

Sıçanlarda Karbon Tetraklorit (CCl₄)'in Oluşturduğu Oksidatif Stresin Kateşin ile Önlenmesi

Prevention of Oxidative Stress Induced by Carbon Tetrachloride (CCl₄) Using Catechine in Rats

Hülyam KURT¹, Ayşe BAŞARAN¹, Ahmet MUSMUL²

¹ Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir

² Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı, Eskişehir

ÖZET: Bu çalışmada deneysel olarak, sıçanlarda oksidatif stres oluşturan kimyasal madde karbon tetraklorit (CCl₄)'e karşı, antioksidan özelliği bilinen kateşinin ne derece koruyucu etkisi olduğu araştırıldı. Çalışmada üç aylık otuz iki adet Sprague Dawley soyu erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar eşit sayıda dört gruba ayrıldı. İlk on günlük uygulamada, sadece IV.gruba kateşin (50 mg/kg/gün) intragastrik (i.g) olarak verildi. İkinci on günlük uygulamada ise, I.gruba (kontrol) sıvı yağ (0.2 ml/kg/gün) intraperitoneal (i.p) ve (i.g), II.gruba CCl₄ (0.2 ml/kg/gün) (i.p), III.gruba kateşin (50 mg/kg/gün) (i.g), IV.gruba kateşin+CCl₄ belirtilen dozlarda ve aynı saatlerde günde iki uygulama ile verildi. Madde uygulaması sona erdikten sonraki 24.saatte, eter anestezisi altında uygun teknikler kullanılarak karaciğer doku örnekleri alındı. Bu örneklerden hazırlanan homojenatta malondialdehit (MDA) düzeyi, katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) aktiviteleri tayin edildi. Histolojik çalışmalar için alınan karaciğer doku örnekleri %10 nötral formalinde tespit edildi. Rutin takip sonrası kesitler H&E ile boyandı ve ışık mikroskopunda incelendi. Çalışma sonunda, kateşinin tek başına beklenildiği gibi kontrole benzer değerler verdiği görüldü. CCl₄ verilen grupta ise, CCl₄ metabolizmasına bağlı olarak, oluşan serbest radikallerin MDA düzeyini artırdığı, böylece oksidatif hasarın oluştuğu tespit edildi. IV.grupta bu hasarın, kateşin tarafından aktiviteleri artırılan ve serbest radikal süpürücüleri olarak kabul edilen CAT ve GPx tarafından, nispeten düzeltilerek kontrol değerlere yaklaştığı görüldü. Histolojik sonuçlarında kimyasal sonuçları desteklediği tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: CCl₄, kateşin, serbest radikal, sıçan.

ABSTRACT: In this study, the antioxidants catechin was investigated experimentally with respect to its protective effect against CCl₄-induced oxidative stress in rats. Three months old and thirty-two Sprague Dawley male rats were used in the study. The rats were assigned to four groups in equal numbers. Group four received catechin (50 mg/kg/day) intragastrically (i.g) for a ten days period as pretreatments. In the second ten days period, group one received liquid oil (0.2 ml/kg/day) intraperitoneally (i.p), group two received CCl₄ (0.2 ml/kg/day) (i.p) group three received catechin (50 mg/kg/day, i.g). In this period the previously treated group four received at the same doses catechin plus CCl₄ daily in two divided doses. Within 24 hours of the last dose, liver tissue samples for homogenate were collected from the rats using appropriate techniques under ether anesthesia. Malondialdehyde (MDA) levels were measured and catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) activities were determined in the samples. Tissue samples were fixed in 10% neutral formalin to be used in histological studies. Slices were stained with H&E and examined under a light microscope. Results have shown that the values obtained in only catechin treatment groups were close to values in control group, as expected. In the CCl₄ treated group, free radical formation secondary to CCl₄ metabolism resulted in increased MDA levels and led to oxidative damage. This damage was corrected to levels almost comparable to that of control by the free radical scavengers CAT and GPx, the activities of which were increased secondary to catechin treatments. Finally, histological studies supported that our chemical results.

Key Words: CCl₄, catechin, free radical, rats

GİRİŞ

Serbest radikaller paylaşılmamış elektron içeren reaktif ve kısa ömürlü moleküllerdir. Bu moleküller hem normal metabolizmanın yan ürünü olarak hem de ilaçların ve diğer zararlı kimyasal maddele-

rin etkisiyle oluşabilmektedir (1). Serbest radikallerin oluşum hızı, bunları etkisiz hale getiren veya azaltan CAT ve GPx gibi bazı endojen antioksidan enzimlerden oluşan savunma sistemlerinin hızı ile dengede olduğu sürece, organizma etkilenmez. Ancak bu denge bozulursa, serbest radikaller zararlı olmaya başlar ve oksidatif stres olarak etkilerini gösterirler (2).

Oksidatif stres oluşumunda rol alan ve birçok araştırmacı tarafından karaciğer hasarı oluşturduğu tespit edilen en önemli kimyasallardan biri CCl₄'dir

(3,4). CCl₄, kuru temizleme, otomobil tamiri ve farmasötikal üretim gibi bazı iş alanlarında kullanılmaktadır (5). CCl₄, toksik etkisini, bir serbest radikal olan triklorometil radikali oluşumu ile gösterir. Bu radikalın daha sonra oksijenle birleşmesi sonucu oluşan peroksil radikali de hücre zar yapısını bozarak hücre hasarı oluşmasında birincil mekanizma olarak rol oynayan kuvvetli bir lipid peroksidasyon başlatıcısıdır (6-8).

Serbest radikallerin zararlı etkileri, bazı maddeler tarafından azaltılır veya tamamen ortadan kaldırılır. Bunlardan biri de kateşindir. Kateşinler, bitkilerde yaygın olarak bulunur ve antioksidan özellikleri olan flavanoid ailesinin altı sınıfından, flavan grubuna dahil polifenolik bileşiklerdir (9-12). Çalışmamızda kullandığımız (+)- kateşin de, flavanoidlerin flavan sınıfından olup, şarap, elma kabuğu ve farklı çay türlerinde, özellikle yeşil çayda bulunan bir polifenoldür (12-14). Yapılan bazı çalışmalarda, kateşinin lipid peroksidasyon oluşumuna bağlı olarak, artan MDA düzeyini önemli ölçüde engellediği gösterilmiştir (15-17). Çalışmamızda kullandığımız (+)-kateşinin, sıçan hepatositlerinde tütünün neden olduğu karsinogenezin engellenmesinde etkili olduğu bulunmuştur (14). Biz de bu çalışmada, deneysel olarak, CCl₄ ile oluşturulan oksidatif stres'e karşı, antioksidan özellikleri bilinen kateşinin ne derece koruyucu etkisi olduğunu araştırmayı planladık.

MATERYAL ve METOD

Bu çalışmada, üç aylık 200-250g ağırlığında otuz iki adet Sprague-Dawley soyu erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar, pellet fare yemi ile adlibidum beslendi ve her gün taze çeşme suyu verildi. Her grupta sekiz hayvan olacak şekilde dört grup oluşturuldu. Tüm gruplara belirtilen uygulamalar her gün aynı saatlerde iki uygulama şeklinde verildi (Tablo 1).

Çalışmada kullanılan CCl₄ ve (+)- kateşin Sigma firmasından temin edildi. CCl₄'in uygulama dozu 0.2 ml/kg/gün (8), kateşin'in 50 mg/kg/gün (9)

olarak belirlendi. CCl₄ sıvı yağda, kateşin ise serum fizyolojikte çözündürülerek, sıçanlara daima taze hazırlanarak verildi. Deney bitimi olan 21. günde tüm sıçanlardan etik kurallara uygun olarak eter anestezisi altında karaciğer örnekleri alındı. Karaciğer homojenatlarından elde edilen süpernatantlar, spektrofotometrenin distile su ile sıfırlanmasından sonra 532nm'de MDA düzeyi (18) ve 405nm'de de CAT aktivitesi (19) için ölçüldü. Literatürlere bağlı kalınarak değerlendirildi. Bunlardan MDA için %1 KCl ve CAT için sodyum-potasyum fosfat tamponu (pH:8) kullanılarak karaciğer örnekleri +4°C'de 4000 min⁻¹ rpm'de (veya 3113xg'de) 15 dk santrifüj edilerek (Soğutmalı santrifüj; Heraeus Biofuge Stratos) homojenize edildi. GPx aktivitesi (Calbiochem® Kat. No:354104) ticari kiti kullanılarak ölçüldü. Bu kit homojenattaki glutatyon peroksidaz aktivitesini indirek olarak ölçmektedir. GPx ortamdaki organik peroksit varlığında redukte glutatyon GSH'ı okside glutatyona (GSSG) dönüştürür. Daha sonra dışarıdan ortama eklenen NADPH ve GR ile okside glutatyon tekrar redukte glutatyona dönüşmekte, böylece GSH derişimi sabit tutulmaktadır. Oluşan kimyasal tepkimede NADPH'ın NADP'ye dönüşmesi esnasında spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda absorbanstaki azalma izlenerek okside glutatyon oluşum hızı ölçülmüş ve GPx enzim aktivitesi hesaplanmıştır. Hazırlanan örneklerde aynı gün ölçüm yapılacaksa +4°C'de, daha sonra ölçüm yapılacaksa, -70°C'de saklandı. Ayrıca hesaplamada kullanılmak üzere Büret yöntemine göre (20) total protein kiti (Bio-Clinica) kullanılarak örneklerde total protein ölçümü yapıldı. Bunlara ilave olarak histolojik değerlendirme için tüm sıçanlardan total karaciğeri kapsayacak örnekler alınarak %10 tamponlanmış nötral formaline alındı. Bu örneklerden rutin takip sonrası kesitler H&E ile boyandı ve ışık mikroskobunda değerlendirilip fotoğraflandı.

Tablo 1. Deney gruplarına maddelerin verilmiş dozu, uygulama şekli ve süresi

Gruplar	n	Ön Uygulama ilk on gün	Ön uygulamayı takip eden son 10 gün	Uygulama şekli
I.Kontrol	8	-	0.2 ml/kg/gün sıvı yağ	(i.p)(i.g)
II.CCl ₄	8	-	0.2 ml/kg/gün CCl ₄	i.p
III.Kateşin	8	-	50 mg/kg/gün Kateşin	i.g
IV.Kateşin+CCl ₄	8	50mg/kg/gün Kateşin	50 mg/kg/gün Kateşin ve 0.2 ml/kg/gün CCl ₄	(i.g) ve(i.p)

Tablo 2. Karaciğer homojenatlarında MDA düzeyleri ile, CAT ve GPx aktivitelerinin istatistiksel değerlendirilmesi

Gruplar	n	Ort ± St. Hata MDA (nmol/ g yaş doku)	Ort ± St. Hata CAT (KU/ g protein)	Ort ± St. Hata GPx (mU/ml)
I. Kontrol	8	16,71 ± 0,83	63.12 ± 15.51	28.90 ± 1.01
II. CCl ₄	8	26.48 ± 2.21*	48.63 ± 11.15 ^{ns}	14.41 ± 1.40***
III. Kateşin	8	12.98 ± 0.66 ^{ns}	73.18 ± 19.27 ^{ns}	30.45 ± 1.44 ^{ns}
IV. Kateşin + CCl ₄	8	19.97 ± 1.94 ^{ns}	59.14 ± 12.05 ^{ns}	21.90 ± 2.07*

MDA: F_(5,42)= 15.28 P<0.001***;Dunnett çoklu karşılaştırma testi; P>0.05^{ns}, P<0.05*, P<0.01**, P<0.001***

CAT: F_(5,42)=0.44 P>0.05^{ns};Dunnett çoklu karşılaştırma testi; P>0.05^{ns}, P<0.05*, P<0.01**, P<0.001***

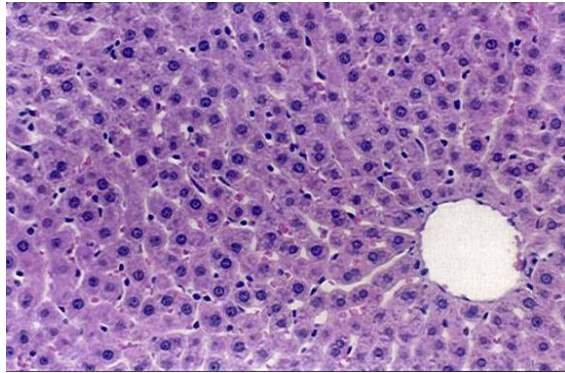
GPx: F_(5,42)=14.14 P<0.001***; Dunnett çoklu karşılaştırma testi; P>0.05^{ns}, P<0.05*, P<0.01**, P<0.001***

BULGULAR

Kontrol I.grup ile kateşin verilen III. grup MDA düzeyi, CAT ve GPx aktivitesi bakımından karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık görülmedi (P>0.05).

MDA düzeyi CCl₄ verilen II.grupta kontrole göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu (P<0.05). Kateşin ve CCl₄'in birlikte verildiği IV.grupta, istatistiksel açıdan kontrole göre anlamlı bir farklılık göstermedi (P>0.05) (Tablo II).

CAT aktivitesi sadece CCl₄ verilen II.grupta kontrole göre oldukça düşük olmasına rağmen, bu değer anlamlı bulunmadı (P>0.05). IV.grup değerleri de kontrol grubuna göre istatistiksel olarak farklılık göstermedi (P>0.05) (Tablo 2).



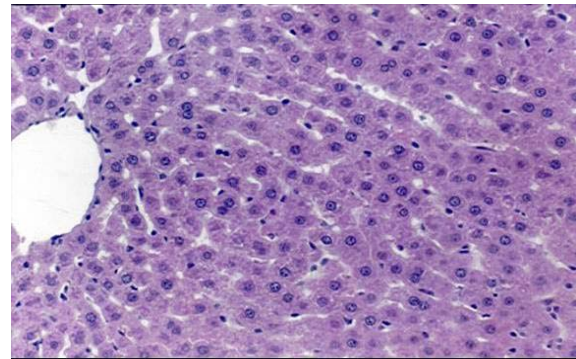
Şekil 1. Kontrol grubuna ait karaciğer örneğinde *Vena centralis* çevresinde kordonlar tarzında düzenlenmiş hepatositler gözlenmektedir. Orijinal büyütme x 66. H&E.

GPx aktivitesi, II. ve IV.grupta kontrole göre, istatistiksel açıdan sırasıyla önemli derecede düşük bulundu (P<0.001)(P<0.05). (Tablo 2).

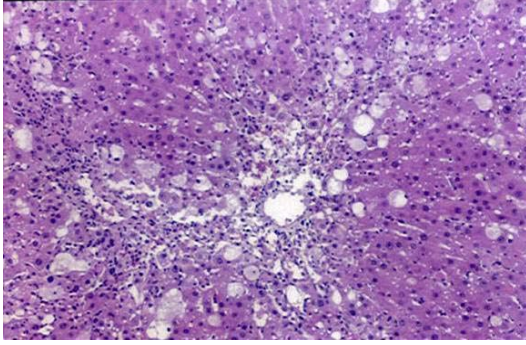
Histolojik olarak, kontrol grubuna ait karaciğer örneklerinde, normal parankimal yapı gözlenmiştir. Bu yapıda, hepatositler *Vena centralis* çevresinde ı-

şınsal olarak kordonlar tarzında düzenlenmiş olup portal alanlarda ve terminal venlerde değişimler bulunmamaktadır (Şekil 1).

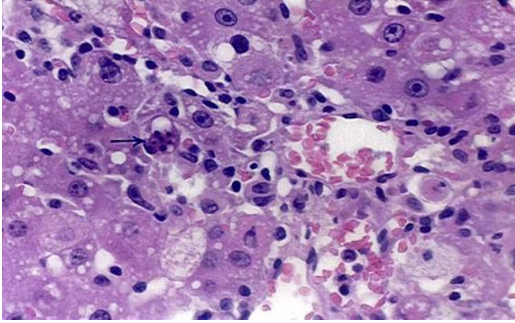
Kateşin verilen III gruba ait karaciğer örneklerinde de kontrol grubuna benzer bir yapı gözlenirken (Şekil 2), CCl₄ verilen II.grupta çok önemli karaciğer hasarı tesbit edilmiştir. Bu hasar yaklaşık %50-60 oranında olup, hepatositlerde sitoplazmik vakuolizasyon, balonlaşma ve yağlı dejenerasyon şeklindedir. Ayrıca diffuz sentrilobüler nekroz oluşmuş, parankimal yapıda düzensizlik gözlenmiş ve klasik lobül yapısı ayırt edilememiştir. Bunlara ilaveten mononükleer ve polimorf nükleer hücre infiltrasyonu vardır. Bazı hepatositlerde sitoplazma eosinofilisi artmış olup, piknotik nükleus dikkati çekmektedir (Şekil 3,4). CCl₄ ile birlikte kateşinin uygulandığı IV.grupta karaciğerde yine diffuz nekroz gözlenmekle birlikte, hasar yaklaşık %40-50 oranında olup, minimal bir iyileşme söz konusudur. Hepatositler nekroz alanları dışında, kordonlar tarzında bir düzen göstermektedir (Şekil 5,6).



Şekil 2. Kateşin grubuna ait karaciğer örneğinde *Vena centralis* ve çevresinde klasik lobül yapısına uygun düzenlenmiş hepatositler gözlenmektedir. Orijinal büyütme x 66. H&E.

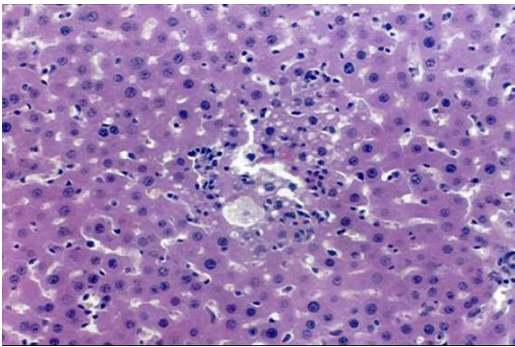


Şekil 3. CCl₄ uygulanan gruba ait karaciğer örneğinde diffüz sentrilobüler nekroz, vakuolizasyon ve yağ dejenerasyonu gözlenmektedir. Orijinal büyütme x33. H&E.

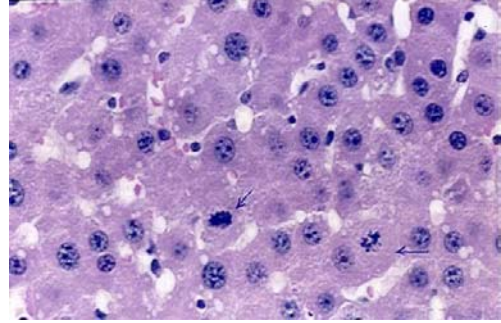


Şekil 4. CCl₄ uygulanan gruba ait karaciğer örneğinde nekroz alanına ait görüntüde hepatositlerde yaygın dejenerasyon, PMNL ve MNL infiltrasyonu ve (→) apoptotik cisimcikler gözlenmektedir. Orijinal büyütme x 132. H&E.

İstatistik Değerlendirme; Bu çalışmada değişkenler Varyans analizi (ANOVA testi) ile belirlenmiş olup, K denemeden birinin kontrol olarak alındığı ve diğer deneme sonuçlarının kontrole göre etkinliğinin analiz edildiği Dunnett T çoklu karşılaştırma testi kullanılarak karşılaştırma yapılmıştır.



Şekil 5. Kateşin+CCl₄ uygulanan gruba ait karaciğer örneğinde nekroz alanı ve çevresinde hasardan korunmuş hepatositler gözlenmektedir. Orijinal büyütme x 66. H&E.



Şekil 6. Kateşin+CCl₄ uygulanan gruba ait karaciğer örneğinde hepatositlerde vakuolizasyon ve (→) mitoz gözlenmektedir. Orijinal büyütme x 132. H&E.

TARTIŞMA

Çalışma sonunda, kateşinin tek başına uygulandığı gruptan elde edilen kimyasal ve histolojik sonuçların kontrole yakın olması beklenildiği gibi, herhangi bir bozucu etkisinin olmadığını göstermiştir. Bu nedenle, tartışmanın bundan sonraki kısmında aynı tekrarları ortadan kaldırmak amacı ile III. grup ele alınmadı.

Homojenat MDA düzeyi, CCl₄ verilen II. Grupta kontrole göre yüksek bulundu. CCl₄ ile kateşinin verildiği IV. grupta ise, kontrol değere yakın bulunması kateşinin düzeltici bir etkisinin olduğunu gösterdi. Sıçanlarda CCl₄ ile oluşturulan oksidatif strese karşı Chitosan'ın antioksidan etkisine bakıldığı bir çalışmada, CCl₄'in karaciğer homojenatında lipid peroksidasyon sonuç ürünlerinden tiyobarbitürik asit reaktif substratları (TBARS) düzeyini artırdığı gösterilmiştir (21). CCl₄ ile yapılan diğer bazı çalışmalarda da lipid peroksidasyonu sonucu artan MDA düzeyi bulguları, bizim bulgularımızla uyumlu bulundu (5,8,22). Erden İnal ve arkadaşları, flavanoidler grubundan quersetinin sıçanlarda ultra viole (U.V) ile oluşturulan oksidatif strese etkisi konulu bir çalışmada, U.V ve quersetinin birlikte verildiği grupta homojenat MDA düzeyinin önemli ölçüde düştüğünü görmüşlerdir. Bu sonuç bizim de çalışmamızda kullandığımız flavanoidler grubundan kateşinin, MDA düzeyine ait bulgularımızla uyumlu bulunmuştur (23). Yine değişik oksidatif stres oluşturuca ajanlara karşı, çay kateşinlerinin etkisi konulu çalışmalardan elde edilen sonuçlar kateşinlerin homojenat MDA düzeyini düşürdüğüne ait bulgularımızla uyumludur (24-26).

Homojenatta katalaz aktivitesi CCl₄ verilen II. grupta kontrol ve diğer gruplara göre düşük, IV. grupta ise kontrole yakın olmasına rağmen istatistiksel açıdan önemli bulunmadı. CCl₄ ile yapılan

bazı çalışmalarda, CCl₄'in homojenatta katalaz aktivitesini düşüğünü gösteren sonuçlar bulgularımızla uyumlu bulunmadı (27,28,29,30) Flavanoid ailesinin bir üyesi olan *Solanum melongena* ile yapılan bir çalışmada, homojenat katalaz aktivitesinin kontrole yakın bulunması, aynı gruptan olan kateşine ait bulgularımızla uyumlu bulundu (26). Sıçanlarda ultra viole (U.V) ile oluşturulan oksidatif stres'e karşı bir flavanoid olan quersetinin etkisi konulu bir çalışmada, U.V + quersetinin birlikte verildiği grupta karaciğer homojenatında görülen katalaz aktivite artışı, bizimde çalışmamızda kullandığımız bir flavanoid olan kateşinin homojenatta gösterdiği katalaz aktivite artışı ile uyumlu bulundu (23).

Homojenatta GPx aktivitesi, CCl₄ verilen II.grupta ve kateşinin CCl₄ ile birlikte verildiği IV. grupta kontrole göre önemli derecede düşük bulundu. Sıçanlarla yapılan birkaç çalışmada CCl₄'in kontrole göre düşürdüğü hepatik GPx aktivitesine ait bulgular, bizim bulgularımızla paralellik göstermektedir (8,28,31). Yapılan bir çalışmada sıçanlarda U.V'nin neden olduğu oksidatif stres durumunda, karaciğer homojenatında GPx aktivitesi azalmış, kateşin gibi bir flavanoid olan quersetin U.V ile birlikte uygulandığında ise artmıştır. Bu bulgu bizim bulgularımızla uyumlu değildir (23).

Histolojik yönden baktığımızda kontrol grubuna ait karaciğer örneklerinde normal parankimal yapı gözlenmiş olup hepatositler *Vena centralis* çevresinde ışınal olarak kordonlar tarzında düzenlenmiştir. Kateşin gruplarına ait karaciğer örneklerinde kontrol grubuna benzer görünüm gözlenmiştir. CCl₄ verilen grupta yaklaşık %50-60 oranında çok önemli düzeyde karaciğer hasarı gözlenmiştir. Bu hasarda hepatositlerde sitoplazmik vakuolizasyon, balonlaşma ve yağlı dejenerasyon, diffuz sentrilobüler nekroz ve parankimal yapıda düzensizlik gözlenmiş olup klasik lobül yapısı ayırt edilememektedir. Ayrıca mononükleer ve polimorf nükleer hücre infiltrasyonu vardır. Bazı hepatositlerde sitoplazma eosinofilisi artmıştır ve piknotik nükleus dikkati çekmektedir. CCl₄ ile birlikte kateşinin uygulandığı grupta ise, karaciğerde yine diffuz nekroz gözlenmekte, ancak hepatositler nekroz alanları dışında, kordonlar tarzında düzenlenmekte olup hasar yaklaşık %40-50 civarındadır. Bu açıdan bakıldığında minimal bir iyileşme söz konusudur. CCl₄ ile kateşinin birlikte kullanılıp karaciğer histolojisine etkisine ait bulgularımızı karşılaştırabilecek bir literatüre ratlayamadık.

Sadece CCl₄ kullanılarak karaciğer histolojisine bakılan bir çalışmada, onbeş gün boyunca sıçanlara 1.5 ml/kg CCl₄ uygulanmıştır. Çalışma sonunda ka-

raciğer lobçuklarında periasiner ve portal bölgelerde hidropik dejenerasyon, koagülasyon nekrozu ve fibrozis ile çoğunluğu mononükleer daha az nötrofil lökositlerden oluşan hücrel eksudasyon saptandığı bildirilmiştir (5). Yine bir başka çalışmada 3 mg/kg CCl₄ uygulandıktan 24 saat sonra sitoplazmik vakuolizasyon, yağlı karaciğer ve sentrilobüler alanda orta derecede hepatosit nekrozu gözlendiği bildirilmiştir (3). CCl₄'in karaciğerde ödem, sitoplazmik şişme ve nükleer piknozis ile karakterize hepatosit bozulmasına neden olduğunu bildiren bir diğer çalışma da mevcuttur (32).

Yapılan bu çalışma sonucunda, CCl₄'in bilinen bozucu etkisi, artan MDA düzeyi, azalan CAT ve GPx enzim aktiviteleri ve histolojik bulgularımız ile tekrar doğrulandı. CCl₄'in bu bozucu etkilerini kateşinin az da olsa kontrol değerlere yaklaştırdığı tespit edildi. Histolojik tetkikler de kimyasal sonuçlarımızı destekler nitelikte olup kateşinin karaciğer hasarını minimal düzeyde tamir ettiği gözlendi. Bu bulguların ışığında, kateşinin daha üst düzeyde iyileştirici antioksidan etkisini ortaya koyabilmek için, kateşinin farklı doz seviyeleri ve uygulama süresi ile ilgili ileride yapılacak yeni çalışmaların, bu etken maddenin daha da iyi anlaşılmasına olanak sağlayacağı kanısındayız.

TEŞEKKÜR

Değerli katkılarından dolayı sayın Prof.Dr.Tuncay ALTUĞ'a teşekkürlerimizi sunarız.

KAYNAKLAR

1. Cross CE, Halliwell B, Borish E.T, et al. Oxygen Radicals and Human Disease. *Ann Intern Med*, 1987;107: 526-545.
2. Özdemir G. Reaktif Oksijen Partikülleri (ROP) (Oksidan Moleküller, Serbest Radikaller). Roche Bilimsel Eserler Serisi, İstanbul: 1993: 20-26.
3. Arosio B, Gagliano N, Fusaro L.M.P, et.al. Aloe-Emodin Quinone Pretreatment Reduces Acute Liver Injury Induced by Carbon Tetrachloride. *Pharmacol & Toxicol*, 2000;87: 229-233.
4. Lu K-L, Tsai C-C, Ho L-K, et.al. Preventive Effect of the Taiwan Folk Medicine *Ixeris laevigata* var. *oldhami* on α -Naphthyl-isothiocyanate and Carbon Tetrachloride- Induced Acute Liver Injury in Rats. *Phytother. Res*. 2002;16: 45-50.
5. Şahin A, Yener Z, Dağoğlu G, ve ark. Karbontetrachlorid (CCl₄) İle Deneysel Olarak Karaciğer Nekrozu Oluşturulan Ratlarda Vitamin E + Selenyum ve *Nigella sativa* (Çörekotu)'nın Karaciğer

- Yıkımını Engelleyici Etkileri. Türk J Vet. Anim. Sci, 2003;27: 141-152.
6. Akkuş İ.:Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yay., Konya, 1995.
 7. Leon O.S, Menendez S, Merino N, et.al. Ozone Oxidative Preconditioning a Protection Against Cellular Damage by Free Radicals. Mediat Inflamm, Aug 1998; Vol:7, No: 4, 6p. 2 charts. 1graph, : 289.
 8. Yalçın A.S, Koçak-Toker N, Uysal M, ve ark. Stimulation of Lipid Peroxidation and impairment of Glutathione. J App Toxicol, 1986; Vol.6(4): 303-306.
 9. Galati SG, Sabzevari O, Wilson J.X, et.al. Prooxidant Activity and Cellular Effects of the Phenoxyl Radicals of Dietary Flavonoids and Other Polyphenolics, Toxicol, 2002; 177: 91-104.
 10. Kahraman A. Ultraviyole A(UVA) Işığının Oluşturduğu Oksidatif Stres Üzerinde Quersetinin Koruyucu Rolü. Doktora Tezi, Eskişehir: T.C. Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bil. Enst. 1998.
 11. Kondo K, Kurihara M, Miyata N, et.al. Scavenging Mechanism of (-)-Epigallocatechin Gallate and (-)-Epicatechin Gallate on Peroxyl Radicals and Formation of Superoxide During the Inhibitory Action. Free Radic Biol & Med, 1999;27: 855-863.
 12. Peterson J, Dwyer J. Flavonoids: Dietary Occurrence and Biochemical Activity, Nutr Res, 1998; Vol:18, No:12, 1995-2018.
 13. Altuğ T, Apaydın B.B, Çerçel A, ve ark. (+)-Catechin'nin Sıçanlarda NMU ile Oluşturulan Meme Karsinomu Üzerine Koruyucu Etkisi. Meme Hast Derg, 2001; Vol:8, sayı: 1, 5-10.
 14. Soleas G.J, Grass L, Josephy P.D, et.al. A Comparison of the Anticarcinogenic Properties of Four Red Wine Polyphenols, Clin Biochem, 2002;35: 119-124.
 15. Chan P, Cheng J-T, Tsai J-C, et.al. Effect of Catechin on the Activity and Gene Expression of Superoxide Dismutase in Cultured Rat Brain Astrocytes. Neurosci Lett, 2002;328: 281-284.
 16. Goldberg D.M, Yan J, Soleas G.J. Absorption of Three Wine-Related Polyphenols in Three Different Matrices by Healthy Subjects, Clin Biochem, 2003;36: 79-87.
 17. Halder J, Bhaduri A.N. Protective Role of Black Tea Against Oxidative Damage of Human Red Blood Cells. Biochem and Biophys Commun, 1998;244: 903-907.
 18. Uchiyama M, Mihara M. Determination Of Malonaldehyde Precursor in Tissues by Thiobarbituric Acid Test. Anal Biochem, 1978;86: 279-286.
 19. Goth L. A Simple Method for Determination of Serum Catalase Activity and Revision of Reference Range. Clin Chim Acta, 1991;196: 143-152.
 20. İmren A.H, Turan O. Klinik Tanıda Laboratuvar. 3.Baskı, Sermet Matbaası, İstanbul, 1998;708-709.
 21. Jeon Tae II, Hwang S.G, Park N.G, et.al. Antioxidative Effect of Chitosan on Chronic Carbon Tetrachloride Induced Hepatic Injury in Rats. Toxicol, 2003;00: 1-7.
 22. Lee M.K, Yeo H, Kim J, et.al. Protection of Rat Hepatocytes Exposed to CCl₄ In-Vitro by Cynandione A, a Biacetophenone from *Cynanchum wilfordii*. J.Pharm. Pharmacol, 2000;52: 341-345.
 23. Inal Erden M, Kahraman A. The Protective of Flavonol Guercetin Against Ultraviolet a Induced Oxidative Stress in Rats. Toxicol, 2000;154:21-29.
 24. Karaman B, Belce A, Altuğ T. Kanserde Kateşinlerin Rolü. Türk Onkoloji Dergisi, 2000;Cilt: 15, Sayı: 3, 123-126.
 25. Komatsu M, Hiramatsu M. The Efficacy of an Antioxidant Cocktail on Lipid Peroxide Level And Superoxide Dismutase Activity in Aged Rat Brain and DNA Damage in Iron-Induced Epileptogenic Foci, Toxicol, 148, 143-148 2000.
 26. Sudheesh S, Sandhya C, Koshy A.S, et.al. Antioxidant Activity of Flavonoids from *Solanum melongena*. Phytotherapy Res, 1999;13:393-396.
 27. Mansour M.A. Protective Effects of Thymoquinone and Desferrioxamine Against Hepatotoxicity of Carbon Tetrachloride in Mice. Life Sci, 2000; Vol: 66, No.26, 2583-2591.
 28. Murthy K.N.C, Jayaprakasha G.K, Singh R.P. Studies on Antioxidant Activity of Pomegranate (*Punica granatum*) Peel Extract Using in Vivo Models. J.Agric Food Chem. 2002;50: 4791-4795.
 29. Murthy K.N.C, Singh R.P, Jayaprakasha G.K. Antioxidant Activities of Grape (*Vitis vinifera*) Pomace Extracts. J.Agric. Food Chem, 2002;50: 5909-5914.
 30. Nomura T, Yamaoka K. Low-Dose γ -Ray Irradiation reduces Oxidative Damage Induced by CCl₄ in Mouse Liver. Free Radic Biol Med, 1999;Vol: 27, Nos.11/12, 1324-1333.
 31. Cabre M, Camps J, Paternain J.L, et.al. Time-Course of Changes in Hepatic Lipid Peroxidation and Glutathione Metabolism in Rats with Carbon Tetrachloride-Induced Cirrhosis. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2000;27: 694-699.
 32. Sotelo-Felix J.I, Martinez-Fong D, Muriel P, et.al. Evaluation of the Effectiveness of *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) in the Alleviation of Carbon Tetrachloride- Induced Acute Hepatotoxicity in the Rat. J. Ethnopharm, 2002;81: 145-154.