinlere bağlı bir şekilde yayılırlar. Buralarda düzgün yüzeyli endoplazmik retikulumunda, trigliseridleri oluşturmak üzere esterleşirler. Trigliseritlerin yeniden sentezlenmesi için gerekli olan enzimler (asil-CoA sentetaz ve asiltransferazlar) düzgün yüzeyli endoplazmik retikulumun membranlarında bulunmaktadır.

Yeniden sentezlenen trigliseridler daha sonra bir apoprotein-lipid kompleksi olan şilomikronlara dönüştürülmek üzere golgi aygıtına taşınır. Golgi aygıtında vezikülün, enterositin bazolateral bölgesindeki plazma membranı ile birleşmesini sağlayacak şekilde, şilomikronlar membran ile kaplanır. Şilomikronlar hücrelerarası alana ve villusun lamina propriyasında yer alan lenfatik bir damar olan merkezi laktealin içerisine boşalırlar. Bu kontraksiyonlar ile villuslar üzerinde pompalayıcı bir etki oluşur ve lenf sıvısı mezenterik lenfatiklere doğru itilir. Az miktarda serbest kolesterol, kolesterol esteri ve fosfolipid ile biraraya gelirler; bir protein tabakasıyla da kaplanarak suda çözünebilir ve transport edilebilir **şilomikronları** oluştururlar. Şilomikronlar da lenf sistemi yoluyla dolaşıma katılırlar.⁽⁴¹⁾

3.2.4. Duodenuma Patolojik Yaklaşım

Villüs Atrofisi: Hücre boyutunun hücre madde kaybı ile küçülmesine atrofi denir. Yeteri miktarda hücre atrofiye uğradığında doku ya da organ atrofik hale gelir. Atrofinin nedenleri iş yükünün azalması, inervasyonun kaybı, kan akımının azalması yetersiz beslenme, endokrin uyarının kaybı ve yaşlanmadır. Bu uyarıların bir kısmı fizyolojik diğer bir kısmı ise patolojik olmasına rağmen temelde hücresel değişimler benzerdir.

Atrofi hücrenin yapısal elemanlarında bir azalmayı gösterir; işte duodenumda da çeşitli çevresel etkiler sonucunda villüs boyutunun azalması gözlenir. Bu etkilerin biyokimyasal mekanizmaları çok çeşitli olmasına karşın gerçek anlamda sentez ve yıkım arasındaki dengenin etkilenmesi sonucu oluşurlar.

Villüs Hipertrofisi: Atrofinin aksine hipertrofide hücrelerin boyutundaki artış sonucu organ boyutunda buna bağlı olarak artması olayıdır.

3.3. Pestisitler

Yoğun ve bilinçsiz bir şekilde kullanılan ve çevre kirliliğine neden olan etkenlerden biri olan pestisitler, ekonomik bir şekilde üretilmeleri ve kullanım kolaylığı nedeniyle, ürünü hastalıkların, böceklerin, yabancı otların ve diğer zararlıların olumsuz etkilerinden koruyarak verim ve kaliteyi güvence altına almayı amaçlayan tarımsal savaşımında çok önemli bir yer tutmaktadır.

Pestisit deyimi, insektisit (böcek öldürücü), **herbisit** (yabani ot öldürücü), fungusit (küf öldürücü), rodentisit (kemirgen öldürücü) vb. şeklinde sınıflandırılan kimyasal maddelerin

tümünü kapsamaktadır. Pestisitler, etkili maddelerinin kökenlerine göre de gruplara ayrılabilir:

I. İnorganik maddeler

II. Doğal organik maddeler

- Bitkisel maddeler
- Petrol yağları vb.

III. Sentetik organik maddeler

- Klorlu hidrokarbonlar
- Organik fosforlar
- Diğer sentetik organik maddeler (azotlu bileşikler, piretroidler)

Pestisitlerin kullanımı çok eski tarihlere dayanmaktadır. M.Ö. 1500'lere ait bir papirüs üzerinde bit, pire ve eşek arılarına karşı insektisitlerin hazırlanışına dair kayıtlar bulunmuştur. 19.yy'da zararlılara karşı inorganik pestisitler kullanılmış, 1940'lardan sonra pestisit üretiminde organik kimyadan faydalanılmış, DDT ve diğer iyi bilinen insektisit ve herbisitler keşfedilmiştir. Bugüne kadar 6000 kadar sentetik bileşik patent almasına karşın, bunlardan 600 kadarı ticari kullanım olanağı bulmuştur. Ülkemizde tarımı yapılan kültür bitkileri, sayıları 200'ü aşan hastalık ve zararlıların tehdidi altında olup yeterli savaşım yapılmadığı için toplam ürünün yaklaşık 1/3'ü kayıba uğramaktadır. Bu kayıpların önlenmesi bakımından pestisitlerin daha uzun yıllar büyük bir kullanım potansiyeline sahip olacağı kuşkusuzdur. Formülasyon olarak 30 000 ton civarında olan pestisit tüketiminde en yoğun olarak kullanılan gruplar sırasıyla herbisitler, insektisitler, fungusitler ve yağlardır.

Bununla beraber, yoğun ve bilinçsiz pestisit kullanımının sonucunda gıdalarda, toprak, su ve havada kullanılan pestisitlerin kendisi ya da dönüşüm ürünleri kalabilmektedir. Hedef olmayan diğer organizmalar ve insanlar üzerinde olumsuz etkileri görülmektedir. Pestisit kalıntılarının önemi ilk kez 1948 ve 1951 yıllarında insan vücudunda organik klorlu pestisitlerin kalıntılarının bulunmasıyla anlaşılmıştır. Pestisitlerin bazıları toksikolojik açıdan bir zarar oluşturmazken, bazılarının kanserojen, sinir sistemini etkileyici ve hatta mutasyon oluşturucu etkiler saptanmıştır. Pestisit kalıntılarının en önemli kaynağı gıdalardır. Bu nedenle 1960 yılında FAO ve WHO "Pestisit Kalıntıları Kodeks Komitesi"ni kurmuşlar ve bu komitenin çalışmaları sonucu konu ile ilgili tanımlamalar yapılmış, bilimsel araştırma verilerine dayanılarak gıdalarda bulunmasına izin verilen maksimum kalıntı değerleri saptanmıştır.

Bitkinin direkt yolla veya toprakta kalan pestisitleri kendi bünyesine alması ve bu bitkilerin insan gıdası veya hayvan yemi olarak kullanılması sonucunda pestisitler insanların gıda zincirine girmektedirler.

3.3.1. Herbisitler

Kültürü yapılan bitkilerin kullandığı ışığa, besin maddelerine, suya ortak olan, üretim ve kalitenin düşmesine sebep olan bitkilerin “yabancı ot”, öldürülmesi veya gelişiminin baskılanması için kullanılan kimyasal maddelere herbisit denir.

Herbisitler içindeki etkinlik gösteren kimyasal maddeler “aktif madde” olarak nitelendirilmekte ve ticari preparatlarda “dolgu maddesi” ile karışık halde bulunmaktadır.

Herbisitleri değişik özelliklerine göre sınıflandıracak olursak.

- Bitki bünyesinde etkililik mekanizmasına göre.
 - Fotosentezi önleyenler (Üre bileşikleri, triazin v.b)
 - Solunumu önleyenler (Dinitrophenol, anilin v.b)
 - Mitoz bölünmeyi engelleyenler (Anilinler, charbamatlar v.b)
 - Çimlenmeyi önleyenler (Anilinler, charbamatlar v.b)

İnhibe edilen bu biyolojik işlevler; hücre bölünmesi, nükleik asit sentezi, aminoasit sentezi, karotenoid sentezi ve lipid sentezidir.

- Bitki bünyesinde taşınma özelliğine göre.
 - Kontakt herbisitler.(Temas ettiği kısımda etkili olup, başka bölgelere taşınmayanlar)
 - Sistemik herbisitler.(Temas ettiği yerden bitki dokusuna girip diğer organlara taşınarak oralarda etkinlik gösterenler)

- Bitki dokusu içine giriş yerlerine göre.
 - Toprak herbisitleri.(Toprak altı organlardan giriş yapanlar)
 - Yaprak herbisitleri.(Toprak üstü organlardan giriş yapanlar)

Bitkinin kök sistemini veya çimlenen tohumlarını etkileyen herbisitler: Toprağa karıştırılan herbisitler buradaki istenmeyen bitki tohumlarını yok eder. Arsenik asit, pentaklorofenol (PCB) örnek olarak verilebilir.⁽⁴⁴⁾

- Kullanış amaçlarına göre.
 - Total herbisitler.(Toprak üstü tüm bitkileri öldürmek için kullanılırlar.)

- Seçici “selektif” herbisitler.(Bitkilerin bir kısmına zarar vermeden diğerlerini öldürmek için kullanılanlar)

➤ Uygulanma zamanlarına göre.

- Ekim öncesi
- Çıkış Sonrası
- Ekim sonrası- çıkış öncesi

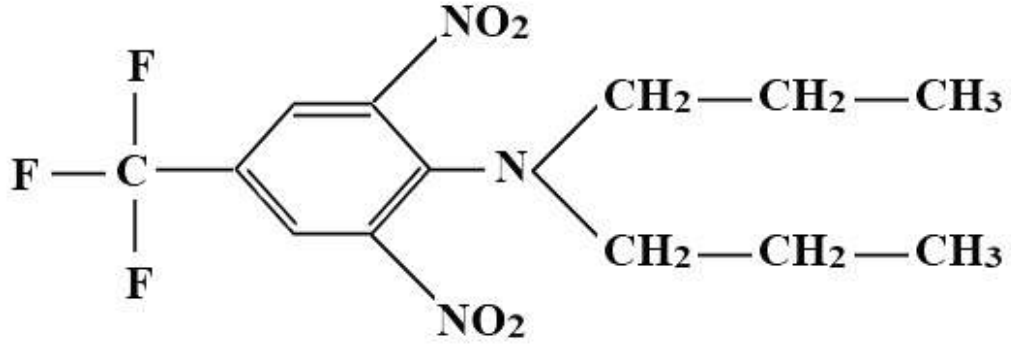
Bitki büyümesini inhibe eden herbisitler, bitki büyümesini etkileyen hormonlar üzerinde etkili olarak hormon dengesini bozarlar. Bu herbisitler, fenoksiasetik asitler ve benzoik asitler olmak üzere ikiye ayrılırlar.⁽⁴⁵⁾

➤ Kimyasal yapılarına göre.

- Phenoxy grubu(2,4-D,MCPA-T v.b)
- Aliphatic grubu (TCA, Dalapon, Glyphosphate v.b)
- **Dinitroanilin** grubu (**Trifluralin**, Orzyalin v.b)
- Nitril grubu (Bromoxynil, Ioxynil v.b)
- Amidler grubu (Propanil, Naptalam v.b)
- Doymuş benzoik asitler grubu (Chloramben,2.3.6-TBA Dicamba v.b)
- Charbamatlar grubu (Propham, Chloropham v.b)
- Uracil grubu (Bromacil v.b)
- Diazin grubu (Maleic, Hydrazide v.b)
- Triazin grubu (Simazine, Atrazine v.b)
- Bipyridilium grubu (Diquat, paraquat v.b)
- Üre bileşikleri (Buturon, Fenuron v.b)
- Diğer organik herbisit bileşikleri(Amitrol, DCPA v.b)
- İnorganik herbisit bileşikleri (Sodyum Chlorat, Boratlar, Arsenikler v.b)

3.3.1.1. **Trifluralin (TRF)**

TRF, ürün çıkış öncesi kullanılan, dinitroanilinli selektif bir herbisittir.⁽⁴⁶⁾ Moleküler formülü $C_{13}H_{16}F_3N_3O_4$ olan TRF’in kimyasal yapısı Şekil 1’de gösterilmiştir.



Şekil 1: TRF'nin kimyasal yapısı

Genel olarak ilaçlamadan sonra 6-8 saat içerisinde toprağın 5-6 cm derinliğine karıştırılarak uygulanan TRF fiziksel ve kimyasal özellikleri Şekil 2'de gösterilmiştir.

Özellik	Açıklama
CAS Numarası	1582-09-8
Görünümü	Sarı-turuncu renkli katı kristal
Kimyasal adı	a,a,a-trifluoro-2,6-dinitro-N,N-dipropyl-p-toluidine
Teknik form saflığı	% 96
Çözünürlüğü	
Suda	27 °C'de % 0.0024
Aseton	> 50 g/ 100ml
Metanol	2 g / 100 ml
Xylene	81 g / 100 ml
Kaynama Derecesi	139-140 °C

Şekil 2: TRF'in fiziksel ve kimyasal özellikleri.⁽⁴⁷⁾

TRF; sıvı, emülsiyon konsantre (%3.9-50.8), tanecikli (%0.17-10), akışkan konsantrasyon (%10.9), doymuş materyal (%18.9), sıvıda çözülebilir konsantrasyon (%43.8), katıda çözülebilir konsantrasyon (%14) ve suda taneciklere dağılmış (%0.75-80) şekilde olmak üzere çeşitli ticari formulasyonlarda bulunabilmektedir. TRF ayrıca, triallate, benfluralin, alachlor, clomazone, isoxaben, imazaquin, clopyralid, oxadiazon, imazethapyr ve flumetsulam içeren diğer birkaç herbisit ile formüle edilir. TRF; uçak, püskürtücü, merkezden

sulama, damlatma ile sulama, tepeden püskürtme ile sulama, granüler uygulama, elle dağıtma, sallayıcı ve gübre serpmeye makinesini içerisine alan zemin ve hava araçları tarafından uygulanabilir. Uygulama zamanı hedef organizmaya ve uygulama alanına göre farklılık gösterebilir. Bu nedenlerden dolayı kimyasal dört mevsim boyunca uygulanabilme özelliğine sahiptir. Tarımsal kullanımının çeşitliliğine rağmen her sezonda yalnız bir kez uygulanabilmektedir.⁽⁴⁸⁾

TRF kullanımını ilk olarak ABD’de 1963 yılında kaydedilmiştir. 1998 yılı kayıtlarına göre dünya çapındaki satış tutarı 300 milyon dolar, üretim oranı ise 24 bin ton olarak rapor edilmiştir. TRF günümüz itibarı ile 50’den fazla ülkede kayıtlı olup 80’den fazla zirai ürün için kullanılmaktadır.⁽⁴⁹⁾

Amerika’da en fazla kullanılan ilk 5 herbisit içerisinde yer almaktadır. TRF ülkemizde zirai mücadelede uzun yıllardan beri en yaygın kullanılan herbisitlerin başında gelmektedir. (Şekil 3)⁽⁵⁰⁾

Herbisit	Yıllara göre herbisit tüketimindeki payları (%)			
	1999	2000	2001	2002
2,4-D	45,28	44,34	47,49	33,62
Trifluralin	27,02	27,86	20,21	24,60
Molinate	7,10	6,44	3,69	3,50
Propanil	4,54	3,62	-	-
Glyhposate	4,10	6,94	9,08	7,57
Chloridazon	-	-	5,38	-
Metalochlor	-	-	-	5,10

Şekil 3:1999-2002 yıllarında Türkiye’de en yoğun kullanılan herbisitler ve genel herbisit tüketimindeki payları.⁽⁵⁰⁾

TRF’in 1999-2002 yılları arasındaki kullanım oranlarına bakıldığında kullanım oranları yaklaşık olarak sabit olmakla birlikte 2,4-D’den sonra en fazla miktarda kullanılan herbisit olduğu görülmektedir.⁽⁵⁰⁾

Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı’nın yayınlamış olduğu 2007 istatistiksel bilgilere göre TRF Türkiye’de 2007 yılı içerisinde 724.420 litre tüketilmiştir. 2007 yılında Türkiye’de özellikle Ege ve Akdeniz bölgesinde en çok tüketilen herbisit’tir.

TRF'in genel olarak kullanıldığı alanlar buğday, arpa, lahana, havuç, marul, şeker pancarı ve baklagil üretimidir. Bunun yanında pamuk, soya, ayçiçeği, soya, domates ve kanola üretimi ile bağcılıkta da yaygın olarak kullanılmaktadır. TRF ayrıca, bahçe bitkileri ve sera bitkileri üretimi alanlarında da uygulanmaktadır.

Akut Toksikite: TRF'in saf halinin uygulandığı deney hayvanlarında deri, göz ve solunum için toksiklik görülmemiştir. Sıçan LD₅₀>10000 mg/kg (oral yolla), İnsan:0.024 mg/kg/gün, kuş LD₅₀>5000 mg/kg, balık LC₅₀>0.02 mg/lt (96 saat), arı LD₅₀>100 µg/arı (kontakt), farede >5000 mg/kg ve tavukda >2000 mg/kg'dır. Sıçanlarda madde gözlerine bulaştığı halde çok az bir hassasiyet görülmüş ve herbisit 7 günde temizlenmiştir. Bazı çiftçilerde deride alerjik reaksiyonlar görülmüştür (Dil, boğaz şişmesi ve solunum güçlüğü).⁽⁵¹⁾

Kronik Toksikite: Uzun süreli temas veya kullanımda alerjik dermatit görülmektedir. Köpeklerde uzun süreçte yapılan çalışmalarda eritrositlerin miktarında azalma ve methemoglobin miktarında artış görülmüştür. TRF oral yoldan alınınca hayvanlar için böbrek ve karaciğere etki etmektedir.⁽⁵¹⁾

Reproductive (Üreme), Teratojenik (Doğum anomalisi) ve Mutajen (Gen mutasyonu) Etkisi: TRF'le yapılan çalışmalarda bu etkilere rastlanılmamıştır.⁽⁵²⁾

Karsinojenik (Kanserojen) Etkisi: Sıçanlarda yapılan çalışmalarda böbrek, vesica urinaria ve tiroidlerde malign tümörler görülmüştür.⁽⁵²⁾

Organ Toksikitesi: TRF; karaciğer, böbrek ve tiroid bezlerini etkilemektedir.⁽⁵²⁾

Ekolojik Etki: Kuşlar ve arılar için toksik değil. Sucul organizmalarda yüksek oranda toksisite gösteriyor. Alabalık LD₅₀: 0,5-0,6 ppm.⁽⁵²⁾

Çevre Etkisi: Toprakta Yarı Ömrü 45-60 gündür (6-8 hafta). Toprakta kalıcılığı 6-8 ay devam eder. Altı aydan bir yıla kadar %80-90 aktivitesi devam etmektedir. Sudaki çözünürlüğü: 0,0024 gr/100/ml'dir. Sularındaki kalıcılığı 6 hafta ile 6 ay arasında değişmektedir. EPA verilerine göre 1 ppm'in üstünde sularda toksiktir.⁽⁵¹⁾

EPA'ya göre; TRF'le kontamine havayı solumakla, deri yolu ile ve TRF'ne maruz bırakılmış besinlerin tüketilmesi ile vücuda alınabilmektedir.⁽⁵²⁾

İnsandaki zehirlenme belirtileri: Yüksek ateş, baş dönmesi, baş ağrısı, bulantı, solunum güçlüğü, taşikardiye neden olmaktadır. İnce bağırsak ya da sindirim sistemindeki mekanizması azotlu (nitro NO₂) iyonlarla ve aminlerle bağlantılıdır. Absorbe edilen TRF güçlü bir şekilde metabolize edilir. Öncelikli olarak azot yüklü olanlar reaksiyona girer ve son

olarak tamamen idrarla atılır. Köpek ve sıçanlarda yapılan çalışmalar, TRF'nin %20'sinin üre içinde atıldığını göstermektedir, Bu oranın %90'ı da ilk üç günde idrar ile atılmaktadır. Uygulanan oral dozun %75-80 kadarı köpek ve sıçanlarda feçeste gözükür, değişime uğramayan TRF ise %8 oranındadır. Yaşam boyu 0,0075 mg/gün TRF ye maruz kalınması durumunda kanserojen etki yaptığı yapılan çalışmalarla bildirilmiştir.⁽⁴⁶⁾

3.4. Apopitoz

Apopitoz; organizmanın ihtiyaç duymadığı, biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlı hücrelerin, zararsız bir şekilde ortadan kaldırılmasını sağlayan genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür.⁽⁵³⁾

Apopitoz 1842 yılında Vogt tarafından hücrelerin normal gelişimleri sürecinde meydana gelen ölüm olarak tanımlanmıştır. Programlanmış hücre ölümü terimi ilk kez 1965 yılında kullanılmıştır. Apopitoz terimi ise ilk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır. Yunanca bir kelime olan *apoptosis* apo = ayrı, ptosis = düşen kelimelerinden oluşur ve ağaçtan düşen yapraklar olarak tarif edilmiştir.⁽⁵⁴⁾ Kerr fizyolojik olarak ölü hücrelerin çekirdeklerinde yoğun kromatin parçalarını ve bu hücrelerin organellerinin iyi korunduğunu gözlemleyerek bu olayı büzüşme nekrozu olarak adlandırmıştır.⁽⁵⁵⁾

Apopitoz canlıların bazı doku ve hücrelerinde sürekli olmakta ve ömür boyu devam etmektedir. Günde yaklaşık bir milyon hücre apopitoza uğrayarak ölür ve yerine yeni hücreler yapılır. Bu hızda bir hücre ölümü ve yeniden yapımı bir insanın vücut ağırlığının her 24 ayda bir yenilenmesi anlamına gelir.^(56,57)

Fizyolojik Olaylar

- Embriyogenez ve metamorfoz sürecinde (Müller ve Wolf kanallarının involüsyonu, alp gibi bazı içi boşluklu organların lümenlerinin oluşması).
- Vertebraların nöron gelişimi sırasında. Barsak kripta epiteli gibi sürekli proliferasyon gösteren hücre gruplarında hücre sayısının dengelenmesinde.
- Menstruel siklusta endometriyum hücrelerinde, menapozda folikül atrezisi, laktasyonun kesilmesinden sonra meme bezlerinin rejenerasyonu gibi olaylarda.
- T lenfositlerinin kontrolünde, matür T lenfositlerinin antijene bağımlı düzenlenmesinde, immatür B lenfositlerinin gelişi gibi immun sistemin düzenlenmesinde.

- Epidermisin en üst tabakası olan stratum korneumun sürekli dökülüp yenilenmesinde görülür⁽⁵⁸⁾

Patolojik Olaylar

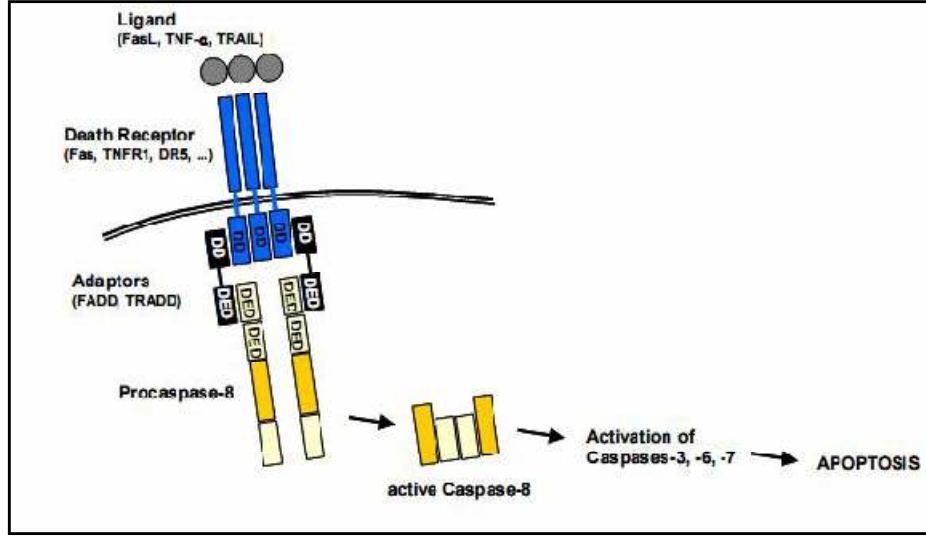
- Her türlü neoplastik oluşumda, hipertermi, düşük doz sitotoksik ilaçlar, iyonize radyasyon, hafif travma, hafif hipoksi gibi hafif şiddette fiziksel ve toksik uyaranlara maruz kalan dokularda.
- Hormonlara bağlı dokularda patolojik atrofide, otoimmün hastalıklar sitotoksik T hücreleri ile oluşturulan hücre ölümünde.
- Pankreasta ve böbrek tübüllerindeki gibi parankimden zengin dokularda duktus tıkanması sonrası patolojik atrofide apoptoz görülmektedir.⁽⁵⁸⁾

Apoptoz süreci; hücre membranı tarafından ölüm sinyallerinin alınmasıyla (ekstrensek), DNA hasarına genlerin yanıtıyla (intrensek) veya proteolitik enzimlerin doğrudan hücreye girişiyle (Perforin – Granzim) 3 farklı şekilde gelişebilir.⁽⁵⁹⁾ Özetle apoptoz mekanizmasındaki 3 temel grup ölüm reseptörleri, adaptör proteinler ve proteolitik enzimlerdir.⁽⁶⁰⁾ Apoptozda görevli en önemli reseptör grubu TNF reseptör (TNFR) ailesidir. Bu reseptör ailesinden bazıları apoptoza neden olurken bazıları da hücrelerin proliferasyonunda görev alır. TNFR içinde apoptoza neden olan reseptörlerden en önemlileri Fas ve TNFR1'dir.

Diğer ölüm reseptörleri ise DR3, DR4, DR5 ve DR6'dır. Bu reseptörler Fas ligand, DR3 ligandı veya TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) olarak isimlendirilen ligandlarıyla stimule edildiğinde, hücrenin sitoplazmasında bulunan parçaları, adaptör proteinlere bağlanırlar. Adaptör proteinlerin ölüm efektör parçaları ise kaspazlara bağlanıp kaspaz kaskadını aktive ederler.⁽⁶¹⁾

Fas ligandının, hücre yüzeyindeki Fas reseptörüne (CD95, APO-1) bağlanması ile Fas reseptörünün hücre içindeki parçası, Fas adaptör proteiniyle (FADD-Fas adapter protein with a death domain) birleşerek apoptozu indükleyen sinyal kompleksini (DISC-Death inducing signal complex) oluşturur. Bu da prokaspaz 8'in aktifleşmesini sağlar.

TNF'nin, reseptörleriyle (TNFR1) bağlanması sonucunda da reseptörün hücre içinde bulunan parçası, TNFR adaptör protein (TRAAD-TNFR adapter protein with a death domain) ile etkileşir. TRAAD daha sonra FAAD ile birleşerek prokaspaz 8'i aktive ederek apoptoza neden olur (Şekil 4).



Şekil 4: Reseptör aracılı Kaspaz aktivasyonu.

Sitotoksik T lenfositlerin aracılığıyla meydana gelen apoptoz ise sitotoksik T lenfositlerin yabancı antijeni tanımasıyla yüzeylerinde oluşan Fas ligandının, hedef hücrelerin Fas reseptörlerine tutunmasıyla başlar.⁽⁶¹⁾ Sitotoksik T lenfositlerin ve doğal katil hücrelerin sitoplâzmalarında perforin ve granzimler (serin proteaz) adlı proteinleri içeren salgı granülleri bulunur. Sitotoksik T lenfositlerin yüzeyindeki reseptör hedef hücreye bağlandığında, hücre içi kalsiyum seviyesinde artış meydana gelir. Granzim B, reseptör aracılığı ile bir vezikül içinde açılan delikten hedef hücreye girer. Hücre içine giren perforin proteini, vezikülden granzim B'nin serbest kalmasını sağlar. Serbest kalan granzim B hızlı bir şekilde DNA parçalanmasını ve prokaspaz aktivasyonunu başlatır. Aynı şekilde granzim A'da, perforinle sinerjik olarak kaspaz bağımsız apoptozda rol alır.^(62.63) Ancak bu mekanizma ile sağlıklı komşu hücrelerin de apoptoza gitme riski artmaktadır.⁽⁵⁶⁾

Hücre İçi Proteazların (Kaspazların) Aktivasyonu

İç ve dış sinyallerle hücre içinde bulunan bir grup proteaz aktive olur. Bu proteazlara kaspaz (caspase=cysteine-containing aspartate specific proteases) adı verilir. Kaspazlar, proteinleri yalnızca aspartik asit bulunan bölgelerden keser, bu nedenle c-asp-ases adını almışlardır. Böylece kaspazların kısıtlı proteolizisi nedeniyle, hücrede lizis gerçekleşmez ve apoptotik cisimcikler oluşur.⁽⁶⁴⁾

Kaspazlar inaktif olan proenzim (zimojen) olarak salınırlar. Büyük (20 kilodalton=kDa), küçük (10kDa) ve inaktif N-terminal prodomain olmak üzere üç kimyasal alandan oluşan kaspazlar iki bölünme ile tamamen fonksiyonel proteazlara aktive olurlar.

Kaspazlar başlatıcı ve sonlandırıcı olmak üzere ikiye ayrılırlar. Günümüze dek kaspaz ailesinin 14 üyesi tespit edilmiştir. Kaspaz 2, 3, 6, 7, 8, 9 ve 10 hücre ölümüyle ilişkilidir. Bunlardan en yaygın ve apoptozdan asıl sorumlu olanı kaspaz 3'tür. Kaspaz 14 ise sadece deride bulunmaktadır.⁽⁶¹⁾

Kaspaz aktivasyonunda iki önemli uyarı yolu vardır. Biri ölüm reseptörleri aracılı ekstrinsik yol, diğeri ise mitokondri aracılı-intrinsik yoldur. Başlatıcı kaspazlar aktive edilince zincirleme olarak diğerkaspazlar aktive olur. İç sinyallerle oluşan apoptozda mitokondri daha önce anlatıldığı gibi önemli rol oynamaktadır.⁽⁶¹⁾

Apoptotik programın merkezi bileşeni kaspazlardır. Kaspaz aktivasyonu hücreye özgüdür ve kaspaz inhibitörlerinin (IAP) efektör kaspazları inhibe ederek apoptozu engellediği gösterilmiştir.⁽⁶⁵⁾ Ayrıca IAP (Inhibitors of Apoptosis) ailesinin kaspazlardan ayrı olarak transkripsiyon faktörlerin modülasyonu ve hücre siklusunun kontrolünde de yer alarak apoptozu inhibe ettiği bilinmektedir.⁽⁶⁴⁾

Biyokimyasal Ve Morfolojik Değişiklikler

Apoptoz çeşitli morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerle karakterize edilebilmektedir.⁽⁶⁶⁾ İntranükleozomal DNA yıkımı, apoptozda giden hücreler için karakteristik morfolojik bir değişimdir. İntranükleozomal DNA yıkımı apoptozun biyokimyasal bir belirtecidir.⁽⁶⁷⁾ Apoptozin diğerkbir belirteci normalde hücre membranının iç yüzeyinde yerleşmiş olan fosfatidilserinin dış yüzeye çıkmasıdır. Böylece makrofajlar tarafından tanınma sinyali verilmiş olur.⁽⁶⁸⁾

Morfolojik değişikliklerin ilk belirtisi apoptotik kromatin yoğunlaşmasıdır.⁽⁶⁷⁾ Hücreler diğerk hücrelerle olan bağlantılarını kaybederler. Su kaybederek küçülür ve büzülürler. sitoplazmaları yoğunlaşır ve organeller birbirlerine daha yakın konumlanırlar. Bazen ribozomlarda çökme gözlenir. Sitoplazmada yüzeye paralel yerleşimli mikrofilaman kümeleşmeleri ve endoplazmik retikulumda geçici genişlemeler görülür. Genellikle mitokondriler yapılarını korurlar. Apoptotik süreç ilerledikçe hücre membranla çevrili sitoplazmik parçalara bölünür. Bunlara 'apoptotik cisim' adı verilir.⁽⁶⁸⁾

3.5. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türevleri

Hücrelere giren oksijen, %1-4 oranında reaktif oksijen türlerine (ROS) dönüşmektedir. Bu içeriğin bazıları dış orbitallerinde bir ya da daha fazla ortaklanmamış elektron içeren kimyasal yapılardır ve 'serbest radikal' olarak adlandırılmaktadır.⁽⁷⁰⁾ Bu serbest radikaller,

vücuttaki kayıp elektronlarını bulmak için dolaşırlar ve çeşitli maddelere atak yaparak bunları deformasyona uğratarak aşındırırlar. Eşlenmemiş elektrona sahip bu moleküller elektronunu başka bir moleküle vererek veya elektron alarak daha kararlı hale geçme eğilimindedirler. (71.72.73.74)

Biyolojik Sistemlerdeki Radikallerin Sınıflandırılması

Biyolojik sistemlerdeki radikaller; oksijen kaynaklı (Süperoksit anyon radikali, hidroksil radikali, hidrojen peroksit, singlet oksijen), karbon kaynaklı (Triklorometilperoksil radikali), nitrojen kaynaklı (Nitrik oksit (NO) ve fenilhidrazin radikali) sülfür kaynaklı olabilirler. Ayrıca transian metal kompleksleri ve Fosfor merkezli radikallerinde bulunduğu bildirilmiştir. (72)

Reaktif Oksijen Türleri

Organizmalar için serbest radikallerin başlıca kaynağı moleküler oksijendir. Biyolojik sistemlerde büyük öneme sahip serbest radikaller oksijenden oluşan radikallerdir. Serbest radikaller aynı zamanda oksidan moleküller, serbest oksijen radikalleri veya reaktif oksijen türevleri (ROS) olarak da adlandırılmaktadır. Normal metabolizma sürecinde oluşan oksidasyon - redüksiyon olayları sonucunda ROS'un biyolojik bozukluklara neden olmamasına rağmen; iskemi, inflamasyon, radyasyon, elektromanyetik alan, hiperoksi vb. durumlarda daha fazla üretilmeleri sonucu membranlar, nükleik asitler, polisakkaritler ve enzimler üzerinde farklı etkiler yaparak, değişik derecelerde çeşitli dokularda hasara yol açmaktadırlar. (75.76) Bunlar (radikaller) ve (radikal olmayanlar) olarak iki grupta toplanabilirler (Şekil 5).

RADİKALLER	RADİKAL OLMAYANLAR
Süperoksit anyon radikali(O ^{·-})	Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)
Hidroksil radikali (OH [·])	Singlet oksijen (O ₂)
Peroksil radikal (ROO [·])	Lipid hidroperoksit (LOOH)
Alkoksil radikal (RO [·])	Peroksinitrit (ONOO [·])
Organik peroksit radikali (RCOO [·])	Hipokloröz asit (HOCl)
Organik radikaller (R [·])	Hipohalöz asit (HOX)
Semikinon radikal (HQ [·])	Azot dioksit (NO ₂)
Nitrik oksid (NO)	Ozon (O ₃)
Hemoproteine bağlı serbest radikaller	N-halojenli aminler (R-NH-X)

Şekil 5: Reaktif Oksijen Türevleri

Radikaller elektron eksiklikleri nedeniyle başlıca moleküllerle kolayca elektron alışverişi yapabilirler. Radikal olmayanlar ise elektron eksiklikleri olmadığı halde başka moleküllerle daha zayıf bir şekilde birleşirler.

Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)

Biyolojik sistemlerde en fazla oksijeni taşıyan serbest radikalidir. Bu radikalın en önemli kaynakları mitokondri, kloroplast ve endoplazmik retikulum elektron transport zincirinden sızan elektronlardır. Çoğu aerobik hücrelerde O_2 'nin bir elektron alarak indirgenmesiyle kararsız bir yapı olan ($O_2^{\cdot-}$) radikali oluşmaktadır. ^(71.74.77)

Süperoksit radikali, organizmaya direk zarar vermese de bir hidrojen peroksit kaynağıdır.

Ayrıca nitrik oksit ile reaksiyona girerek reaktif oksijen türevi olan peroksinitriti ($ONOO^{\cdot-}$) oluşturmaktadır.

Süperoksit radikalının başlıca kaynakları: ^(77.78)

- Elektron transport zincirindeki elektron sızıntıları,
- Sitokrom P450 tarafından O_2 'nin bir elektron indirgenmesi,
- Aktive fagositler,
- Ksantin ve hipoksantin'in ksantin oksidaz tarafından oksidasyonu,
- NADPH'nin NADPH tarafından oksidasyonu,
- Dopamin, epinefrin, norepinefrin gibi biyolojik aminlerin otooksidasyonu,
- Arjinin ve tetrahidrobiopterin defektif olduğu zaman eNOS ve nNOS tarafından O_2 'nin bir elektron alarak indirgenmesi,
- İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu da $O_2^{\cdot-}$ meydana getirebilir.

Hidrojen Peroksit (H_2O_2):

H_2O_2 normalde serbest radikal değildir. Fakat serbest elektron içermesi, serbest hidroksil radikali oluşturabilmesi ve hücre membranlarına kolaylıkla girebildiği için önemlidir. H_2O_2 geçiş metal iyonlarının varlığında kolayca parçalanarak yüksek oranda toksik olan hidroksil radikalini oluşturmaktadır. ^(71.79)

SOD aktivitesi sonucu ortaya çıkan H_2O_2 ; katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimleri ile su ve oksijene dönüştürülür.

Hidroksil Radikali (OH⁻):

Hemen hemen çoğu molekülle reaksiyona girdiğinden oldukça reaktiftir. Oksidatif streste en güçlü radikal olarak bilinir. OH⁻, DNA hasarına ve iyonize radyasyonun membranlara zarar vermesine neden olur. Ayrıca tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden proton kopmasına ve yeni radikallerin oluşmasına neden olmaktadır. Lipid peroksidasyon sürecini de başlatmaktadır. ⁽⁷¹⁾

Singlet Oksijen (O₂):

Serbest radikal olmamasına rağmen serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına neden olduğu için önemlidir. Süperoksit radikalının dismutasyonu ve hidrojen peroksitin hipoklorit ile reaksiyonu sonucunda da oluşabilir. ^(71.80)

Serbest radikallerin endojen ve eksojen olmak üzere başlıca iki önemli kaynağı vardır;

➤ Eksojen Kaynaklar:

• Çevresel kaynaklı; hiperoksijenasyon, pestisitler, sigara, solventler, anestezipler, hava kirliliği, manyetik alan

- Radyasyon, stres
- Alkol, uyuşturucu, karsinojen maddeler, sıcak şoku güneş ışınları
- Antineoplastik ajanlar; nitrofurantoin, bleomisin, adriamisin vb.

➤ Endojen Kaynaklar:

• Küçük moleküllerin otooksidasyonu; tioller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler, tetrahidropterinler, antibiyotikler vb. ^(71.73.81.82)

• Çözünür enzimler ve proteinler; ksantin oksidaz, flavoprotein dehidrogenaz, triptofan dioksijenaz, dihidroorotat dehidrogenaz, aminoasit oksidaz gibi enzimler, hemoglobin vb. ^(71.83)

• Mitokondrial elektron transportu

• Endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemleri; sitokrom P 450, sitokrom b5. ^(71.83)

• Peroksizomlar; oksidazlar, flavoproteinler

• Plazma membranı; lipoksijenaz, NADPH oksidaz, prostaglandin sentetaz, lipid peroksidasyonu.

- Oksidatif stres oluşturan durumlar; iskemi, travma, intoksikasyon.

- Aktive olmuş fagositlerdir.

Serbest Radikallerin Etkileri

Antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz kaldığı durumlarda serbest radikaller membran lipidleri, DNA, karbonhidratlar, proteinler ile reaksiyona girerek hücre hasarına ve hücre ölümüne neden olurlar. ^(84.85.86.87)

Proteinlere Etkileri

Proteinler aminoasit kompozisyonlarına bağlı olarak serbest radikal hasarından etkilenirler. Triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi aminoasitlere sahip proteinler serbest radikal hasarına açıktırlar. ^(71.88)

Nükleik Asitler ve DNA Üzerine Etkileri

Serbest radikaller DNA'nın nukleotid yapısını oluşturan purin ve pirimidin bazları üzerine etki ederek DNA yapısında mutasyon, karsinogenez ve hücre ölümüne yol açabilirler. Guanin bazının radikaller tarafından hidroksilasyonu DNA molekülünün yapısı değişerek mutasyonlar oluşmaktadır. Hidroksil radikali deoksiriboz ve bazlarla reaksiyona girerek yapılarında değişikliklere yol açar.

Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan H₂O₂ hücre çekirdeğine ulaşarak hücre disfonksiyonuna DNA hasarına ve hatta hücre ölümüne neden olabilir. ^(71.89)

Karbonhidratlara Etkileri

Fizyolojik pH ve sıcaklıkta glikoz gibi monosakkaritlerin oksidasyonu H₂O₂, peroksitler ve okzoaldehidler oluşmaktadır. Okzoaldehidler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme özelliğinde olduğu için antimitotik etki göstererek kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynar. ^(71.90)

Membran Lipidleri Üzerine Etkileri (Lipid Peroksidasyonu)

Hücre membranındaki lipidler serbest radikallere karşı oldukça hassastırlar. Lipid peroksidasyonu membran yapısını oluşturan fosfolipid, glikolipid, gliserid ve sterol yapısındaki poliunsature yağ asitlerinin (PUFA), reaktif oksijen türleri tarafından peroksitler, alkoller, aldehitler, hidroksi yağ asitleri, etan, pentan gibi sekonder ürünlere yıkılma reaksiyonudur ⁽⁷⁸⁾. Lipid peroksidasyonu dejeneratif bir süreçtir ve zincirleme reaksiyonlar şeklinde ilerleyerek membranlarda geri dönüşümsüz hasarlara neden olur. ^(71.89)

Lipid peroksidasyonu oldukça zararlı bir reaksiyondur. Membran yapısına direk olarak, reaktif aldehytler üreterek de indirekt olarak da hücre bileşenlerine zarar verir. Lipid radikalleri hidrofobik yapıda olduğundan reaksiyonların çoğu membrana bağlı moleküllerle meydana gelir. Membran permeabilitesi büyük oranda etkilenir. Peroksidasyonla oluşan malondialdehit (MDA), membran komponentlerinin çapraz bağlanmasına sebep olur. Bu da hücre membranında deformasyon, enzim aktivitesi, iyon transportu, hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir. MDA'nın bu etkileri karsinojenik, genotoksik, mutajenik olduğunun bir göstergesidir. ⁽⁷¹⁾

Tüm bu etkilerinden dolayı serbest radikaller, çoğu hastalığın patogenezinde rol oynamaktadır. Diyabet, ateroskleroz, kardiovasküler hastalıklar, hipertansiyon, kanser, deri kas, göz hastalıkları, Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklar, romatoid artrit, çeşitli immun hastalıklar ile yaşlılık gibi birçok hastalık durumunda serbest radikal üretimi artmakta ve antioksidan savunma mekanizmaları yetersiz kalmaktadır. ^(86.87.92.93.94)

Fakat bu hastalıkların çoğunda hastalıklarının sebebinin serbest radikallerden dolayı olup olmadığı tam olarak bilinmemektedir.

3.6. Antioksidanlar ve Savunma Sistemleri

Antioksidanlar, serbest radikallerin vücutta oluşturduğu hasarları önlemek amacıyla geliştirilmiş savunma sistemleridir. Reaktif oksijen türlerine karşı koruma, oluşan radikallerin detoksifiye edilmesi, radikal zincir reaksiyonlarının ve radikal oluşumunun engellenmesi ile sağlanmaktadır. ⁽⁹⁵⁾

Antioksidanlar peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid preoksidasyonunu inhibe ederler. Antioksidanları, doğal (endojen) ve eksojen kaynaklı olmak üzere iki grupta toplayabiliriz. ⁽⁹⁶⁾

Doğal Antioksidanlar (Endojen)

- Enzimler: Mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon transferaz
- Enzim olmayanlar:
 - Lipid fazda bulunanlar: Alfa-tokoferol ve beta-karoten
 - Sıvı fazda bulunanlar: Askorbik asit, melatonin, urat, sistein, ferritin, albümin, bilirubin, serüloplazmin, transferrin, laktoferrin, miyogloblin, hemogloblin, glutatyon

Eksojen Antioksidanlar

- Ksantin oksidaz inhibitörleri: Allopürinol, oksipürinol, folik asit.
- Soya fasülyesi inhibitörleri
- NADPH oksidaz inhibitörleri: Adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, non-steroidal antiinflamatuvar ilaçlar
- Rekombinant superoksid dismutaz
- Diğer nonenzimatik serbest radikal toplatıcıları: Mannitol
- Demir redoks döngüsü inhibitörleri: Desferrioksamin
- Nötrofil adhezyon inhibitörleri

Gıda Antioksidanlar

- Butylated hydroxytoluene (BHT)
- Butylated hydroxyanisole (BHA)
- Sodyum benzoat
- Ethoxyquin
- Propyl gallate
- Demir-superoksid dismutaz

Antioksidan etki tipleri:

- Toplayıcı (scavenging) etki: Serbest oksijen radikallerini tutma veya daha zayıf yeni bir moleküle çevirme etkisidir.
- Bastırıcı (quancher) etki: Serbest radikallerle etkileşme sonrasında, onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan ya da inaktif şekle dönüştüren etki şeklindedir.
- Zincir kırıcı (chain breaking) etki
- Onarıcı (repair) etki. ⁽⁹⁷⁾

4. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Biriminden (DETFAB) temin edilen, Wistar suşu toplam 30 erkek sıçan (200-250gr) kullanıldı. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda, Wistar suşunun bulunması ve literatür ile uyumlu olması nedeniyle bu tür seçildi. Tüm hayvanlar deney sonlanıncaya kadar Deney Hayvanları Laboratuvarlarında 12/12 saat karanlık/aydınlık periyodunda, 20–22 °C oda sıcaklığında barındırıldı. Hayvanlar dinlendirilmiş musluk suyu ve standart pellet yem ile beslendi.

4 çalışma grubu oluşturuldu. Deney grupları aşağıdaki şekilde düzenlendi:

I. grup: Kontrol grubu: Normal ad libidum beslenen grup (n=7)(21 gün)

II. grup: Sham grubu: TRF eklenmemiş mısır yağı verilen grup (n=7). (21 gün)

III. grup: 2 g/kg/gün TRF verilen deney grubu (n=7).Yüksek Doz (YD) (21 gün)

IV. grup: 0.8 g/kg/gün TRF verilen deney grubu (n=7). Düşük Doz (DD) (21 gün)

Trifluralin, 48% lik saflıkta Zirai Mücadele Merkezi (İzmir, Türkiye)'nden elde edildi. TRF uygulaması 21 gün süre ile mısır yağı içinde çözdürülerek mide gavajı yöntemiyle verildi. Çalışmanın başında ve sonunda olmak üzere iki defa kuyruktan enjeksiyonla kan örnekleri alınarak biyokimyasal analiz yapıldı. Bu süre içinde herhangi bir nedenle deneye devam edemeyen ya da deney bitmeden yaşamı sonlanan denekler, grup sayıları korunarak deney ve istatistik kapsamından çıkarıldı. Deney sonunda eter anestezisi uygulanarak hayvanlar sakrifiye edildi. Sakrifikasyondan karaciğer ve duodenum dokuları çıkartılarak %10'luk tamponlanmış nötral formaldehid içinde fikse edildi.

TRF'nin toksik etkisine karşı araştırmacı ve personel maske ve eldiven kullanıldı. Toksik maddelerin hazırlanması inhalasyonla zehirlenme riskine karşın çeker ocakta yapıldı. Sakrifikasyondan sonra hayvanlar ve ortaya çıkan atıklar, tıbbi atık torbalarına alınarak deney hayvanları multidisiplin laboratuvarı tarafından hastanenin imha bölümüne gönderilerek kurallara uygun koşullarda yok edildi.

4.1 Işık Mikroskopik İncelemeler

Karaciğer ve duodenumun bir kısmı ışık mikroskopik inceleme için %10'luk formaldehit solüsyonunda 24-48 saat fikse edildikten sonra fiksatifin uzaklaştırılması amacıyla 1 gece akarsu altında yıkandı. Dehidratasyon için sırasıyla %70, %80 ve %96'lık etil

alkol serilerinde 20’şer dakika; ardından 4 farklı aseton serisinde 20’şer dakika tutuldu. Şeffaflaştırma amacıyla 30’ar dakika iki farklı ksilene tabi tutulduktan sonra 1’er saatlik 2 kez parafin ile immersiyonu sağlandı sonra ise dokular parafin bloklar içerisine gömüldü (Şekil 6). Rotary mikrotom (RM 2255, Leica) aracılığı ile 5µ’luk parafin kesitler alındı.

İşlem	Madde	Süre
Fiksasyon	%10’luk Formaldehit	24-48 Saat
Fiksatiften Uzaklaştırma	Akarsu	1 Gece
Dehidratasyon	%70’lik Alkol	20 dk.
“	%80’lik Alkol	20 dk.
“	%96’lık Alkol	20 dk.
Post Fiksasyon	Aseton 1	20 dk.
“	Aseton 2	20 dk.
“	Aseton 3	20 dk.
“	Aseton 4	20 dk.
Şeffaflandırma	Xylol 1	30 dk.
“	Xylol 2	30 dk.
“	Parafin 1	60 dk.
“	Parafin 2	60 dk.
Bloklama	Parafin	

Şekil 6:Rutin Doku Takibi(Rutin doku takibindeki tüm işlemler 60°C etüvde gerçekleştirildi).

4.1.1 Hemotoksilen-Eozin Boyaması

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 30 dk. 60°C’lik etüvde bırakıldı. Ardından ilki 20 dk. (etüvde) diğer ikisi 10’ar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Daha sonra rehidratasyon işlemi için 2 değişim absolü alkol ve %96’dan %70’e azalan alkol serilerinden geçirdi, kesitler distle su ile çalkalandıktan sonra 10 dk. Hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyandı. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dk akarsuda yıkanan kesitler, 2 dk. Eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyandı. Boyamadan sonra sırasıyla %70, %80, %96 ve 2 seri Absolü alkol serilerinden geçirilen kesitler

şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dk üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Şekil 7).

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C Etüvde	30 dk
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (Etüvde)	20 dk
	Ksilen 2 (Oda Isısında)	10 dk
	Ksilen 3	10 dk
Rehidratasyon	Absolü Alkol	Çalkalama
	Absolü Alkol	Çalkalama
	% 96 Alkol	Çalkalama
	% 80 Alkol	Çalkalama
	% 70 Alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Hematoksilen	10 dk
Yıkama	Akarsu	10 dk
Boyama	Eosin	2 dk
Yıkama	% 70 Alkol	Çalkalama
	% 80 Alkol	Çalkalama
	% 96 Alkol	Çalkalama
	Absolü Alkol	Çalkalama
	Absolü Alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1	20 dk
	Ksilen 2	20 dk
	Ksilen 3	20 dk
Kapama	Entellan	

Şekil 7: Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü

4.1.2 Masson-Trikrom boyaması

Alınan parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakıldı. Ardından ilki 1 saat (etüvde) diğer ikisi 30'ar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Daha sonra rehidratasyon işlemi için 2 değişim absolü alkol ve %96'dan %70'e azalan alkol serilerinden geçirildi. Ve akarsuda 5 dakika bekletildikten sonra Masson Trikróm boyama seti (2049 GBL, İstanbul, Türkiye) içerisinde dokular üzerine 8 damla Weigert hematoksilen boyası ile 8 damla ferrik klorür çözeltisi damlatıldı ve 20 dakika bekletildi. 1 dk distile su ile yıkandıktan sonra 8 damla asit-alkol çözeltisi ile 1 dakika bekletilen kesitler distile suyla iyice yıkandı. Ardından 8 damla Ponceau asit fuksin azofloksin çözeltisi dokunun üzerini tamamen kaplayacak şekilde uygulandı. 5 dakika sonra uzaklaştırıldı ve 1 ml stok asit çözeltisi ve 29 ml distile su ile hazırlanan asitli su ile kısaca yıkandı. 8 damla fosfomolibdik asit turuncu G boyası ile 20 dakika muamele edildikten sonra asitli su ile yıkandı ve 8 damla açık yeşil boya ile 5 dakika boyandı. Boyamanın ardından akarsu altında yıkanan kesitler artan alkol serilerinden geçirildi. Ksilene ile şeffaflaştırma yapıldıktan sonra entellan ile kapatıldı (Şekil 8)

4.1.3 Peryodik Asit Schiff Boyaması (PAS) :

Alınan parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakıldı. Ardından ilki 1 saat (etüvde) diğer ikisi 30'ar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Daha sonra rehidratasyon işlemi için 2 değişim absolü alkol ve %96'dan %70'e azalan alkol serilerinden geçirildi, kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra 3-5 dakika periyodik asit ile boyandı. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 1-2 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 20-23 dakika schiff boyası ile boyandı. Boyamadan sonra 5 dk akarsuda tutuldu. Daha sonra dehidratasyon işlemi için sırasıyla %70, %80, %96 ve 2 seri Absolü alkol serilerinden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dakika üç değişim ksilene tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı. (Şekil 9)

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C Etüvde	1 Gece
Deparafinizasyon	Ksilen 1-2-3	30 x 3 dk
Rehidratasyon	% 96-80-70-60'lık Alkol	2 x 4 dk
Yıkama	Akarsu	5 dk
Boyama	No:1 + No:2 Solusyonu	20 dk
Yıkama	Distile Su	Kısaca
Diferansiyasyon	No:3	1 dk
Yıkama	Distile Su	Kısaca
Boyama	No:4	5 dk
Yıkama	Asitli Su	Kısaca
Boyama	No:6	20 dk
Yıkama	Asitli Su	Kısaca
Boyama	No:7	5 dk
Yıkama	Akarsu	Kısaca
Dehidratasyon	%80 Ve %95'lik Alkol	2 x 2 dk
Şeffaflaştırma	Ksilen	30 x 3 dk
Kapama	Entellan	

Şekil 8: Masson Trikrom boyama Protokolü

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C Etüvde	1 Gece
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (Etüvde)	1 Saat
Deparafinizasyon	Ksilen 2-3 (Oda Isısında)	30 Dakika
Rehidratasyon	%100-100-96-80-70'lik Alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	10 Dakika
Boyama	Peryodik Asit	3-5 Dakika
Yıkama	Akarsu	1 Dakika
Boyama	Schiff	20-23 Dakika
Yıkama	Akarsu	1-2 Dakika
Boyama	Hemotoksilen	1-2 Dakika
Yıkama	Akarsu	5 Dakika
Dehidratasyon	%60-70-80-96-100'lük Alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1-2-3	20'şer Dakika
Kapama	Entellan	

Şekil 9: Periyodik Asit Schiff (PAS) Protokolü

4.2 İmmünohistokimyasal İncelemeler

4.2.1 TUNEL Boyama

Işık mikroskopik inceleme için hazırlanan parafin bloklardan 5-6 µm kalınlığındaki kesitler poli lizinli lamlara alındı. Karaciğer ve duodenum dokularında TUNEL pozitif hücreleri göstermek için In situ Cell Death Detection Kit, POD, TUNEL (terminal

deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) tekniğinden yararlanıldı ve bunun için Roche® kiti (68298 Mannheim Germany cat. No. 11 684 817 910; Roche) kullanıldı. Her gruptaki deneklerin karaciğer ve duodenum doku kesitlerinden, karaciğer için X20 objektif büyütmesi ile 5000 µm²lik 10 ayrı alanda TUNEL pozitif hücreler belirlendi ve elde edilen değerlerin ortalaması her denek için hesaplandı. Elde edilen sonuçlar istatistik değerlendirmeye alındı. Duodenum dokusu için yine X20 büyütmede 100 duodenum epitel hücresi sayıldı ve TUNEL pozitif boyanan hücreler belirlenerek ortalamalar hesaplandı ve elde edilen veriler gruplar arası farkı göstermek için istatistikî değerlendirmeye alındı.

TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated Deoxyuridine Triphosphate DNA Nick-End Labelling) Boyaması:

DNA fragmantasyonu TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate DNA nick-end labelling) kiti ile gösterildi. Bu yöntemde biyotinlenmiş nükleotid, terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) enzimini kullanarak DNA'nın 3'-OH ucuna bağlanır. Daha sonra işaretlenmiş streptavidin bu biyotinlenmiş nükleotidlere bağlanır. Bu prosedüre göre fragmente DNA içeren nukleuslar koyu kahverengi olarak boyanır. DNA kırığının antikoru ile terminal uçtan işaretlenmesi esasına dayanır.

➤ Hazır kit solüsyonlarından birinci şişe Enzim solüsyonu ikinci şişe İşaretleme (Label) solüsyonudur. Boyamaya başlanmadan önce bu solüsyonların karıştırılarak TUNEL reaksiyon karışımının hazırlanması gerekir. Bunun için ikinci şişeden 100µl negatif kontrolde kullanılmak üzere ayrıldı. Kalan stok solüsyonun üzerine ilk şişeden 50µl eklendi iyice vorteksledi. Böylece 500µl lik reaksiyon karışımı elde edildi.

➤ Boyanacak alanın etrafı PapPen ile çizildi ve lamlar PBS ile yıkandıktan sonra belirlenen alana Proteinaz K konuldu ve 30 dk. oda sıcaklığında bekletildi.

➤ Preparatlar PBS ile yıkandı. Belirlenen alanın etrafındaki fazla sıvı alındıktan sonra reaksiyon karışımı dokunun tamamını kapatacak şekilde konuldu ve 60dk 37°C'de inkübasyona bırakıldı.

➤ 3 kez PBS ile yıkayıp fazla sıvısı kurulan lamaların üzerine 50µl Converted POD (3.şişe) ilave edildi ve 30dk 37°C'de inkübasyona bırakıldı.⁽⁴¹⁾

➤ Bu süre içinde bir sonraki basamakta kullanılacak olan DAB yarım saat önceden hazırlandı. Bunun için 300 µl DAB substratı 2700 µl DAB dilisyonu ile karıştırılarak ve karanlık bir yerde bekletildi.

- İnkübasyon süresi sonunda 3 kez PBS ile yıkayıp fazla suyu alınan lamın üzerine, hazırlanan DAB solüsyonunu koyulup yaklaşık 2dk beklenildi.
- Preparatlar distile suyla yıkandı. Lamaların üzerine Mayers Hematoksilen konulup 10-15 sn beklenecek zemin boyaması yapıldı ve yine distile suyla yıkandı.
- Lamalar kurumadan alkol ve ksilol serilerinden geçirilip entellan ile kapatıldı.(Şekil 10)

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C Etivde	1 Gece
Deparafinizasyon	Ksilen	30 dk
	Ksilen	30 dk
Rehidratasyon	% 95 Alkol	Çalkalama
	% 80 Alkol	Çalkalama
	% 70 Alkol	Çalkalama
	% 60 Alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	10 dk
Doku Etrafını Çizme	Dakopen	
Yıkama	PBS	3x5 dk
	Proteinaz K Solusyonu	30 dk
Yıkama	PBS	3x5 dk
Primer Antikor	Enzim Solusyonu	37°De 1 Saat
Yıkama	PBS	3x5 dk
	Convert-POD (Dönüştürücü enzim)	30 dk
Yıkama	PBS	3x5 dk
Boyama	DAB Boyası	10 dk
Yıkama	Distile Su	10 dk
Zemin Boyama	Mayer Hematoksilen	10-15 sn
Dehidratasyon	%80- %90'lık Alkol Serileri	2 dk
Şeffaflaştırma	Ksilen	30 dk
Kapama	Entellan	

Şekil 10: TUNEL boyama protokolü

4.2.2. Kaspaz 3 Boyama

İmunohistokimyasal analizler, hücre ve dokulardaki var olan özel proteinlerin belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Aşağıda belirtilen üç temel adım uygulanır:

- Primer antikor özel antijene bağlanır,
- Antijen-antikor kompleksi, bir konjugasyon enzimi yardımıyla ikinci bir antikorla bağlanır,
- Substrat ve kromojen varlığında, bu enzim antijen-antikor bağlanma bölgesinde renkli bir depozite dönüşür. Görünüm ışık mikroskopunda histopatolojik olarak değerlendirilir.

Lizimli lamlara alınan 5 µ'luk kesitler 56–60 °C da bir gece etüvde bekletildi. Şeffaflaştırma amacıyla 15'er dakika üç değişim ksilole tabi tutuldu. Sırasıyla %96, %80, %70 azalan alkol serilerinden geçirilip hidrasyon sağlanarak 5'er dakika iki değişim distile suda bekletildi. Boyanacak alanın etrafı PapPen ile çizilerek alan kısıtlandı ve dokuların PBS ile yıkandı. Kurutma kâğıdı ile PBS' i alınan dokular üzerine proteinaz K damlatılarak 37 °C de 30 dk tutuldu. Etüvden çıkarılan dokular PBS ile yıkandı. 400µl %30luk stok H₂O₂ (Hidrojen peroksit) 3,6 ml PBS (Phosphate Buffer Saline) ile karıştırılarak %3lük H₂O₂ hazırlandı. Doku üzerine damlalık yardımı ile Endojen peroksidazı inhibe etmek amacı ile 15 dakika %3'lük H₂O₂ konuldu ve 10 dk. Oda sıcaklığında bekletildi. PBS ile yıkandı. Kesitler 1 saat bloklama solusyonu (TA-125-UB, Lab Vision, Fremont, CA) ile inkübe edildi.

Bloklama solüsyonu dokudan uzaklaştırılıp yıkama yapılmadan, 1/50 oranında hazırlanmış olduğumuz primer antikor ((CPP32) Ab-4(Lab Vision, ABD, rabbit polyclonal antibody)) 1 gece +4° C de bekletildi. PBS ile yıkandı. Kesitler anti-mouse biotin sekonder antikor karışımında 30 dakika işleme alındı. PBS ile yıkandı. Kesitler anti-mouse streptavidin sekonder antikor (Kit içerisinde bulunan streptavidin solüsyonunun A şişesi ile B şişesi birebir oranında karıştırılarak elde edildi) ile 30 dakika boyandı. PBS ile yıkandı. Reaksiyonunun görünürlüğünü saptamak amacıyla 100 µl diaminobenzidine (DAB) ile boyandı. Distile su ile yıkandı. Mayyers hematoksilen ile zemin boyaması yapıldı. Artan alkol serilerinden geçirilerek (%70, %80 %96, %100' lük) dehidratasyon yapıldı. 3 kez 20 dakika ksilene ile şeffaflaştırma yapıldı. Entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldı.(Şekil 11)

Her gruptaki deneklerin karaciğer ve duodenum doku kesitlerinden, karaciğer için X20 objektif büyütmesi ile 5000 μm^2 lik 10 ayrı alanda kaspaz 3 pozitif hücreler belirlendi ve elde edilen değerlerin ortalaması her denek için hesaplandı. Elde edilen sonuçlar istatistik değerlendirmeye alındı. Duodenum dokusu için yine X20 büyütmede 100 duodenum epitel hücresi sayıldı ve kaspaz 3 pozitif boyanan hücreler belirlenerek ortalamalar hesaplandı ve elde edilen veriler gruplar arası farkı göstermek için istatistikî değerlendirmeye alındı.

4.3. Hayvan Ağırlıkları Değerlendirmesi

Deney Başlangıcında ve deney sonunda (sakrifikasyon öncesi) hayvanların Ağırlıkları ölçülüp, not edildi. Sonuçlar SPSS 15,0 Programında Wilcoxon Signed Ranks Testi kullanılarak değerlendirildi. Deneklerin ağırlıklarının başlangıç ve deney sonundaki verilerinin grup içinde karşılaştırılmasında $p \leq 0,05$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.4. Biyokimyasal İncelemeler.

4.4.1. Doku Homojenatlarının Hazırlanması

Karaciğer ve duodenumun bir kısmı alınarak biyokimyasal analizler için kullanıldı. Doku örnekleri 2 ml soğuk distile su içinde ultrasonik homojenizatörde 1 dk süreyle homojenize edildi. Homojenizasyon işlemleri sırasında örnekler buz üstünde tutuldu. Homojenat $+4^\circ\text{C}$ 'de ve 10 000 g devirde 15 dk santrifüj edildi ve süpernatandan enzim ve protein ölçümü yapıldı. Örnekler ölçüm yapılana kadar -70°C 'de saklandı.

4.4.2. MDA (malondialdehit) değerlerinin saptanması:

- Daha önceden -80°C 'deki doku homojenatları 10 dakika oda ısısında çözüldü.
- 200 μL 'lik örnekler tüplere konuldu.
- Her tüpe 10'ar μL probukol eklendi. (Bioxytech, Oxis Research, MDA 586®)
- Her tüpe 640 μL R1 solüsyonundan eklendi.
- Dikkatlice vortekslendi.
- Her tüpe 150 μL R2 solüsyonundan eklendi.
- Dikkatlice vortekslenip 45°C de 60 dakika inkübe edildi.
- Temiz bir süpernatant için örnekler santrifüj edildi (ör. 10,000 X g 10 dakika).
- Temiz süpernatant kısım ölçüm küvetine konularak spektrofotometre ile 586 nm absorbanla ölçüldü (HACH-LANGE DR 5000®).

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C Etüvde	30 dk
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (Etüvde)	20 dk
	Ksilen 2-3 (Oda Isısında)	10x2 dk
Rehidratasyon	%100-100-96-80-70'lik Alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Sınırlama	Dakopen	
	%5 Tripsin	15 dk
Yıkama	PBS	3x5 dk
	%3 H ₂ O ₂	
	Bloklama Solusyonu	1 Saat
	Primer Antikor	1 Gece +4 ⁰ C
	Tampon Solusyonu	3x5 dk
Boyama	Sekonder Antikor 1-2-3	30x3 dk
	Tampon Solusyonu	3x5 dk
Boyama	DAB	1-5 dk
Boyama	H&E	5 dk
Dehidratasyon	%80-96-100'lük Alkol Serileri	2x3 dk
Şeffaflaştırma	Ksilen 1-2-3	30x3 dk
Kapama	Entellan	

Şekil 11: Kaspaz 3 boyama prosedürü.

4.4.3. SOD (Süperoxide Dismutase) Aktivitesinin ölçümü.

SOD değerleri, SOD ticari kiti ile (Ransod, Randox international, inc), spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Doku Homojenatları kit prosedürüne göre hazırlandıktan sonra Arcitect 16000(Abbott, USA) cihazıyla spektrofotometrik olarak ölçüldü.

4.4.4. GPx (Glutathione peroxidase) aktivitesinin ölçümü:

GPx değerleri, GPx ticari kiti ile (Ransel, Randox international, inc), spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Doku Homojenatları kit prosedürüne göre hazırlandıktan sonra Arcitect 16000(Abbott, USA) cihazıyla spektrofotometrik olarak ölçüldü.

4.4.5. Kan Analizleri

Karaciğer fonksiyonlarının saptanması için deney başlangıcında ve sonunda kan örnekleri toplandı ve kaydedildi. Bu örneklerin santrifüjlenmesi(4000 X g de 10dk) ile elde edilen serum örnekleri kanların alındığı gün Arcitect 16000(Abbott, USA) cihazıyla spektrofotometrik olarak AST, ALT, ALP ve Albumin değerleri ölçüldü.

Çalışmamızda karaciğer ve duodenum dokularında, ALT, AST, ALP, Albumin, MDA, SOD ve GPX düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılmasında One Way ANOVA testini kullandık. $p < 0.05$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.4.6. Etik Kurul Onayı

Tüm bu çalışmalar DEÜ Tıp Fakültesi Deney Hayvanı Araştırmaları Etik Kurulunun 21-11-2008 tarihli ve 128 sayılı toplantısında almış olan etik onayı sonucunda gerçekleşmiştir.

4.4.7. Verilerin Değerlendirilmesi.

Çalışma sürecinde elde edilen parametrik veriler değerlendirilirken, istatistiksel analizler SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 15.0 bilgisayar paket programında yapıldı. Değerlendirmede ortalama, standart sapma, ANOVA varyans analizi, Tukey testi kullanıldı. Nonparametrik verilerde ise Wilcoxon testi kullanıldı. Tüm sonuçlarda $p < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

5.

6. BULGULAR

5.1. Işık Mikroskopik Bulgular

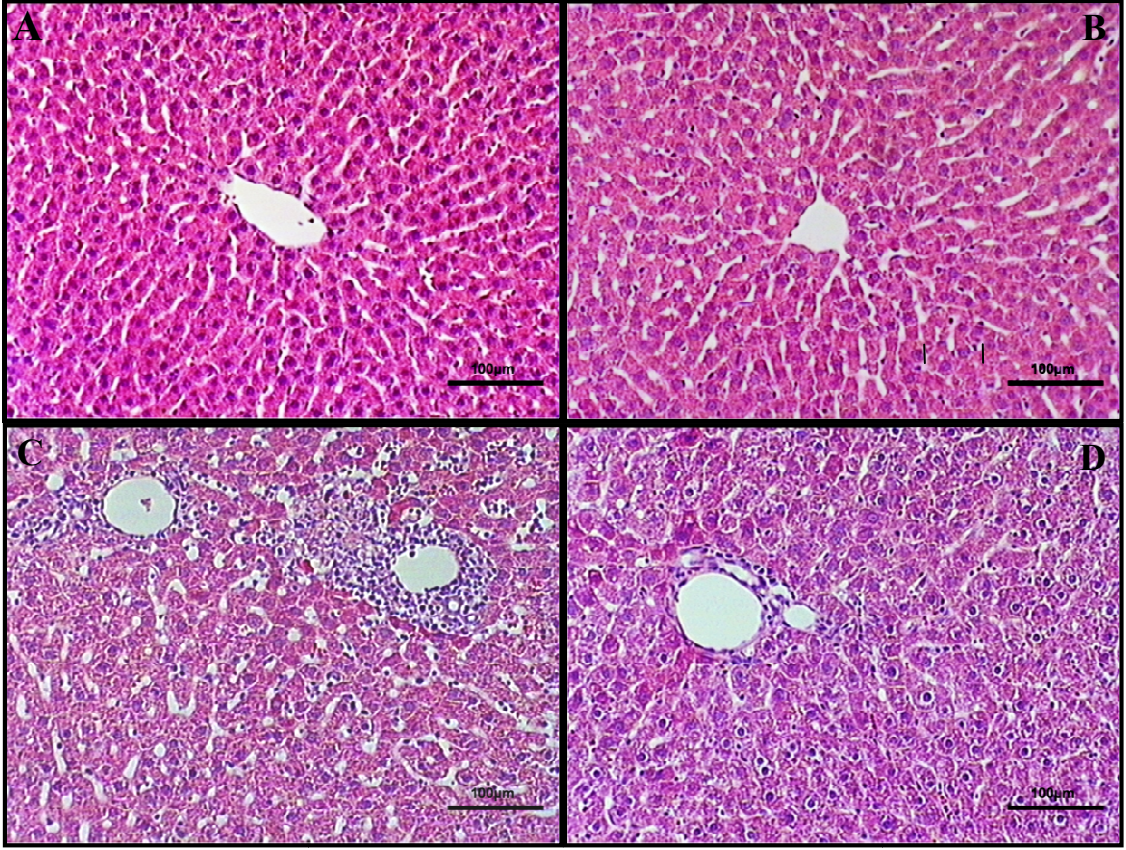
Karaciğer

Karaciğer dokusunun histolojik açıdan değerlendirilmesi için H&E boyasıyla boyayıp, bu boyanmış kesitlerin incelenmesi ile gruplar arasında farklı sonuçlar olduğu gözlenmiştir.

Çalışmamızda kontrol grubuna ait karaciğer kesitleri incelendiğinde, klasik karaciğer lobülünün ortasında vena sentralis, vena sentralisten ışınsal biçimde perifere doğru uzanan hepatosit kordonları ve bu kordonların arasında yer alan sinüzoidler izlenmiştir. Sinüzoidler normal yapıda ve genişlikte gözlendi. Hepatositlerde nukleus yuvarlak ve çoğunlukla ökromatik, sitoplazma ise eozinofilik boyanmıştır. Sinüzoidlerde endotel hücrelerinin nukleusları ise yassı ve koyu boyanmış olarak gözlenmiştir. Endotel hücrelerinin arasında ya da lümeneye bakan yüzünde tutunmuş olarak endotel hücrelerinden daha büyük, nukleusları oval ve soluk boyanan Kupffer hücrelerine rastlanmıştır. Portal alanlarda, vena porta, arteria hepatica, safra duktusu ve lenfatik damar normal olarak gözlenmiştir. Kontrol grubuna ait kesitlerde herhangi bir hücre infiltrasyonu gözlenmedi. (Şekil 12 A)

H&E boyasıyla boyanan sham grubuna ait kesitlerde, karaciğer parankiması, stroması ve portal alanlardaki bulgular kontrol grubu ile benzer yapısal özellikleri göstermektedir.(Şekil 12 B)

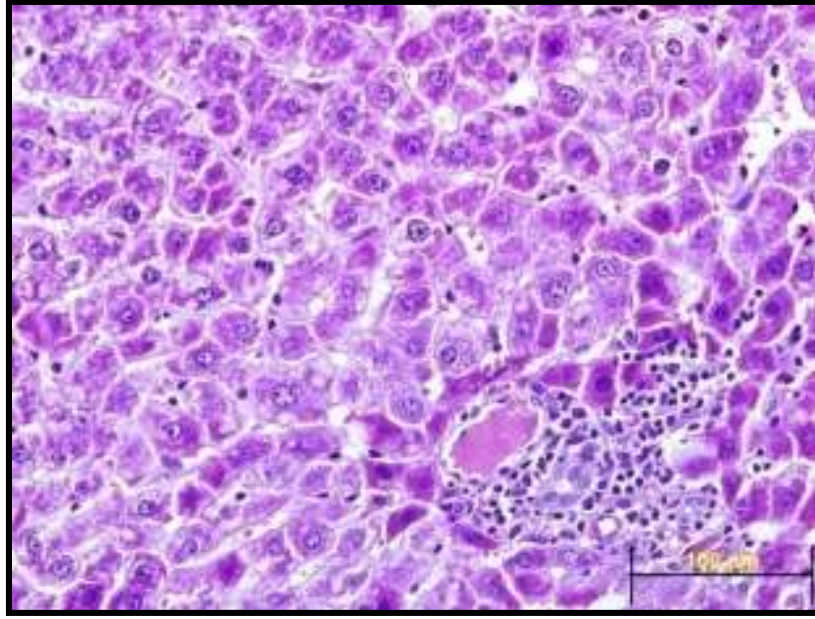
Diğer boyamalarda (Masson-Trikromve PAS) gruplara arası anlamlı farklılıklar gözlenmedi.(Şekil 15,16)



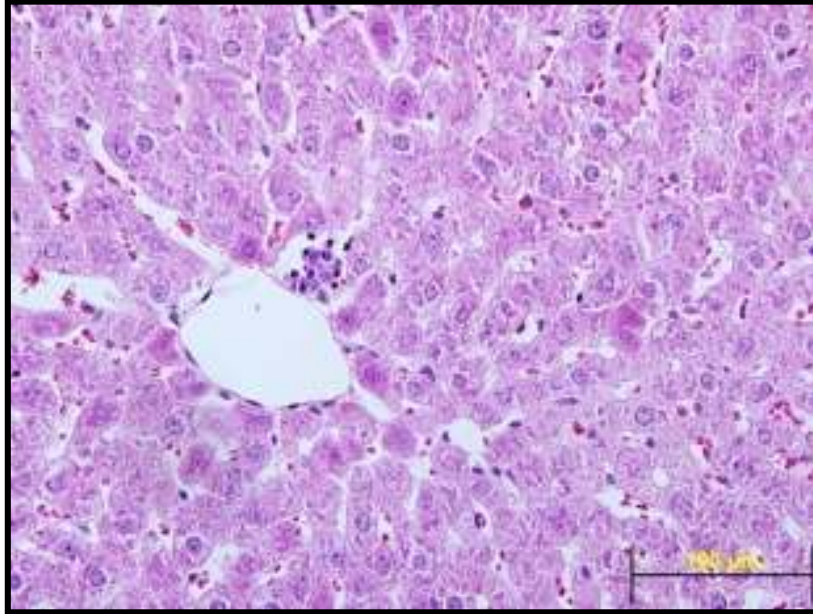
ŞEKİL 12:Karaciğer dokusu Kontrol (A) , Sham (B), YD (C) ve DD (D) gruplarına ait genel görüntüler.(H&E)

YD grubunda ise hepatosit hücre kordonlarının bütünlüğü bozulmuş, sinüzoidlerde dilatasyon, mononükleer hücre infiltrasyonu ve hepatositlerde hidrofik dejenerasyon görüldü. Ayrıca bazı bölgelerde mikrogranülom yapıları gözlendi.(Şekil 12 (C), Şekil 13)

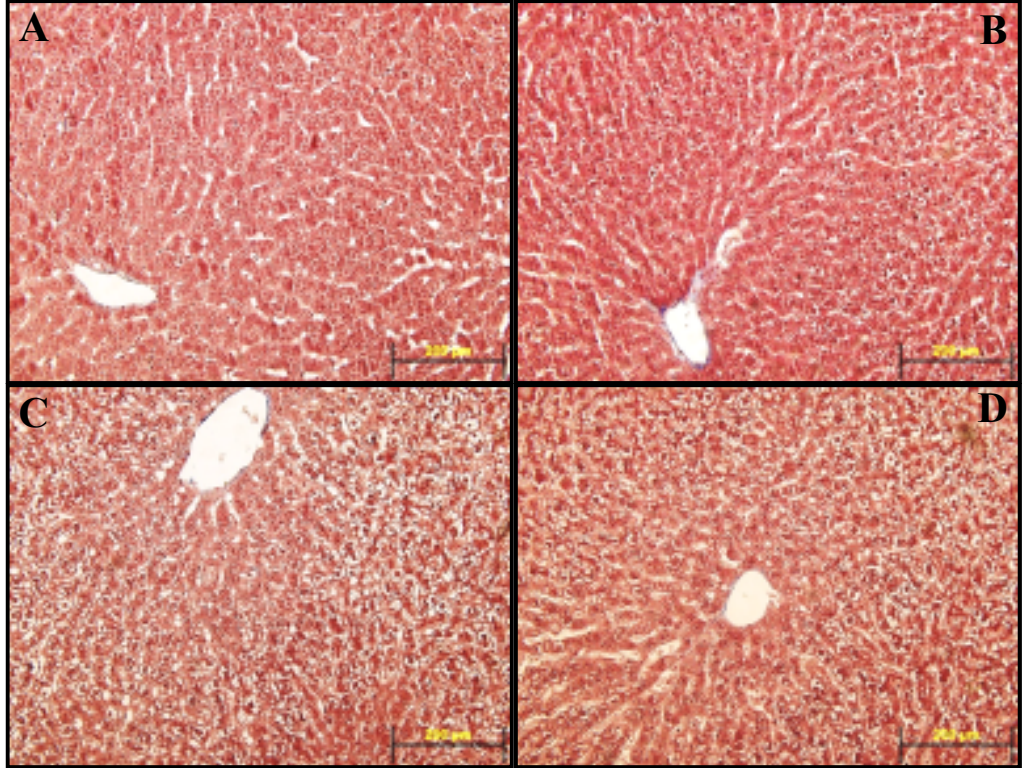
DD grubunda ise Hem YD hemde kontrol ve sham gruplarıyla kıyaslandığında YD grubuna oranla daha az yoğunlukta hücresel değişiklik ve yine az yoğunlukta mononükleer hücre infiltrasyonu gözlenmiştir.(Şekil 12 (D), Şekil 14)



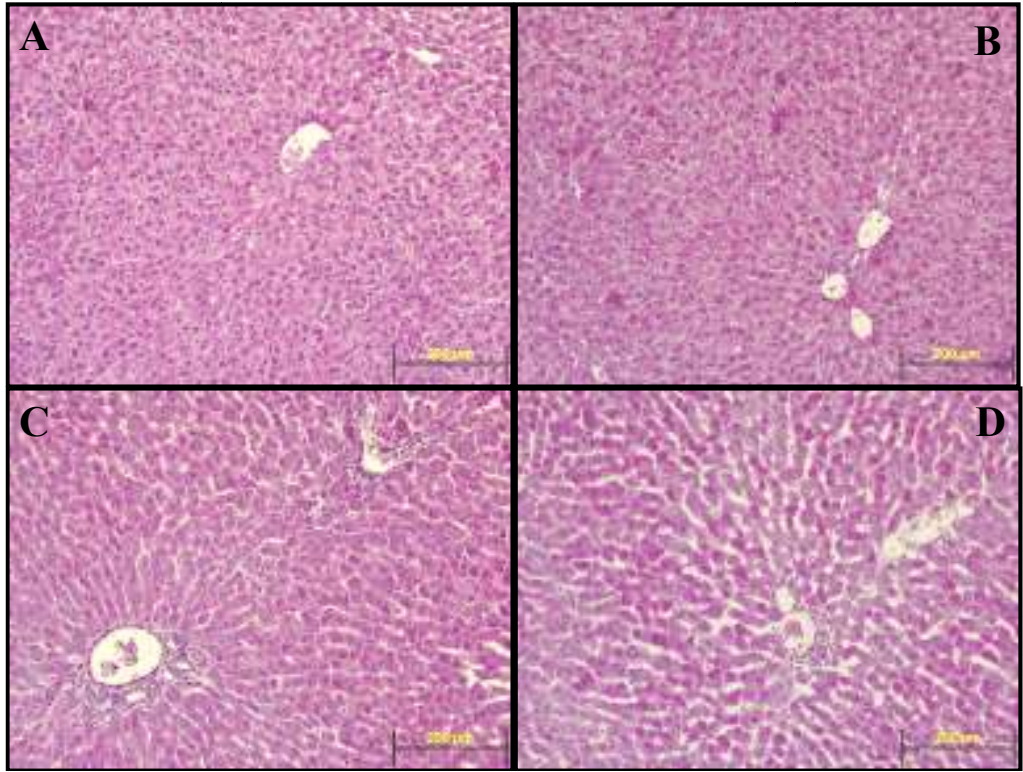
ŞEKİL 13:Karaciğer dokusu YD grubuna ait H&E ile boyanmış kesitte mononükleer hücre infiltrasyonu görüntüsü.



ŞEKİL 14: Karaciğer dokusu DD grubuna ait H&E ile boyanmış kesitte mononükleer hücre infiltrasyonu görüntüsü.



ŞEKİL 15:Karaciğer dokusu Kontrol (A) , Sham (B), YD (C) ve DD (D) gruplarına ait genel görüntüler.(Masson Trikrom)



ŞEKİL 16:Karaciğer dokusu Kontrol (A) , Sham (B), YD (C) ve DD (D) gruplarına ait genel görüntüler.(PAS)

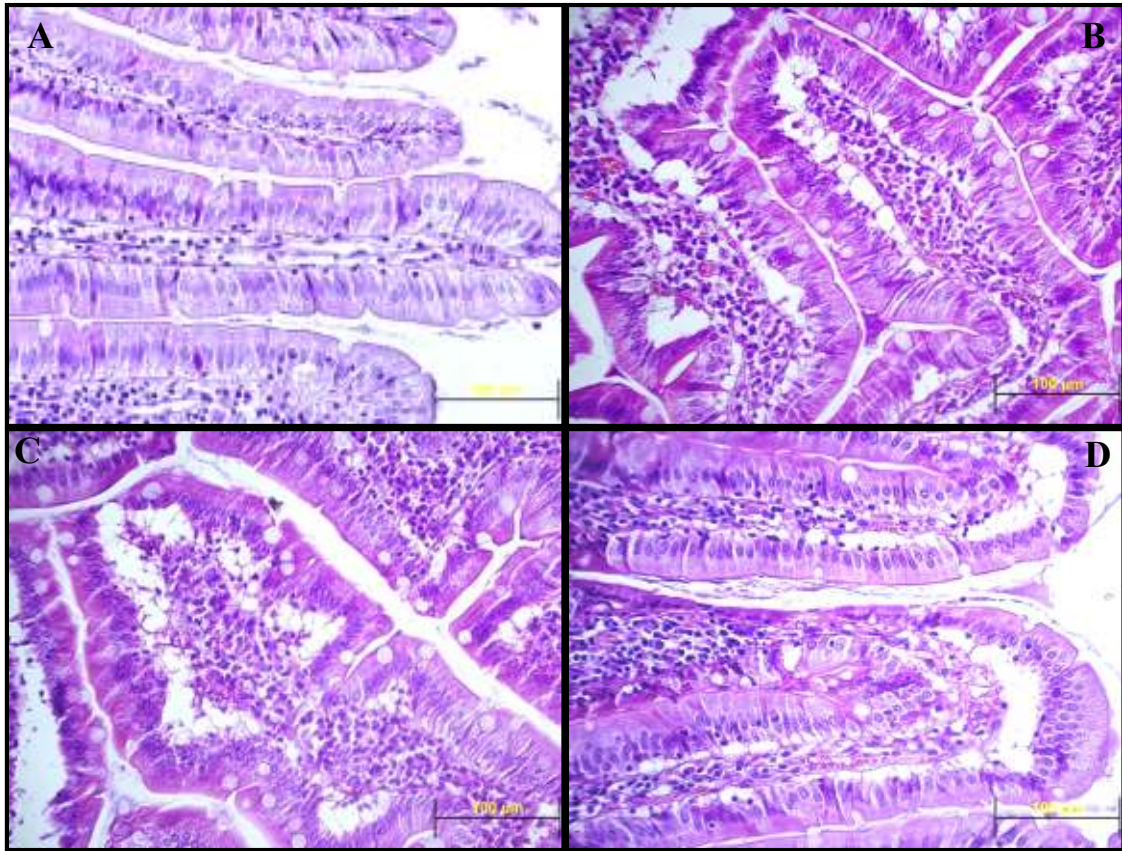
Duodenum

Kontrol grubu ratların ince bağırsaklarına ait histolojik kesitlerde herhangi bir patolojik bulguya rastlanmamıştır. İnce bağırsağı astarlayan villuslar ve bu yapıların üzerinde bulunan epitel hücreleri normal yapıda görülmektedir (Şekil 17,(A)).

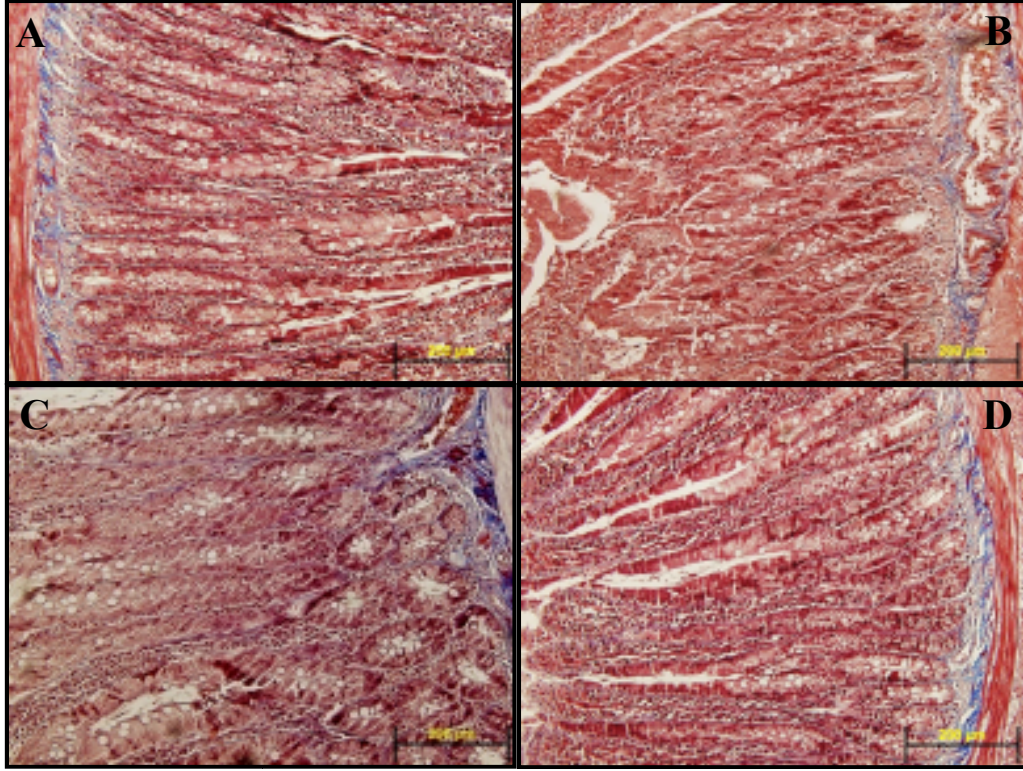
Sham grubunda kontrol grubuna göre epitel hücre bazalinde yağlı değişiklik dışında herhangi bir patolojik değişiklik görülmemiştir.(Şekil 17,(B))

YD grubunda kontrol ve sham grubuna göre L.propria artış görüldü; bu artışı belirlemek için 10 adet villüs çapı ölçüldü. İstatistiki olarak gruplar arasında lökosit infiltrasyon artışı gözlemlendi. (Şekil 20,21) Yine bu artışıda her grupta 10 ayrı alanda 100'er hücre sayıldı ve çıkan değerlerin istatistiki sonuçları değerlendirildi. Ayrıca epitel doku bazalinde yağ birikimi yoğun bir şekilde görüldü(Şekil 17(C)). Bu türdeki değişiklikler DD grubunda daha az yoğunlukta görülmüştür.(Şekil 17,(D))

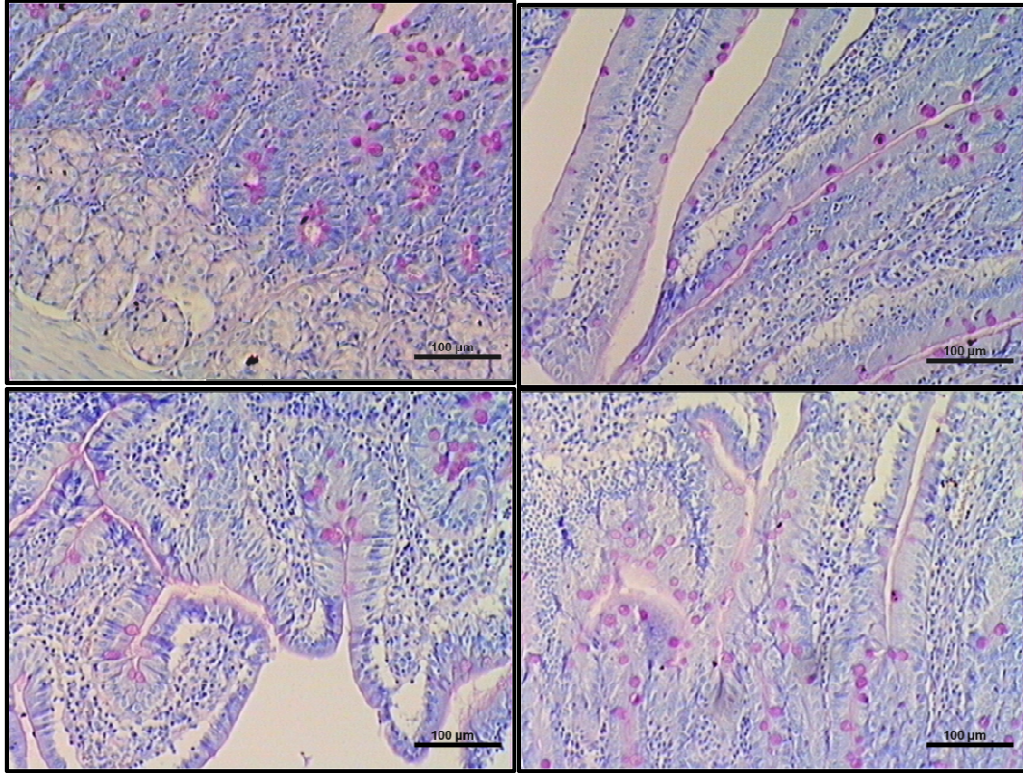
Diğer boyamalarda (Masson-Trikrom ve PAS) gruplara arası anlamlı farklılıklar gözlenmedi.(Şekil 18,19)



Şekil 17:Duodenum dokusu Kontrol (A) , Sham (B), YD (C) ve DD (D) gruplarına ait genel görüntüler.(H&E)



Şekil 18:Duodenum dokusu Kontrol (A) , Sham (B), YD (C) ve DD (D) gruplarına ait genel görüntüler.(Masson-Trikrom)

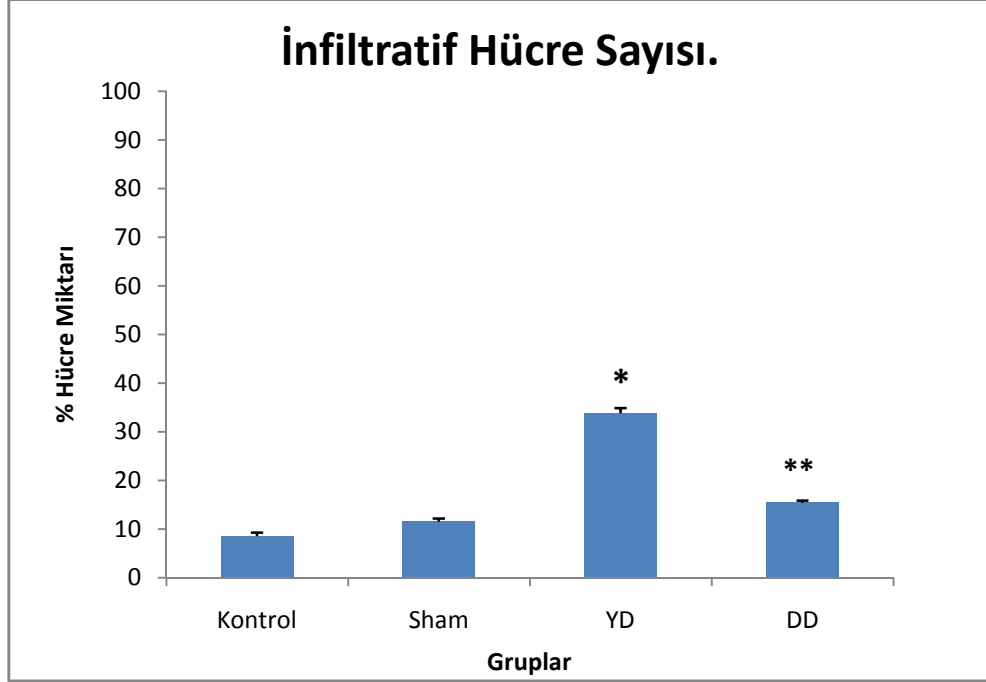


Şekil 19:Duodenum dokusu Kontrol (A) , Sham (B), YD (C) ve DD (D) gruplarına ait genel görüntüler. (PAS)

Şekil 20: Duodenum dokusunda gruplar arası lökosit infiltrasyonu

*: Kontrol grubuna göre anlamlı artış gösteren YD grubu.($p \leq 0,0001$)

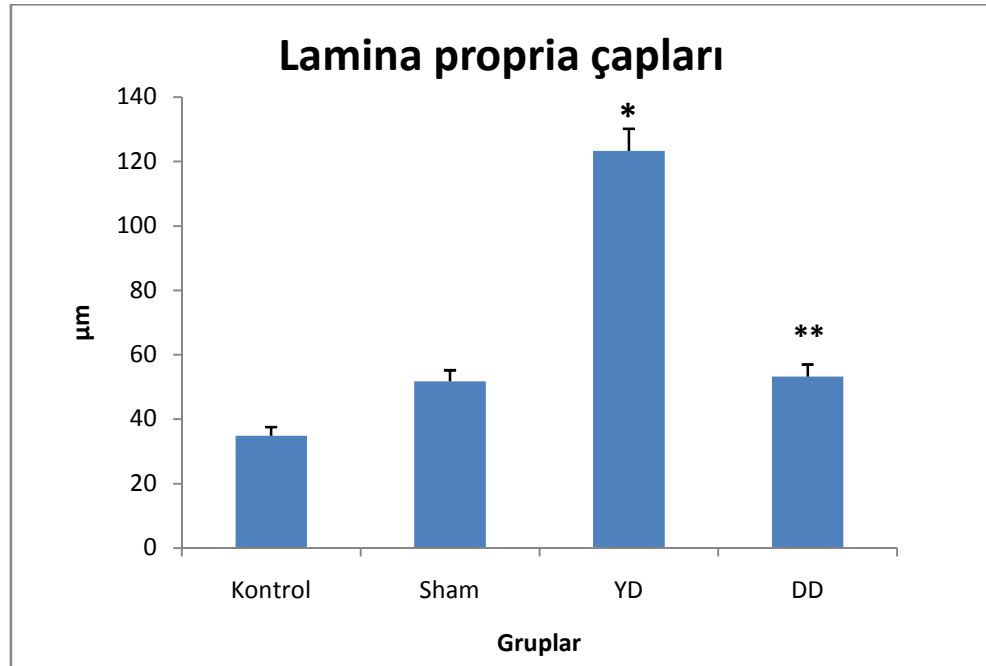
** : Kontrol grubuna göre anlamlı artış gösteren DD grubu($p \leq 0,03$)



Şekil 21: Duodenum dokusu gruplar arası L. Propria çap değerleri.

*: Kontrol grubuna göre anlamlı artış gösteren YD grubu.($p \leq 0,0001$)

** : Kontrol grubuna göre anlamlı artış gösteren DD grubu($p \leq 0,03$)



5.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

5.2.1 Tunel Boyama

Karaciğer

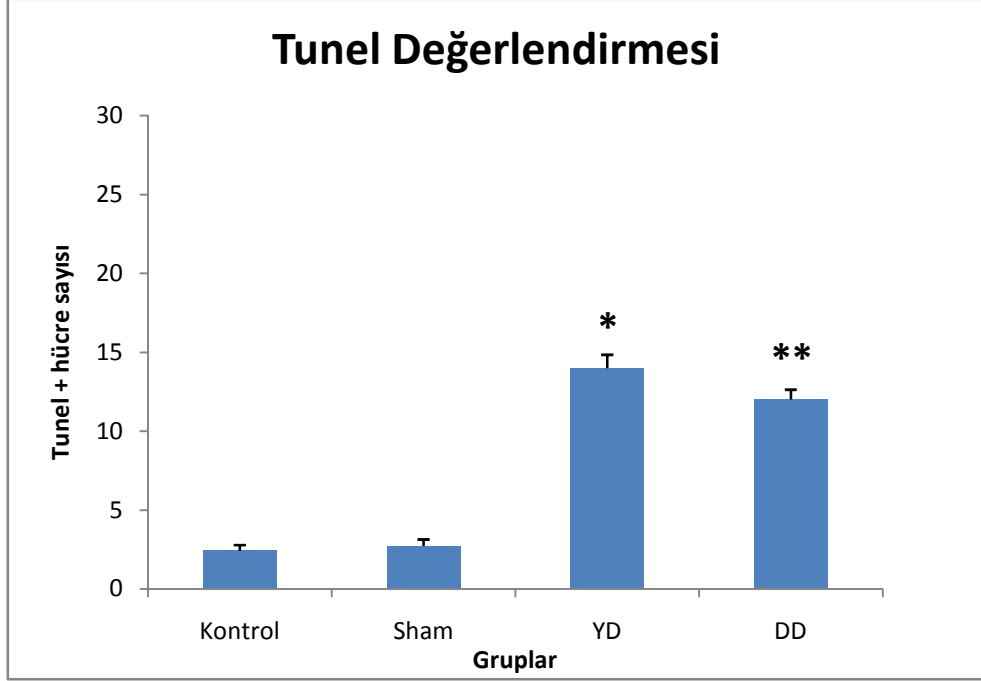
TUNEL Pozitif Hücre Sayımı

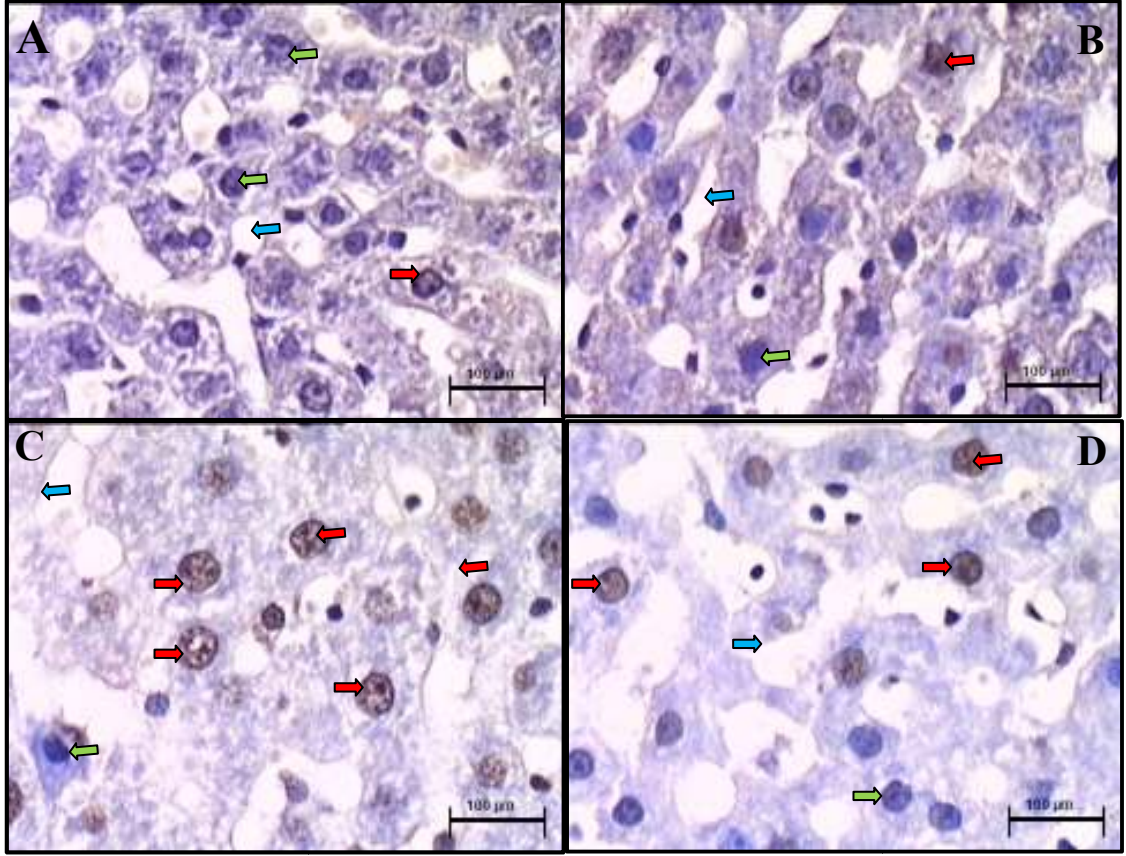
Kontrol grubuna ait doku örnekleri incelenip TUNEL pozitif hücre sayımı yapıldığında ortalaması 2.42 ± 0.36 ($5000 \mu\text{m}^2$ alanda) olarak saptandı. Sham grubuna ait doku örnekleri incelenip TUNEL pozitif hücre sayımı (TUNEL) yapıldığında ortalaması 2.71 ± 0.42 ($5000 \mu\text{m}^2$ alanda) olarak tespit edildi. Bu iki grup arasında pozitif TUNEL hücre sayımı sonuçları bakımından istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı ($p \leq 0,9$). YD grubuna ait doku örnekleri incelenip TUNEL pozitif hücre sayımı (TUNEL) yapıldığında ortalaması 14.0 ± 0.84 ($5000 \mu\text{m}^2$ alanda) olarak saptandı. YD grubunda TUNEL pozitif hücre sayımı, kontrol ve sham gruplarına göre daha çok olduğu saptandı ve bu gruplar ile yapılan istatistik karşılaştırma ile YD grubuna ait TUNEL pozitif hücre sayımı ortalaması ile kontrol grubuna ait TUNEL pozitif hücre sayımının ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık gözlemlendi. ($p \leq 0.0001$). Yine YD grubuna ait TUNEL pozitif hücre sayımı ortalaması ile sham grubuna ait TUNEL pozitif hücre sayımının ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık gözlemlendi ($p \leq 0.0001$). DD grubuna ait doku örnekleri incelenip TUNEL pozitif hücre sayımı (TUNEL) yapıldığında ortalaması 12.0 ± 0.63 ($5000 \mu\text{m}^2$ alanda) olarak saptandı. DD grubuna ait TUNEL pozitif hücre sayımı ortalaması ile kontrol grubuna ait TUNEL pozitif hücre sayımı ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık saptandı. ($P \leq 0.0001$). DD grubuna ait TUNEL pozitif hücre sayımı ortalaması ile sham grubuna ait TUNEL pozitif hücre sayımı ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık gözlemlendi. ($P \leq 0.0001$). YD grubuna ait TUNEL pozitif hücre sayımı ortalaması ile DD grubuna ait TUNEL pozitif hücre sayımı ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık saptanmadı ($p \leq 0.1$). (Şekil 22,23)

Şekil 22: Karaciğer dokusu TUNEL Değerlendirmesi

*: Kontrol grubuna göre anlamlı artış gösteren YD grubu.($p \leq 0,0001$)

** : Kontrol grubuna göre anlamlı artış gösteren DD grubu($p \leq 0,0001$)





→ Normal Hepatosi → TUNEL pozitif Hücre → Sinüzoid

Şekil 23: Karaciğer dokusu Kontrol (A) , Sham (B), YD (C) ve DD (D) gruplarına ait TUNEL pozitif boyanmış hücre görüntüleri, (TUNEL) boyaması,

Duodenum

TUNEL Pozitif Hücre Sayımı

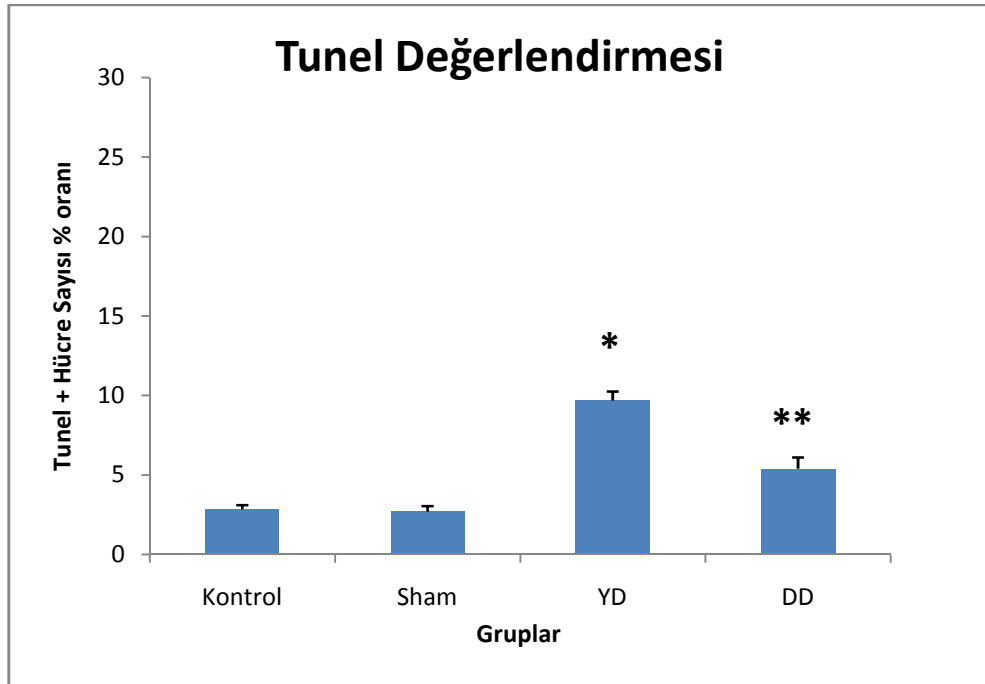
Kontrol grubuna ait doku örnekleri incelenip TUNEL pozitif hücre sayımı yapıldığında ortalaması 2.85 ± 0.26 olarak saptandı. Sham grubuna ait doku örnekleri incelenip TUNEL pozitif hücre sayımı (TUNEL) yapıldığında ortalaması 2.71 ± 0.35 olarak tespit edildi. Bu iki grup arasında pozitif TUNEL hücre sayımı sonuçları bakımından istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı ($p \leq 0,9$). YD grubuna ait doku örnekleri incelenip TUNEL pozitif hücre sayımı (TUNEL) yapıldığında ortalaması 9.7 ± 0.56 olarak saptandı. YD grubunda TUNEL pozitif hücre sayımı, kontrol ve sham gruplarına göre daha çok olduğu saptandı ve bu gruplar ile yapılan istatistik karşılaştırma ile YD grubuna ait TUNEL pozitif hücre sayımı ortalaması ile kontrol grubuna ait TUNEL pozitif hücre sayımının ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık gözlemlendi. ($p \leq 0.0001$). Yine YD grubuna ait TUNEL pozitif hücre sayımı ortalaması

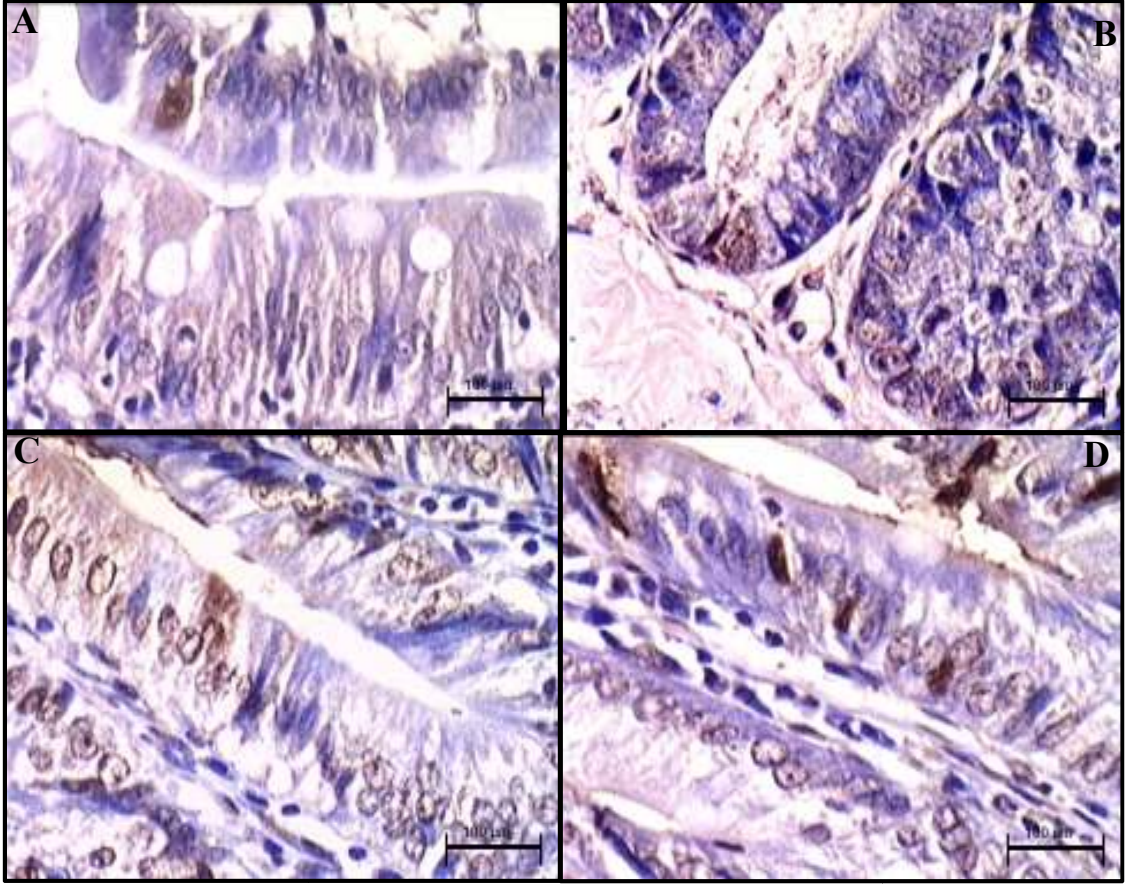
ile sham grubuna ait TUNEL pozitif hücre sayımın ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık gözlemlendi ($p \leq 0.0001$). DD grubuna ait doku örnekleri incelenip TUNEL pozitif hücre sayımı (TUNEL) yapıldığında ortalaması 5.4 ± 0.71 olarak saptandı. DD grubuna ait TUNEL pozitif hücre sayımı ortalaması ile kontrol grubuna ait TUNEL pozitif hücre sayımı ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık saptandı. ($P \leq 0.008$). DD grubuna ait TUNEL pozitif hücre sayımı ortalaması ile sham grubuna ait TUNEL pozitif hücre sayımı ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık gözlemlendi. ($P \leq 0.005$). YD grubuna ait TUNEL pozitif hücre sayımı ortalaması ile DD grubuna ait TUNEL pozitif hücre sayımı ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık saptandı ($p \leq 0.0001$). (Şekil 24,25)

Şekil 24: Duodenum Dokusu TUNEL Değerlendirmesi

*: Kontrol grubuna göre anlamlı artış gösteren YD grubu. ($p \leq 0,0001$)

** : Kontrol grubuna göre anlamlı artış gösteren DD grubu ($p \leq 0,008$)





Şekil 25: Duodenum dokusu Kontrol (A) , Sham (B), YD (C) ve DD (D) gruplarına ait TUNEL pozitif boyanmış hücre görüntüleri, (TUNEL) boyaması,

5.2.1 Aktif Kaspaz 3 Boyama

Karaciğer

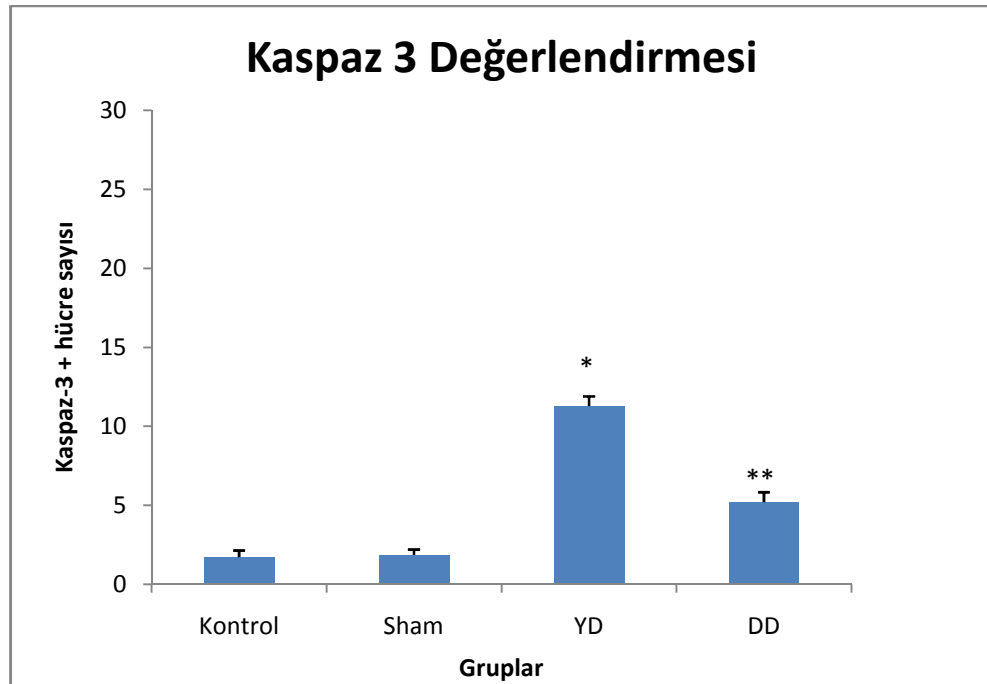
Kontrol grubuna ait doku örnekleri incelenip kaspaz 3 pozitif hücre sayımı yapıldığında ortalaması 1.71 ± 0.42 ($5000 \mu\text{m}^2$ alanda) olarak saptandı. Sham grubuna ait doku örnekleri incelenip kaspaz 3 pozitif hücre sayımı yapıldığında ortalaması 1.85 ± 0.34 ($5000 \mu\text{m}^2$ alanda) olarak tespit edildi. Bu iki grup arasında kaspaz 3 pozitif hücre sayımı sonuçları bakımından istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı ($p \leq 0,9$). YD grubuna ait doku örnekleri incelenip kaspaz 3 pozitif hücre sayımı yapıldığında ortalaması 11.29 ± 0.6 ($5000 \mu\text{m}^2$ alanda) olarak saptandı. YD grubunda kaspaz 3 pozitif hücre sayımı, kontrol ve sham gruplarına göre daha çok olduğu saptandı ve bu gruplar ile yapılan istatistik karşılaştırma ile YD grubuna ait kaspaz 3 pozitif hücre sayımı ortalaması ile kontrol grubuna ait kaspaz 3 pozitif hücre sayımının ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık gözlemlendi. ($p \leq 0.0001$). Yine YD grubuna ait

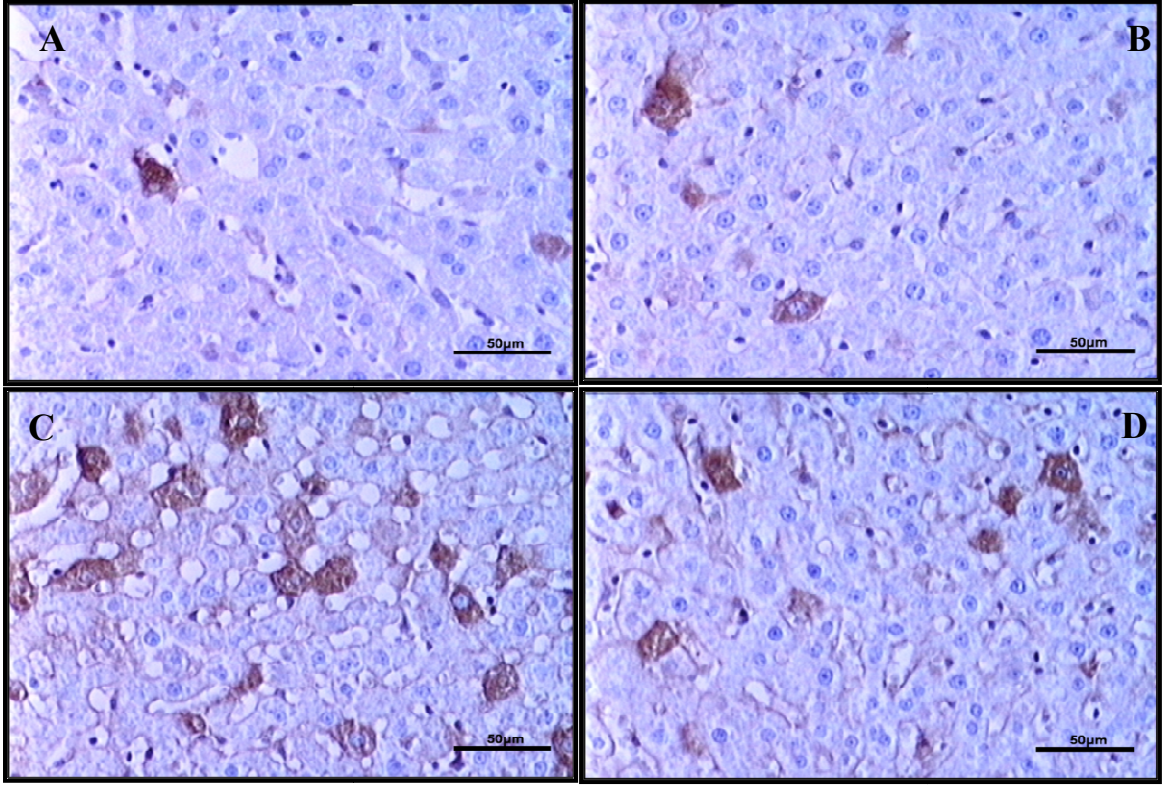
kaspaz 3 pozitif hücre sayımı ortalaması ile sham grubuna ait kaspaz 3 pozitif hücre sayımının ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık gözlemlendi ($p \leq 0.0001$). DD grubuna ait doku örnekleri incelenip kaspaz 3 pozitif hücre sayımı yapıldığında ortalaması 5.21 ± 0.6 ($5000 \mu\text{m}^2$ alanda) olarak saptandı. DD grubuna ait kaspaz 3 pozitif hücre sayımı ortalaması ile kontrol grubuna ait kaspaz 3 pozitif hücre sayımı ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık saptandı. ($p \leq 0.0001$). DD grubuna ait kaspaz 3 pozitif hücre sayımı ortalaması ile sham grubuna ait kaspaz 3 pozitif hücre sayımı ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık gözlemlendi. ($p \leq 0.0001$). YD grubuna ait kaspaz 3 pozitif hücre sayımı ortalaması ile DD grubuna ait kaspaz 3 pozitif hücre sayımı ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık saptandı. ($p \leq 0.0001$) (Şekil 26,27)

Şekil 26: Karaciğer dokusu Kaspaz 3 Değerlendirmesi

*: Kontrol grubuna göre anlamlı artış gösteren YD grubu. ($p \leq 0,0001$)

** : Kontrol grubuna göre anlamlı artış gösteren DD grubu ($p \leq 0,0001$)





Şekil 27: Karaciğer dokusu Kontrol (A) , Sham (B), YD (C) ve DD (D) gruplarına ait Kaspaz 3 pozitif boyanmış hücre görüntüleri, Aktif Kaspaz 3 IHC boyaması.

Duodenum

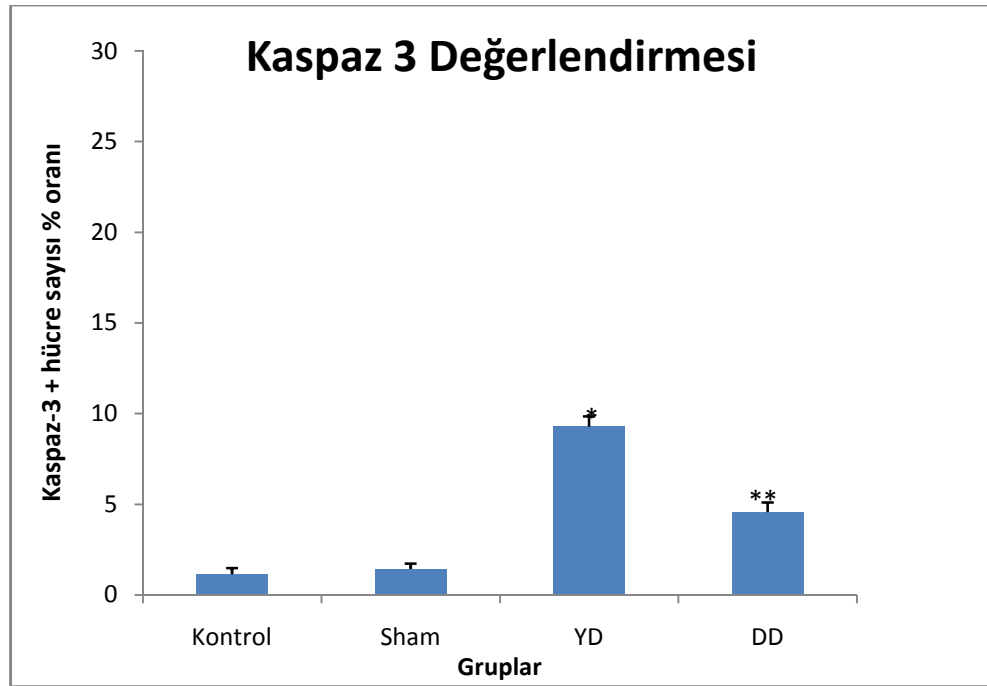
Kontrol grubuna ait doku örnekleri incelenip kaspaz 3 pozitif hücre sayımı yapıldığında ortalaması 1.14 ± 0.34 olarak saptandı. Sham grubuna ait doku örnekleri incelenip kaspaz 3 pozitif hücre sayımı yapıldığında ortalaması 1.42 ± 0.29 olarak tespit edildi. Bu iki grup arasında pozitif kaspaz 3 hücre sayımı sonuçları bakımından istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı ($p \leq 0,9$). YD grubuna ait doku örnekleri incelenip kaspaz 3 pozitif hücre sayımı yapıldığında ortalaması 9.28 ± 0.56 olarak saptandı. YD grubunda kaspaz 3 pozitif hücre sayımı, kontrol ve sham gruplarına göre daha çok olduğu saptandı ve bu gruplar ile yapılan istatistik karşılaştırma ile YD grubuna ait kaspaz 3 pozitif hücre sayımı ortalaması ile kontrol grubuna ait kaspaz 3 pozitif hücre sayımının ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık gözlemlendi. ($p \leq 0.0001$). Yine YD grubuna ait kaspaz 3 pozitif hücre sayımı ortalaması ile sham grubuna ait kaspaz 3 pozitif hücre sayımının ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık gözlemlendi ($p \leq 0.0001$). DD grubuna ait doku örnekleri incelenip kaspaz 3 pozitif hücre sayımı yapıldığında ortalaması 4.57 ± 0.52 olarak saptandı. DD grubuna ait kaspaz 3 pozitif hücre

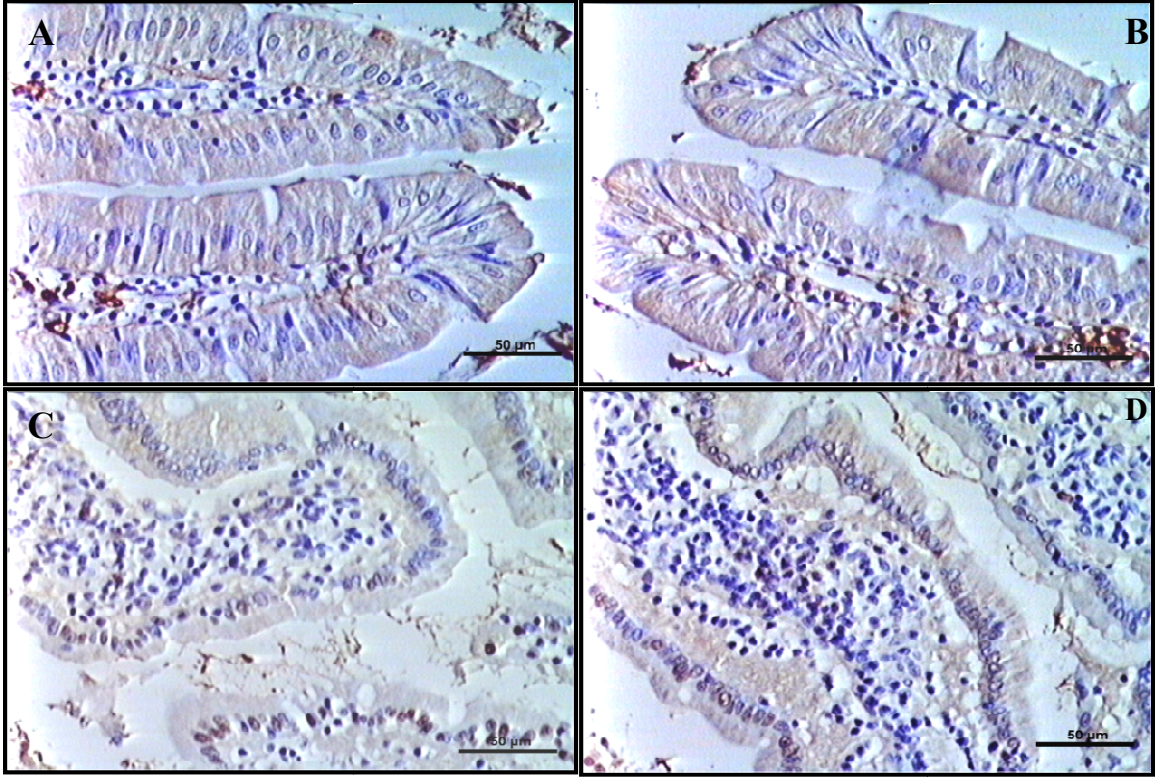
sayımı ortalaması ile kontrol grubuna ait kaspaz 3 pozitif hücre sayımı ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık saptandı. ($p \leq 0.0001$). DD grubuna ait kaspaz 3 pozitif hücre sayımı ortalaması ile sham grubuna ait kaspaz 3 pozitif hücre sayımı ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık gözlemlendi. ($p \leq 0.0001$). YD grubuna ait kaspaz 3 pozitif hücre sayımı ortalaması ile DD grubuna ait kaspaz 3 pozitif hücre sayımı ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık saptandı ($p \leq 0.0001$). (Şekil 28,29)

Şekil 28: Duodenum Dokusu kaspaz 3 Değerlendirmesi

*: Kontrol grubuna göre anlamlı artış gösteren YD grubu. ($p \leq 0,0001$)

** : Kontrol grubuna göre anlamlı artış gösteren DD grubu ($p \leq 0,008$)





Şekil 29: Duodenum dokusu Kontrol (A) , Sham (B), YD (C) ve DD (D) gruplarına ait kaspaz 3 pozitif boyanmış hücre görüntüleri, (kaspaz 3 boyaması),

5.3. Hayvan Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

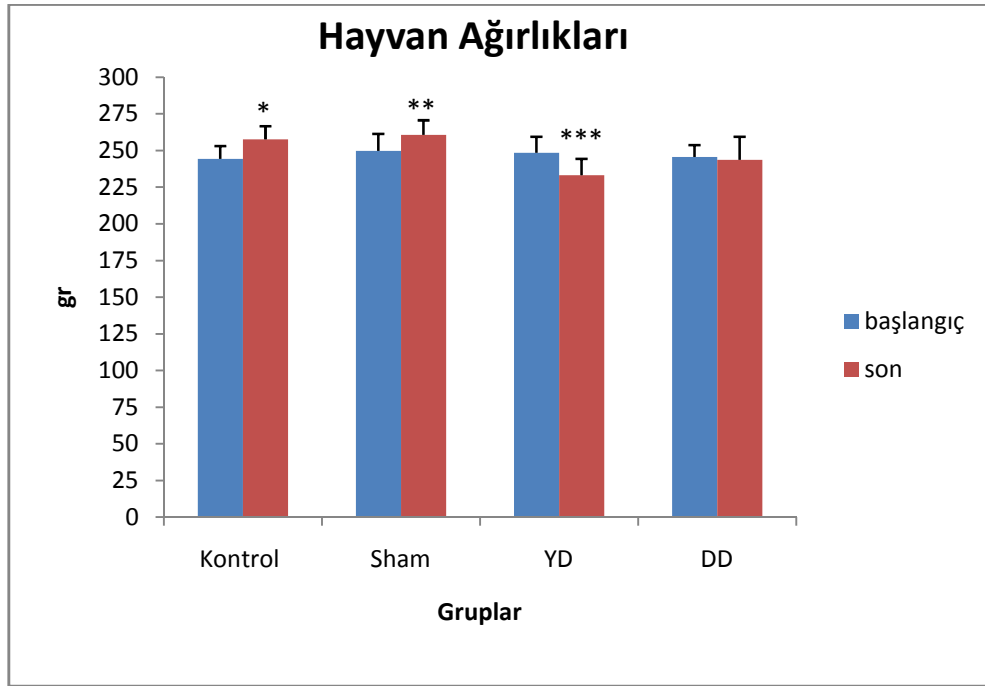
Başlangıç ağırlıklarına baktığımızda grupların ağırlık düzeyleri ortalamaları; Kontrol grubunda $244,42 \pm 8,61$ gr, Sham grubunda $249,85 \pm 11,58$ gr, YD grubunda $248,57 \pm 10,89$ gr ve DD grubunda $245,57 \pm 8,2$ gr, olarak saptanırken. Son ağırlıklarına baktığımızda; Kontrol grubunda $257,57 \pm 9,07$ gr, Sham grubunda $260,71 \pm 9,94$ gr, YD grubunda $233,14 \pm 11,24$ gr ve DD grubunda $243,71 \pm 15,68$ gr, olarak saptandı (Şekil 30) Kontrol grubunda başlangıç ve son ağırlıkları arasında istatistiki olarak anlamlı şekilde arttığı görüldü. ($p \leq 0,01$). Sham grubunda da yine başlangıç ve son ağırlıkları istatistikî olarak anlamlılık gözlemlendi ($p \leq 0,001$). YD grubunu karşılaştırdığımızda yine istatistiki olarak anlamlı bulundu. ($p \leq 0,01$) DD grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p \leq 0,4$).

Şekil 30: Grupların deney başlangıcı ve deney sonundaki ağırlıkları.

*: Kontrol grb. hayvanların başlangıç ağırlığına göre anlamlı artış gösteren grup.($p \leq 0,01$)

** : Sham grb. hayvanların başlangıç ağırlığına göre anlamlı artış gösteren grup.($p \leq 0,001$)

***: YD grb. hayvanların başlangıç ağırlığına göre anlamlı artış gösteren grup.($p \leq 0,01$)



5.4. Biyokimyasal Bulgular

Karaciğer

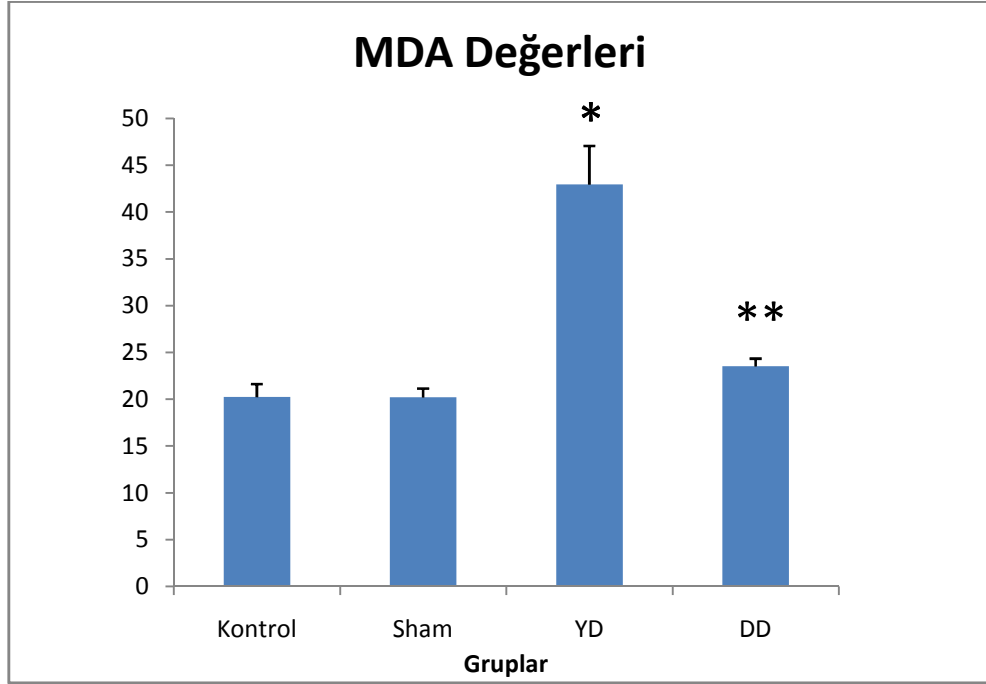
Karaciğer dokusuna baktığımızda grupların MDA düzeyleri ortalamaları; Kontrol grubunda $20,25 \pm 1,39 \mu\text{M}$, Sham grubunda $20,20 \pm 0,97 \mu\text{M}$, YD grubunda $42,95 \pm 4,12 \mu\text{M}$, ve DD grubunda $23,54 \pm 0,82 \mu\text{M}$, olarak saptandı. Kontrol grubuyla, Sham grubu karşılaştırıldığında, istatistikî olarak herhangi bir anlamlılık gözlenmezken ($p \leq 1,0$). Kontrol ve YD gruplarını karşılaştırdığımızda YD grubunun MDA değerleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p \leq 0,0001$). YD ve DD grupları arasında

MDA düzeylerinde ise istatistiksel olarak anlamlı dercede YD 'nin daha yüksek MDA değeri barındırdığı gözlemlendi. ($p \leq 0,0001$). (Şekil 31)

Şekil 31: Karaciğer MDA Değerleri.

*: Kontrol grubuna göre anlamlı artış gösteren YD grubu. ($p \leq 0,0001$)

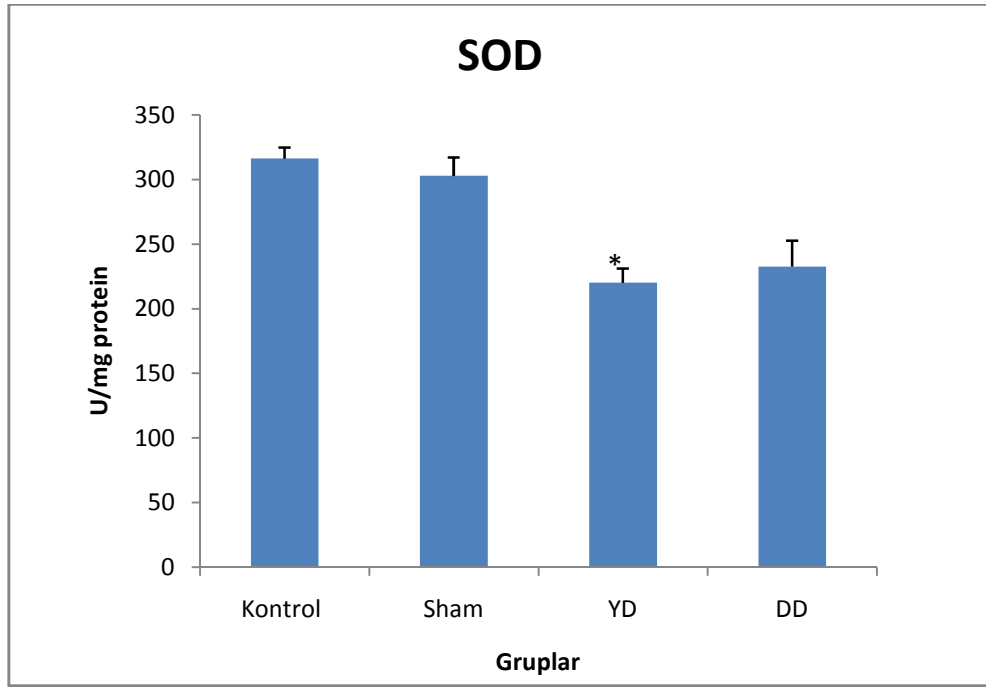
** : YD grubuna göre anlamlı artış gösteren DD grubu ($p \leq 0,0001$)



SOD düzeyleri ortalamaları; Kontrol grubunda $316,25 \pm 3,24$ U/mg protein, Sham grubunda $302,89 \pm 5,38$ U/mg protein, YD grubunda $220,11 \pm 4,22$ U/mg protein ve DD grubunda $232,64 \pm 7,6$ U/mg protein olarak saptandı. (Şekil 32) Kontrol grubuyla, Sham grubu karşılaştırıldığında, istatistikî olarak herhangi bir anlamlılık gözlenmedi ($p \leq 0,3$). Kontrol ve YD gruplarını karşılaştırdığımızda YD grubunun SOD değerleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu ($p \leq 0,0001$). YD ve DD grupları arasında SOD düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p \leq 0,3$).

Şekil 32: Karaciğer SOD değerleri.

* Kontrol grubuna göre anlamlı azalma mevcut. ($p \leq 0,0001$)

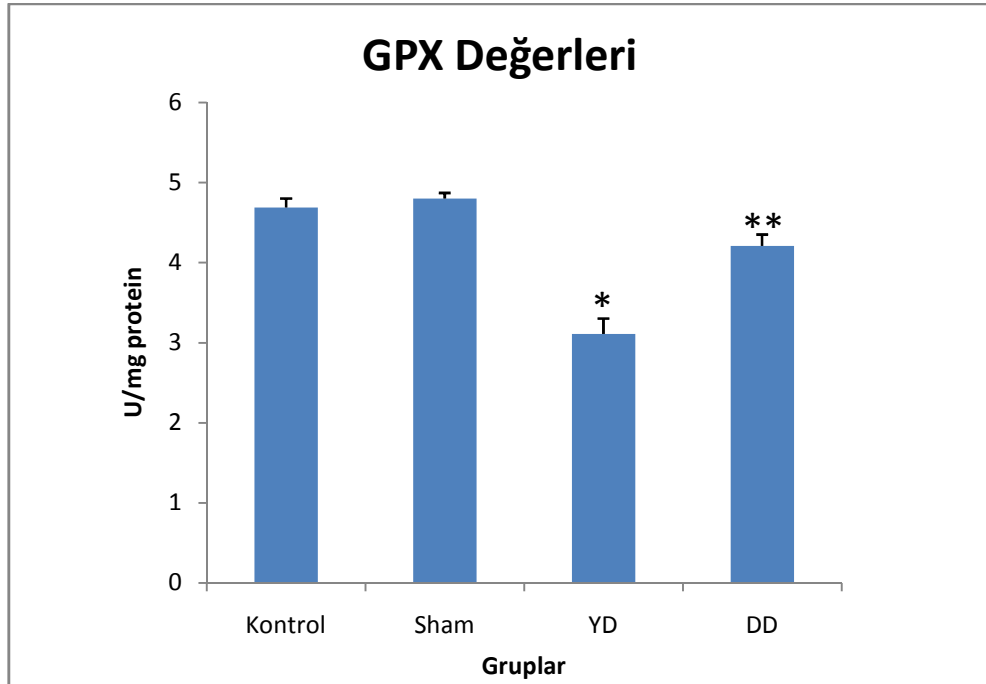


GPx düzeyleri ortalamaları; Kontrol grubunda $4,69 \pm 0,11$ U/mg protein, Sham grubunda $4,80 \pm 0,07$ U/mg protein, YD grubunda $3,11 \pm 0,19$ U/mg protein ve DD grubunda $4,21 \pm 0,14$ U/mg protein olarak saptandı. Kontrol grubuyla, Sham grubu karşılaştırıldığında, istatistikî olarak herhangi bir anlamlılık gözlenmedi ($p \leq 0,5$). Kontrol ve YD gruplarını karşılaştırdığımızda YD grubunun GPx değerleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu ($p \leq 0,0001$). YD ve DD grupları arasında GPX düzeylerinde ise istatistiksel olarak anlamlı derecede YD 'nin daha düşük GPX değeri barındırdığı gözlendi. ($p \leq 0,0001$). (Şekil 33)

Şekil 33: Karaciğer GPX Değerleri

*: Kontrol grubuna göre anlamlı düşüş gösteren YD grubu. ($p \leq 0,0001$)

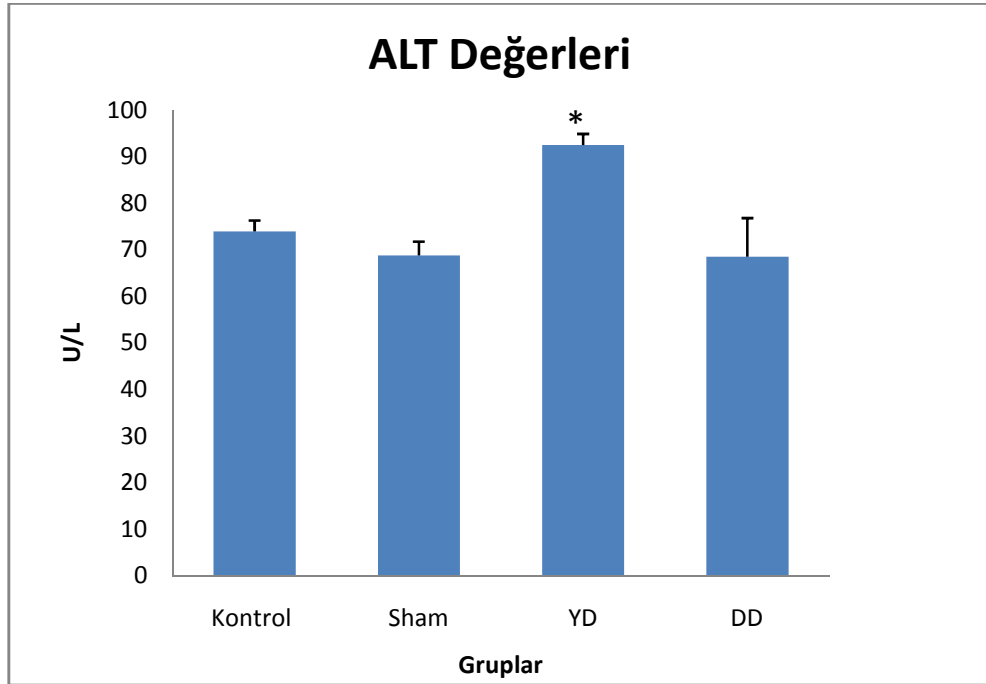
** : Kontrol grubuna göre anlamlı düşüş gösteren DD grubu ($p \leq 0,0001$)



ALT düzeyleri ortalamaları; Kontrol grubunda $74,0 \pm 2,34$ U/L, Sham grubunda $68,85 \pm 2,93$ U/L, YD grubunda $92,57 \pm 2,37$ U/L ve DD grubunda $68,57 \pm 8,28$ U/L olarak saptandı (Şekil 34) Kontrol grubuyla, Sham grubu karşılaştırıldığında, istatistikî olarak herhangi bir anlamlılık gözlenmedi ($p \leq 0,8$). Kontrol ve YD gruplarını karşılaştırdığımızda YD grubunun ALT değerleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p \leq 0,04$). Kontrol ve DD grupları arasında ALT düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p \leq 0,8$).

Şekil 34: ALT değerleri

*: kontrol grubuna göre anlamlı artış gösteren grup.($p:0,04$)

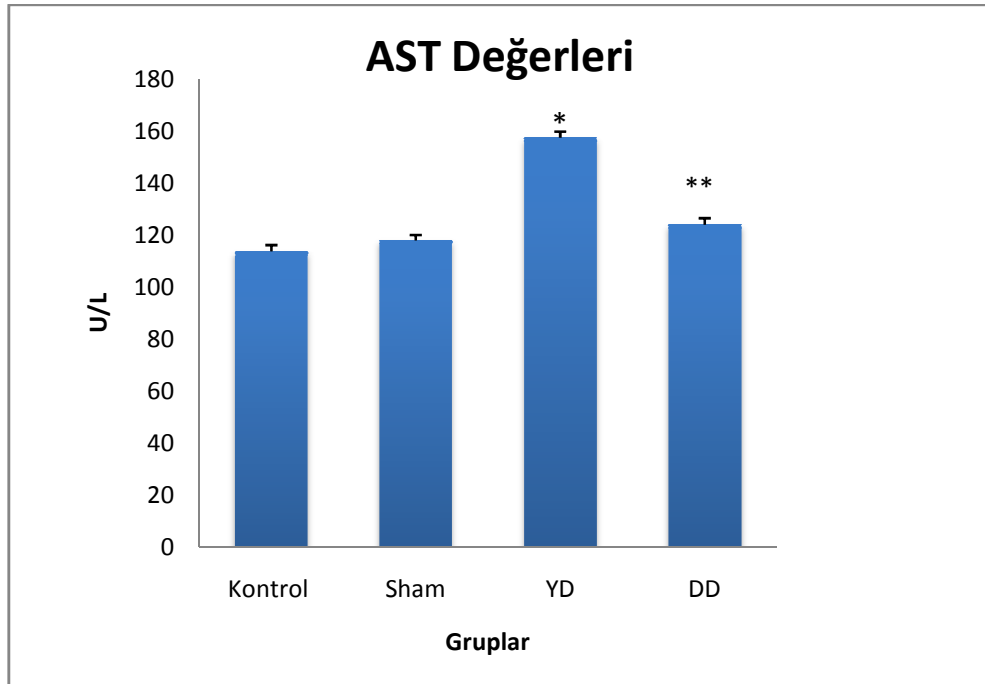


AST düzeyleri ortalamaları; Kontrol grubunda $113,89 \pm 2,38$ U/L, Sham grubunda $118,00 \pm 2,09$ U/L, YD grubunda $157,57 \pm 2,31$ U/L ve DD grubunda $124,00 \pm 2,57$ U/L olarak saptandı (Şekil 35). Kontrol grubuyla, Sham grubu karşılaştırıldığında, istatistikî olarak herhangi bir anlamlılık gözlenmedi ($p \leq 0,6$). Kontrol ve YD gruplarını karşılaştırdığımızda YD grubunun AST değerleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p \leq 0,0001$). Kontrol ve DD grupları arasında AST düzeylerinde istatistiksel olarak yine anlamlı derecede artış görüldü ($p \leq 0,02$).

Şekil 35: AST değerleri.

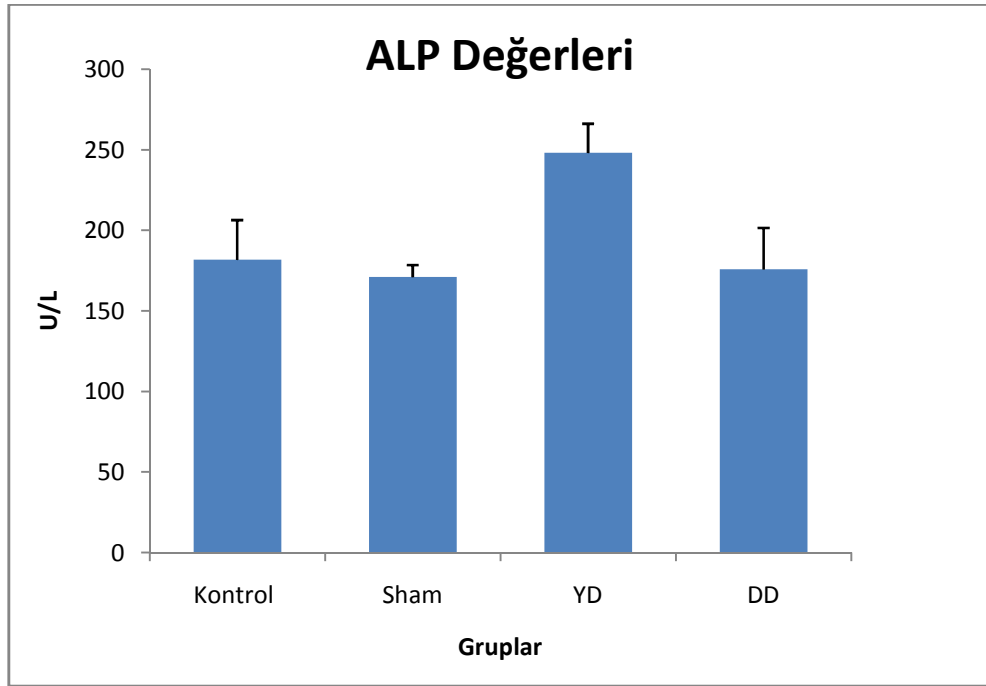
*: kontrol grubuna göre anlamlı artış gösteren YD grubu. ($p \leq 0,0001$)

** : kontrol grubuna göre anlamlı artış gösteren DD grubu. ($p \leq 0,02$)



ALP düzeyleri ortalamaları; Kontrol grubunda $181,71 \pm 24,85$ U/L, Sham grubunda $171,14 \pm 7,49$ U/L, YD grubunda $248,14 \pm 18,20$ U/L ve DD grubunda $175,85 \pm 25,82$ U/L olarak saptandı (Şekil 36). Kontrol grubuyla, Sham grubu karşılaştırıldığında, istatistikî olarak herhangi bir anlamlılık gözlenmedi ($p \leq 0,9$). Kontrol ve YD gruplarını karşılaştırdığımızda YD grubunun ALP değerleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılık gözlenmedi. ($p \leq 0,1$). Kontrol ve DD grupları arasında ALP düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p \leq 0,9$).

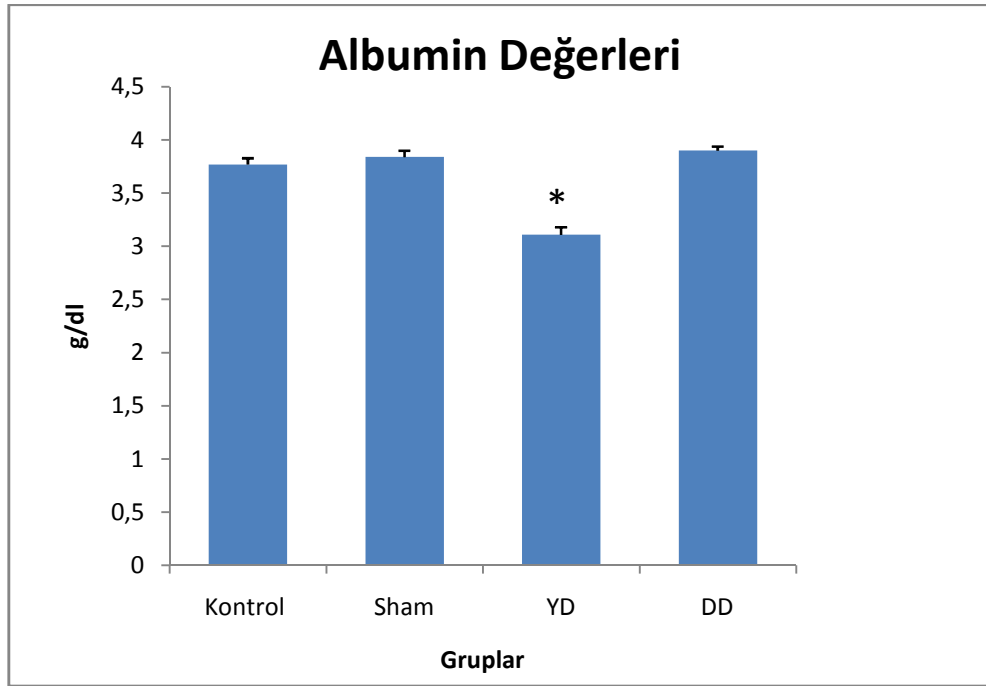
Şekil 36: ALP Değerleri



Albumin düzeyleri ortalamaları; Kontrol grubunda $3,77 \pm 0,06$ g/dl, Sham grubunda $3,84 \pm 0,06$ g/dl, YD grubunda $3,11 \pm 0,07$ g/dl ve DD grubunda $3,90 \pm 0,04$ g/dl olarak saptandı (Şekil 37) Kontrol grubuyla, Sham grubu karşılaştırıldığında, istatistikî olarak herhangi bir anlamlılık gözlenmedi ($p \leq 0,8$). Kontrol ve YD gruplarını karşılaştırdığımızda YD grubunun Albumin değerleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu ($p \leq 0,0001$). Kontrol ve DD grupları arasında Albumin düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p \leq 0,4$).

Şekil 37: Albumin Değerleri

*: Kontrol grubuna göre anlamlı düşme gösteren YD grubu. ($p \leq 0,0001$)

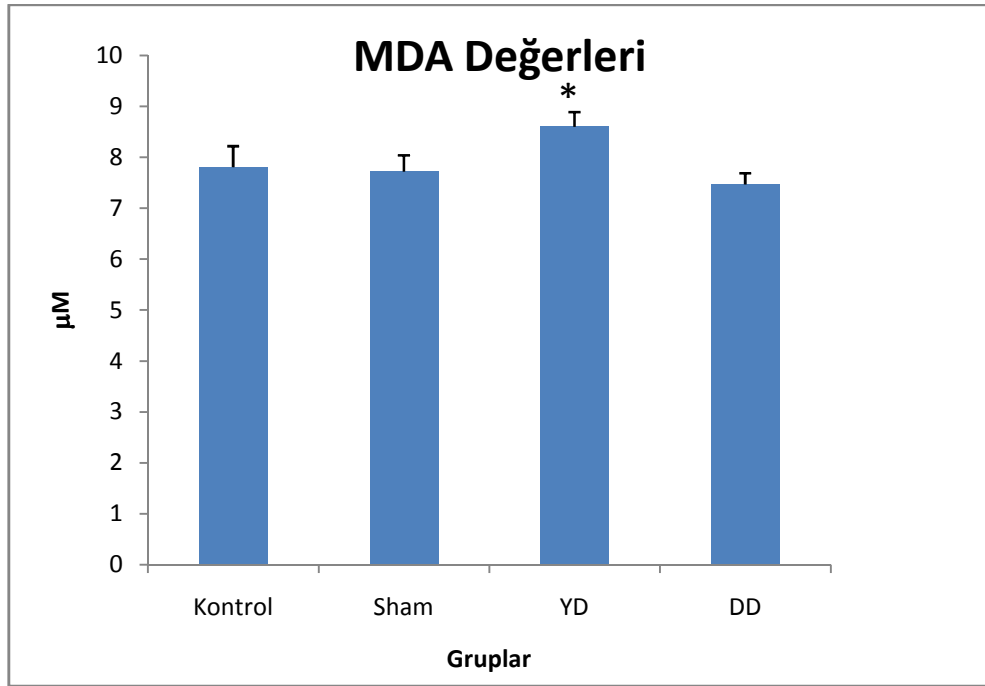


Duodenum

Duodenum dokusuna baktığımızda ise grupların MDA düzeyleri ortalamaları; Kontrol grubunda $7,81 \pm 0,41 \mu\text{M}$, Sham grubunda $7,72 \pm 0,32 \mu\text{M}$, YD grubunda $8,60 \pm 0,29 \mu\text{M}$, ve DD grubunda $7,47 \pm 0,22 \mu\text{M}$, olarak saptandı.(Şekil 38) Kontrol grubuyla, Sham grubu karşılaştırıldığında, istatistikî olarak herhangi bir anlamlılık gözlenmedi ($p \leq 0,9$). Kontrol ve YD gruplarını karşılaştırdığımızda YD grubunun MDA değerleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p \leq 0,01$). YD ve DD grupları arasında MDA düzeylerinde ise istatistiksel olarak anlamlı dercede YD 'nin daha yüksek MDA değeri barındırdığı gözlemlendi. ($p \leq 0,001$).

Şekil 38: Duodenum MDA Değerleri

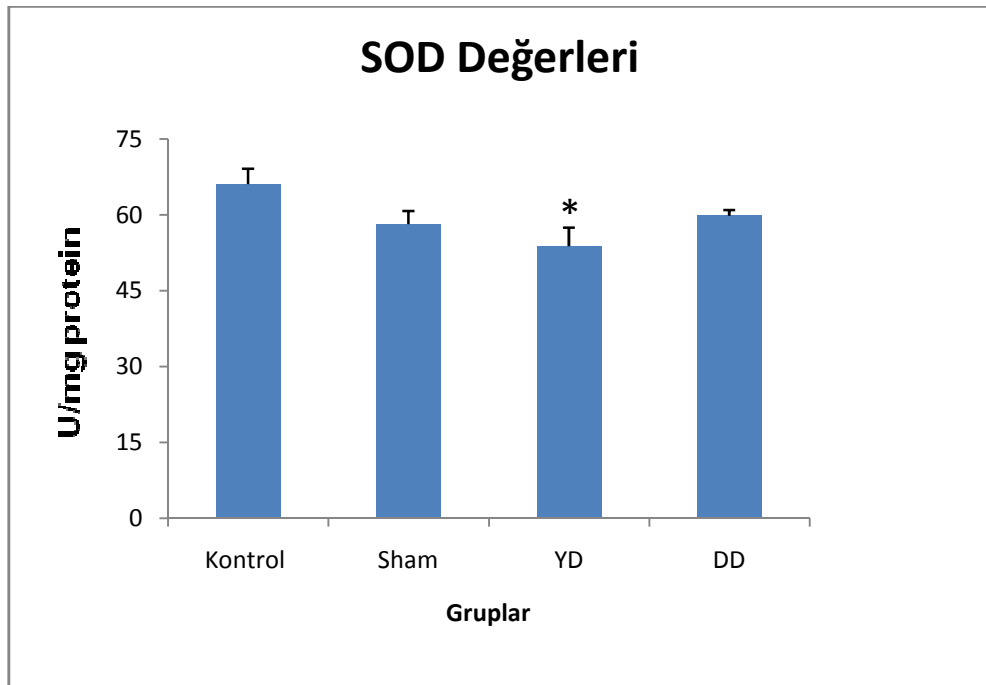
*: Kontrol grubuna göre anlamlı artış gösteren YD grubu. ($p \leq 0,01$)



SOD düzeyleri ortalamaları; Kontrol grubunda 66,13±3,02 U/mg protein, Sham grubunda 58,18±2,61 U/mg protein, YD grubunda 53,85±3,64 U/mg protein ve DD grubunda 59,85±1,14 U/mg protein olarak saptandı. (Şekil 39) Kontrol grubuyla, Sham grubu karşılaştırıldığında, istatistikî olarak herhangi bir anlamlılık gözlenmedi ($p \leq 0,2$). Kontrol ve YD gruplarını karşılaştırdığımızda YD grubunun SOD değerleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu ($p \leq 0,02$). YD ve DD grupları arasında SOD düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p \leq 0,4$).

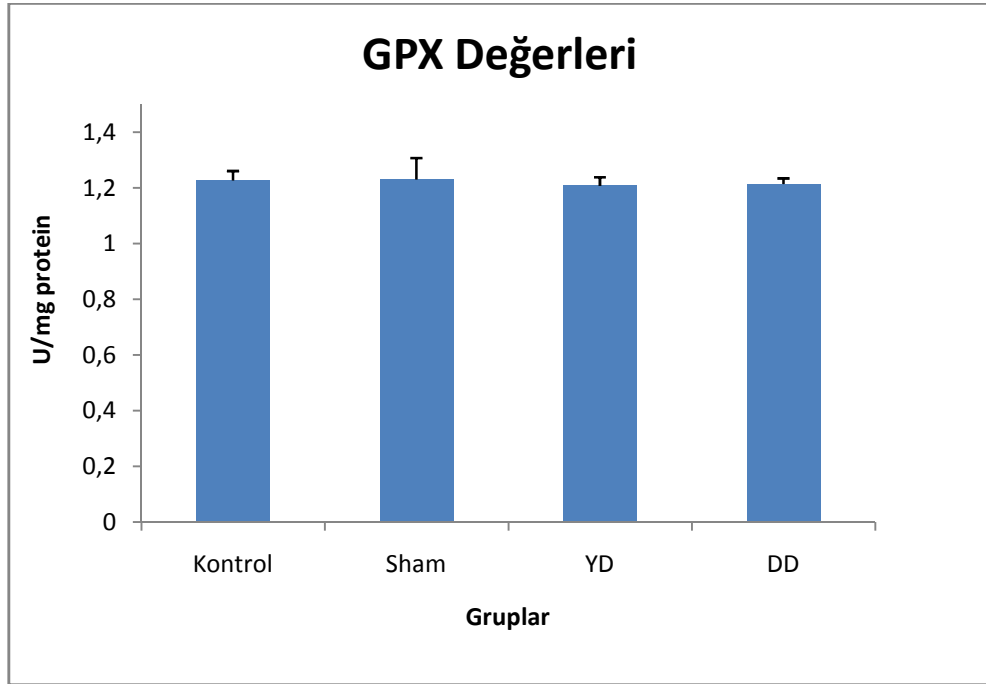
Şekil 39: Duodenum SOD Değerleri

*: Kontrol grubuna göre anlamlı azalma gösteren YD grubu. ($p \leq 0,0001$)



GPx düzeyleri ortalamaları; Kontrol grubunda $1,22 \pm 0,03$ U/mg protein, Sham grubunda $1,27 \pm 0,07$ U/mg protein, YD grubunda $1,20 \pm 0,03$ U/mg protein ve DD grubunda $1,20 \pm 0,02$ U/mg protein olarak saptandı (Şekil 40). Kontrol grubuyla, Sham grubu karşılaştırıldığında, istatistikî olarak herhangi bir anlamlılık gözlenmedi ($p \leq 0,3$). Kontrol ve YD gruplarını karşılaştırdığımızda da istatistikî olarak herhangi bir anlamlılık gözlenmedi. ($p \leq 0,8$) YD ve DD grupları arasında GPx düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p \leq 0,9$).

Şekil 40: Duodenum GPX Değerleri



7. TARTIŞMA

Tarımsal savaşım, bitkilerin hastalık, zararlı ve yabancı otların etkilerinden ekonomik ölçüler içinde korunması, ürünün ve kalitenin arttırılmasıdır. Tarımsal savaşım değişik yöntemleri içermektedir. Bu yöntemlerden birisi de tarım ilaçlarının (pestisitlerin) kullanıldığı kimyasal savaşımdır. Ancak, pestisitlerin bilinçsiz ve kontrolsüz kullanımı sonucu, zararlı organizmalarda dayanıklılık oluşturabilme riskleri ve kalıntılar yoluyla insan sağlığına ve çevreye olumsuz etkileri kesinlikle göz ardı edilmemelidir.

Yapılan çalışmalarla bu pestisitlerin toksik içerikleri nedeniyle özellikle mutajenik, karsinojenik ve teratojenik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir.^(98,99)

Brovwer ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada pestisitlerin, kullanıldığı tarım alanlarında çalışan insanlar üzerindeki toksik etkileri araştırılmış, pestisitlerin renal ve hepatik toksisiteyi arttırdığı saptanmıştır.⁽¹⁰⁰⁾

Diğer bir çalışmada ise Izushi ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada pestisitlerin karaciğer ve kas bozulmalarına neden olduğunu saptamışlardır.⁽⁸⁾

Vesna Poleksic ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, TRF'nin sazan balıkları üzerindeki akut ve subakut toksisitesini laboratuvar ortamında incelemişlerdir. Akut çalışmada 96 saat boyunca 0,045mg/L TRF uygulamışlardır. Subakut çalışmada ise 14 gün boyunca üç farklı dozda(0,005-0,01-0,02 mg/L) TRF uygulanmıştır. Bu çalışmada biyokimyasal parametreler (AST, ALT ve ALP) ayrıca solungaç, karaciğer ve böbrek yapıları incelemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlarında kan serumunda enzim aktivitelerinin arttığını göstermişler. Histolojik bulgularda 0,005 mg/L uygulanan hayvanlarda solungaçlarda normal yapı korunurken, 0,01 ve 0,02 mg/L doza maruz kalan hayvanlarda epitelyal hiperplazi, subepitelyal boşlukta ödem ve solunum epitelinde kıvrılma not etmişlerdir. Karaciğer dokusunda 0,005 mg/L dozunda herhangi bir değişiklik görülmezken, 0,01 mg/L uygulanan dozda hepatositlerde az yoğunlukta vakuolizasyon ve 0,02 mg/L uygulanan dozda hepatositlerde vakuolizasyon ve bölgesel olarak hepatosit nukleusunda piknozis tespit etmişlerdir. Sonuç olarak TRF'nin etkisinden dolayı AST deki artış sonucunda hepatositlerin nekroza gittiğini belirtmişlerdir.⁽¹⁰¹⁾

Bizim çalışmamızda histolojik incelemede ise H&E boyamalarda karaciğer hücrelerinde hidrofik şişme, mononükleer hücre infiltrasyonu ve sinüzoidlerde dilatasyon gözlenmiştir ayrıca duodenum dokusunda lamina propriada artış ve lökosit hücre infiltrasyonu gözlendi. Bizim kullandığımız hayvan modeli bu çalışmada literatürde tek olduğundan dolayı Vesna

Poleksic ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada bulunan sonuçlarla bizim sonuçlarımız paralellik göstermektedir.

Sinha S. ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada dinitroanniline türevi olan Fluchoraline herbisitinin sitotoksik etkilerini memeli hücrelerinde kültür ortamında incelemişlerdir. Fare uterusundan izole ettikleri embriyonik fibroblast hücreleri üzerine 8 ve 12 saat boyunca fluchloralin uygulanan hücrelerde metafaz evresindeki ve kromozomal hasara uğramış hücrelerin sayısında anlamlı artış gözlenmiştir. Uygulanma süresi 72 saate çıkarıldığında hücrelerin canlılık oranı % 50 azalmıştır. Sonuç olarak araştırmacılar Fluchoralinin apoptosisi tetiklediği ve burada DNA sentezine etki ederek gerçekleştirdiğini belirtmişlerdir. Agoroze jel elektroforez yöntemini kullanarak apoptosize giden hücrelerin fluchoraline maruz kaldığını belirtmişlerdir.⁽¹⁰²⁾

Anne R. Greenlee ve arkadaşlarının yapmış olduğu başka bir çalışmada ise 21-26 günlük dişi fareleri, follikül stimüle hormonu i.p. enjeksiyonu ile süperovule edilmiş ve 47 saat aynı tür erkek farelerle birlikte barındırılmış. hCG enjeksiyonundan 18 saat sonra embriyolar fare oviduktusdan toplanmış ve uygun besi ortamı içerisine alınmıştır. Bu embriyoları 96 saat boyunca dinitroanniline grubuna ait Pendimethalin herbisidine maruz bırakmışlar ve deney sonunda elde ettikleri blastositlere TUNEL yöntemi uygulayarak apoptotik hücreleri saymışlar. Sonuçta kontrol grubuyla karşılaştırıldığında Pendimethaline maruz kalan hücrelerdeki apoptotik hücre sayısı anlamlı düzeyde artış göstermiş.⁽¹⁰³⁾

Bizim yaptığımız çalışmada da TRF ye maruz kalmış olan karaciğer ve duodenum dokularında YD ve DD gruplarında TUNEL ve kaspaz 3 pozitif hücrelerinin artışı Kontrol ve sham grubuna göre anlamlı fark göstermiştir. Elde ettiğimiz bulgular S. Sinha ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma ile karşılaştığımızda, apoptotik hücre sayısındaki artış bulgularımız ile benzerlik göstermektedir.

Shakil A. Saghir ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada ise 2 hafta boyunca TRF ye maruz kalan ratların vücut ağırlıkları değerlendirilmiş ve bu grubun vücut ağırlıkları ile kontrol grubu ağırlıkları karşılaştırıldığında deney grubunda kontrol grubuna göre %14 azalma görülmüştür.⁽¹⁰⁴⁾

Bizim yaptığımız çalışmada da TRF ye maruz kalmış olan YD ve DD gruplarında vücut ağırlıkları kontrol ve sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma göstermişlerdir.

Paulina CA. ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada 2,4-D herbisidini akut, subkronik ve kronik olmak üzere üç farklı etkisini belirlemek için 24 saat, 30 gün ve 180 gün oral yolla sıçanlara uygulamışlar. Araştırmacılar sıçanlardan aldıkları kan örnekleri ile serum AST, ALT, LDH, ALP, amilaz, glukoz ve total protein seviyelerini ölçmüşler sonuçta akut, subkronik ve kronik gruplarda AST, ALT, LDH ve ALP düzeyleri artarken amilaz ve glukoz seviyeleri düşme göstermiştir. Sonuç olarak Paulina CA ve arkadaşları bu enzimlerdeki değişikliklerin 2,4-D herbisidinin dokularda oluşturduğu hasara dayandırmışlardır.⁽¹⁰⁵⁾

Başka bir çalışmada Luiz Benedetti ve arkadaşları Glyphosate-Biocarb herbisitinin sıçan karaciğerine etkisi araştırılmıştır. Çalışmada 30 adet wistar suşu sıçan kontrol ve üç farklı dozda Glyphosate-Biocarb içeren 4 gruba ayrılmışlar. İki gün aralıklarla 75 gün boyunca bu dozlar deneklere uygulanmış. Deney sonunda sıçanların kanları ve karaciğer dokuları alınmış. Elde edilen sonuçlarda karaciğer enzimleri AST ve ALT düzeylerinde kontrol grubuna oranla anlamlı artış gözlemlenmiştir. Bu artışta Glyphosate-Biocarb'ın karaciğer verdiği hasar nedeniyle olduğunu bildirmişler.⁽¹⁰⁶⁾

Biz de çalışmamızda sıçanlardan elde ettiğimiz kan örnekleri ile serum AST, ALT, ALP ve albumin seviyelerini ölçtük. AST değerleri TRF uygulanan her iki dozda da hem kontrol hem de sham grubuna oranla anlamlı artış gösterdi. ALT de ise artış sadece YD grubunda anlamlı düzeydeydi. Ayrıca albumin değerlerindeki azalma ise yine sadece YD grubunda anlamlı düzeydeydi. Sonuç olarak elde ettiğimiz bu sonuçlar Benedetti ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmayla paralellik göstermektedir.

Organizmada normal fizyolojik şartlarda veya herhangi bir patolojik olay sonucunda oluşan serbest radikaller ile bunların koruyucusu olan antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin serbest radikaller lehine kayması oksidatif stresi gösterir. Canlılar oksidatif hasara karşı enzimatik ve nonenzimatik antioksidan sistem ve moleküllerle korunur. Hücre seviyesinde etkili olan enzimatik antioksidan sistemler içerisinde SOD ve GPx yer alır.⁽¹⁰⁷⁾

Pestisitlerin neden olduğu oksidatif stres sonucu etkilenen en önemli sistemlerden biri de antioksidan sistemdir. Antioksidanlar hem doğrudan hem de dolaylı olarak ksenobiyotiklerin, ilaçların, karsinojenlerin ve toksik radikal reaksiyonların istenmeyen etkilerine karşı hücreleri koruyan maddelerdir. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek veya serbest radikal türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler.⁽¹⁰⁸⁾

Malondialdehit (MDA) lipid peroksidasyonu sonucu oluşan ürünlerden biridir ve oksidatif hasarı göstermede yaygın olarak kullanılan bir parametredir.⁽¹⁰⁹⁾

Sunny O. Abarikwu ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada 30 adet wistar sıçana 7-16 gün boyunca uyguladıkları atrazine herbisitinin testis dokusundaki oksidatif strese ve sperm kalitesine etkisini araştırmışlar. Çalışma sonucunda testis dokusunda MDA düzeyi istatistiksel olarak artış gösterirken, SOD ve GPx seviyeleri anlamlı azalma göstermiş. Çalışma sonundaki verilere dayanarak Atrazin herbisitinin oksidatif stresi arttırarak testis dokusunda hasara yol açtığını belirtmişlerdir.⁽¹¹⁰⁾

Yapmış olduğumuz bu çalışmada, TRF'ye maruz kalmış karaciğer ve duodenum doku örneklerinde SOD ve GPx aktiviteleri incelendiğinde; Karaciğer dokusunda hem YD hem de DD gruplarında, duodenum dokusunda ise YD grubunda SOD seviyeleri kontrol ve sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığını tespit ettik. Ayrıca YD grubunda karaciğer dokusu GPx seviyesi kontrol ve sham grubuyla karşılaştırdığımızda yine istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığını gördük. SOD ve GPx enzimlerindeki bu azalma, bu dokulardaki antioksidan savunma mekanizmasının TRF tarafından bozulduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda da, TRF uygulanan YD ve DD gruplarında karaciğer dokusunda hem YD hem de DD gruplarında, duodenum da ise YD grubundaki MDA düzeylerinin, kontrol ve sham gruplarına göre anlamlı bir şekilde arttığı görülmüştür. MDA düzeyindeki bu artış, TRF'nin bu dokularda lipid peroksidasyonuna ve doğal olarak oksidatif hasara yol açtığı ortaya konmuştur.

8. SONUC ve ÖNERİLER

TRF yarılanma süresinin uzun olması ülkemizde son verilere göre yüksek miktarda kullanılması sonucunda kalıntı miktarının fazlalığı birçok risk barındırmaktadır. Biz bu çalışmada TRF'nin karaciğer ve duodenum üzerine oluşturabileceği etkileri araştırdık. Bu araştırma için sıçanlardan aldığımız doku ve kan örneklerini histolojik, immunhistokimyasal, istatistiksel ve biyokimyasal olarak değerlendirdik.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar tartışma bölümünde de görülebileceği gibi genel olarak ulaştığımız literatürlerle uyum göstermektedir. TRF uygulanmış deneklerde karaciğer dokusunun histolojik değerlendirmesinde hücre kordon yapısında bozulmalar, hidrofik dejenerasyon, mononükleer hücre infiltrasyonu ve sinüzoidlerde dilatasyon tespit edildi. Ayrıca duodenum dokusunda ise lamina propria dokusunda artış, epitel hücrelerinin bazalinde yağ birikimi ve lökosit infiltrasyonu gözlemlendi.

Deneklerin ağırlıkları her grup içinde başlangıç ve son değerleri kıyaslandığında TRF uygulanmış sıçanlarda TRF nin etkisi nedeniyle anlamlı kilo kaybı gözlenmiştir.

Apoptosis değerlendirmesi için yaptığımız TUNEL ve kaspaz 3 boyamada hem karaciğerde hem de duodenumda gruplar arası apoptotik hücre sayılarını kıyasladığımızda TRF uygulanmış sıçanlarda TUNEL ve kaspaz 3 pozitif hücre sayısının kontrol ve sham gruplarına oranla anlamlı arttığını tespit ettik.

Karaciğer hücre hasarında artış gösteren AST ve ALT değerleri incelendiğinde TRF uygulanmış sıçanlarda karaciğer hasarına bağlı olarak kontrol ve sham gruplarına kıyasla anlamlı artış gözlenmiştir. Ayrıca yine karaciğer hasarlarında azalma gösteren albumin seviyeleride gruplar arası kıyaslandığında TRF uygulanmış sıçanlarda kontrol ve sham grubuna oranla anlamlı azalma göstermiştir.

Elde ettiğimiz sonuçlarda oksidatif stres parametrelerinin ölçümü ile hem karaciğerde hem de duodenumda TRF nin toksik etkisinden dolayı TRF uygulanmış sıçanlarda MDA düzeylerinde artış, SOD ve GPx seviyelerinde ise azalma gözlenmiştir.

TRF nin oluşturmuş olduğu hasarın daha iyi anlaşılması için moleküler ve biyokimyasal yollarının açığa çıkması gerekmektedir. Bu yüzden bu tür araştırmaların yapılması büyük önem taşımaktadır.

Yukardaki sonuçlar doğrultusunda TRF nin uyguladığımız dozlarada, hem karaciğerde hem de duodenumda toksik etkisi sonucu hasara neden olduğunu gözlemledik. Dinitroanniline türevi herbisit olarak bilinen TRF' nin kalıntı miktarlarını göz önünde tutarak

daha kontrollü ve bilinçli kullanılması, doğal dengenin bozulmaması ve halk sağlığı açısından gelecek nesillerde sağlık sorunlarının yaşanmaması için gerekli denetimlerin yapılması büyük önem taşımaktadır.

9. KAYNAKLAR

1. Anonymous, 1996. Gıdalarda Katkı-Kalıntı ve Bulaşanların İzlenmesi. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Uludağ Üniversitesi Basımevi, Bursa, 196 s.
2. Amdur, M.O., Doull, J., Klassen, C.D., Casarett and Doull's Toxicology. The basic science of poisons, Pergamon Press, New York 1033, 1991.
3. Guest, J.A., Copley, M.P., Homernic, K.L., Carcinogenic effects of pesticides. *Pathol Pharmacol.*, 71(3): 387-390, 1991
4. Curley, F.D., *Arch. Environm. Contam. Toxicol.*, 1977.
5. Datta, C., Gupta, J., Sarkar, A., Sengupta, D., Effects of organophosphorus insecticide phosphomidon on antioxidant defence components of human erythrocyte and plasma. *Indian J. Exp. Biol.* 30 (1) 65- 67 1992.
6. Pope, C.N., Charracorti, T.K., Dose-related inhibition of brain and plasma Cholinesterase in neonatal and adults following sublethal organophosphate exposures. *Toxicology*, 73. 35-42, 1992.
7. Philip, G.H., Reddy, P.M., Sridevi, G., Cypermetrin-induced in vivo alterations in the carbohydrate metabolism of freshwater fish, *Labeo rohita*. *Ecotoxicol Environ* 31 (12) p 173-178, 1995.
8. Izushi, F., Ogata M., Hepatic and muscle injuries in mice treated with heptachlor *Toxicol Lett.* 54 (1) p 47-54, 1990.
9. Brovwer, E.J., Evelo, C.T., Verplanke, A.J., van Welie, R.T., de Wolf, F.A., Biological effect monitoring of occupational exposure to 1,3 dichloropropene : effects on liver and renal function and on glutathione conjugation. *Br. J. ind. Med.* 48 (3) p 167-172, 1991.
10. Anonymous., Bitki Koruma Ürünleri, T.C. Tarım ve Köy işleri Bakanlığı, Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü 2002. TİSİT Tarım ilaçları Sanayici, ithalatçı ve Temsilcileri Derneği (www.tisit.org)
11. Welseh. U. Sobotta/Hammersen. Tercüme, Tekelioğlu. M. *Histoloji Istanbul.* Beta. A.Ş 1994 168-173
12. Kalaycı. Ş.: *Histoloji Birinci baskı Uludağ Üniversitesi basımevi* 1987 Bursa 449-466
13. William K. Ovalle, Patrick C. Nahirney. *Netter's Essential Histology.* Saunders Elsevier. 2008
14. Ross Mh, Pawlina W, Kaye Gl. *Histology A Text and Atlas,* Lippincott Williams and

Wilkins; Fifth edition 2006

15. Leeson. T. S. Leeson. C. R. Paparo, A. A. Text/Atlas Of Histology, W.B. Saunders Int. edition Company Philadelphia-London- Toronto-Montreal- Sydney-Tokyo. 1988.
16. Dabros W, Goc A, Turyna B, Kordowiak AM. Influence of vanadyl sulphate [VOS04] on biochemical activity and morphology of control and streptozotocin- diabetic rat liver Golgi complexes. *Pol J Pathol.* 2004;55(1):25-32.
17. Fawcett. D.W.: Bloom and Fawcett. A textbook of histology. Eleventh edition. W.B. Saunders Company. Philadelphia-london-Taronto -Mexico-Rio de Janerio-Sydney-Tokyo-Hong Kong. 1986. p.652-684.
18. J.F.A. Histologic Demonstration of Mucin After Periodic Acid. *Nature*,158-202,1946
19. Bancroft, J. D, Cook, H.C; Manual of histological techniques. First edition. Churchill livingstone, Edinburg-london-Melbourne and New York. 1984. p44-56 pp.91 ppp.256-257
20. Lefkowitz JH. Haythe JH. Regent N. Kupffer cell aggregation and perivenular distribution in steatohepatitis. *Mod Pathol.* 2002 Jul; 15(7):699-704.
21. Niir GK, O'Morchoe CC. Patten and distribution of intrahepatic Iymph vessels in the rat. *Anat Rec.* 1986 Aug; 215(4):351-60.
22. Nakatani K, Kaneda K, Seki S, Nakajima Y. Pit cells as liver-associated natural killer cells: morphology and function. *Med Electron Microsc.* 2004 Mar;37(1):2936.
23. Trutmann M, Sasse D. The Iym'phatics of the liver. *Anat Embryol (Berl).* 1994 Sep;190(3):201-9.
24. Sun W, He F. Applications of proteomics in hepatic diseases research. *Sci China C Life ScL* 2004 Apr;47(2):101-6.
25. Gramlich T, Kleiner DE, McCullough AJ, Matteoni CA, Boparai N, Younossi ZM. Pathologic features associated with fibrosis in nonaleoholic fatty liver disease. *Hum Pathol.* 2004 Feb;35(2):196-9.
26. Corehero J, Martin-Partido G, Dallas SL, Fernaridez-Sa/guero PM. Liver portal fibrosis in dioxin receptor-null mice that overexpress the latent transforming growth factor-beta-binding protein-1. *Int J Exp Pathol.* 2004 Oct;85(5):295-302.
27. Ortiz-Delgado JB, Darias MJ, Canavate JP, Yufera M, Sarasquete C. Organogenesis of the digestive tract in the white seabream, *Diplodus sargus*. Histological and histochemical approaches. *Histol HistopathaL.* 2003 Oct;18(4):1141-54.

28. Steingrub JS. Pregnancy-associated severe liver dysfunction. *Crit Care Clin.* 2004 Oct;20(4):763-76.
29. Ahn BM. [Herbal Preparation-induced Liver Injury] *Korean J Gastroenterol.* 2004 Sep;44(3): 113-25.
30. Andreato A, Galante D, Perna P, Adinolfi L, Ruggiero G. [Effect of /evamisole on changes in the of hepatic RES induced by chronic ethanol poisoning] *Boll Soc Ital Biol Sper.* 1981 Apr 30;57(8):887-90.
31. Kew MC. Hepatocellular carcinoma with and without cirrhosis. A comparison in southern African blacks. *Gastroenterology.* 1989 Jul;97(1):136-9
32. Younossi ZM, McCullough AJ, Ong JP, Barnes DS, Post A, Tavilli A, Bringman D, Martin LM, Assmann, Gramlich T, Mullen KD, O'Shea R, Carey WD, Ferguson R. Obesity and non-alcoholic fatty liver disease in chronic hepatitis C. *J Clin Gastroenterol.* 2004 Sep;38(8):705-9.
33. Moon KW, Leem JM, Bae SS, Lee KM, Kim SH, Chae HB, Park SM, Yoon SJ. [The prevalence of metabolic syndrome in patients with nonalcoholic Fatty liver disease] *Korean J Hepatol.* 2004 Sep;10(3):197-206
34. Wanless IR, Shiota K. The pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis and other fatty liver diseases: a four-step model including the role of lipid release and hepatic venular obstruction in the progression to cirrhosis. *Semin Liver Dis.* 2004 Feb;24(1):99-106
35. Burke A, Lucey MR. Non-alcoholic fatty liver disease, non-alcoholic steatohepatitis and orthotopic liver transplantation. *Am J Transplant.* 2004 May;4(5):686-93
36. Hui JM, Farrell GC, Kench JG, George J. High sensitivity C-reactive protein values do not reliably predict the severity of histological changes in NAFLD. *Hepatology.* 2004 May;39(5):1458-9.
37. Gramlich T, Kleiner DE, McCullough AJ, Matteoni CA, Boparai N, Younossi ZM. Pathologic features associated with fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Hum Pathol.* 2004 Feb;35(2): 196-9.
38. Loria P, Lonardo A, Leonardi F, Fontana C, Carulli L, Verrone AM, Borsatti A, Bertolo M, Cassani F, Bagni A, Muratori P, Ganazzi D, Bianchi FB, Carulli N. Non-organ-specific autoantibodies in nonalcoholic fatty liver disease: prevalence and correlates. *Dig Dis Sci.* 2003 Nov;48(11):2173-81
39. Arıncı K, Elhan A. *Anatomi. Cilt 1, (3. baskı) Günes Kitabevi, Ankara 1997;223-283,*

40. Healy J.C, Borley N.R, Glass J, Ind T. Abdomen and Pelvis. In: Standing S, Ellis, Healy J.C, Johnson D, Williams A, Collins P. at al. Gray's Anatomy-The Anatomical Basis of Clinical Practite. Thirty-ninth edition. Churchill Livingstone. 2005; 1095-1396
41. Kierszenbaum AL. Histology and Cell Biology Mosby 2006.
42. Luis Carlos Junqueira, Jose Carneiro, Basic Histology: Text & Atlas, 10th Edition
43. Ross, M., Romrell, JR., Kaye, GI.:Histology; 1995;
44. Vural N.,1996,Toksikoloji Kitabı,Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayını,No:73.
45. Ecevit.O.Mennan,H., Aksoy, H.M.,Akça,_,1999,Tarımsal Mücadele ilaçları ve Çevreye Olan Etkileri,O.M.U.Ziraaat Fak.Ders Kitabı
46. No:32.Samsun "Trifluralin in Drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality", Health criteria and other supporting information, World Health Organization, (1996).
47. Kidd, H. ve James, D.R. "The Agrochemicals Handbook, Third Edition. RoyalSociety of Chemistry Information Services", Cambridge, UK, Sayfa:10-12(1991)
48. Patterson, A.S.M. "Trifluralin Analysis of Risks to Endangered and ThreatenedPacific Salmon and Steelhead", Ph.D. Environmental Field Branch Office of Pesticide Programs, (2004).
49. Trifluralin. **ERİŞİM:** <http://www.pan-uk.org/pestnews/Actives/Triflura.htm>].
50. Delen, N., Durmuşoğlu, E., Güncan, A., Güngör, N., Turgut, C. ve Burçak, A. "Türkiye'de pestisit kullanımı, kalıntı ve organizmalarda duyarlılık azalışı sorunları" Türkiye Ziraat Mühendisliği VI. Teknik Kongre. **ERİŞİM:** <http://www.agr.ege.edu.tr/~guncan/pdf/2005tzmtk.pdf> 06.04.2007
51. 8trf. İnternet: The Extention Toxicology Network (Extoxnet) "Trifluralin" <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/pyrethrins-ziram/trifluralinext.html> (1993
52. Ebert*, K.-H. Leist, R. Hack and G. Ehling "Toxicology and Hazard Potential of Trifluralin" Fd Chem. Toxic. Vol. 30, No. 12, pp. 1031-1044, 1992)
53. Hikim APS, Wang C, Leung AR, Swerdloff S. Involvement of apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. Endocrinology 1995;136 (6): 2770-2775.
54. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972;26: 239-57.
55. URL: www.istanbul.edu.tr/fen/mbg/notlar/1226326853.pdf

56. Ulukaya E. Apoptozis ders notları. (2003) Erişim: http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis_ders_notu.pdf.
57. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 2000; 407.
58. Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4): 495–516.
59. Roshal M, Zhu Y, Planelles V. Apoptosis in AIDS, *Apoptosis*, 2001; 6: 103–116.
60. Nagata S. Apoptosis by death factor, *Cell*, 1997; 88: 355–365.
61. Delhalle S, Duvoix A, Schnekenburger M, Morceau F, et al. An introduction to the molecular mechanisms of apoptosis. *Ann NY Acad Sci* 2003;1010: 1-8.
62. Tomatır AG. Apoptozis;programlı hücre ölümü,T. *Klin. J. Med. Sci.* 2003;23: 499-508.
63. Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annual Review of Immunology* 1998; 16: 395-419.
64. Nicholson DW, Nicotera P, Melino G. Caspases and cell death, *Encyclopedia of Biological Chemistry*, 2004;1: 319-327.
65. Donoghue S, Baden HS, Lauder I, Sobolewski S, Pringle JH. Immunohistochemical localization of caspase-3 correlates with clinical outcome in B-cell diffuse large-cell lymphoma, *Cancer Research*, 1999;59: 5386–5391.
66. Cohen, GM. Caspases: The executioners of apoptosis. *Biochem.J.* 1997;326: 1-16.
67. Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Experimental Cell Research*, 2000; 256, 42-49.
68. Göncü NE, Pehlivan S. Apoptozisin morfolojik, biyokimyasal ve moleküler işaretleri. *Arşiv*, 2001; 10: 292-307.
69. Öktem S, Özhan MH, Özol D. Apoptozisin önemi, *Toraks Dergisi*, 2001;2 (1): 91-95.
70. Leigh GH. Nomenclature of inorganic chemistry. Blackwell Scientific, 1990; Oxford.
71. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya, Mimoza Yayınları, 1. Baskı. 1995; 1-84.
72. Aybey B, Tufan H, Ergenekon G. Serbest radikaller. *Türkderm.* 1996;30: 116-122.
73. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin.* 1993;49: 481-493.
74. Stoian I, Oros A, Moldoveanu E. Apoptosis and free radicals. *Biochemical and Molecular Medicine.* 1996; 59: 93-97.

75. Bulkley GB. Free radicals and other reactive oxygen metabolites: Clinical relevance and the therapeutic efficacy of antioxidant therapy. *Surgery*. 1993;113: 479-483.
76. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*. 1994;74: 139-162.
77. Nordberg J, Arner ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology Medicine*. 2001;31: 1287-1312.
78. Frang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition* 2002;18: 872-879.
79. Mccord JM. The evolution of free radicals and oxidative stres. *Am J Med*. 2000;108: 652-659.
80. Ryter SW, Tyrrell RM. Singlet molecular oxygen: a possible effector of eukaryotic gene expression. *Free Radic Biol Med*. 1998;24: 1520-1534.
81. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med*. 1998; 91: 14-21.
82. Notarajan V. Oxidants and signal transduction in vascular endothelium. *J Lab Clin Med*. 1995;125: 26-37.
83. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies JM. Biochemistry and pathology of radical mediated protein oxidation. *Biochem J*. 1997;324: 1-18.
84. Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease: Curiosity, cause or consequence? *The Lancet* 1994; 344: 721-724.
85. Lledias F, Rangel P, Hansberg W. Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J Biol Chem*. 1998;273: 10630-10637.
86. Sorg O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *C R Biologies*. 2004; 327: 649-662.
87. Willcox JK, Ash SL, Catignani GL. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2004;44: 275-295.
88. Erden M. Serbest radikaller. *Türkiye Klinik Tıp Bilimleri Dergisi*. 1992;12: 201-207.
89. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover and effector action in biological systems. *The Journal of Lipid Research*. 1998;39: 1529-1542.
90. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. Second edition Clarendon Press, Oxford. (1989).
91. Köse K, Doğan P. Lipid peroksidasyonu. *Erciyes Tıp Dergisi* 1992; Ek-1: 340-350.

92. Bulkley GB. Free radicals and other reactive oxygen metabolites: Clinical relevance and the therapeutic efficacy of antioxidant therapy. *Surgery* 1993;113: 479-483.
93. Junqueira VB, Barros SB, Chan SS, Rodrigues L, et al. Aging and oxidative stress. *Mol Aspects Med.* 2004; 25: 5-16.
94. Mates JM, Sanchez-Jimenez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Frontiers in Bioscience* 1999;4: 339-345.
95. Seven A, Candan G (1996) Antioksidan savunma sistemleri Cerrahpaşa J.Med; 27: 41 50
96. Cheeseman KH and Slater TF (1993). An introduction to free radical biochemistry. *Br Med. Bull;* 49 (3): 481-493
97. Choi D (1990) Free radicals. *Stroke;* 21: 88-89
98. Gomez-Arroyo S, Baiza AM, Lopez G, Villalobos-Pietrini R. A Comparative study of the cytogenetic effects of the insecticides heptochlor, malathion and methylparathion in *Vicia faba*. *Contam Ambient* 1985; 1: 7-16
99. Carrano AV, Natarajan AT. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutat Res* 1988; 204(3): 379-406.
100. Brovwer, E.J., Evelo, C.T., Verplanke, A.J., van Welie, R.T., de Wolf, F.A., Biological effect monitoring of occupational exposure to 1,3 dichloropropene : effects on liver and renal function and on glutathione conjugation. *Br. J. ind. Med.* 48 (3) p 167-172, 1991.
101. Effects of Trifluralin on Carp: Biochemical and Histological Evaluation Vesna PoleksicH1 and Vesela Karan
102. S. Sinha, N. Panneerselvam, and G. Shanmugam Fluchloralin Is Cytotoxic and Genotoxic and Induces Apoptosis in Mammalian Cells *Environmental and Molecular Mutagenesis* 31:257±262 (1998)
103. Anne R. Greenlee,¹ Tammy M. Ellis,¹ and Richard L. Berg² Low-Dose Agrochemicals and Lawn-Care Pesticides Induce Developmental Toxicity in Murine Preimplantation Embryos *Environmental Health Perspectives* VOLUME 112 NUMBER 6 May 2004
104. Shakil A. Saghir*, Grantley D. Charles, Michael J. Bartels, Lynn H.L. Kan, Mark D. Dryzga, Kathy A. Brzak, Amy J. Clark *Toxicology & Environmental Research & Consulting, The Dow Chemical Company, Midland, MI 48674, USA.*

105. Paulina CA., Guerra JL, Oliveira GH,Palermo- Neto J. Acute, subchronic and chronic 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) intoxication in rats, *Veterinary and Human Toxicology*,1996 Oct;35(5)348-52
106. Alo´isio Luiz Benedetti a, Cidˆ,onia de Lourdes Vituri b, Andr´ea Gonçalves Trentin a Maria Aparecida Cust´odio Domingues c, Marcio Alvarez-Silva, The effects of sub-chronic exposure of Wistar rats to the herbicide Glyphosate-Biocarb® *Toxicology Letters* 153 (2004) 227–232
107. Akyol ˆ. (1994). Beyin tmrlerinde doku SOD, CAT ve GPx aktiviteleri. Uzmanlık tezi Ankara.
108. Bagchi, D., Bagchi, M., Hassoun, E.A. and Stohs, S.J., “In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides”, *Toxicology*, 104 (1-3): 129-140 (1995)
109. Kamal A.A., Gomaa A., El Khafif M., Hammad A.S. (1989). Plasma lipid peroxides among workers exposed to silica or asbestos dust. *Environ Res* 49, 173-180.
110. Sunny O. Abarikwu, Adebukola C. Adesiyan, Titilola O. Oyeloja, Matthew O. Oyeyemi Ebenezer O. Farombi.,Changes in sperm characteristics and induction of oxidative stres in the testis and epididymis of experimental rats by a herbicide, Atrazine. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 12 August 2009.