

DeneySEL Araştırma

Sıçanlarda Karbontetraklorür ile Oluşturulacak Karaciğer Hasarına Karşı Uygulanan Ozon Tedavisinin Etkileri

Merve KAVAKLI KARAKAŞ¹, Leyla CANPOLAT KOYUTÜRK¹, Nalan KAYA TEKTEMUR¹, Feyza AKSU^{2,a}, Tuncay KULOĞLU¹, Ramazan Fazıl AKKOÇ², Ahmet KAVAKLI³

¹Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

²Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

³Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, GETAT Merkezi, Elazığ, Türkiye

ÖZ

Amaç: Çalışmada, karbontetraklorür (CCl₄) uygulanan sıçanların karaciğer dokularında meydana gelen değişiklikler üzerine ozonun (O₃) koruyucu ve tedavi edici etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada 8-10 haftalık 40 adet Sprague Dawley cinsi erkek sıçan kullanıldı. Deney hayvanları 4 eşit gruba ayrıldı. Kontrol grubuna deney süresince hiçbir uygulama yapılmadı. O₃ grubuna deney süresince haftada 3 gün 150 µg/kg/gün ip O₃ uygulandı. CCl₄ grubuna deney süresince 2 mg/kg dozunda haftada 2 gün ip CCl₄ uygulandı. CCl₄+O₃ grubuna deney süresince CCl₄+O₃ uygulandı. Deney sonunda sıçanlar dekapite edildi. Dekapitasyonun ardından karaciğer dokuları hızla çıkarıldı ve histopatolojik azalizler için kullanıldı.

Bulgular: CCl₄ maruziyeti TUNEL apoptotik indekste artışa ve histopatolojik değerlendirmelerde hepatosit hasarına neden olduğu görüldü. Antioksidan amaçlı verilen O₃ uygulaması, kontrol grubuna göre anlamlı değişiklikler oluşturmadı. Fakat CCl₄ maruziyeti olan gruptaki sıçanların karaciğerinde beklenenin aksine oksidan etkiye neden oldu.

Sonuç: O₃'ün CCl₄ toksikasyonuna karşı antioksidan kullanımıyla ilgili hem doz konsantrasyon farklılığı hem de sayı başta olmak üzere daha fazla çalışmaya gerek duyulmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Karbontetraklorür, Ozon, Karaciğer, TUNEL.

ABSTRACT

With Carbontetrachloride in Rats Liver Damage to be Created Effects of Ozone Therapy Applied Against

Objective: In this study, it was aimed to investigate the protective and therapeutic effects of ozone (O₃) on the changes in liver tissues of rats treated with carbontetrachloride (CCl₄).

Material and Method: Forty 8-10 weeks old Sprague Dawley rats were used in the study. Experimental animals were divided into 4 equal groups. No application was made to the control group during the experiment. During the experiment, O₃ group received 150 µg/kg/day ip O₃ 3 days a week. CCl₄ group was given ip CCl₄ 2 days a week at a dose of 2 mg/kg throughout the experiment. CCl₄+ O₃ group was treated with CCl₄+ O₃ throughout the experiment. At the end of the experiment, the rats were decapitated. After decapitation, liver tissues were rapidly removed and used for histopathological reductions.

Results: CCl₄ exposure caused an increase in TUNEL apoptotic index and hepatocyte damage in histopathological evaluations. O₃ given for antioxidant purpose did not cause significant changes compared to the control group, but it caused an oxidant effect in the liver of the rats in the CCl₄ exposed group, contrary to what was expected.

Conclusion: More studies are needed on the use of antioxidants against CCl₄ toxicity of O₃, both in dose concentration differences and in numbers.

Keywords: Carbontetrachloride, Ozone, Liver, TUNEL.

Bu makale atıfta nasıl kullanılır: Kavaklı Karakaş M, Canpolat Koyutürk L, Kaya Tektemur N, Aksu F, Kuloğlu T, Akkoç RF, Kavaklı A. Sıçanlarda Karbontetraklorür ile Oluşturulacak Karaciğer Hasarına Karşı Uygulanan Ozon Tedavisinin Etkileri. Fırat Tıp Dergisi 2022; 27(4): 242-246.

How to cite this article: Kavaklı Karakas M, Canpolat Koyutürk L, Kaya Tektemur N, Aksu F, Kuloğlu T, Akkoç RF, Kavaklı A. With Carbontetrachloride in Rats Liver Damage to be Created Effects of Ozone Therapy Applied Against. Fırat Med J 2022; 27(4): 242-246.

ORCID IDs: M.K.K. 0000000307548901, L.C.K. 0000000242143259, N.K.T. 0000000188804932, F.A. 0000000185950010, T.K. 0000000198743838, R.F.A. 0000000205598932, A.K. 0000000307548901.

Karbontetraklorür (CCl₄) renksiz, berrak ve hızlı buharlaşabilen, kararlı, apolar molekül yapısına sahip, organik bir çözücüdür (1, 2). CCl₄ endüstriyel alanlarda, pestisit ürünlerinde, petrol ve yağ ürünlerinde organik çözücü olarak kullanılır. Tekstil ve kimya fabrikalarında, böcek ilaçlamalarında, atık merkezinde ve kuru temizleme sektöründe çalışan insanlarda CCl₄'e maruziyetin arttığı bildirilmiştir (2, 3). CCl₄ en fazla soluma

yoluyla olmak üzere, ağız ve deri yoluyla vücuda girer. Vücuda CCl₄ girişinin ortalama günlük 0,1 µg olduğu tahmin edilmektedir. ABD Çevre Koruma Dairesi (EPA), CCl₄'ü insan için kansere neden olabilen grup B2 sınıfı ajanlara dahil etmiştir (4). CCl₄ zehirlenme belirtileri emilimi takiben hemen ortaya çıkar. Zehirlenme belirtileri doza ve maruz kalınan süreye bağlı bir şekilde değişiklik gösterir. Merkezi sinir sisteminin

^aYazışma Adresi: Feyza AKSU, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

Tel: 0424 233 3555

Geliş Tarihi/Received: 03.05.2022

e-mail: feyza-aksu@hotmail.com

Kabul Tarihi/Accepted: 09.08.2022

baskılanmasına, vücutta dengesizliğe, uyuşukluğa, sersemliğe ve baş dönmesine neden olabilir (5).

CCl₄'ün yıkımı sonucu açığa çıkan reaktif bileşikler hedef moleküllere bağlanır, bu moleküller de primer ya da sekonder ilişki yoluyla lipid peroksidasyon, reaktif oksijen türleri (ROT) oluşumu, GSH/GSSG oranında değişiklikler oluşturup toksisite meydana getirir (6). CCl₄ maruziyetinin devamlılığı, serbest radikallerin salınımı aracılığıyla karaciğer dokusunda toksisite oluşturmaktadır. Karaciğerdeki toksisite sonucunda histopatolojik olarak balonlaşma dejenerasyonu, komşu hepatosit yağ başkalaşımı, hücre iltihabı, santral ven etrafına lokalize lenfosit ve Kupffer hücre infiltrasyonu ve nekroz gözlenir. Kupffer hücreleri; proinflamatuvar sitokin, tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) ve interlökin 1h (IL-1h) üretimine neden olur. Ve bu sürecin devamlılığı sonucunda karaciğerde fibrozis ve siroz oluşabilir. Literatürde yer alan çalışmaların çoğunda, artan oksidatif stres ile karaciğer fibrozisi arasındaki ilişki gösterilmiştir (7-9). Lipid peroksidasyonu, lipoprotein sentezinde gerekli olan yapıları da hasara uğratarak karaciğerde lipidozise katkıda bulunur. Aşırı lipit birikimi karaciğerde işlevsel bozukluğa sebep olur, bu da siroza doğru ilerleyen değişimler ortaya çıkarır (7, 8). CCl₄'e bağlı karaciğer hasarının gelişim basamakları; redüktif dehalojenasyon, radikallerin kovalent bağlanması, protein sentezinin inhibisyonu, yağ birikimi, kalsiyum sekestrasyonunda kayıp, apoptozis ve fibrozis şeklidir (10).

Ozon (O₃), "ozein" (koku yayan) kelimesinden türetilmiş, gaz halinde bulunan ve üç oksijen atomundan oluşan bir moleküldür. O₃ gazı yeryüzünden 20-50 km yükseklikte ozonosfer tabakasında bulunur ve UV dalgalarını (260-280 nm) absorbe eder. O₃ yoğunluğu biyolojik denge açısından önemlidir ve ozonosferin tahrip olması güneşin zararlı UV ışınlarına maruziyeti arttırmaktadır (11). O₃'nun ilk kullanımı dezenfektan ve antibakteriyel etkisi ile olmuştur. O₃; virüs ve bakterileri öldürür, mikroorganizmaları ve toksinlerini okside eder, pestisitleri, fenoller, kimyasal atıkları, aromatik bileşikler ve deterjanları etkili bir şekilde nötralize edebilir (12, 13). O₃ ilk olarak çoklu doymamış yağ asidi (ÇDYA) ile ve daha sonra antioksidanlar (ürik asit, askorbik asit vb), -SH grupları içeren tiyol bileşikler (sistein gibi), redükte glutatyon ve albuminle reaksiyona girer (14). Reaksiyonlar sonucunda O₃'nun hücre seviyesindeki etkileri, ROT ve lipid oksidasyon ürünleri (LOÜ) aracılığıyla olur. ROT plazmada çok süratli oluşur ve antioksidan kapasitede %5-25 kadar azalma meydana gelir, sonrasında 15-20 dakika içerisinde bu etki geri döner (15). ROT'un yarılanma süresi çok kısa olduğu için, henüz kan hastaya geri verilmeden önce ortadan kalkarak yerlerini LOÜ'ye bırakır. LOÜ daha kararlıdır. Bir kısmı idrarla ve safra ile atılırken bir kısmı da glutatyon transferaz (GSH-transferaz) ve aldehid dehidrogenaz yoluyla ile metabolize edilir. Mikromolar konsantrasyonda geriye kalanlar ise vücutta devam eden oksidatif stresin haberci molekülleri olarak vücuda yayılırlar. Bu yayılım sonucunda vücuttaki glutatyon redüktaz (GSH-redüktaz),

glutatyon peroksidaz (GSH-peroksidaz), süperoksit dismutaz ve katalaz gibi antioksidan enzim üretiminde artış olur (16). O₃'nun dokularda gösterdiği etkiler; eritrositlerde glukoz 6 fosfat dehidrogenaz seviyesinde yükselme, glikolizde ve ATP miktarında artış, hücre içi pH'ta düşme, 2,3 difosfogliserat miktarında yükselme sonucu oksijen disosiyasyon eğrisinde sağa kayma, dolayısıyla dokulara oksijen verilmesinde ve arteryel oksijen basıncında artış; endotel hücrelerinden nitrik oksit (NO) ve karbonmonoksit salınımında artış ve prostasiklin indüksiyonuyla vazodilatasyon gelişmesi; plateletlerde hidrojen peroksit (H₂O₂) artışı nedeniyle agregasyonda ve growth faktör üretiminde ve trombosit fonksiyonlarında artış, aktive olan trombositlerde bulunan büyüme faktörleri ve inflamatuvar sitokinlerin (PDGF- β , TGF- β , IL-8 ve EGF) salınımı ile iskemi ve ülserli hastalarda iyileşmeye olumlu etki; immün sistem hücrelerinde nötrofillerin fagositik aktivitelerinde artış, H₂O₂ artışı, tirozin kinaz aktivasyonu ile proinflamatuvar süreci hızlandırması ve sitokin salınımını indüklemesidir (17-20). Yine H₂O₂ artışına bağlı interferonlar, interlökinler, tümör nekroz faktör, transforme edici büyüme faktör, granülosit-makrofaj koloni stimulan faktörü artışı meydana gelir. Retikuloendotelial sistemi stimüle ederek dokuların tamir mekanizmasını destekler (13, 21). O₃'nun oksidatif etkisi nedeniyle doz ayarlaması çok önemlidir. Terapötik doz aralığı 10-80 μ g/ml olup bu doz aralığındaki uygulamalarda herhangi bir yan etki oluşmamaktadır. Düşük dozlarda terapötik etki ortaya çıkmazken, doz aşımında güçlü bir oksidan olarak toksik etki gösterir (18). Terapötik dozda verildiğinde vücutta oluşturulan şey aslında kontrollü bir oksidatif strestir. Fizyolojik seviyede oksidatif stresin nörohumoral mekanizma ile yararlı olduğu bildirilmektedir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deneysel çalışma, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyle Yeri Etik Kurulu Başkanlığı'nın onayı ve Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (FÜBAP) (Proje No: TF. 11. 79) desteği alındıktan sonra yapıldı. Çalışmada Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde (FÜDAM) gerçekleştirildi. Çalışmada denek olarak F.Ü. Deneysel Araştırmalar Merkezi (FÜDAM) biriminden temin edilen 8-10 haftalık 40 adet Sprague Dawley cinsi erkek sıçan her grupta 10 hayvan olacak şekilde rastgele 4 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna deney süresince hiçbir uygulama yapılmadı. O₃ grubuna deney süresince haftada 3 gün 150 μ g/kg/gün ip O₃ tedavisi uygulandı. CCl₄ grubuna deney süresince 2 mg/kg dozunda haftada 2 gün ip CCl₄ tedavisi uygulandı. CCl₄+O₃ grubuna deney süresince CCl₄+O₃ tedavisi uygulandı.

CCl₄ Uygulaması: Ratlar canlı ağırlıkları birbirine yakın olacak şekilde gruplara ayrıldıktan sonra dört hafta boyunca 2 ml/kg dozunda CCl₄ 1/3 oranında zeytinyağı ile homojen karışım halinde hazırlandıktan sonra 2 mg/kg dozunda deneklere uygulandı (22, 23).

Sıçanlar havalandırma şartlarının uygun olduğu bir mekanda özellikli hazırlanmış kafeslerde (3'lü-4'lü gruplar halinde) barındırıldı. Deney hayvanlarının yem ve suyu özel hazırlanmış çelik içerikli ürünlerde verildi. Denekler Yem Sanayi T.A.Ş. Elazığ Yem Fabrikasında hazırlanan pelet halindeki sıçan yemi ile beslendi. Denekler standart rat yemi ve çeşme suyu ile ad libitum olarak beslendi. Sıçanların deney öncesi ve deney süresince bakımlarına bu şekilde devam edildi. Deney sonunda 4 grupta yer alan sıçanların hepsi ketamin (75 mg/kg) + xylazine (10 mg/kg) ip uygulanarak anestezi altında sakrifiye edilerek çalışma sonlandırıldı. Sonrasında sıçanların karaciğer dokuları hızlı bir şekilde çıkarıldı. Çıkarılan karaciğer dokuları histolojik incelemeler için bouin solüsyonunda tespit edildi.

Ozonun Elde Edilmesi

Ozon (O_2/O_3 karışımı), tıbbi sınıf oksijenden ozonator ekipmanı ile Humazona cihazından (Humares, Almanya) üretildi, ozon konsantrasyonu 254 nm'de bir UV spektrofotometresi kullanılarak ölçüldü. Elde edilen ozon gazı oksijen-ozon karışımı olup %95 oksijen ve %5 ozon içermekteydi.

Terminal Deoksिनükleotidil Transferaz dUTP Nick Uç Etiketleme (TUNEL)

Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler elde edilip polilizinli lamlara alındı. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon, cat no: S7101, USA) kullanıldı ve apoptozise giden hücreler belirlendi. Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskopunda (Olympus BH-2) incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı. TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde Harris hematoksilen ile maviye boyanan çekirdekler normal, kahverengi nükleer boyanan hücreler apoptotik olarak değerlendirildi.

Histokimyasal Boyama

Sıçanların karaciğer dokuları %10'luk formaldehit solüsyonunda tespit edildi ve ardından musluk suyu altında yıkandı. Yıkanan dokular rutin histolojik takip serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Dehidrasyondan sonra ksilolde parlatılıp parafine (P3558, Sigma-Aldrich, ABD) gömüldü. Rodajlı ve polilizinli lamlara, hazırlanan parafin bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Preparatlar Hematoksilen-Eozin (H&E) boyası ile boyandı. Işık mikroskopunda (DM2500 LED, Leica, Almanya) incelenip fotoğraflandı (MC170 HD, Leica, Almanya).

İstatistiksel Analiz

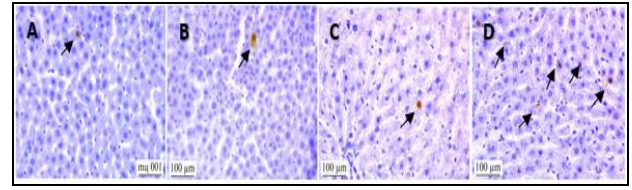
Veriler ortalama ± SEM değerleri olarak sunuldu. $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi. Verilerin normal dağılımının varsayımına uygunluğu Shapiro Wilk testi uygulanarak incelendi ve test sonucunda verilerin normal bir dağılım gösterdiği tespit edildi. Buna istinaden normal dağılım gösteren grupların birbiri ile karşılaştırılarak aralarındaki farklılıkların tespiti için Tek Yönlü Varyans (ANOVA) Analizi uygulandı ve ikili karşılaştırmalar için de post-hoc Duncan testi kullanıldı. Tüm istatiki analizler SPSS (Statistical Package for

Social Sciences) versiyon 15.0 paket programı kullanılarak yapıldı.

BULGULAR

TUNEL Bulguları

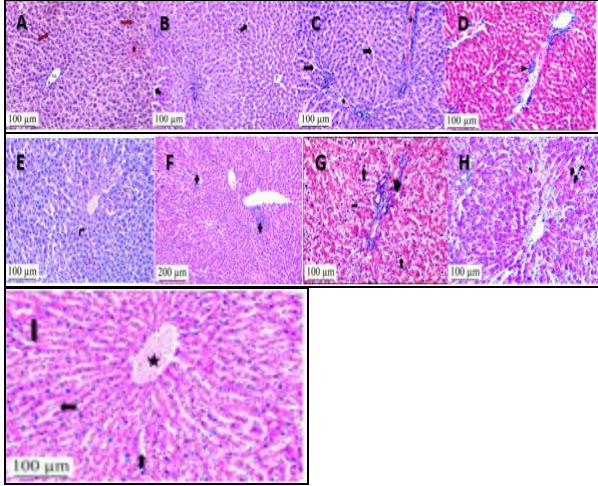
TUNEL boyama ışık mikroskobu altında incelendi; TUNEL pozitifliği karaciğer dokusunda hepatositlerde (siyah ok) gözlemlendi. TUNEL pozitifliği; Kontrol, O_3 ve CCl_4 gruplarında benzer bulundu. CCl_4 grubuyla kıyaslandığında ise $CCl_4 + O_3$ grubunda TUNEL pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış bulundu ($p < 0.05$) (Şekil 1).



Şekil 1. TUNEL bulguları, A: kontrol grubu, B: O_3 grubu, C: CCl_4 grubu, D: $CCl_4 + O_3$ grubu.

Histolojik Bulgular

H&E, PAS ve Masson Trikom histolojik boyama metodları uygulandıktan sonra deney hayvanlarının karaciğer dokularından histolojik görüntüler elde edildi. Pozitif kontrol grubuna ait doku kesitlerinde hafif sinüzoidal dilatasyon ve vasküler konjesyon (PAS ve H&E boyama ile) tespit edildi. CCl_4 grubuna ait doku kesitlerinde portal alanda, V. centralis ve sinüzoidler arasında mononükleer hücrelerde artış ve az sayıda hepatositte mikroveziküler yağlanma (PAS, H&E ve Masson Trikom boyama ile) saptandı. $CCl_4 + O_3$ grubuna ait doku kesitlerinde glikojeni kaybetmiş hepatositler, central dizilimde bozulma, vasküler konjesyon, belirgin sinüzoidal dilatasyon, heterokromatik ve piknotik çekirdekli hepatositler (PAS, H&E ve Masson Trikom boyama ile) tespit edildi (Şekil 2).



Şekil 2. H&E, PAS ve Masson Trikrom histopatolojik boyama bulguları. A: Negatif kontrol grubuna ait kesit. Normal histolojik görünümli hepatositler (kırmızı ok) ve Vena sentralis (V.S), hafif vasküler konjesyon (siyah yıldız). H&E x20. B: Pozitif kontrol grubuna ait kesit. Hafif sinüzoidal dilatasyon (çentikli siyah ok). Pas x20. C: Pozitif kontrol grubuna ait kesit. Vasküler konjesyon (siyah yıldız), Hafif sinüzoidal dilatasyon (çentikli siyah ok). H&E x20. D: CCl₄ grubuna ait kesit. Portal alanda mononükleer hücrelerde artış (siyah üçgen). Masson x20. E: CCl₄ grubuna ait kesit. Az sayıda hepatositte mikroveziküler yağlanma ve mononükleer hücre artışı (eğri siyah ok). Pas x20. F: CCl₄ grubuna ait kesit. V. centralis ve sinüzoidler arasında mononükleer hücre infiltrasyonu (çok yönlü siyah ok). H&E x10. G: CCl₄ + O₃ grubuna ait kesit. Glikojenini kaybetmiş hepatositler (siyah ok), central dizilimde bozulma, damarda konjesyon (kalın siyah ok). Masson x20. H: CCl₄ + O₃ grubuna ait kesit. Bazı alanlarda glikojen içeriği boşalmış hepatositler (siyah ok). Heterokromatik ve piknotik çekirdekli hepatositler (siyah ok başı). Pas x20. I: CCl₄+O₃ grubuna ait kesit. Belirgin sinüzoidal dilatasyon (çentikli siyah ok), vasküler konjesyon (siyah yıldız). H&E x20.

TARTIŞMA

Karaciğer çeşitli kimyasal ajanları, toksik etkili ürünleri ve farmakolojik maddeleri inhibe eden önemli bir organdır. Bu nedenle birçok faktör karaciğerde akut

veya kronik bozukluklara neden olur. Karaciğerde akut veya kronik hasarlanmaya neden olan kimyasal meddelerden biri de CCl₄'tür (24, 25).

Yapılan deneysel araştırmalarda CCl₄ maruziyetinin karaciğerde; hepatosit dejenerasyonunda ve TUNEL ile boyanan apoptotik hücre sayısında önemli artışa, dağılık nekroz alanlarına, belirgin hepatosit ödemine, hücresel sınır kaybı oluşumuna, hepatic yapıda bozulmaya, lobüller boyunca yağ birikimine, hücresel vakuolizasyonun yanı sıra sinüzoidal endotelde fokal bozulmaya, Disse boşluklarında genişlemeye ve portal alanda mononükleer inflamatuvar hücre infiltrasyonuna neden olduğu rapor edilmiştir (26-28).

Bu çalışmada da literatürle benzer şekilde CCl₄'e maruz kalan sıçanların TUNEL ile boyanan apoptotik hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da artış meydana geldi. Bunun yanında mikroveziküler yağlanma, hem portal alanda hem de v. centralis ve sinüzoidler arasında mononükleer hücre sayısında artış şeklinde hepatic yapıda bozulmalar saptandı.

Yapılan bu çalışmada hafif vasküler konjesyon ve hafif sinüzoidal dilatasyon şeklinde minimal hepatic değişiklikleri gözlemlendi. Elde edilen veriler literatür çalışmaları ile benzerdi (29).

Yapılan bu çalışmada CCl₄+O₃ uygulanan gruptaki sıçanların karaciğer dokularında TUNEL pozitifliğinin anlamlı derece arttığı ve histopatolojik görüntülemelerde diğer boyama yöntemleriyle glikojenini kaybetmiş hepatosit, vasküler konjesyon, central dizilimde bozulma ve belirgin sinüzoidal dilatasyon bulguları elde edildi. Çalışma sonucunda O₃'ün beklenen oksidan etkiye sahip olmadığı kanaatine varılmıştır. CCl₄ intoksikasyonunda O₃ uygulamasının hepatic hasar tablosunu daha da dramatize etmiş olması nedeniyle O₃ uygulamalarında doz çalışmalarına ve etki mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik yeni araştırma planlarına ihtiyaç olduğu anlaşılmıştır.

KAYNAKLAR

- Doğan A. Farmakoloji. Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Ders Kitapları, Kars. 2000.
- National Academies Press, 1995.
- Kumar V, Abbas A, Fausto N. Pathologic Basis of Disease. 7nd Ed, China: Elsevier Saunders, 2005: 1525.
- Thrall KD, Vucelick ME, Gies RA et al. Comparative Metabolism of 113 Carbon Tetrachloride İi Rats, Mice, and Hamsters Using Gas Uptake and PBPK Modeling. J Toxicol Environ Health A 2000; 60: 531-48.
- Basu S. Carbon Tetrachloride-induced Lipid Peroxidation: Eicosanoid Formation and Their Regulation by Antioxidant Nutrients. Toxicology 2003; 189: 113-27.

6. Weber LW, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and Mechanism of Action Of haloalkanes: Carbon Tetrachloride as a Toxicological Model. *Critical Reviews in Toxicology* 2003; 33: 105-36.
7. Güven A, Güven A, Gülmez M. The effect of Kefir on the Activities of GSHPx, GST, CAT, GSH and LPO Levels in Carbon Tetrachloride-Induced Mice Tissues. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2003; 50: 412-6.
8. Oh WY, Pyo S, Lee KR et al. Effect of Holotrichia Diomphalia Larvae on Liver Fibrosis and Hepatotoxicity in Rats. *J Ethnopharma* 2003; 87: 175-80.
9. Wang H, Wei W, Wang NP. Melatonin Ameliorates Carbontetrachloride Induced Hepatic Fibrogenesis in Rats via İnhibition of Oxidative Stres. *Life Sciences* 2005; 77: 1902-15.
10. Boll M, Weber L, Becker E, Stampfl A. Mechanism of Carbon Tetrachloride Induced Hepatotoxicity. Hepatocellular Damage by Reactive Carbon Tetrachloride Metabolites. *Z Naturforsch* 2001; 560: 649-59.
11. Viebahn-Haensler R. The Use of Ozone in Medicine. 5. Ed. İffezheim, Germany: Odrei Publishers, 2007: 14-48.
12. Beck EG, Wasser G, Viebahn-Hansler R. The Current Status of Ozone Therapy Empirical Developments and Basic Research. *Forsch Komplementarmed* 1989; 5: 61-75.
13. Bocci VA. Scientific and Medical Aspects of Ozone Therapy. State of the art. *Arch Med Res* 2006; 37: 425-35.
14. Hernandez FA. To What Extent Does Ozone Therapy Need a Real Biochemical Control System? Assessment and İmportance of Oxidative Stress. *Arch Med Res.* 2007; 38: 571-8.
15. Rice-Evans C, Miller NJ. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods Enzymol.* 1994; 234: 279-93.
16. Snyder SH, Baranano DE. Heme Oxygenase: a font of Multiple Messengers. *Neuropsychopharmacology* 2001; 25: 294-8.
17. Bocci V, Luzzi E, Conradeschi F et al. Studies on the Biological Effects of Ozone. 4. Cytokine Production and Glutathion Levels in Erythrocytes. *J Biol Regul Homeost Agents* 1993; 7: 133-8.
18. Travagli V, Zanardi I, Silvietti A, Bocci V. A Physicochemical İnvestigation on the Effects of Ozone on Blood. *Int J Biol Macromol* 2007; 41: 5; 504-11.
19. Bocci V, Biological and Clinical Effects of Ozone. Has Ozone Therapy a Future in Medicine? *Br J Biomed Sci* 1999; 56: 270-9.
20. Volkhovskaya NB, Tkachenko SB, Belopolsky AA. Modulation of Phagocytic Activity of Blood Polynuclear Leukocytes with Ozonized Physiological Saline. *Bull Exp Biol Med.* 2008; 146: 559-61.
21. Viebahn-Hänsler R. The Use of Ozone in Medicine: Mechanisms of Action. *Munich* 2003; 5; 23-5.
22. Shaker E, Mahmoud H, Mnaa S. Silymarin, the Antioxidant Component, and Silybum Marianum Extracts Prevent Liver Damage, Food and Chemical Toxicology 2010; 48: 803-6.
23. Bahçecioğlu GH, Koca SS, Poyrazoğlu OK et al. Hepatoprotective Effect of Infliximab, and Anti-TNF- α Agent, on Carbon Tetrachloride-Induced Hepatic Fibrosis, İnflammation 2008; 31: 215-21.
24. Çetinkaya A. Ratlarda N-asetil Sistein ve L-karnitin'in Karbon Tetraklorür ile Oluşturulan Akut Karaciğer Hasarı Üzerine Etkileri (Yan Dal Uzmanlık Tezi). Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bilim Dalı, Kahramanmaraş, Türkiye. 2009.
25. Hong RT, Xu JM, Mei Q. Melatonin Ameliorates Experimental Hepatic Fibrosisinduced by Carbon Tetrachloride in Rats. *World J Gastroenterol.* 2009; 15: 1452-8.
26. Chen X, Meng Q, Wang C et al. Protective Effects of Calycosin Against CCl4-İnduced Liver İnjury with Activation of FXR and STAT3 in Mice. *Pharm Res.* 2015; 32: 538-48.
27. Li S, Liu J, Zhang M, Chen Y, Zhu T, Wang J. Protective Effect of Eckol Against Acute Hepatic İnjury Induced by Carbon Tetrachloride in Mice. *Mar Drugs* 2018; 16: 300.
28. Eidi A, Mortazavi P, Behzadi K, Rohani AH, Safi S. Hepatoprotective Effect of Manganese Chloride Against CCl4-induced Liver İnjury in Rats. *Biol Trace Elem Res.* 2013; 155: 267-75.
29. Güvendi GF, Eroğlu HA, Mustafa Makav, Güvendi B, Adalı Y. Selenium or Ozone: Effects on Liver İnjury Caused by Experimental İron Overload. *Life Sci* 2020; 262: 118558.