

Ratlarda Pentadekafluorooktanoik Asit ile Oluşturulan Karaciğer Hasarı Üzerine Üzüm Çekirdeği ve Kolşisinin Etkisi[#]

Ayhan ATASEVER¹, Duygu YAMAN^{1*}, Akın TEMEL²

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

²Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri, Türkiye

*Sorumlu Yazar: Duygu YAMAN Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, 38039, Kayseri, Türkiye

e-posta: dyguyaman@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received: 31.07.2013

ÖZET

Çalışmamızda, ratlarda pentadekafluorooktanoik asit (PFOA; perfluorooctanoic acid) ile oluşturulan karaciğer hasarına üzüm çekirdeği ve kolşisinin etkisi ile bazı serum biyokimyasal parametrelerindeki değişiklikleri belirlemek amaçlandı. Altmış adet Wistar albino rat (200-250 g) 10'arlı altı gruba ayrıldı. Grup 1 (kontrol)'dekilere bir hafta % 0,9'luk tuzlu su, grup 2'dekilere haftada iki kez pentadekafluorooktanoik asit, grup 3 ve 4'dekilere ilk hafta iki kez pentadekafluorooktanoik asit enjeksiyonunu takiben sırasıyla dört hafta boyunca üzüm çekirdeği ekstresi ve kolşisin, grup 5 ve 6'dakilere dört hafta boyunca sırasıyla kolşisin ve üzüm çekirdeği ekstresi verildi. Histopatolojik olarak; Grup 2'deki ratların karaciğerlerinde hiperemi, fokal kanamalar, yağ dejenerasyonu ile portal bölgelerde daha belirgin bağ doku elemanlarında artış ve lenfoid seri hücre infiltrasyonları gözlemlendi. Grup 3 ve 4'deki bulgular Grup 2'deki ile benzerdi. Biyokimyasal olarak; serum total protein, albümin ve globülin düzeyleri yönünden kontrol (grup 1) ile deneme grupları (grup 2, 3, 4, 5, 6) arasında istatistiksel bir fark saptanmadı (P>0,05). Grup 2'deki ratlara göre Grup 3 ve 4'deki ratlarda total protein, albümin ve globülin düzeylerinde istatistiksel olarak bir değişim belirlenmemesine (P>0,05) karşın, Grup 5 ve 6'daki ratlarda bu parametrelerde önemli düzeyde artış (P<0,01; P<0,05) gözlemlendi. Serum trigliserit ve total kolesterol düzeyleri ile AST, ALT ve ALP aktiviteleri uygulamalardan istatistiksel önemde etkilenmedi (P>0,05). Sonuç olarak; pentadekafluorooktanoik asit enjeksiyonu ile oluşturulan akut karaciğer hasarına karşı üzüm çekirdeği ekstresi ve kolşisinin etkisinin olmadığı kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Kolşisin, Pentadekafluorooktanoik asit, rat, üzüm çekirdeği

ABSTRACT

THE EFFECTS OF GRAPE SEED AND COLCHICINE ON PENTADEC AFLUORO OCTANOIC ACIDE INDUCED HEPATIC DAMAGE ON RATS

This study aims to determine the effects of grape seed and colchicine on pentadecafluorooctanoic acid (PFOA; Perfluorooctanoic acid) induced hepatic damage and on some serum biochemical parameters. A total of 60 Wistar albino rats (200-250 g) were divided into 6 equal groups. Those in group 1 (controls) received 0.9% saline weekly;

[#] Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından SBT-07-46 kod numarası ile desteklenen "Ratlarda Pentadeka-Fluorooktanoik Asit ile Oluşturulan Karaciğer Hasarı Üzerine Üzüm Çekirdeği ve Kolşisinin Etkisi" başlıklı yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

group 2 PFOA twice a week; group 3 and 4 PFOA twice in the first week, followed by grape seed extract and colchicine for 4 weeks, respectively; group 5 and 6 received colchicine and grape seed extract for 4 weeks, respectively. Hyperemia, focal bleeding, fat degeneration and increase in connective tissue elements, pronounced in portal sites in particular, and infiltration of lymphoid series cell observed in the livers of the rats in group 2. Histological findings in the rats in group 3 and 4 were similar to those in group 2. Biochemically, there were no statistical differences between the control and experimental groups for serum total protein, albumin and globulin levels ($P>0.05$). Although total protein, albumin and globulin levels did not changed statistically ($P>0.05$) in group 3 and 4 compared to group 2, these parameters increased significantly for the rats allocated in the group 5 and 6 ($P<0.01$, $P<0.05$). Serum triglyceride and total cholesterol levels, and AST, ALT and ALP activities did not changed significantly ($P>0.05$). We conclude that grape seed extract and colchicine do not contribute to acute hepatic damage caused by PFOA shot.

Key Words: Colchicine, Pentadecafluorooctanoic acid, rat, grape seed

Giriş

Perfluorooktanoik asit (PFOA) ve Perfluorooktan sülfonat (PFOS) başta olmak üzere perfloralkil kimyasalları (PFC), doğada kalıcı olmakta ve besin zincirleri boyunca biyolojik birikime yol açmaktadır. Bu kimyasallar yaygın olarak, yüzey aktif maddeler, yağlar, cilalar, kâğıt ve tekstil kaplamaları, gıda ambalajı ve yangın söndürücü köpükler gibi endüstriyel maddelerin üretiminde kullanılmaktadırlar (Calafat ve ark., 2007). PFOS ve PFOA insanlarda ve vahşi yaşamda bulunmasına rağmen, PFOA'lar biyokonsantrasyonları ve ekolojik sistemlerdeki bozulmaya karşı direncinin fazla olmasından dolayı daha geniş bir dağılıma sahiptir (Cui ve ark., 2009). PFC'lerin, laboratuvar hayvanlarında gelişimsel bozukluklara ve bir takım yan etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Lau ve ark., 2007; U.S. Environmental Protection Agency, 2013). Bu tip kimyasal maddelere maruz kalmış rat karaciğerlerinde, toplam sitokrom P-450 (CYP450) içeriğinde, benzfetamin N-demetilaz aktivitelerinde (Pastoor ve ark., 1987) ve karboksilesteraz aktivitelerinde (Hosokawa ve Satoh, 1993) artış ile birlikte düz endoplazmik retikulum artışı (Pastoor ve ark., 1987) gözlenmiştir. PFC'lerin toksisite mekanizmaları halen tam olarak bilinmemesine rağmen rodentlerin karaciğerlerinde, glutasyonla ilişkili enzimler gibi sitozolik enzim aktivitelerini değiştirerek hepatik katalaz, açıl-CoA oksidaz ve glutasyon indüksiyonuna neden olduğu kabul edilmektedir (Chen ve ark., 2001; DePierre, 2002; O'Brien ve ark., 2001).

Karaciğer, vücuttaki stratejik konumundan

dolayı vücudun maruz kaldığı çeşitli kseno-biyotiklerin, çevre kirliliği etkenlerinin ve kemoterapötik ajanların metabolizmasının, salgılama ve atılım işlemlerinin gerçekleştirilmesi için anahtar bir organdır. Rat, fare ve hamster gibi bazı deney hayvanlarında PFOA'ların karaciğer ve kanda (veya serumda) yüksek oranlarda bulunduğu bildirilmiştir (Dupont, 1982; Ylinen ve ark., 1990). Yapılan araştırmalarda PFOA'ların ratlarda özellikle karaciğer ve böbrekte daha fazla birikim yaptığı saptanmıştır (Han ve ark., 2005).

Bitkisel kaynaklardan elde edilen antioksidanların genellikle tokoferoller, flavonoidler, karotenler, alkaloidler, klorofiller, proteinler, polifonksiyonlu organik asitler ve fenolik asit gibi fenolik bileşikler yapılarında olduğu görülmüştür (Chahardehi ve ark., 2009; Larson, 1988). Flavonoidlerden proantosiyanidinler, bitkilerdeki kırmızı, sarı ve mavi renk pigmentlerini oluşturan ve polifenol yapısında olan, lipitlerde çözünen antioksidanlardır. Proantosiyanidinlerin karışımı olan üzüm çekirdeği ekstresi (GSE), organizmada primer olarak koruyucu bir etki göstermekle birlikte biyolojik, farmakolojik ve toksik etkileri de düzenlemektedir (Bagchi ve ark., 2000; Tebib ve ark., 1997). Bunun yanında GSE, hepatik fibrozis ile sonuçlanan hücre dışı matriks elemanlarının oksidan kaynaklı üretimi ve birikimini önleyici etkiye de sahiptir (Bagchi ve ark., 2000; Bouhamidi ve ark., 1998; Tebib ve ark., 1997).

Colchium autumnale bitkisinden elde edilen bir alkaloid olan kolşisin, kollegen sentezi ve salınımını inhibe etmektedir (Cutrin ve ark., 1991; Leighton ve ark., 1990). Ayrıca,

karaciğer fibrozisinde rol oynayan hücrelerin mitozunu baskılamakta, lenfosit ve monosit gibi yangı hücrelerinin fonksiyonunu azaltan anti-inflamatuvar etkisi ile fibrozisi ve lipid peroksidasyonunu da engellemektedir (Kershenobisc ve ark., 1990; Leighton ve ark., 1991; Menino ve ark., 1993; O'Conner, 1988).

Bu çalışma, pentadekafluorooktanoik asitle karaciğer yağlanması oluşturulmuş ratlarda, üzüm çekirdeği ve kolşisinin oluşan lezyonlara, ayrıca AST, ALT, ALP, total protein, albümin, trigliserit, total kolesterol üzerine ve serum parametrelerine etkisini belirlemek amacıyla planlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bu araştırma için gerekli etik kurul onayı Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurul'undan alınmıştır (15.02.2007 tarih ve 04/06 sayılı onay belgesi). Çalışmada, 200-250 g ağırlığında Wistar albino cinsi toplam altmış adet erkek rat kullanıldı. Ratlar, 3'er ve 4'erli olarak kafeslerde tutuldu ve pelet yem ile ad libitum olarak beslendi. Kafeslerinde sürekli temiz su bulunduruldu. Ratlar 10'arlı altı gruba ayrıldı. Grup 1 (kontrol)'dekilere bir hafta %0,9'luk tuzlu su (1 ml/kg), grup 2'dekilere haftada iki kez 10 mg/kg fizyolojik tuzlu suda çözündürülmüş pentadekafluorooktanoik asit, intraperitoneal (1 ml/kg), grup 3'dekilere ilk hafta iki kez 10 mg/kg fizyolojik tuzlu suda çözündürülmüş pentadekafluorooktanoik asit, intraperitoneal (1 ml/kg) enjeksiyonu takiben dört hafta boyunca haftada beş gün 100 mg/kg/gün üzüm çekirdeği ekstresi (gavaj), grup 4'tekilere haftada iki kez 10 mg/kg fizyolojik tuzlu suda çözündürülmüş pentadekafluorooktanoik asit, intraperitoneal (1ml/kg) enjeksiyonu takiben dört hafta boyunca haftada beş gün 50 mg/kg/gün intraperitoneal kolşisin, grup 5 ve 6'daki ratlara dört hafta boyunca haftada beş gün sırasıyla 50 mg/kg intraperitoneal kolşisin ve 100 mg/kg/gün üzüm çekirdeği ekstresi (gavaj) verildi.

Son enjeksiyondan 24 saat sonra, ratlardan intrakardiyak kan numuneleri toplandı. Vacutainer tüpüne alınan kan örnekleri 1 saat

oda sıcaklığında bekletildikten sonra 3000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek serumlar ayrıldı ve analize kadar -20 °C'de saklandı.

Çalışma sürecinde tüm gruplarda ölen ve çalışma sonunda hayatta kalan tüm ratlar hafif eter anestezisi altında dekapitasyon yöntemiyle ötanazilerini takiben nekropsileri yapıldı. Hayvanların karaciğerleri alınıp histopatolojik inceleme için %10 nötral formalin solüsyonunda tespit edildi. Karaciğer dokusunun trimleme işlemini takiben histokinet cihazından geçirilerek parafinde bloklandı. Bu bloklar mikrotom ile kesilip (5-6 mikron) hematoksilin-eosin ile boyanıp ışık mikroskopuyla incelendi.

Çalışmada, karaciğerde hepatositlerde oluşan yağlanma ve fibrozis semikantitatif olarak değerlendirildi. Buna göre, her bir kesitte 10 farklı alanda, yağ birikimi görülen hepatositler sayıldı ve grup içerisinde ortalama yüzdelik değerleri hesaplandı. Her bir grupta elde edilen değerler istatistiksel olarak değerlendirildi ve gruplar arasındaki istatistiksel önem kaydedildi. Fibrozis derecesini belirlemek için yapılan skorlama metodu İncioğlu (2008)'e göre uygulandı.

Verilerin istatistiki analizleri, Microsoft için SPSS 15,0 paket programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arasındaki fark tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile belirlendi. F değeri önemli bulunduğunda farkın hangi gruptan kaynaklandığını belirlemek için Duncan's Multiple Range Test'i uygulandı. Veriler ortalama ve ortalamaların standart hatası olarak verildi.

Bulgular

Klinik Bulgular

Ratlarda, halsizlik, kambur duruş, sendeleyerek yürüme, aşırı salivasyon, ptosis, ataksi ve korneal opasite gözlemlendi.

Nekropsi Bulguları

Çalışma sonunda, Grup 1, Grup 5 ve Grup 6'da yapılan nekropsi işlemi sonucunda karaciğerler normal kırmızı rengine olup makroskopik bir lezyona rastlanmadı. Grup 2, Grup 3 ve Grup 4'de ise karaciğerlerin

bazılarında koyu kırmızı, bazılarında ise gri-beyaz renk değişimleri gözlemlendi ve karaciğerlerde büyüme dışında makroskopik bir lezyona rastlanmadı.

Histopatolojik Bulgular

Kontrol grubundan alınan karaciğer doku örneklerinin normal yapıda olduğu (Şekil 1-A) ve aralarında herhangi bir farklılığın bulunmadığı görüldü. Grup 2'deki ratların karaciğerlerinde yağlanma ve nekrotik değişiklikler ile özellikle portal bölgelerde hafif fibrozis dikkati çekti. Yağlanma, vena sentralis çevresindeki hücrelerde belirgin olmak üzere tüm parankimde görüldü (Şekil 1-B). Bu bölgedeki hepatositlerin sitoplazmasındaki farklı büyüklükteki yağ vakuol oluşumları ile ilgili olarak genişlediği ve sinüzoidleri daralttığı gözlemlendi. Portal alana komşu hücreler nispeten normale yakın görünmekle birlikte sinüzoidlerin normal açıklıkta olduğu izlendi. Sinüzoidler içerisinde bol miktarda eritrositle birlikte, Kupffer hücrelerinde artış saptandı (Şekil 1-C). Ayrıca özellikle portal alanlara yakın bölgelerde kümeler oluşturacak tarzda, lenfositler zengin mononükleer hücre infiltrasyon alanları yer alırken, seyrek olarak bu durumun vena sentralis çevresindeki nekrotik alanlar ile tüm parankime yayıldığı görüldü (Şekil 1-D). Grup 3'deki ratların karaciğerlerindeki bulgular grup 2 ile benzerdi. Yağlanmanın yoğun olduğu alanlarda hepatositlerin farklı büyüklükte yağ damlacıkları içerdiği görüldü. Bazı hücreler multivakuoler tarzda yağ damlacıkları içerirken, bunlardaki çekirdekler genel olarak merkezi yerleşimliydi. İri, sınırları keskin univakuoler yağ damlacıkları içeren hücrelerde ise çekirdek genel olarak yassılaştı ve hücre periferine itilmiş olarak gözlemlendi (Şekil 1-E). Grup 4'teki ratların karaciğerleri histolojik olarak incelendiğinde bulgular grup 2 ve grup 3 ile benzerdi. Yağlanma, vena sentralis çevresindeki hücrelerde belirgin olmak üzere tüm parankimde görüldü (Şekil 1-F). Grup 5 ve grup 6'daki ratlardan alınan karaciğer doku örnekleri incelendiğinde histolojik yönden normal yapıya

sahip oldukları ve çekirdeklerdeki kromatin dağılımı ile çekirdeklerin görünümünün kontrollere yakın olduğu dikkati çekti (Şekil 1-G, H).

Karaciğerde hepatositlerde oluşan yağlanma semikantitatif olarak değerlendirildi ve her bir kesitte 10 farklı alanda, yağ birikimi görülen hepatositler sayılarak grup içerisinde ortalama yüzdelik değerleri Şekil 2'de gösterildi.

Fibrozis derecesini belirlemek için yapılan skorlama metodu genellikle insan hekimliği için kullanılmaktadır (Aydın ve ark., 2005; Güllüoğlu ve ark., 2005; İncioğlu, 2008). İncioğlu (2008)'e göre hazırlanan Tablo 1'de görüldüğü üzere sunulan çalışmada PFOA, PFOA+üzüm çekirdeği ve PFOA+kolşisin verilen gruplarda çoğu portal alanlarda kısa fibröz genişleme ve nadir köprüleşme gözlemlendi. Sonuç olarak fibrozisin mevcut olduğu, evresinin ise 3/6 olduğu belirlendi (Tablo 1).

Biyokimyasal Bulgular

Çalışmada serum total protein, albümin ve globülin düzeyleri yönünden kontrol grubu (grup 1) ile deneme grupları (grup 2, 3, 4, 5, 6) arasında istatistiksel bir fark saptanmadı ($P>0,05$). Grup 2'ye göre, grup 3 veya grup 4'te total protein, albümin ve globülin düzeylerinde istatistiksel olarak bir değişim belirlenmemesine ($P>0,05$) karşın, grup 5 ve grup 6'daki ratlarda bu parametrelerde önemli düzeyde artış ($P<0,01$; $P<0,05$) gözlemlendi. Serum trigliserit ve total kolesterol düzeyleri ile AST, ALT ve ALP aktiviteleri ise uygulamalardan istatistiksel önemde etkilenmedi ($P>0,05$), (Tablo 2).

İstatistiksel Bulgular

Kontrol, üzüm çekirdeği ve kolşisin gruplarında yağlanma oranı 0 olarak kabul edildi. Gruplar arasındaki fark tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile belirlendi. PFOA ve PFOA+üzüm çekirdeği uygulanan gruplarda istatistiksel olarak fark gözlenmezken; PFOA+kolşisin uygulanan grupta istatistiksel olarak fark gözlemlendi ($P<0,05$), (Tablo 3).

Tablo 1. Fibrozis ve sirozun evrelemesi.**Table 1.** Staging of fibrosis and cirrhosis.

Değişiklik	Skor	GRUPLAR					
		Kontrol	Üzüm çekirdeği	Kolşisin	PFOA	PFOA + Üzüm Çekirdeği	PFOA + Kolşisin
Fibrozis yok	0	+	+	+	-	-	-
Bazı portal alanlarda kısa fibröz septumlu veya septumsuz fibröz genişleme	1	-	-	-	-	-	-
Çoğu portal alanlarda kısa fibröz septumlu veya septumsuz fibröz genişleme	2	-	-	-	-	-	-
Çoğu portal alanlarda kısa fibröz genişleme, nadir köprüleşme	3	-	-	-	+	+	+
Portal alanlarda köprüleşme ile birlikte hem P-P hem de P-C köprüleşme	4	-	-	-	-	-	-
Nadir nodüllerle birlikte belirgin köprüleşme (P-P ve/veya P-C) (inkomplet siroz)	5	-	-	-	-	-	-
Siroz; muhtemel ya da kesin	6	-	-	-	-	-	-

P-P: Portal-Portal.

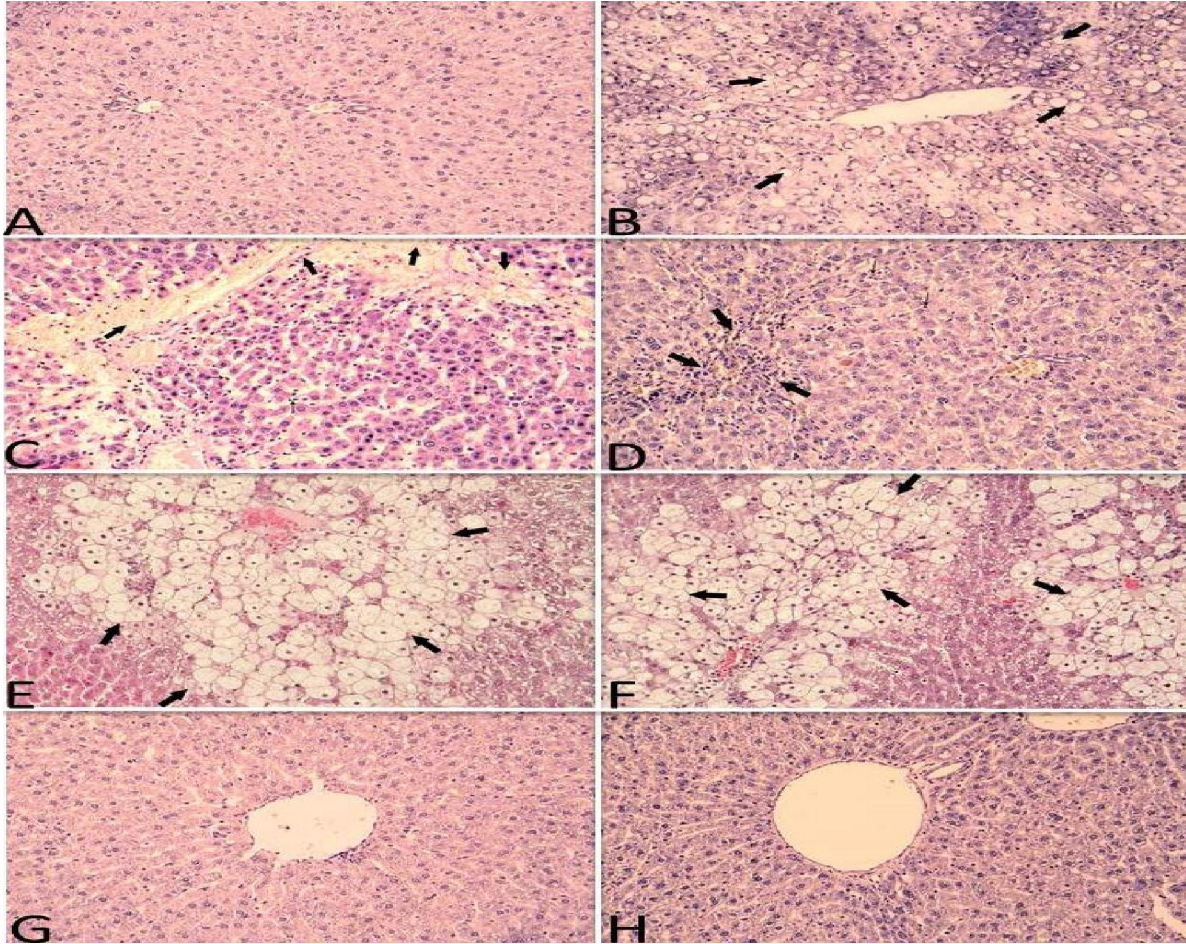
P-C: Portal-Sentral.

Tablo 2. Kontrol ve deney gruplarında bazı serum biyokimyasal parametreler**Table 2.** Some serum biochemical parameters in the control and experimental groups

Parametreler	GRUPLAR						P
	Kontrol (n=10)	PFOA (n=11)	PFOA+Üzüm Çekirdeği Ekstresi (n=10)	PFOA+Kolşisin (n=10)	Kolşisin (n=10)	Üzüm Çekirdeği Ekstresi (n=10)	
Total protein (g/dL)	6,15±0,14 ^{ab}	6,20±0,18 ^b	6,20±0,13 ^{ab}	5,75 ±0,26 ^b	6,45±0,19 ^a	6,67±0,14 ^a	**
Albumin (g/dL)	1,69±0,03 ^{ab}	1,59±0,04 ^b	1,68±0,05 ^{ab}	1,53±0,06 ^b	1,77±0,07 ^a	1,81±0,05 ^a	**
Globulin (g/dL)	4,46±0,12 ^{ab}	4,23±0,14 ^b	4,53±0,14 ^{ab}	4,22±0,20 ^b	4,68±0,13 ^a	4,86±0,10 ^a	*
Trigliserit (mg/dL)	123,80±25,46	185,55±18,33	161,70±25,28	159,80±22,53	147,00±17,78	198,20±23,54	-
Total Kolesterol (mg/dL)	46,40±0,98	44,09±2,95	48,30±1,89	49,50±3,11	53,90±0,99	49,00±2,49	-
AST (U/L)	135,30±9,75	128,27±13,55	216,50±42,34	171,70±34,85	227,70±47,89	114,90±10,44	-
ALT (U/L)	61,70±2,25	63,55±3,61	87,50±13,49	77,70±13,10	108,00±24,48	80,00±6,63	-
ALP (U/L)	210,10±4,32	166,00±10,60	201,90±56,29	222,30±25,50	177,30±9,84	223,00±15,77	-

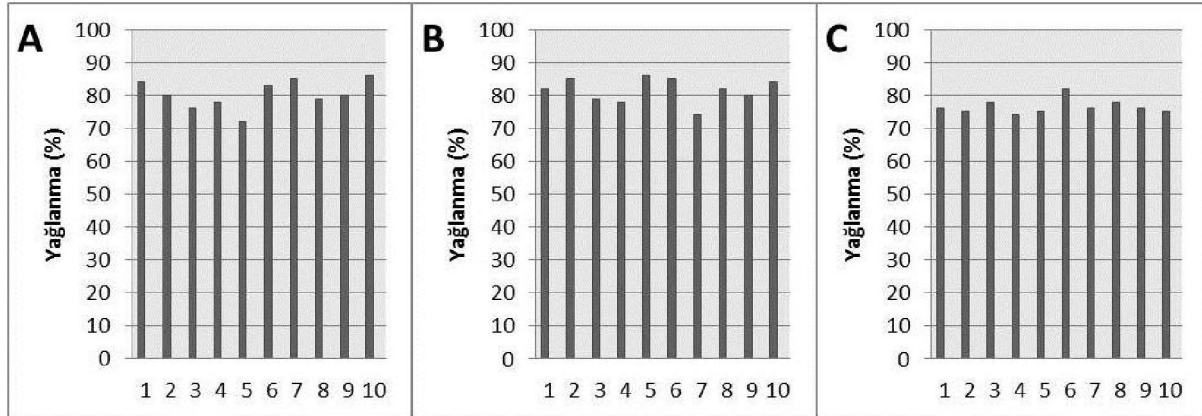
-: Önemsiz, *: P<0,05, **:P<0,01

^{a,b}: Aynı satırda farklı harf taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir.



Şekil 1. A- Kontrol grubundaki ratların karaciğerlerinin normal görünümü. Karaciğer, HxE, 200, B- Grup II'deki ratların karaciğerlerinde vena sentralis çevresindeki hücrelerde belirgin olmak üzere tüm paransimde büyüklükleri farklı, keskin kenarlı yuvarlak yağ vakuollerinin görünümü (siyah oklar). Karaciğer, HxE, 200, C- Grup II'deki ratların karaciğerlerinde portal alanda geniş kanama alanları (siyah kalın oklar) yanında komşu bölgedeki hücreler nispeten normale yakın olup sinüzoidlerin içerisinde bol miktarda eritrositle birlikte, Kupffer hücrelerinde artış (siyah ince oklar). Karaciğer, HxE, 200, D- Grup II'deki ratların karaciğerlerinde portal bölgeye yakın çoğunluğu lenfosit olan (siyah ince oklar) mononükleer hücre infiltrasyon alanları (siyah kalın oklar). Karaciğer, HxE, 200, E- Grup III'deki ratların karaciğerlerinde paransimde hücreler içinde diffüz olarak yerleşim gösteren büyüklükleri farklı, hücre çekirdeğini perifere itmiş keskin kenarlı yuvarlak yağ vakuollerinin görünümü (siyah oklar). Karaciğer, HxE, 200, F- Grup IV'deki ratların karaciğerlerinde paransimde diffüz olarak yerleşim gösteren büyüklükleri farklı, keskin kenarlı, yuvarlak yağ vakuollerinin görünümü (siyah oklar). Karaciğer, HxE, 200, G- Grup V'deki ratların karaciğerlerinin normal histolojik görünümü. Karaciğer, HxE, 200, H- Grup VI'deki ratların karaciğerlerinin normal histolojik görünümü. Karaciğer, HxE, 200.

Figure 1. A- Normal appearance of the livers of the control group. Liver, HxE, 200, B- The appearance of sharp edges fat vacuoles having different size in the all parenchyma that significant in the cells around vena centralis in the rats of the group 2 (black thick arrows). Liver, HxE, 200, C- In group 2, with large areas of hemorrhage in the portal area (black thick arrows), liver cells are relatively normal in the adjacent area with large amounts of erythrocytes in the sinusoids. Kupffer cells proliferation (black thin arrows) was also observed. Liver, HxE, 200, D- Mononuclear cell infiltration (black thick arrows) near the portal area, majority of them have lymphocytes (black thin arrows), are observed the rats in the group 2. Liver, HxE, 200, E- The appearance sharp edged rounded fat vacuoles that pushed the cell nucleus to the peripheral areas and diffusely located in the cells with different size in the liver for the rats in the group 3 (black arrows). Liver, HxE, 200, F- The appearance sharp edged rounded fat vacuoles having different size in the liver for the rats in the group 4 (black arrows). Liver, HxE, 200, G- Normal appearance of the livers of the group 5. Liver, HxE, 200, H- Normal appearance of the livers of the group 6. Liver, HxE, 200.



Şekil 2. Deney gruplarında yağlanmanın yüzdesel dağılımları; A- PFOA, B- PFOA+Üzüm Çekirdeği, C- PFOA+Kolşisin.

Figure 2. Percentage distribution of adiposity on experimental groups; A- PFOA, B- PFOA+Grape seed, C- PFOA+Colchicine.

Tablo 3. Deney gruplarında yağlanmanın istatistiksel olarak değerlendirilmesi

Table 3. Statistical evaluation of adiposity on experimental groups

Grup	N	Ortalama± Std. Hata	Min.	Max.	Önem Kontrolü ANOVA
PFOA	10	80,3±1,375 ^a	72	86	
PFOA+ Üzüm çekirdeği	10	81,5±1,195 ^a	74	86	P<0,05
PFOA+ Kolşisin	10	76,5±0,734 ^b	74	82	

^{a,b}: Farklı harf taşıyan ortalamalar arası fark istatistiksel olarak önemlidir.

Tartışma ve Sonuç

Genel olarak enfeksiyonlar (viral ve bakteriyel), parazitler, tümörler, anemiler, toksik durumlar, depo hastalıkları, kalp yetmezliği, konjenital kalp hastalığı ve metabolik bozukluklar gibi durumlar hepatomegaliye sebep olmaktadır. Yapılan çalışmalar, PFOA'ların hayvan modelleri üzerinde en iyi gözlenen etkilerinden birinin hepatomegali olduğunu göstermiştir (Pastoor ve ark., 1987; Takagi ve ark., 1992; White ve ark., 2011). Çalışmamızda deney gruplarında (Grup 2, 3, 4'de) makroskobik olarak karaciğerde büyüme saptanmış olup bu sonuç diğer

araştırmacıların bulguları ile paralellik göstermektedir.

PFOA'nın karaciğer ve diğer dokular üzerindeki etkilerini konu alan çalışmalarda histopatolojik değerlendirmelere çok fazla rastlanılmamıştır (Han ve ark., 2005; Kudo ve ark., 2007). Cui ve ark. (2009) yapmış oldukları bir çalışmada, ratlara 5 mg/kg ve 20 mg/kg olmak üzere iki farklı dozda PFOA uygulamış ve karaciğerlerinde meydana gelen değişimleri makroskobik ve histopatolojik olarak değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar 5 mg/kg dozda PFOA uyguladıkları grupta makroskobik ve mikroskobik olarak kontrol grubundan önemli derecede farklı bir bulguya rastlamamışlardır. 20 mg/kg dozda PFOA uyguladıkları grubun karaciğerlerinde büyüme ve koyu renk değişimleri gözlemişlerdir. Mikroskobik olarak ise değişen derecede yağ birikimleri, santral vende anjiyektazi, hepatik sinüzoidlerde konjesyon, fokal hemoraji, fokal hepatositik nekroz, sitoplazmik vakuolasyon, hepatositik hipertrofi ve yangısal hücre infiltrasyonu saptamışlardır. Sunulan çalışmada, deney gruplarına (grup 2, 3, 4), 10 mg/kg dozda PFOA uygulanmış ve karaciğerlerde tanımlanan büyüme ve kırmızıdan griye değişen makroskobik gözlemler, araştırmacıların sonuçları ile örtüşmektedir. Ayrıca histopatolojik incelemede karaciğerde hepatositlerde yağlanma ve dejeneratif

değişiklikler, bağ dokusu artışı, yangı, remark kordon yapılarının bozulması (disosiasyon), diğer araştırmacıların (Cui ve ark., 2009) gözlemleri ile uyumludur.

Kolşisinin karaciğer hastalığı üzerine etkilerini histolojik açıdan inceleyen deneysel çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu çalışmalarda, kolşisinin perivasküler fibrozisi azalttığı, lipid peroksidasyonu engellediği ve yağlanmayı geriletmediği bildirilmiştir (Rojkind ve Kershenobich, 1975; Sabouraud ve ark., 1992). Çalışmamızda, Grup 4'deki ratların karaciğerlerinde yapılan histopatolojik muayenede Grup 2'dekinden farklı iyileşmeye ilişkin bir bulguya rastlanmamış olup kolşisin ile ilgili olumlu bilgi veren araştırmacılar (Bodenheimer ve ark., 1988; Bolarin ve ark., 1987; Kershenobich ve ark., 1988; Seitz ve ark., 1987) farklı bir sonuç elde edilmiş ve kolşisinin iyileşmeye ilişkin bir etkisinin olmadığı düşüncesine varılmıştır.

Günümüzde üzüm çekirdeğinin karaciğer yağlanması üzerine etkisi ve antioksidan özelliği ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bouhamidi ve ark. (1998), ex vivo çalışmalarında üzüm çekirdeğinin farelerin karaciğer mikrozomlarındaki çoklu doymamış yağ asidi oksidasyonunu azalttığını göstermiştir. Tebib ve ark. (1997), ratları yüksek kolesterolü-E vitamininden fakir bir diyetle besleyerek üzüm çekirdeğinin çeşitli dokulardaki antioksidan enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. E vitamininden fakir diyet aortik, hepatik, kardiyak, intestinal, musküler ve renal dokularda katalaz, glutatyon, peroksidaz ve süperoksit dismutaz aktivitesini azaltmıştır. Üzüm çekirdeği verilen ratlarda bu enzim düzeyleri değişmeden korunmuştur. Ayrıca üzüm çekirdeği glutatyon düzeylerini başlangıç düzeylerine getirmiş ve lipid peroksidasyonunu plazma ve dokularda E vitamini kadar etkin şekilde azaltmıştır. Sato ve ark. (2001), iskemik/reperfüze ratlarda üzüm çekirdeğinin kalbi koruyucu etkilerini araştırmışlar ve kontrol grubuna göre miyokard enfarktüs oranını üzüm çekirdeği alan ratlarda daha düşük bulmuşlardır. Üzüm çekirdeğinin kalbi

iskemi/reperfüzyon hasarına karşı koruduğunu ve bu korumanın iskemik/reperfüzyon sırasında üretilen peroksil ve hidroksil radikallere karşı temizleme yeteneğinden kaynaklandığı sonucuna varılmıştır. Çalışmamızda, Grup 3'teki ratların karaciğerlerinin histopatolojik incelemesinde Grup 2'dekilerden farklı olarak iyileşmeye ilişkin bir bulguya rastlanmamıştır. Böylece üzüm çekirdeği ile ilgili olumlu bilgi veren araştırmacılar (Bouhamidi ve ark., 1997; Tebib ve ark., 1997; Sato ve ark., 2001) farklı bir sonuç elde edilmiş ve üzüm çekirdeği ekstresinin iyileşmeye ilişkin bir etkisinin olmadığı düşüncesine varılmıştır.

Çalışmamız ile bire bir örtüşen benzer bir biyokimyasal çalışma olmasa da; çalışmamızda biyokimyasal olarak; grup 1, 5 ve 6'ya göre grup 2, 3 ve 4'deki ratlarda serum total protein, albümin ve globülin düzeyleri düşerken, ALT aktiviteleri artmıştır. En düşük ALP aktivitesi grup 4 ve 5'te belirlenmiştir. Trigliserit, total kolesterol düzeyleri ile AST aktivitesi uygulamalardan etkilenmemiştir. Çalışmada serum total protein, albumin ve globülin düzeyleri yönünden kontrol grubu (grup 1) ile deneme grupları (grup 2, 3, 4, 5, 6) arasında istatistiksel bir fark saptanmamıştır ($P>0,05$). Haftada iki kez 10 mg/kg fizyolojik tuzlu suda çözüldürülmüş pentadekafluorooktanoik asit intraperitoneal (1 ml/kg) verilen ratlara göre (grup 2), PFOA ile birlikte üzüm çekirdeği ekstresi (grup 3) veya kolşisin (grup 4) verilen grupların total protein, albumin ve globülin düzeylerinde istatistiksel olarak bir değişim belirlenmemesine ($P>0,05$) karşın, dört hafta boyunca haftada beş gün sırasıyla 50 mg/kg intraperitoneal kolşisin (grup 5) ve 100 mg/kg/gün üzüm çekirdeği ekstresi (grup 6) verilen ratlarda bu parametrelerde önemli düzeyde artış ($P<0,01$; $P<0,05$) gözlenmiştir. Serum trigliserit ve total kolesterol düzeyleri ile AST, ALT ve ALP aktiviteleri ise uygulamalardan istatistiksel önemde etkilenmemiştir ($P>0,05$). Bu sonuçlar diğer araştırmacıların görüşleri ile uyumlu idi (Comporti, 1985; Freeman ve Crapo, 1982; Munoz ve ark., 1990; Parola ve ark., 1992; Tribble ve Jones, 1987; Wang ve ark., 1996).

Sonuç olarak, pentadekafluorooktanoik asit uygulanan karaciğerlerde, üzüm çekirdeği ve kolşisinin her birinin, ayrı uygulama gruplarında akut karaciğer hasarı üzerine iyileştirme yönünden etkili olmadıkları görülmüştür. Ancak kesin ifadeler kullanılabilmesi için benzer şekilde yeni çalışmaların yapılmasına ihtiyaç bulunduğu sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Aydın, O., Yıldız, L., Kefeli, M., Barış, S., Kandemir, B., 2005.** Kronik viral hepatitlerde ishak modifiye histolojik aktivite indeksinin tek gözlemci ve gözlemciler arası tekrarlanabilirliği. *Türk Patoloji Dergisi* 21 (3-4), 58-61.
- Bagchi, D., Bagchi, M., Stohs, J., Das, D., Ray, S., Kuszynski, C.A., Joshi, S.S., Pruess, H.G., 2000.** Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: Importance in human health and disease prevention. *Toxicology* 148, 187-197.
- Bodenheimer, H., Schaffner, F., Pezzulo, J., 1998.** Evaluation of colchicine therapy in primary biliary cirrhosis. *Journal of Gastroenterology* 95, 124-129.
- Bolarin, D.M., Barker, K., Fuller, G., 1987.** Enzyme markers of collagen synthesis in carbon tetrachloride-induced fibrosis and during colchicine modification of CCl₄ induced liver injury. *Experimental and Molecular Pathology* 46, 145-152.
- Bouhamidi, V., Prevost, V., Nouvelot, A., 1998.** High protection by grape seed proanthocyanidins (GSPC) of polyunsaturated fatty acids against UV-C induced peroxidation. *Life Sciences* 321, 31-38.
- Calafat, A.M., Wong, L.Y., Kuklennyik, Z., Reidy, J.A., Needham, L.L., 2007.** Polyfluoroalkyl chemicals in the U.S. population: data from the National Health and Nutrition Examination Survey NHANES 2003-2004 and comparisons with NHANES 1999-2000. *Environmental Health Perspectives* 115 (11), 1596-1602.
- Chahardehi, A.M., Ibrahim, D., Sulaiman, S.F., 2009.** Antioxidant activity and total phenolic content of some medicinal plants in Urticaceae family. *Journal of Applied Biological Sciences* 3, 25-29.
- Chen, L.C., Tatum, V., Glauert, H.P., Chow, C.K., 2001.** Peroxisome proliferator perfluorodecanoic acid alters glutathione and related enzymes. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 15, 107-112.
- Comporti, M., 1985.** Biology of disease lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Laboratory Investigation* 53, 599-623.
- Cui, L., Zhou, Q.F., Liao, C.Y., 2009.** Studies on the toxicological effects of PFOA and PFOS on rats using histological observation and chemical analysis. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 56 (2), 338-349.
- Cutrin, C., Menino, M.J., Carballo, C., Pajoj, A., Barrio, E., Parafita, M.A., 1991.** Lactacidaemia in rats with cirrhosis induced by carbon tetrachloride and ethanol: treatment with colchicine, nifedipine and S-adenosyl methionine. *Journal of Research in Medical Sciences* 19, 351-352.
- DePierre, J.W., 2002.** Effects on rodents of perfluorofatty acids. In: Neilson, A.H. (Ed), *The Handbook of Environmental Chemistry*. Berlin, Springer-Verlag, pp. 203-248.
- DuPont Haskell Laboratory, 1982.** Excretion and disposition of ¹⁴C-ammonium perfluorooctanoate in male and female rats, mice, hamsters, and rabbits. US EPA Public Docket AR-226. US Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- Freeman, B., Crapo, J.D., 1982.** Biology of disease, free radicals and tissue injury. *Laboratory Investigation* 47, 412-426.
- Güllüoğlu, M.G., Özlük, Y., Öztürk, A.S., Demir, D., Çevikbaş, U., 2005.** Viral hepatitlerin histolojik skorlamasında gözlemciler arası uyum. *Türk Patoloji Dergisi* 21 (1-2), 3-7.
- Han, X., Kemper, R.A., Jepson, G.W., 2005.** Subcellular distribution and protein binding of perfluorooctanoic acid in rat liver and kidney. *Drug and Chemical Toxicology* 28 (2), 197-209.
- Hosokawa, M., Satoh, T., 1993.** Differences in the induction of carboxylesterase isozymes in rat liver microsomes by perfluorinated fatty acids. *Xenobiotica* 23, 1125-1133.
- İncioğlu, A., 2008.** Kronik hepatit B'nin doğal seyri; ilerleyişi ve prognostik faktörler. Uzmanlık Tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği, İstanbul.

- Kershenobich, D., Vargas, F., Garcia, G., Tamayo, R.P., Gent, M., Rojkind, M., 1988.** Colchicine in the treatment of cirrhosis of the liver. *New England Journal of Medicine* 318, 1709-1713.
- Kershenobisc, D., Rojkind, M., Quiroga, A.Q., Alcocer-Varela, J., 1990.** Effect of colchicines on lymphocyte and monocyte function and its relation to fibroblast proliferation in primary biliary cirrhosis. *Journal of Hepatology* 9, 205-209.
- Kudo, N., Sakai, A., Atsushi, M., Yasuhide, H., Tadashi, T., Yoichi, K., 2007.** Tissue distribution and hepatic subcellular distribution of perfluorooctanoic acid at low dose are different from those at high dose in rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 30 (8), 1535-1540.
- Larson, R.A., 1988.** The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* 27, 969-978.
- Lau, C., Anitole, K., Hodes, C., Lai, D., Pfahles-Hutchens A., Seed J., 2007.** Perfluoroalkyl acids: a review of monitoring and toxicological findings. *Toxicological Sciences* 99 (2), 366-394.
- Leighton, J.A., Bay, M.K., Maldonado, A.L., Johnson, R.F., Schenker, S., Speeg, K.V., 1990:** The effect of liver dysfunction on colchicines pharmacokinetics in the rat. *Journal of Hepatology* 11, 210-215.
- Leighton, J.A., Bay, M.K., Maldonado, A.L., Johnson, R.F., Schenker, S., Speeg, K.V., 1991.** Colchicine clearance is impaired in alcoholic cirrhosis. *Journal of Hepatology* 14, 1013-1015.
- Menino, M.J., Cutrin, C., Parafita, M.A., 1993.** Effect of colchicines on lactate production by isolated hepatocytes in rats treated with carbon tetrachloride and ethanol. *Drug and Alcohol Dependence* 32, 181-185.
- Munoz, R.H., Munoz, M.D., Suarez, J., Sánchez, C.V., 1990.** Adenosine partially prevents cirrhosis induced by carbon tetrachloride in rats. *Journal of Hepatology* 12, 242-248.
- O'Brien, M.L., Cunningham, M.L., Spear, B.T., Glauert, H.P., 2001.** Effects of peroxisome proliferators on glutathione and glutathione related enzymes in rats and hamsters. *Toxicology and Applied Pharmacology* 171, 27-37.
- O'Conner, J.J., 1988.** Is colchicines effective therapy for cirrhosis. *New England Journal of Medicine* 318, 1751-1752.
- Parola, M., Leonarduzzi, G., Biasi, F., Albano, E., Biocca, M.E., Poli, G., Dianzani, M.U., 1992.** Vitamin E dietary supplementation protects against carbon tetrachloride induced chronic liver damage and cirrhosis. *Journal of Hepatology* 16, 1014-1021.
- Pastoor, T.P., Lee, K.P., Perri, M.A., Gillies, P.J., 1987.** Biochemical and morphological studies of ammonium perfluorooctanoate-induced hepatomegaly and peroxisome proliferation. *Experimental and Molecular Pathology* 47, 98-109.
- Rojkind, M., Kershenobich, D., 1975.** Effect of colchicines on collagen, albumin and transferring synthesis by cirrhotic rat liver slices. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 378, 415-423.
- Sabouraud, A., Rochdi, M., Urtizbera, M., Christen, M.O., Achtert, G., Scherrmann, J.M., 1992.** Pharmacokinetics of colchicine: a review of experimental and clinical data. *Gastroenterology* 30 (1), 35-39.
- Sato, M., Bagchi, D., Tosaki, A., Das, D., 2001.** Grape seed proanthocyanidin reduces cardiomyocyte apoptosis by inhibiting ischemia/reperfusion-induced activation of JNK-1 and C-JUN. *Free Radical Biology and Medicine* 31 (6), 729-737.
- Seitz, H.K., Busenkell, R., Simanowski, U.A., Boesche, J., Kommerell, B., Rojkind, M., 1987.** Effect of colchicine on in vivo and in vitro ethanol metabolism in the rat. *Gastroenterology* 25, 270-273.
- Takagi, A., Sai, K., Umemura, T., Hasegawa, R., Kurokawa, Y., 1992.** Hepatomegaly is an early biomarker for hepatocarcinogenesis induced by peroxisome proliferators. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 11 (3), 145-149.
- Tebib, K., Rouanet, J., Besancon, P., 1997.** Antioxidant effects of dietary polymeric grape seed tannins in tissues of rats fed a high cholesterol-vitamin E deficient diet. *Food Chemistry* 59 (1), 135-141.
- Tribble, D.L., Jones, D.P., 1987.** The pathological significance of lipid peroxidation in oxidative cell injury. *Journal of Hepatology* 7, 377-387.
- U.S. Environmental Protection Agency, 2013.** Perfluorooctanoic Acid (PFOA) and Fluorinated Telomers. <http://www.epa.gov/oppt/pfoa/>, (Erişim Tarihi: 17.01.2013).

- Wang, D.H., Ishii, K., Zhen, L.X., Taketa, K., 1996.** Enhanced liver injury in acatalasemic mice following exposure to carbon tetrachloride. *Archives of Toxicology* 70, 189-194.
- White, S.S., Fenton, S.E., Hines, E.P., 2011.** Endocrine disrupting properties of perfluorooctanoic acid. *Journal of Steroid*

Biochemistry and Molecular Biology 127 (1-2), 16-26.

- Ylinen, M., Kojo, A., Hanhijarvi, H., Peura, P., 1990.** Disposition of perfluorooctanoic acid in the rat after single and subchronic administration. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 44, 46-53.