T.C.

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

KARBON TETRAKLORÜR İLE DENEYSEL SİROZ OLUŞTURULAN RATLARDA SERBEST RADİKAL METABOLİZMASI; STOBADİN'İN ANTİOKSİDAN ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Seda DUYGULU DEVAY

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Orhan CANBOLAT

ANKARA – 2008

T.C.

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

KARBON TETRAKLORÜR İLE DENEYSEL SİROZ OLUŞTURULAN RATLARDA SERBEST RADİKAL METABOLİZMASI; STOBADİN'İN ANTİOKSİDAN ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Seda DUYGULU DEVAY

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Orhan CANBOLAT

ANKARA – 2008

TEŞEKKÜR

İhtisas eğitimim boyunca ve tez çalışmam aşamasında; destek ve yardımlarını esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Orhan CANBOLAT'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin hazırlanmasında bana yardımcı olan; değerli bilgi, beceri ve tecrübelerini aktaran, sabır ve anlayışını esirgemeyen Prof. Dr. Mustafa KAVUTÇU'ya teşekkürü bir borç bilirim.

İlgisini ve desteğini her zaman gördüğüm Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hatice PAŞAOĞLU'na ve tüm Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Tezimde antioksidan olarak kullandığım Stobadin'i temin eden Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Prof. Dr. Çimen KARASU'ya; Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Prof. Dr. Suna Ömeroğlu'na, yardımlarını esirgemeyen ve sevgisini hep hissettiğim Uzm. Dr. Neşe Lortlar Uçankuş'a; Halk Sağlığı Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Y.Doç.Dr Mustafa İlhan'a ve deneylerde kullandığımız hayvanların bakımını üstlenen Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Merkezi ekibine teşekkür ederim.

Tez çalışma aşamasındaki sıkıntılı dönemlerimde bana moral veren canım arkadaşım Dr. Canan YILMAZ DEMİRTAŞ ve Y.Doç.Dr. Ebru OFLUOĞLU'na sonsuz sevgilerimi sunarım.

Bugünlere gelmemde büyük emekleri olan sevgili aileme; asistanlığım süresince yanımda olarak beni destekleyen eşim Dr. Ali Önder'e ve herşeyim, biricik oğlum Ali Arda'ya teşekkür ederim.

Dr. Seda DUYGULU DEVAY

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

TEŞEKKÜR i
İÇİNDEKİLER ii
ŞEKİLLER DİZİNİ vii
TABLOLAR DİZİNİ viii
GRAFİKLER DİZİNİ ix
RESİMLER DİZİNİ x
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Karaciğer 3
2.2. Karaciğer sirozu 5
2.2.1. Tanım 5
2.2.2. Fizyopatogenez 6
2.2.3. Sınıflandırma 9
2.2.3.1. Morfolojik sınıflandırma 9
2.2.3.2. Etyolojik sınıflandırma 9
2.2.4. Klinik belirti ve bulgular 11
2.2.4.1. Kompanse siroz 11
2.2.4.2. Dekompanse siroz 11
2.2.5. Laboratuvar bulguları 12
2.2.5.1. Hematolojik bulgular 12
2.2.5.2. Biyokimyasal bulgular 12
2.2.5.3. İdrar bulguları 13
2.2.5.4. Siroz tanısında kullanılan görüntüleme yöntemleri 13

2.2.6. Hastalığın seyri 14
2.2.7. Sirozun komplikasyonları 14
2.2.7.1. Portal hipertansiyon 14
2.2.7.2. Spontan bakteriyel peritonit 15
2.2.7.3. Hepatik (Portosistemik) ensefalopati 15
2.2.7.4. Pankreatit 16
2.2.7.5. Assit 16
2.2.7.6. Hepatorenal sendrom 17
2.2.7.7. Karaciğer yetmezliği 17
2.2.8. Tedavi 17
2.3. Karaciğerde biyotransformasyon 18
2.3.1. Faz 1 reaksiyonlar 20
2.3.1.1. Oksidasyon reaksiyonları ve sitokrom P_{450} ailesi 20
2.3.1.2. İndirgenme reaksiyonları 21
2.3.1.3. Kopma reaksiyonları 22
2.3.2. Faz 2 reaksiyonlar 22
2.4. Karbon tetraklorür (CCl_4)'ün karaciğere etkisi 22
2.5. Serbest radikaller ve oksidatif stres 25
2.5.1. Serbest Radikal Türevleri 28
2.5.1.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot -}$) 29
2.5.1.2. Hidroksil Radikali ($OH^{\cdot}$) 30
2.5.1.3. Hidrojen Peroksit (H_2O_2) 31
2.5.1.4. Hipoklorik Asit (HOCl) 32
2.5.1.5. Singlet oksijen ($^1O_2$) 32
2.5.1.6. Perhidroksil radikali ($OOH^{\cdot}$) 32
2.5.1.7. Peroksil radikali ($ROO^{\cdot}$) 33
2.5.1.8. Nitrik Oksit ($NO^{\cdot}$) 33

2.5.1.9.Peroksinitrit ($ONOO^-$) 34

2.5.2. Serbest Radikallerle Oluşan Lipid Peroksidasyonu 34

2.5.3. Serbest Radikallerle Oluşan Protein Oksidasyonu 36

2.6.Antioksidan savunma sistemleri.....37

2.6.1.Antioksidanların sınıflandırılması 41

2.6.1.1 Enzimatik Yapıda Olan Antioksidanlar.....42

2.6.1.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1) 42

2.6.1.1.2. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px; EC.1.11.1.9) ve Glutatyon Redüktaz (GR; EC.1.6.4.2) 43

2.6.1.1.3. Katalaz.....45

2.6.1.1.4. Glutatyon-S-Transferaz (GST; EC 2.5.1.18) 46

2.6.1.1.5. Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz (G6PDH, EC 1.1.1.49) 47

2.6.1.2. Nonenzimatik Yapıda Olan Antioksidanlar 47

2.6.1.2.1. Suda çözünen radikal tutucuları.....48

2.6.1.2.1.1. Askorbik asit (C vitamini).....48

2.6.1.2.1.2. Glutatyon (GSH) 48

2.6.1.2.1.3. Ürik asit (Ürat) 50

2.6.1.2.1.4. Melatonin 50

2.6.1.2.2. Yağda çözünen radikal tutucuları.....50

2.6.1.2.2.1. E vitamini (α-tokoferol) 50

2.6.1.2.2.2. Karotenoidler (Beta karoten).....51

2.6.1.2.2.3. Bilirubin 51

2.6.1.2.2.4. Ubikinon.....52

2.6.1.2.3. Stobadin (STB) 52

3. MATERYEL VE YÖNTEM.....55
3.1. Kullanılan Gereçler.....55
3.1.1. Deney Grupları.....55
3.1.2. Kullanılan aletler.....55
3.1.3. Kullanılan Kimyasallar.....56
3.2. Uygulanan Yöntemler.....56
3.2.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması.....56
3.2.2. Yöntemlerin Uygulanması.....57
3.2.2.1. Karaciğer doku örneklerinin homojenize edilmesi.....57
3.2.2.2. Rat karaciğer doku örneklerinde Malondialdehid (MDA) tayini.....58
3.2.2.3. Rat karaciğer doku örneklerinde protein tayini.....60
3.2.2.4. Rat karaciğer doku örneklerinde SOD aktivitesinin ölçümü.....61
3.2.2.5. Rat karaciğer doku örneklerinde Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesinin ölçümü.....63
3.2.2.6. Rat karaciğer doku örneklerinde Katalaz aktivitesinin ölçümü.....65
3.2.2.7. Histopatolojik inceleme.....66
3.2.2.7.1. Hematoksilen-Eozin Boyası.....66
3.2.2.7.2. Masson-Trikrom Yöntemi.....66
3.2.2.7.3. İmmünhistokimyasal Yöntem.....67
3.3. İstatistiksel analiz.....67
4. BULGULAR.....68
4.1. Biyokimyasal Bulgular.....68
4.2. Histopatolojik Bulgular.....72
4.2.1. Masson-trikrom ile boyanmış karaciğer dokusu kesitleri.....72

4.2.2. İmmünhistokimyasal yöntemle boyanmış karaciğer dokusu kesitleri 80

5. TARTIŞMA VE SONUÇ 84

6. ÖZET 91

7. SUMMARY 93

8. KAYNAKLAR 95

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

Şekil 1. Primer ve sekonder fibrogenezis 8

Şekil 2. Oksidatif Stres 25

Şekil 3. Memeli hücrelerinde reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türlerinin meydana gelişi 29

Şekil 4. Reaktif Oksijen türleri (ROS) ve Reaktif Nitrojen türleri (RNS)'nin birbirleriyle etkileşimi 34

Şekil 5. Metallerin katalizlediği lipid peroksidasyonu 35

Şekil 6. Lipid peroksidasyonu ile oluşan aldehidler 36

Şekil 7. Metallerin katalizlediği bölge spesifik protein oksidasyonu 37

Şekil 8. Memeli Hücrelerinde Antioksidan Sistem 38

Şekil 9. Oksidan-antioksidan dengesi 39

Şekil 10. Glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktazın katalizlediği reaksiyon 44

Şekil 11. Stobadin'in yapısı 52

Şekil 12. MDA Standart eğrisi 59

Şekil 13. Protein Standart eğrisi 61

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 1. Bazı ekstrasellüler matriks proteinlerinin hücresel kaynakları 7

Tablo 2. Karaciğer sirozunun nedenleri 10

Tablo 3. Karaciğer sirozuna neden olan etkenlerin sıklığı 11

Tablo 4. Child- Pugh evrelendirmesi.....14

Tablo 5. Sirozun nedenleri ve olası tedavi seçenekleri 18

Tablo 6. Faz 1 ve faz 2 reaksiyonlar.....19

Tablo 7. Enzimatik Antioksidanlar.....41

Tablo 8. Nonenzimatik Antioksidanlar 41

Tablo 9. Karaciğer dokusu SOD, Katalaz ve GSH-Px enzim aktiviteleri ile MDA düzeyleri (ortalama±standart hata = X ±SD).....68

GRAFİKLER DİZİNİ

Sayfa No:

Grafik1: Karaciğer dokusu MDA (µmol / mg prot) düzeyleri (X ± SD) 69

Grafik 2: Karaciğer dokusu GSH-Px (IÜ / mg prot) aktivitesi sonuçları (X±SD) 69

Grafik 3: Karaciğer dokusu SOD (Ü / mg prot) aktivitesi sonuçları (X±SD).....70

Grafik 4: Karaciğer dokusu Katalaz (IÜ / mg protein) aktivitesi sonuçları (X ±SD).....70

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa No:

Resim1,2. Kontrol grubuna ait masson-trikrom ile boyanmış karaciğer dokusu kesitleri 72,73

Resim 3-4. Stobadin grubuna ait masson-trikrom ile boyanmış karaciğer dokusu kesitleri 74,75

Resim 5-6. CCl_4 grubuna ait masson-trikrom ile boyanmış karaciğer dokusu kesitleri.....76,77

Resim7-8. Stobadin + CCl_4 grubuna ait masson-trikrom ile boyanmış karaciğer dokusu kesitleri 78,79

Resim 9. Kontrol grubuna ait immünhistokimyasal yöntemle boyanmış karaciğer dokusu kesitleri 80

Resim 10. Stobadin grubuna ait immünhistokimyasal yöntemle boyanmış karaciğer dokusu kesitleri 81

Resim 11 -12. CCl_4 grubuna ait immünhistokimyasal yöntemle boyanmış karaciğer dokusu kesitleri 82

Resim-13. Stobadin + CCl_4 grubuna ait immünhistokimyasal yöntemle boyanmış karaciğer dokusu kesitleri.....83

1. GİRİŞ

Karaciğer; anatomik lokalizasyonu, fizyolojik ve biyokimyasal rolü nedeniyle toksik madde ve ilaçlara sıkça maruz kalan bir organdır. Karaciğer'de hasar dahil, çeşitli patolojik tablolara yol açan 600`den fazla maddeden biri de Karbon tetraklorür (CCl_4)'dür.[148,196] CCl_4 deneysel olarak karaciğer hasarı oluşturulmasında yaygın kullanılan bir ksenobiyotiktir.[146,165] Bu hasarın değişik şekillerinin; oksidatif stres ve bunu takiben ortaya çıkan serbest radikallerle oluştuğu bilinmektedir. Toksik oksi ve hidroksi radikallerinin lipid peroksidasyonu ve başka yollarla hepatosit membranını hasarlayabilecekleri invivo / invitro ortamlarda deneysel olarak gösterilmiştir.[157,51]

CCl_4`e bağlı karaciğer hasarında meydana gelen lipid peroksidasyonu oldukça önemlidir.[120,132] Çünkü bu hasara bağlı olarak ilerleyen süreç sonunda karaciğer fibrozisi ve siroz oluşabilir. Karaciğer fibrozisi; ekstrasellüler matriks komponentlerinin artması ile karakterizedir. Ekstrasellüler matriksin yapımı ve yıkımı arasındaki denge; oluşan toksik oksijen radikallerine bağlı olarak, potent profibrojenik mediatörlerin de aktive olması ile sürekli matriks yapımı yönünde bozulmaktadır.[102] Yapılmış olan birçok çalışmada karaciğer hastalıklarında; oksidatif stres ve buna bağlı olarak ortaya çıkan karaciğer hasarı ile fibrozis arasında ilişki olduğu gösterilmiştir.[161,162]

Serbest radikaller; dış orbitallerinde ortaklanmamış veya çiftleşmemiş elektron taşıyan, yüklü veya yüksüz, atom veya moleküllerdir. Serbest radikaller; organizmada normal metabolik yolların işleyişi sırasında meydana gelebildikleri gibi, dış etkenlerle de oluşabilirler. Biyolojik sistemlerde bulunan serbest radikallerin başlıcaları; süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet -}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil ($OH^{\bullet}$) radikalleridir. Yaşam süreleri çok kısa, ancak yapılarındaki dengesizlik nedeniyle çok aktif olan bu bileşikler tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme özelliğine

sahiptirler. Serbest radikallerin lipid peroksidasyonunu tetikleyerek oksidatif stresi arttırdığından da bahsedilmektedir.[25,36,43,124,136,164]

Canlılarda serbest radikallerin hasarını önleyen, sınırlayan veya kısmen onaran antioksidan mekanizmalar mevcuttur. Hücre dışında ve hücrede farklı organellerde yerleşerek savunma mekanizmasında rol alan antioksidanlar; enzimatik yapıda olabilecekleri gibi non enzimatik yapıda da olabilirler.[88]

Reaktif oksijen türevlerinin oluşumunu önlemek veya zararlı etkilerini azaltabilmek için farklı etki mekanizmalarına sahip olarak geliştirilen antioksidanlar arasında Stobadin de bulunmaktadır. Heterosiklik indol türevlerinden bir pridoindol olan Stobadin ile ilgili olarak halen günümüzde devam etmekte olan birçok çalışma yapılmaktadır. Güçlü bir antioksidan olan Stobadin; biyolojik sistemlerde –SH gruplarının oksidasyonunu, amino asit oksidasyonunu ve singlet oksijen oluşumunu engeller. Hidroksil, peroksil, alkoksil radikallerini de etkin biçimde nötralize eder.[83] Stobadin'in bu özellikleri indolik nitrojen üzerinde nitrojen merkezli stabil radikal oluşturma yeteneğinden kaynaklanır. Böylece oksidatif strese bağlı lipid peroksidasyonunu ve protein oksidasyonunu azaltır.[168,169]

Çalışmamızda; CCl_4 ile deneysel olarak siroz oluşturulan ratlarda, CCl_4 kullanımının ortaya çıkardığı fibrotik-sirotik proçes; hem antioksidan enzimler olan süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (CAT) ile takip edilmeye çalışılacak, hem de histopatolojik ve immünhistokimyasal boyama teknikleriyle değerlendirilecektir. Ayrıca CCl_4'nün neden olduğu radikal hasarının engellenmesinde yeni bir antioksidan molekül olan Stobadin'in etkisi de incelenecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KARACİĞER

Karaciğer; vücudun deriden sonra en büyük organı ve en büyük bezidir. Yaklaşık 1,5 kg ağırlığında olan karaciğer, diyafragmanın altında abdominal boşlukta yerleşmiştir.[10] Sağ ve sol olmak üzere iki anatomik loba ayrılmıştır. Sağ lobun arka yüzeyinde caudate lob ve alt yüzeyinde quadrate lob denilen iki küçük lob daha bulunmaktadır. Karaciğer; hepatik arter ve portal venin sağ ve sol kolları tarafından beslenmektedir. Hepatik arter karaciğere genel dolaşımdan bol oksijenli kanı taşırken; portal ven sindirim sisteminin kapiller yatağından besin maddelerince zengin kanı taşır. Venöz drenaj hepatik venler içine; biliyer drenaj ise sağ ve sol hepatik kanallar içinedir. İnce bir bağ dokusu olan Glisson kapsülü karaciğerin bütün yüzeyini kaplamaktadır. Glisson kapsülü; damar ve sinir kollarıyla karaciğer parankimi için destekleyici bir yapı sağlamakta ve parankimi ikiye ayırmaktadır.[8]

Karaciğer çok sayıda lobüllerden oluşmaktadır. Klasik karaciğer lobülü; vasküler, biliyer damarlar ve bağ dokusuyla ayrılmış polihedral bir yapıdır. Santral ven lobülün merkezindedir. Parankimal epitel hücrelere ait tek hücre tabakaları santral venden çıkarak yayılırlar. Sinuzoidler; karaciğer hücre tabakalarının her iki tarafına kan taşıyan vasküler kanallardır. Bunlar santral ven yakınlarında zengin intralobüler, vasküler bir ağ oluştururlar. Sinuzoidleri kaplayan hücreler ya endotelyal hücrelerdir ya da Kupffer hücreleridir. Endotelyal hücreler ile hepatositler arasındaki doku aralığı Disse aralığı olup; besin maddeleri ile kan ve karaciğerden artık ürünlerin transferini sağlayan interstisyel sıvıyı içerir.[8]

Karaciğer hücreleri (hepatositler); 20-30 mikron çapında, poligonal hücrelerdir.[8] Hematoksilen eozinle (H.E) boyanmış kesitlerde; çok sayıda mitokondri ve bir miktar düz endoplazmik retikulumun bulunması nedeniyle, hepatositin sitoplazması eozinofiliktir. Her bir hepatositin yüzeyi; diğer hepatositlerin yüzeyi ve

Disse aralığı boyunca sinüzoidlerin duvarıyla temas halindedir. İki hepatositin bitişik olduğu her yerde, hücrelerin arasında safra kanalikülü olarak bilinen tübüler bir aralık bulunur. Safra kanalikülleri; safra kanal sisteminin ilk kısımlarıdır. Safra kanalikülleri karaciğer lobülünün plakları boyunca anastomoz yapan karmaşık bir ağ oluştururlar ve portal alanlarda sonlanırlar. Bu nedenle safra kanın ters yönünde, yani lobülün merkezinden çevresine doğru ilerleyerek, kübik hücrelerden oluşmuş safra kanalcıkları ya da Hering kanallarına girer. Kanalcıklar kısa bir mesafe katettikten sonra portal alanlardaki safra kanallarında sonlanırlar. Safra kanalları; kübik ya da prizmatik epitel ile örtülüdür ve belirgin bir bağ dokusu kılıfına sahiptir. Safra kanalları; sağ ve sol hepatik kanalları oluşturarak karaciğeri terk ederler.[10]

Hepatosit; bol miktarda kaba ve düz endoplazmik retikuluma sahiptir. Hepatositte kaba endoplazmik retikulum; sitoplazma içine saçılmış kümeler oluşturur, bunlar bazofilik cisimler olarak isimlendirilir. Bu yapılardaki poliribozomlarda birkaç tip protein (kan albumini, fibrinojen) sentezi yapılır. Sitoplazma içinde yaygın olarak dağılmış düz endoplazmik retikulum; çeşitli maddelerin vücuttan atılmadan önce etkisizleştirilmesi için gerekli oksidasyon, metilasyon ve konjugasyon işlemlerinden sorumludur.[10]

Hepatosit glikojen içerir. Karaciğerde bulunan glikojenin miktarı günlük bir ritme uyar; aynı zamanda kişinin beslenme durumuna da bağlıdır. Karaciğer glikojeni glukoz için bir depodur ve kandaki glukoz düzeyi normalin altına düşerse mobilize olur. Bu şekilde hepatositler vücut tarafından kullanılan enerjinin ana kaynaklarından biri olan kan glukozunu sabit bir düzeyde tutar.[10]

Hepatositte bulunan diğer bir organel de lizozomlardır. Hepatosit lizozomları; hücre içi organellerin yıkımı ve dönüşümü için önemlidir. Peroksizomlar da; lizozomlar gibi enzim içeren ve hepatositlerde bol miktarda bulunan organellerdir. Peroksizomların işlevlerinden bazıları; yağ asitlerinin oksidasyonu ve bu oksidasyon sonucunda oluşan H_2O_2' in katalaz aktivitesi yoluyla yıkılması, pürinlerin (AMP, GMP) fazlasının ürik asite yıkılması, kolesterol, safra asitleri ve miyelin yapımında kullanılan bazı lipidlerin sentezine katılmaktı.r[10]

Hepatositte golgi kompleksleri de bol miktardadır. Bu organelin işlevleri arasında; lizozomların oluşturulması ve plazma proteinlerinin (örn. albumin, kompleman sisteminin proteinleri), glikoproteinlerin (örn. transferrin) ve lipoproteinlerin (örn. çok düşük dansiteli lipoproteinler; VLDL) salgılanması vardır.[10]

Karaciğer; yaşam için gerekli birçok farklı fonksiyona sahiptir. Aminoasitleri, karbonhidratları, lipidleri, vitaminleri, mineralleri alır, işler ve depolar. Albumin, α ve β globulinler, pıhtılaşma faktörleri ve transport proteinleri dahil olmak üzere birçok plazma proteini karaciğer tarafından sentezlenmektedir. Karaciğer; ilaçlar ve toksinler gibi ekzojen bileşiklerin detoksifikasyonunda primer organdır. Karaciğerin diğer önemli bir fonksiyonu da bilirubinin glukuronik asitle konjugasyonudur. Karaciğer; safra asitlerinin kolesterolden sentezi ve safraya sekresyonu; böylece kolesterol metabolizmasının düzenlenmesi ve diyetsel yağların absorbsiyonunun kolaylaştırılmasından da sorumludur. Karaciğer; tiroid, steroid ve diğer hormonların başlıca katabolizma yeridir ve plazma hormon düzeylerinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır.[8]

2.2. KARACİĞER SİROZU

2.2.1. Tanım

Kronik karaciğer hastalıkları; hepatosellüler hasar ile karakterize olup, genellikle karaciğer fibrozisi ve sirozu ile sonuçlanmaktadır.[7] Siroz; karaciğerin anatomik yapısının fibrozis ve nodülleşme sonucu bozulmasıdır. İlerleyici ve kronik bir karaciğer hastalığıdır.[156] Siroz sıklıkla alkolden kaynaklanır; ancak CCl_4 zehirlenmesi, enfeksiyöz hepatit gibi virus hastalıkları ve safra kanallarının enfeksiyonu gibi durumları takiben de siroz görülebilir.[64]

2.2.2 Fizyopatogenez

Sirozun patogenezinde dört faktör rol oynamaktadır.

1.Kronik aktif hepatit (KAH)

2.Steatohepatit

3.Portal fibrozis

4. Sentrilobüler (Zon 3) fibrozis

Etyolojide rol oynayan faktörler; bu dört yoldan bir ya da birkaçının etkili olduğu bir süreci takiben karaciğer sirozunu oluştururlar.[178]

Sirozun başlangıcında etyolojik nedene bağlı olarak gelişen hepatosellüler hasar ve buna eşlik eden iltihabi infiltrasyon sözkonusudur. İltihabi infiltrasyonun uzun süre devam etmesi karaciğerde aşırı bağ doku artışı olarak ifade edebileceğimiz fibrozise neden olmaktadır. Gelişen fibrozis sonucunda karaciğerin normal yapısı ile mikrovasküler ilişkileri bozulmakta ve devam eden bu süreç sonucunda karaciğer sirozu gelişmektedir. Bu yapısal değişiklikler presinuzoidal alan, sinuzoidler düzeyi ve postsinuzoidal alanda (santral ven) farklı morfolojik oluşumlarla temsil edilir.[141,18,131,60]

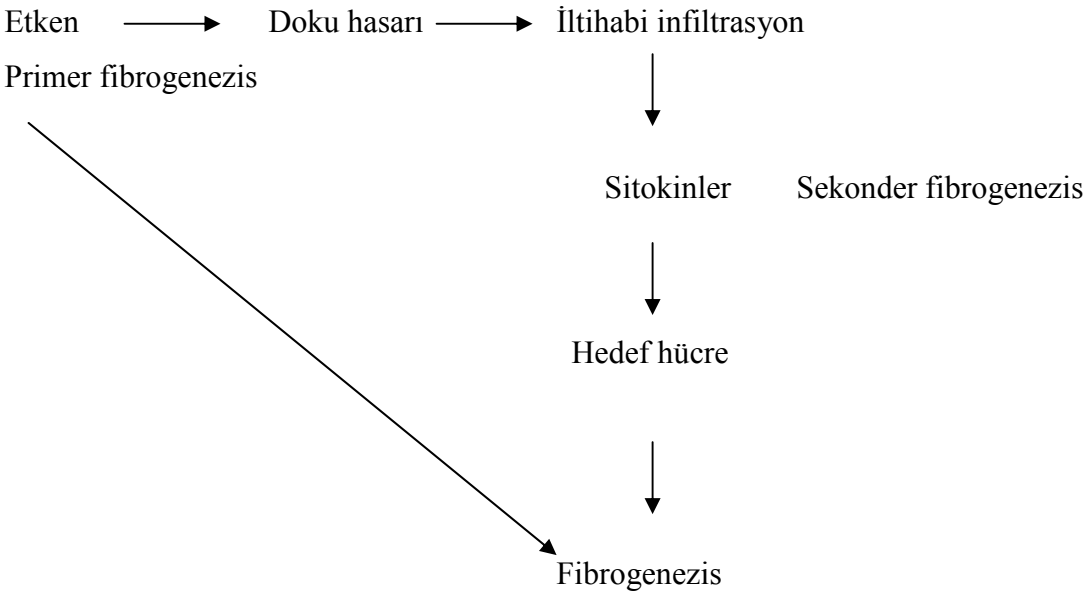
Karaciğer sirozunun temel morfolojik görünümünü oluşturan fibrozis; ekstrasellüler matriksin yapımı (fibrogenezis) ile yıkımı (fibrolizis) arasındaki dengenin bozulması sonucu ortaya çıkar. Karaciğer sirozunda gelişen fibrozisi anlayabilmek için, ekstrasellüler matriksin yapısını bilmek ve karaciğerin parankimal (hepatosit) ve non-parankimal hücrelerinin kronik karaciğer hastalığı zemininde gelişen iltihabi infiltrasyona verdiği yanıtı incelemek gerekir. Karaciğerin hücresel yapısının yaklaşık %65'ini hepatositler, %35'ini ise nonparankimal hücreler oluşturur. Nonparankimal hücre topluluğunun büyük kısmı (%70) endotelyal hücrelerdir. Kupffer hücreleri %20, yıldızsı hücreler yaklaşık %10 kadardır. Ekstrasellüler matriksin yapısında başta kollajen olmak üzere, proteoglikanlar, nidogen, elastin, hyaluronat, fibronektin, laminin ve tenascin gibi matriks proteinleri

bulunur. Bu proteinler karaciğerdeki çeşitli hücreler tarafından sentezlenip salgılanırlar. Tablo 1'de ekstrasellüler matriks proteinlerinin hücresel kaynakları gösterilmiştir.[141,18,131,60]

Tablo 1. Bazı ekstrasellüler matriks proteinlerinin hücresel kaynakları.[141,18,131,60]

Matriks proteini	Hepatosit	Yıldızsı hücreler	Endotelyal hücreler	Kupffer hücreleri	Safra yolu epiteli
Fibronektin	+	++	-	-	?
Laminin	-	+	-	-	+
Kollajen-1	+/-	+	-	-	-
Kollajen-3	+/-	++	-	-	-
Kollajen-4	-	+	+	-	+
Decorin	-	+	?	-	?

Ekstrasellüler matriks sentezinde en önemli rolü olan hücreler yıldızsı hücrelerdir. İltihabi infiltrasyon ortamında bazı yapısal değişikliklere uğrayan bu hücrelerin lipid içeriği ve retinoid konsantrasyonu azalırken, hücre yüzey reseptörlerinde de bazı değişiklikler meydana gelir. Morfolojik olarak da önemli ölçüde değişmiş olan hücrenin bu yeni formu "Myofibroblast" olarak adlandırılır. Myofibroblastlar; ekstrasellüler matriks proteinlerinin sentez ve sekresyonunun yanı sıra çok sayıda profibrojenik sitokin ve growth faktörün sentezinden de sorumludur. Yıldızsı hücrelerin uyarımı, diğer nonparankimal hücreler üzerinden olabileceği gibi hepatositler tarafından da başlatılabilir. Fibrogenezisi başlatan süreç; immün yanıt, yara iyileşmesi gibi bir neden ya da primer fibrogenezis şeklinde olabilir. Bunların ilk ikisinde fibrogenetik stimulus iltihabi infiltrasyon üzerinden gelişen indirekt bir etkileşime dayanırken; alkolik karaciğer hastalığında alkol metabolitleri (asetaldehid) ve hemakromatozis'de demirin direkt uyarıcı etkisi ön planda yer almaktadır.[141,18,131,60] (şekil 1).



Şekil 1. Primer ve sekonder fibrogenezis[141,18,131,60]

Fibrogenetik stimulusta rolü olan sitokinler oldukça çeşitlidir. Bunların bir kısmı primer fibrogenetik stimulusta rol oynarken, diğerleri sekonder fibrogenetik uyarımda etkili olmaktadır. İnterferon gibi bazı sitokinler ise fibrogenez sürecinde inhibitör etki gösterirler. Karaciğer fibrozisinde bir yandan kollajen ve diğer matriks proteinlerinin miktarları artarken diğer taraftan da bunların rölatif miktarları arasında önemli değişiklikler meydana gelir. Normal karaciğerde tip1 kollajen / tip 3 kollajen oranı 1:1 iken; sirotik karaciğerde bu oran 4:1 gibi bir değere ulaşmaktadır. Fibrogenetik sürecin gelişiminde ekstrasellüler matriksin yapımı kadar yıkım hızı da rol oynamaktadır. Matriks proteinlerinin yıkımında rol oynayan metalloproteinazlara örnek olarak interstisyel ve nötrofil kollajenaz, jelatinaz, stromelysin verilebilir.[141,18,131,60]

Fibrozis ilerledikçe karaciğerin yapısını bozulur. Sinuzoidlerde oluşan daralma karaciğer damar direncinde artışa ve portal hipertansiyona neden olur. Bunu takiben oluşan rejenerasyon nodülleri tam bir siroz oluşumunu sağlar.[158,159]

Siroz yaygın bir karaciğer hastalığı olduğu halde; lezyonlar asimetriktir ve homojen değildir. Sirozun erken safhasında karaciğer; yağlanma, iltihabi eksuda ve

ödem nedeniyle büyüyebilir ve ağırlığı artabilir. Geç safhada akut enflamatuvar reaksiyonun kaybolması ve fibröz dokunun artıp, karaciğerin büzüşmesi ile organ hem ağırlık hem de boyut olarak küçülür.[33]

2.2.3. Sınıflandırma

2.2.3.1. Morfolojik sınıflandırma

Sirozun üç anatomik tipi vardır.

2.2.3.1.1. Mikronodüler siroz: 1 cm'den küçük, eşit çaptaki ufak nodüllerin arasında muntazam görünümlü ince septumlarla karakterizedir. Mikronodüler siroz karaciğerin rejenerasyon kapasitesinin yeterli olmadığı alkolizm, yaşlılık, malnutrisyon ya da anemi gibi durumlarda görülür. Bu gruba örnek olarak alkolik siroz verilebilir.[31,33] Mikronodüler siroz sıklıkla makronodüler siroza dönüşür.[49]

2.2.3.1.2. Makronodüler siroz: Değişik boyutlarda, septalarla ayrılmış normal lobüler yapı içeren ve bazen çapı 5 cm'ye ulaşabilen büyük nodüllerle karakterizedir. Bu gruba örnek olarak postnekrotik sirozlar verilebilir.[158]

2.2.3.1.3. Mikst tip siroz: Hem mikronodüler hem de makronodüler tip sirozun özellikleri birlikte bulunur.[158]

2.2.3.2. Etyolojik sınıflandırma

Klinik uygulamalarda yaygın olarak kullanılır ve sirozu oluşturan nedenlere dayanır.[178] Bu nedenler tablo 2'de gösterilmiştir.[141,18,131,60,89,137,158,178]

2.2.3.2.1.Etyoloji

Sirozda etyoloji ne olursa olsun en son histopatolojik model ve klinik tablo aynıdır.[89,158] Klinik pratikte karşılaşılan siroz nedenleri ülkelere göre farklılıklar gösterebilmektedir. Ülkemiz için yapılmış çalışmalarda karaciğer sirozu nedenlerinin sıklığı tablo 3'de oranlarıyla gösterilmiştir.[141,18,131,60] Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'da çoğunlukla alkolik, kronik hepatit B ve C ile kriptojenik siroz görülür. Gelişmekte olan ülkelerde önde gelen nedenler hepatit B ve C virüsleridir. Tiplere göre yaş ve cinsiyet dağılımı farklılık gösterir.[158]

Tablo 2. Karaciğer sirozunun nedenleri[141,18,131,60,89,137,158,178]

1-Enfeksiyöz hastalıklar	Hepatitler (Hepatit B, C, B+D), Konjenital sifiliz.
2-Alkol	
3-Metabolik veya genetik hastalıklar	Hemokromatozis, Wilson hastalığı, Alfa 1-Antitripsin eksikliği, Galaktozemi, Tip 4 Glikojen depo hastalığı, Tirozinemi, Herediter fruktoz intoleransı.
4-Uzamış kolestaz	İntrahepatik ve Ekstrahepatik kolestaz.
5-İmmünolojik nedenler	Lupoid hepatit, Primer biliyer siroz Sklerozan kolanjit.
6-İlaçlar ve toksinler	Metotreksat, Metil dopa, İzoniazid, Amiodaron, Oksifenasetin, A vitamini, Karbon tetraklorür.
7-Vasküler olaylar	Sağ kalp yetmezliği, Budd -Chiari sendromu, Veno-oklüziv hastalık.
8-İntestinal by pass	
9-Hindistan çocukluk çağı sirozu	
10-Diğer nedenler	Malnutrisyon, Sarkoidoz, Kriptojenik.*

*Bilinen nedenlerden hiçbirisinin saptanamadığı siroz olguları

Tablo 3. Karaciğer sirozuna neden olan etkenlerin sıklığı[141,18,131,60]

Viral hepatitler(B,C,Delta) **	%60
Alkol	%11
Alkol + viral hepatit	%4
Diğer nedenler	%9
Kriptojenik	%16

**Viral hepatitlerde sıklık oranı HBV > HCV > HDV şeklindedir.

2.2.4. Klinik belirti ve bulgular

İlerleyici bir hastalık olan siroz genellikle ileri evrelere ulaşmadan bulgu vermez. Sirozda klinik bulgular karaciğerdeki hasarın derecesi ve portal hipertansiyonla ilişkilidir. Klinik olarak kompanse ve dekompanse siroz olarak ikiye ayrılır.[89,158]

2.2.4.1.Kompanse siroz

Hastaların bazıları hiç bir bulgu vermez. Hastalık rutin bir muayane veya biyokimyasal tarama sırasında farkedilir. En sık görülen semptomlar; halsizlik, çabuk yorulma, iştahsızlık, bulantı, hafif ateş, spider anjiom (arteriyollerde örümcek şeklindeki genişlemeler), palmar eritem (avuç içinde olan eritem), bileklerde ödem, açıklanamayan burun kanamaları ve belirsiz karın ağrılarıdır. Tanı koydurucu bulgular; hepatomegali ve splenomegalidir.[158,178] Portal hipertansiyon ile karaciğer yetmezliğine bağlı olarak gelişen özefagus varis kanamaları, assit ve hepatik (portosistemik) ensefalopati dekompanse döneme girildiğini gösterir.[89]

2.2.4.2.Dekompanse siroz

Bu dönemde hastada halsizlik, kas erimesi ve kilo kaybı vardır. Ateş 37.5-38^{o} C arasında olabilir. Assit ve / veya sarılık vardır. Sarılık; karaciğer hücre harabiyetini

gösteren önemli bir bulgudur. Serum bilirubin konsantrasyonu 2-3 mg/dl ‘ye (34-51µmol/L) ulaşınca görülür. Sarılık karaciğer hastalığının en karakteristik belirtisidir fakat karaciğer hastalığına özgün değildir. Hemoliz ve bilirubin metabolizması bozukluklarında da görülür.[8,158]

2.2.5. Laboratuvar bulguları

Laboratuvar bulguları siroz tanısında önemlidir. Fakat bulguların normal olması hastalığın olmadığı anlamına gelmez. Siroz tanısı koyduran başlıca laboratuvar bulguları; albumin düzeylerinde düşme ve protrombin zamanında (PTZ) olan uzamadır.[135,178]

2.2.5.1.Hematolojik bulgular

Genellikle hafif normositik, normokromik bazen de makrositik anemi vardır. Gastrointestinal traktustan olan kanama hipokromik anemiye sebep olabilir. Hipersplenizm varsa trombosit ve lökosit sayıları düşüktür. Protrombin zamanı uzamıştır ve K vitaminine yanıt vermez.[33,158]

2.2.5.2.Biyokimyasal bulgular

Serum bilirubin düzeyleri biliyer siroz dışında genellikle normaldir. Bilirubin düzeylerinde olan yükselme; sirozun aktif olduğunu ya da komplikasyonların geliştiğini gösterir. Serum albumin düzeylerinde azalma ve gama globulin düzeylerinde artma görülür. Serum albumin düzeyleri; karaciğer sentez fonksiyonlarını yansıtan en iyi testtir. Serum alkalen fosfataz (ALP), aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT) değerleri genellikle artar, ancak ileri derecede nekrozu olan hastalarda enzim düzeyleri normal olabilir. Gama glutamiltransferaz (GGT) ve laktat dehidrogenaz (LDH) düzeyleri hafifçe artabilir.[12,158,178] Serum protein elektroforezinde; albumin düzeyinde düşme ile beta

ve gama bantları arasında plazma IgG ve IgA düzeylerinde artma vardır. Beta ve gama bantları arasına göç eden IgG ve IgA bu iki bant arasında bir yükselti oluşturarak β-γ köprüleşmesi denilen görünümü meydana getirir.[17]

2.2.5.3.İdrar bulguları

İdrarda ürobilinojen artar. Sarılığı olan hastalarda idrarda bilirubin de bulunabilir. Assit varlığında idrarda sodyum atılımı bozulur ve ciddi vakalarda 4mmol/L'den daha azdır.[89,158]

2.2.5.4. Siroz tanısında kullanılan görüntüleme yöntemleri

Tanıda kullanılacak görüntüleme yöntemlerinin başında ultrasonografi (USG) gelir. USG'de karaciğer sınırları düzensiz, kenarları küntleşmiş ve ekosu düzensiz olarak artmıştır. Kaudat lob sağ loba göre göreceli olarak büyümüştür. Yer yer rejenerasyon nodülleri görülebilir.[158,178] Bilgisayarlı tomografi (BT) ve angiografinin tanıda ilave bir yararı yoktur. Özefagus varislerinin ve konjestif gastropatinin saptanmasında endoskopi önemlidir.[178] Karaciğer nodülleri laparoskopi ile görülebilir ve doğrudan karaciğer biyopsisi alınabilir. Radyoizotop görüntülemede azalmış tutulum ve düzensizlik görülür ancak nodüller ayıredilemez.[158] Sirozun kesin tanısı için biyopsi zorunludur. Biyopsi materyelinin incelenmesinde tanı; fibrozis ve rejenerasyon nodüllerinin görülmesi ile konulur.[89,178] Tanıda en çok yardımcı olan biyopsi bulguları; Portal yolların kaybı, anormal damarsal düzenlenme, hepatik arteriyollerin portal ven ile olan ilişkisinin kesilmesi, fibröz septa ile nodüllerin varlığı, çeşitli alanlarda karaciğer hücre boyutlarında ve görünümünde farklılıklar ve kalınlaşmış karaciğer hücre tabakalarıdır.[152]

2.2.6. Hastalığın seyri

Hastalığın seyri; etyolojiye, evresine ve yapılan tedaviye göre farklılıklar gösterir. Komplikasyonlar hastalığın gidişini kötüleştirir. Hastalığın seyrini belirlemede Child-Pugh evrelendirmesi kullanılır. Child A'dan C'ye ilerledikçe hastalığın seyri kötüleşir. Child-Pugh evrelendirmesi tablo 4'de gösterilmiştir.[84,158,178]

Tablo 4. Child- Pugh evrelendirmesi[84,158,178]

Evrelendirme kriterleri	**1**	**2**	**3**
Ensefalopati	Yok	Orta	İleri
Assit	Yok	Az	Çok
Bilirubin(mg/dl)	1-2	2-3	>3
Albumin(g/dl)	>3.5	2.8-3.5	<2.8
Protrombin zamanı(sn/uzama)	1-4	4-6	>6

2.2.7. Sirozun komplikasyonları

Sirozun komplikasyonları şu şekilde özetlenebilir.

2.2.7.1. Portal hipertansiyon

Portal dolaşım; gastrointestinal sistem, dalak, pankreas ve safra kesesinin venöz akışını kapsar. Portal ven; splenik ven ile süperior mezenterik venin birleşmesiyle oluşur.[8] Sirozda karaciğer yapısının bozulmasıyla portal kan akımına karşı bir direnç oluşur. Portal hipertansiyonda portal ve sistemik dolaşım arasında venöz kollateraller oluşur. Bunların en önemli oluşma yeri; mide fundusu ve özefagus submukozasıdır.[137,177] Sirozlu hastalarda ölümün başlıca nedeni kanayan varislerdir. Portal hipertansiyona yol açan tıkanmanın nedenleri; presinuzoidal, sinuzoidal ve postsinuzidal olarak sınıflandırılabilir. Presinuzoidal portal

hipertansiyona en sık olarak portal ven trombozu veya şistozomiyazis yol açmaktadır. Sinuzoidal hipertansiyona daha çok siroz neden olmaktadır. Postsinuzoidal hipertansiyon ise en yaygın olarak hepatik ven trombozu (Budd-Chiari sendromu), kemik iliği transplantasyonundan sonra görülen veno-okluziv hastalık ve konstriktif perikarditten kaynaklanmaktadır.[8]

Portal hipertansiyonun komplikasyonları arasında; kanamalı özefagus varisleri, konjestif splenomegali, hipersplenizm, assit ve hepatik ensefalopati sayılabilir. Bu durum karaciğerin pek çok metabolik işlevini tehlikeye atmaktadır. Portal şant hepatositlerin perfüzyonunu azaltır, senteze yönelik işlevler kaybolur. Hipoalbuminemiye bağlı olarak assite olan yatkınlık artar. Hipotrombinemi nedeniyle kanama eğilimi ve venöz tromboza yatkınlık sağlayacak şekilde antitrombin 3 gibi trombolitik faktörlerde kayıp olur.[8]

2.2.7.2. Spontan bakteriyel peritonit

Sirozlu hastalarda assitin enfeksiyonu koliform bakterilerle olur. Mortalitesi yüksek ve yoğun antibiyotik tedavisi gerektiren bir durumdur.[137,158,177]

2.2.7.3. Hepatik (Portosistemik) ensefalopati

Hepatik ensefalopati; karaciğer yetmezliğinin santral sinir sistemi üzerindeki zararlı etkilerini tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Nöropsikiyatrik disfonksiyon ile karakterizedir. Viral veya ilaçla indüklenen hepatitli bireylerde akut bir sendrom olarak veya siroz ve karaciğer yetmezliği ile ilişkili kronik bir sendrom olarak oluşabilir. Bütün kronik hepatik ensefalopatilerin ortak özelliği portosistemik şantta ve hepatosit işlevinde olan azalmadır. Nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte; bağırsaklarda yıkıma uğrayan proteinlerden açığa çıkan toksik metabolitlerin karaciğerde detoksifiye edilemeden beyine ulaşması sonucu ortaya çıkan klinik

tablodur. Genellikle aşırı uyku hali şeklinde başlar ve bireyin gün boyu uyuma eğiliminde olup gece uyanık kalması şeklindeki uyku bozukluğu ile devam eder. Kişilik değişiklikleri, irritabilite ve sosyal davranış bozuklukları görülebilir. Genellikle belirgin konfüzyona ilerler. Bunu spontan hareket azalması, apati ve derece derece ilerleyen koma izler. Nörolojik anormallikler; bozuk konuşma, asterixis olarak adlandırılan karakteristik tremor, artmış kas tonusu ve anormal reflekslerdir. Kronik ensefalopatinin aksine akut ensefalopati saatler içinde gelişir ve ölümle sonuçlanabilecek serebral ödemle karakterizedir.[8]

2.2.7.4. Pankreatit

Özellikle alkolik karaciğer hastalığı; kronik tekrarlayan pankreatitler ve pankreatik kalsifikasyonlarla ilişkilidir.[177]

2.2.7.5. Assit

Assit seröz sıvının abdominal boşluğa sızarak orada birikmesidir. En önemli nedeni sirozdur. Sirozlu hastalarda görülen en yaygın semptomdur. Sirozda assit oluşmasında etkili faktörlerin; portal hipertansiyon sonucu ozmotik basınçtaki artış ve karaciğer içindeki venöz dolaşımın tıkanması olduğu düşünülmektedir. Ayrıca karaciğer yetmezliği sonucunda albumin sentezinin azalmasının neden olduğu onkotik basınçtaki azalma da etkilidir. Assitin birçok nedeni vardır ve portal hipertansiyon sonucu oluşan sekonder assitin diğer nedenlerden kaynaklanan assitten ayrılması gerekmektedir. Bu ayırım assit sıvısının analizi ile yapılmaktadır. Serım albumini ile assit sıvısı albumini arasındaki farkın 1.1 g/dl'den büyük olması; portal hipertansiyondan kaynaklanan assit için tanı kriteridir.[89,8]

2.2.7.6.Hepatorenal sendrom

Sirozun bütün türlerinde böbrek içi kan dolaşımında olan değişiklikler hepatorenal sendrom için yatkınlık sağlar. Karaciğer fonksiyonları düzeldiğinde geri dönebilir.[158,177]

2.2.7.7.Karaciğer yetmezliği

Sirozda oluşan hepatosellüler işlev bozukluğu; karaciğer protein yapımının bozulması (hipoalbuminemi, pıhtılaşma faktörlerinin yapımında azalma) ve karaciğerin toksik maddeleri etkisiz hale getirmedeki yetersizliği şeklinde görülür. Bunlara bağlı olarak sirozun klinik belirtileri farklıdır. Kötü beslenme ile kas kaybı oluşabilir. Safra taşları yaygındır. Alkolik sirozlu bireylerde veya sirozun bir nedeni olarak kronik otoimmün hepatiti bulunan kadınlarda spider telenjiektaziler yaygındır. Deri pigmentasyonunda artış ve çomak parmak görülebilir. Alkolik siroz olgularında genital organlarda atrofi, jinekomasti ile dupuytren kontraktürleri ve parotis bezi büyümesi görülür. Genital organlarda atrofi ve jinekomastinin nedeni; muhtemelen östrojenlerin özellikle östradiolün konjugasyon ve atılımının azalmasıdır. Trombositopeni ve hipoprotrombinemiye bağlı olarak kanamaya eğilim belirgindir.[33,177,8]

2.2.8. Tedavi

Sirozda tedavi daha çok komplikasyonlara yöneliktir. Ensefalopati yoksa diyetle 1g/kg protein ve yeterli kalori alınması önerilir. Kolşisin, penisilamin gibi antifibrotik ilaçlar denenmişse de yararlı etkileri bulunamamıştır. Siroz tedavisinde en etkin yol karaciğer transplantasyonudur.[178,8] Tablo 5’ de siroz etkenleri ve olası tedavi seçenekleri gösterilmektedir.[8]

Tablo 5. Sirozun nedenleri ve olası tedavi seçenekleri[8]

Neden	**Tedavi**
Viral Hepatit B ve C	α -interfeon verilmesi
Toksik Alkol	Alkolün bırakılması, karaciğer transplantasyonu
Metotreksat	İlacın bırakılması
Metabolik Hemakromatoz Wilson hastalığı α-1 antitripsin eksikliği	Flebotomi Penisilamin Gen tedavisi?
Biliyer Primer biliyer siroz Primer sklerozan kolanjit	Ursodeoksikolik asit Karaciğer transplantasyonu
Otoimmün hepatit	Kortikosteroidler, azotiopirin
İdiyopatik	Karaciğer transplantasyonu

2.3. Karaciğerde biyotransformasyon

Besinle alınan doğal bileşikler dışında kalan ve çeşitli yollardan insan vücuduna giren maddelere ksenobiyotikler denir. İlaçlar, besin katkı maddeleri, havayı ve suyu kirleten atıklar, tarım ve endüstri kaynaklı kimyasal maddeler v.s. ksenobiyotikler arasında yer almaktadır. Çeşitli yollarla vücuda alınan ksenobiyotikler; değişmeden atılabildikleri gibi, spontan olarak değişime uğrayabilir ya da enzimler aracılığıyla metabolize edilebilirler. Ksenobiyotiklerin çeşitli enzimlerin etkisiyle vücutta uğradığı kimyasal değişikliklere biyotransformasyon denir. Biyotransformasyon sırasında bazı ksenobiyotikler inaktivasyona uğrarken (biyoinaktivasyon), bazıları da biyolojik olarak daha etkin veya toksik metabolitlere dönüşür (biyoaktivasyon). Biyotransformasyonda etkili organ karaciğerdir. Karaciğerde biyotransformasyon başlıca mikrozomal enzimlerle gerçekleştirilir.

Ayrıca hepatositlerde biyotransformasyon ile ilgili mikrozomal olmayan enzimler de vardır.[63]

İlaçlar genellikle lipofiliktir. Dolayısıyla idrar veya safra ile atılamazlar. Daha hidrofilik ve suda atılabilir olmaları; karaciğerde bulunan enzim bağımlı yollarla olmaktadır. Enzimatik biyotransformasyonda rol oynayan kimyasal reaksiyonlar faz 1 ve faz 2 reaksiyonları olmak üzere 2 grupta toplanabilir.[63] Tablo 6'da bu reaksiyonlar gösterilmektedir.

Tablo 6. Faz 1 ve faz 2 reaksiyonlar[63]

Faz 1 reaksiyonlar	**Faz 2 reaksiyonlar**
1-Oksidasyon (sitokrom P_{450})	**1-Konjugasyon**
a)Aromatik halka ve yan zincir oksidasyonu	a)Glukuronik asit konjugasyonu
b)Dealkilasyon	b)Sülfat konjugasyonu
c)Desülfürasyon	c)Asetilasyon
d)Sülfoksit oluşumu	d)Metilasyon
e)N oksidasyon	e)Aminoasit konjugasyonu
f)Epoksidasyon	f)Glutatyon konjugasyonu
g)Dehalojenizasyon	
2-İndirgenme	
a)Aldehitlerin alkollere dönüşümü	
b)Azo(N=N) grubunun aminlere dönüşümü	
c)Nitro grubunun hidroksilamin veya amin grubuna dönüşümü	
3-Kopma	
a)Hidroliz	
b)Dekarboksillenme	
c)Glikozidlerin hidrolizi	
d)O-dealkilasyon ve N-dealkilasyon	

Faz 1 reaksiyonlar; ksenobiyotiğin hem kimyasal yapısında hem de biyolojik etkisinde değişikliğe yol açar. Faz 2 reaksiyonlar ise faz 1 reaksiyonu sonucu oluşan metabolitlerle gerçekleşir ve onları daha polar hale getirir. Faz 2 reaksiyonlar sırasında metabolitlere glukuronik asit, sülfat, asetat, glisin, glutamin ve glutatyon gibi hidrofilik moleküllerden biri bağlanır veya yapısına metil grubu eklenir. Ksenobiyotiklerin çoğu; hem faz 1 hem de faz 2 reaksiyonlara maruz kalırken bazı ilaçlar ve ksenobiyotikler sadece faz 1 reaksiyonları takiben vücuttan uzaklaştırılır.[63]

2.3.1. Faz 1 reaksiyonlar

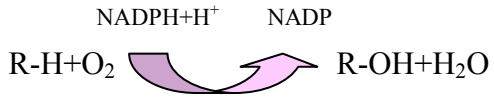
Faz 1 reaksiyonların çoğunu oksidasyon reaksiyonları (sıklıkla hidroksilasyon) oluşturur. Ayrıca deaminasyon, epoksidasyon, peroksidasyon ve indirgenme reaksiyonları da kullanılmaktadır. Oksidasyon (yükseltgenme) reaksiyonlarının büyük bir kısmı karaciğer parankim hücrelerinin mikrozomal enzimleri tarafından gerçekleştirilir.[63]

2.3.1.1. Oksidasyon reaksiyonları ve sitokrom P_{450} ailesi

Karaciğerde oksidasyonla görevli mikrozomal enzimler kısaca sitokrom P_{450} ailesi de denilen karma fonksiyonlu monooksijenazlardır. Sitokrom P_{450} ailesi tüm canlılarda bulunur ve yaklaşık 150 izoformdan oluşur. Birçok organda yaygın olmakla beraber, en bol karaciğerde bulunur. Hücrenin endoplazmik retikulum, mitokondri ve nukleus membranlarda yerleşmiştir. Sitokrom P_{450} enzimi, olgun eritrositlerde ve iskelet kasında bulunmaz.[63]

Sitokrom P_{450} ailesine ait enzimlerin en önemli fonksiyonları ilaçların biyotransformasyonlarına ve ekzojen kimyasalların metabolizmasına katılmaktır. Bu fonksiyon; hücre hasarı, ölümü veya mutasyon gibi istenmeyen etkilere de yol açabilir. Sitokrom P_{450} enzimlerinin başlıca substratları; kolesterol ve diğer steroid yapılı bileşikler, safra asitleri, lipidler, eikozanoidler, ilaçlar ve ksenobiyotiklerdir.[63]

Sitokrom P_{450} ailesindeki enzimlerin önemli bir özelliği uyarılabilir olmalarıdır. Sitokrom P_{450} izoformlarının uyarılması; ilaçların inaktivasyon ve atılım hızında artışa veya etkinliklerinde değişikliklere yol açar. Bu etkinin sitokrom P_{450} mRNA molekülünün transkripsiyonundaki bir artış veya katabolizmasındaki azalma ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Sitokrom P_{450} enzimi'nin katalizlediği genel reaksiyon aşağıdaki gibidir.[63]



Moleküler oksijenin atomlarından birisi substrata aktarılırken; diğeri suya indirgenir. Bu nedenle sitokrom P_{450} enzimlerine monooksijenazlar da denilmektedir.

Memelilerde sitokrom P_{450} enzimi, endoplazmik retikulum veya iç mitokondri membranında terminal elektron alıcısı olarak görev yapar. Sitokrom P_{450} proteinlerinde oksijenin bağlandığı prostetik grup bir demir atomu içeren protoporfirin 9'dur (=hem). Hidroksilasyonun (monooksijenasyon) gerçekleşebilmesi için demir ferri (Fe^{+3}) durumdan ferro duruma (Fe^{+2}) indirgenmelidir. Monooksijenasyon için toplam iki elektron gereklidir, bu elektronlar sitokrom P_{450} molekülüne ancak birer birer aktarılabilir. Birinci elektron oksijenin sitokrom P_{450} 'ye bağlanması için; ikinci elektron ise substrat molekülünün hidroksilasyonu için gerekli olan aktif oksijeni oluşturmakta kullanılır.[63]

Sitokrom P_{450} enzimi'ne substrat bağlandığında, hem demirini çevreleyen yapılarda bir değişiklik meydana gelir ve substratın bağlı olmadığı duruma göre daha yüksek bir indirgenme potansiyeli oluşur. Bu olay, NADPH-flavoprotein redüktaz aracılığıyla NADPH'dan sağlanan elektronlarla sitokrom P_{450} enzimi 'nin indirgenme hızını arttırır.[63]

2.3.1.2. İndirgenme reaksiyonları

Bu reaksiyonlar ilaç ve ksenobiyotik metabolizması sırasında oksidasyon reaksiyonlarına göre daha az gerçekleşmektedir. Bu reaksiyonlarda da NADPH ile birlikte $FADH_2$ ve diğer flavinler görev alır.[63]

2.3.1.3. Kopma reaksiyonları

Bu tip biyotransformasyonlar, ksenobiyotik molekülünden bir grubun koparılmasını veya ilaç molekülünün iki parçaya bölünmesini sağlayan reaksiyonları içerir.[63]

2.3.2. Faz 2 reaksiyonlar

Faz 1 reaksiyonlar ksenobiyotikleri polar metabolitlere dönüştürmekte, faz 2 reaksiyonlar ise bu metabolitlerin glukuronik asit, sülfat veya glutatyon gibi çeşitli bileşiklerle konjuge edilerek daha polar ve suda çözünür hale gelmelerini sağlamaktadır. Faz 2 reaksiyonlarını katalizleyen enzimler; UDP-glukuronil transferaz hariç sitozolde bulunur. Faz 2 reaksiyonlar faz 1 reaksiyonlarına kıyasla daha hızlı gerçekleşir.[63]

2.4. Karbon tetraklorür (CCl_4)'ün karaciğere etkisi

Anatomik lokalizasyonu, fizyolojik ve biyokimyasal rolü nedeniyle zararlı madde ve ilaçlara sıkça maruz kalan karaciğerde; hasar dahil çeşitli patolojik tablolara yol açan 600`den fazla maddeden biri de CCl_4' dür.[148,196] Bu hasarın değişik şekillerinin, oksidatif stres ve bunu takiben ortaya çıkan serbest radikallerle oluştuğu bilinmektedir. Toksik oksi ve hidroksi radikallerinin lipid peroksidasyonu ve başka yollarla hepatosit membranı hasarlayabilecekleri invivo / invitro ortamlarda deneysel olarak gösterilmiştir.[157,51]

CCl_4, kuru temizleme amaçlı, çözücü ve eskiden dondurucu olarak kullanılan bir hidrokarbon bileşiğidir.[48,129] Karbondisülfürün klorlandırılmasıyla veya aynı bileşiğin kükürt monoklorür ile tepkimeye sokulmasıyla elde edilen CCl_4; yüksek dozlarda kullanıldığında karaciğerde birikerek harabiyete neden olur, hatta siroz oluşturabilir. Vücuttaki diğer organlarda da dejenerasyonlar meydana getirir.

CCl_4'ün düşük dozlarda karaciğer hücrelerinde yağ dejenerasyonuna; yüksek dozlarda ise karaciğer hücrelerinin nekrozuna neden olduğu bildirilmektedir.[187,151]

CCl_4 vücuda solunum, sindirim ve deri yoluyla alınabilir.[176] İnsanlarda CCl_4 'ün toksik dozu solunum yolu ile alındığında 65ppm; ağızdan alındığında ise 4 ml'dir. Emildikten sonra bütün organ ve dokulara dağılan CCl_4 en çok yağ dokusunda birikir. 2-6 gün içinde yavaşça dokulardan ayrılarak başlıca akciğerler ve az miktarda da böbrekler yoluyla atılır.[95] Zehirlenme belirtileri deri, solunum veya ağız yoluyla emilimini takiben hemen ortaya çıkar. CCl_4 zehirlenmesi merkezi sinir sisteminin baskılanmasına yol açar. Buna bağlı olarak görülen başlıca belirtiler; baş ağrısı, baş dönmesi, halsizlik, ataksi, görme bulanıklığı, uyuma hali ve bilinç kaybıdır. İlk günden itibaren bulantı, kusma ve karın ağrısı görülür. CCl_4'ün emilimden birkaç gün sonra karaciğer yağlanması ve hasarı ile ilgili belirtiler ortaya çıkar. Karaciğer hücrelerinin nekrozu sonucu aspartat aminotransferaz (AST) ve aldolaz enzim düzeyleri artar. Protrombin zamanı uzar.[110,187] Uzun süreli düşük miktarda (45-100 ppm) CCl_4 solunması huzursuzluk, aşırı hareketlilik, bağırsaklarda düzensiz kasılmalara neden olur. Maruz kalma birkaç haftayı geçtiğinde ciltte kuruma, kabarık kırmızı lekeler, tırnaklarda kırılma ve kuruma ortaya çıkar. Solunmadığı sürece semptomlar azalır ancak tekrarlandığında yeniden ortaya çıkar.[187]

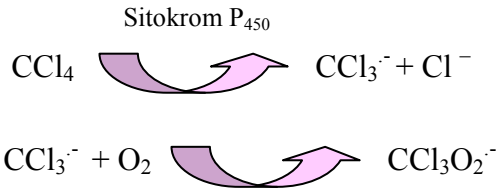
Prooksidan aktiviteye sahip olan CCl_4 seçici hepatotoksik etkisinden dolayı deney hayvanlarında siroz oluşturmak için kullanılmaktadır. CCl_4 mikronodüler siroz oluşturur. Değişik deney hayvanlarının CCl_4 'e vereceği yanıtı önceden kestirmek ve bu yolla karaciğer sirozu modeli oluşturmak zordur.[6,34] CCl_4 'ün tekrarlayan uygulamalarının serbest radikal üretimine neden olarak sirozu indüklediği kesin olarak bilinmektedir.[35,75,120,129,140]

CCl_4'ün karaciğerde mitokondriyal monooksijenaz (P_{450} 2E1) sistemince metabolize edilmesi sonucu ortaya çıkan serbest radikaller membran proteinleri ve lipidlerine iki yolla saldırabilirler.[146,165,120]

1-Direkt etki (kovalent bağlanma)

2-İndirekt etki

1-Metabolizma esnasında öncelikle stabil olmayan başlangıç metaboliti triklorometil ($CCl_3^{\cdot}$) serbest radikali oluştuktan sonra lipidler ve proteinler ile kovalent bağlar oluşturarak hızla triklormetil peroksite ($CCl_3O_2^{\cdot}$) veya hidrojen atomlarını kaybetmiş olan kloroform formuna dönüşür. Daha sonra sekonder olarak oluşan konjuge dien, lipid hidroperoksit ve malondialdehid gibi yapılar ile kısa zincirli karbonhidratlar oluşur.[146,165] Toksik etki sonucu oluşan serbest oksijen radikalleri hücre membranlarındaki fosfolipidlerde bulunan doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonuna neden olarak karaciğer hücre nekrozuna yol açarlar.[6,35,139]

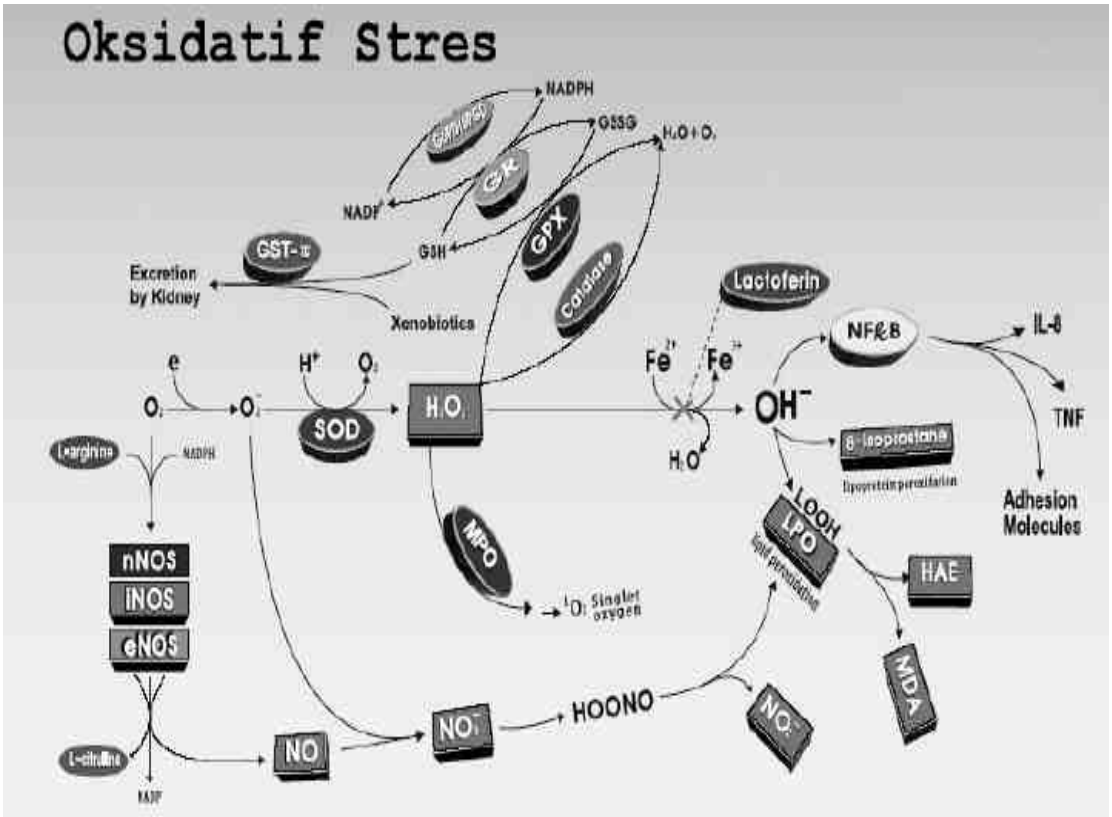


2- $CCl_3^{\cdot}$ radikalinin oksijenle reaksiyonu sonucu meydana gelen $CCl_3O_2^{\cdot}$ radikali de kuvvetli bir lipid peroksidasyonu başlatıcısıdır. Bu olayları takiben serbest radikal üretimi karaciğerde antioksidan savunmaları aşar; bu da hücre membranlarının oksidatif yıkımı ve ciddi doku hasarı ile sonuçlanır.[4,140] Karbon tetraklorür; karaciğerde hidropik dejenerasyon, yağlanma ile hepatosellüler zon 3 nekrozu yapar.[54,154]

CCl_4`e bağlı karaciğer hasarında meydana gelen lipid peroksidasyonu oldukça önemlidir.[120,132] Çünkü lipid peroksidasyonuna bağlı hasar sonunda karaciğerde fibrozis ve siroz oluşabilir. Karaciğer fibrozisi; ekstrasellüler matriks komponentlerinin artması ile karakterizedir. Ekstrasellüler matriksin yapımı ve yıkımı arasındaki denge; oluşan toksik oksijen radikallerine bağlı olarak, potent profibrojenik mediatörlerin de aktive olması ile sürekli matriks yapımı yönünde bozulmaktadır.[102] Yapılmış olan birçok çalışmada karaciğer hastalıklarında oksidatif stres ve buna bağlı olarak ortaya çıkan karaciğer hasarı ile fibrozis arasında ilişki olduğu gösterilmiştir.[161,162]

2.5. Serbest radikaller ve oksidatif stres

Oksidatif stres, pro-oksidan (reaktif oksijen türleri ve reaktif nitrojen türleri) maddeler ile antioksidan savunma sistemi arasındaki hassas dengenin, prooksidan ve oksidan maddelerin lehine kaymasıdır.[163] Miyokard enfarktüsü gibi kardiyolojik hastalıklar, nörolojik hastalıklar, astım, diabetes mellitus, romatoid artrit gibi romatolojik hastalıklar, kanser ve yaşlanma dahil birçok hastalığın oksidatif stresle ilişkisi gösterilmiştir.[40,41,72,127,191,192]



Şekil 2. Oksidatif Stres (www.woongbee.com)

Serbest radikaller; dış orbitallerinde bir veya birden fazla paylaşılmamış elektron içeren moleküllerdir.[184] Her türden kimyasal ve biyokimyasal tepkime atomların dış orbitallerindeki elektronlar sayesinde gerçekleşir. Dış orbitallerde paylaşılmamış elektron bulunması serbest radikallerin reaktivitesini olağanüstü arttırdığı için, serbest radikaller kimyasal aktifliği yüksek moleküllerdir.[112,189]

Serbest radikaller üç temel mekanizmayla oluşmaktadır.[189]

a) Kovalent bağların homolitik kırılması ile: Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalır ise; her iki atom üzerinde paylaşılmamış elektron kalır ve iki adet serbest radikal oluşur.

$$X : Y \longrightarrow X^{\cdot} + Y^{\cdot}$$

b) Normal bir molekülün elektron kaybetmesi veya heterolitik bölünmesi ile: Radikal özelliği bulunmayan bir molekülden elektron kaybı sırasında dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa radikal formu oluşur. Askorbik asit, glutatyon (GSH) ve tokoferoller gibi hücresel antioksidanlar radikal türlere tek elektron verip radikalleri indirgerken; kendilerinin radikal formu oluşur. Bu tipteki bölünmede kovalen bağı oluşturan her iki elektron; atomların birinde kalır ve serbest radikal değil iyonlar meydana gelir.

$$X : Y \longrightarrow X :^{-} + Y^{+}$$

c) Normal bir moleküle elektron transferi ile: Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşuyorsa bu tür indirgenme radikal oluşumuna sebep olabilir. Moleküler oksijenin tek elektron ile indirgenmesi radikal formu olan superoksidin oluşumuna neden olur.

$$X + e^{-} \longrightarrow X^{\cdot -}$$

Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu meydana gelir ve serbest radikallerin çoğu oksijenin indirgenmesi ile oluşur. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötral, organik veya inorganik moleküller şeklinde olabilirler. Cu^{+2}, Fe^{+3}, Mn^{+2}, Mo^{+3} gibi bazı geçiş metalleri de serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar.[67]

Serbest radikaller; normal metabolik olaylar sırasında meydana gelebildikleri gibi çok çeşitli dış etkenlere bağlı olarak da oluşabilirler.[46,92] Ekzojen kaynaklar; hava kirleticiler, doğal zararlı gazlar (ozon, oksijen ve hiperbarik oksijenin yüksek konsantrasyonları), iyonize ve non-iyonize radyasyon, ilaçlar, alkol, patojenik bakteri ve virüslerdir.[70] Endojen kaynaklar ise; mitokondriyal elektron transport sistemi,

endoplazmik retikulum, araşidonik asit metabolizması, redoks döngüsü, fagositik hücreler (monosit ve makrofajlar, nötrofil, eozinofil) ve endotelyal hücreler gibi hücrelerdeki oksidatif reaksiyonlar, ksantin oksidaz, NADPH oksidaz, indolamin dioksijenaz, triptofan dioksijenaz, galaktoz oksidaz, siklooksijenaz, lipooksijenaz, monoamin oksidaz gibi oksidan enzimler ve otooksidasyon reaksiyonlarıdır.[4] Organizmanın yapısında bulunan proteinler, serbest amino asitler, DNA, lipidler ve nükleik asitler gibi makro moleküller bu sistemler tarafından üretilen reaktif oksijen türlerinin etkilerine maruz kaldıklarında hasara uğramaktadırlar.[15] Oksidatif hasar oluşturan türler (reaktif oksijen türleri, nitrojen ve klorin türleri); metabolizma ürünleri, fizyolojik mediyatörler ve sinyal molekülleri olarak ortaya çıkabilirler. Serbest radikaller kalsiyum metabolizmasına etki ederek hücre içi kalsiyumun kontrolsüz yükselmesine, dolayısıyla hücrenin zarar görmesine ya da ölmesine neden olmaktadırlar.[113] Aerobik organizmalar için O_2 esansiyel bir moleküldür. Aynı zamanda O_2 oksidan bir ajandır. Normal koşullar altında moleküler oksijenin çoğu sitokrom sistemi gibi hücre içi sistemler içinde tetravalan redüksiyona uğramaktadır. Bununla birlikte %1-2 oranında bu yoldan sızan oksijenin biyolojik yapılarda univalan redüksiyonu sonucu serbest oksijen radikalleri olarak adlandırılan bir çok reakif ürün ortaya çıkar. Aerobik organizmalarda radikaller daha çok oksijen radikalleri şeklinde bulunmaktadır.[13]

Fizyolojik koşullarda O_2'nin %98'i mitokondride bulunan sitokrom oksidaz tarafından indirgenmekte ve 4 elektron alarak suya dönüşmektedir.

$$O_2 + 4\ H^+ + 4e^- \longrightarrow 2H_2O$$

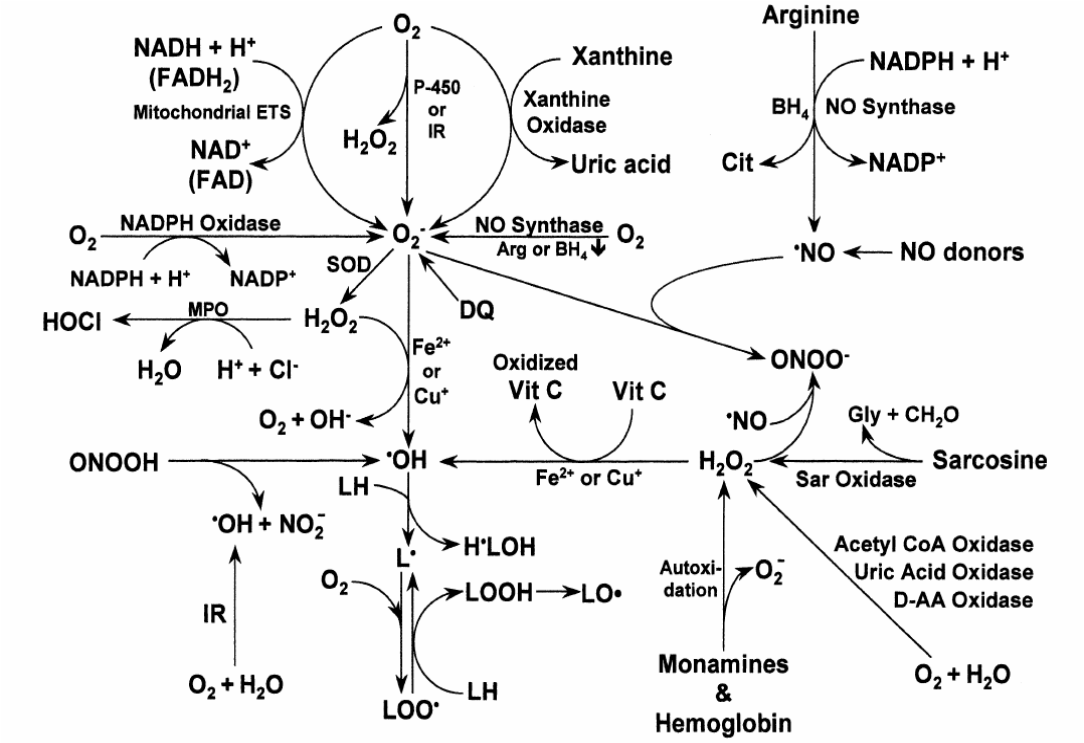
Serbest oksijen radikallerinin oluşum basamaklarında öncelikle tek elektron transferi ile moleküler oksijen süperoksit radikaline dönüşmektedir. Süperoksite iki elektronun eklenmesi ile hidrojen peroksit oluşmaktadır. Hidrojen peroksit; radikal olmamasına karşın elektron almasıyla son derece toksik olan hidroksil radikalini oluşturmaktadır. Hidroksil radikali de univalan redüksiyon ile suya dönüşmektedir. Vücutta üretilen radikaller her zaman tehlikeli ve zararlı maddeler olarak değerlendirilmemelidir. Zararlı etkilerinin yanında vücut için gerekli bir çok fonksiyonun gerçekleştirilmesinde önemli rol oynarlar.[166] Steroid yapıdaki çok

sayıda bileşiğin üretimi, eikozanoidler gibi biyolojik aktif moleküllerin sentezi, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, çok sayıda oksidaz ve hidroksilaz enzimlerinin etkileri ve sitotoksik etkilere sahip hücrelerin fonksiyonları için serbest radikal yapımı olmazsa olmaz bir koşuldur.[122] Serbest radikallerin en iyi bilinen zararlı etkileri; hücre membranı, yağ asitleri ve lipoproteinlere saldırarak lipid peroksidasyonu olarak bilinen bir zincir reaksiyonunu başlatmalarıdır. Lipid peroksidasyonunun ürünleri ileri ki aşamalarda membran proteinlerinde de hasara yol açarak yapısal ve fonksiyonel bozuklukların ortaya çıkmasına neden olurlar.[189]

2.5.1. Serbest Radikal Türevleri

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve reaktif nitrojen türlerinin (RNS) oluşumu için oksijen gereklidir. Serbest oksijen radikallerine süperoksit ($O_2^{\bullet}$), hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$), alkoksil radikali ($RO^{\bullet}$), peroksil radikali ($ROO^{\bullet}$) ve hidroperoksil radikali($OOH^{\bullet}$) örnek verilebilir.

Nitrik oksit ($NO^{\bullet}$) ve nitrojen dioksit ($NO_2^{\bullet}$) radikalleri de RNS' yi oluşturur. Oksijen ve nitrojen serbest radikalleri, hidrojen peroksit (H_2O_2), peroksinitrit ($ONOO^-$), hipoklorik asit (HOCl), hipobromöz asit (HOBr) gibi diğer reaktiflere dönüşebilir (Şekil 3).



Şekil 3. Memeli hücrelerinde reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türlerinin meydana gelişi (İR: İyonize radyasyon, Sit: Sitrüllin, D-AA: D-Amino asit, BH_4: Tetrahidrobiopterin, Gly: Glisin, $L^{\bullet}$: Lipit radikali, SOD: Süperoksit dismutaz, MPO: Myeloperoksidaz) [46]

2.5.1.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\bullet -}$)

Oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu kararsız bir yapı olan süperoksit radikal anyonu meydana gelir.

$$O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{\bullet -}$$

Mitokondriyal elektron transport zinciri sırasında O_2'nin otooksidasyonu sonucu oluşur. Süperoksit radikali O_2 varlığında; ksantin oksidaz'ın ksantini veya hipoksantini indirgemesiyle, NADPH'nin NADPH oksidaz ile oksidasyonuyla, mitokondriyal elektron transport sistemi ile $NADH_2$ ve $FADH_2$'nin NAD ve FAD'ye dönüşümü sırasında, O_2'nin iyonize radyasyonla, sit P_{450} ile ve arginin veya

tetrahidrobiopterin eksikliğinde nitrik oksit sentazla indirgenmesiyle oluşur.[55,53] Makrofajlar ve polimorf nüveli lökositler tarafından gerçekleştirilen fagositoz sırasında O_2 tüketimi artar ve bu durumda plazma membranında bulunan NADPH oksidaz tarafından $O_2^{\bullet-}$ oluşumu tetiklenir.

$$2\ O_2 + NADPH \longrightarrow NADP + 2\ O_2^{\bullet-} + H^+$$

$O_2^{\bullet-}$ 'nin kimyasal davranışı nerede çözündüğüne göre değişmektedir. Suda çok reaktif değildir. Bazen bir elektron alarak, okside edici ajan olarak davranabilir. Örneğin askorbik asidi okside etmektedir.[70]

$$\text{Askorbik Asit} + O_2^{\bullet-} \longrightarrow \text{Askorbik asit radikali} + H_2O_2$$

Organik solventlerde daha reaktif ve tehlikelidir. Biyolojik membranlarda oluştuğunda oldukça fazla hasar meydana getirmektedir.

$O_2^{\bullet-}$ çeşitli organik ya da inorganik bileşiklerle de reaksiyona girebilir. Nitrik oksit ile reaksiyona girebilir. Nitrik asit ile reaksiyona girip peroksinitriti oluşturması önemlidir. [134]

2.5.1.2. Hidroksil Radikali ($OH^{\bullet}$)

Yarılanma ömrü kısa ve güçlü bir serbest radikal olan hidroksil radikali; kuvvetli hasar oluşturur. Tüm biyolojik substratlarla reaksiyona girebilme özelliğine sahiptir. Oluşan hasar üç şekilde meyadana gelir.

1) Protein ve lipidler arası çapraz bağlar oluşturarak,

2) Proton çıkararak,

3) Elektron transferi yaparak.

Toksik $OH^{\bullet}$ oluşumunda demir, bakır gibi bazı metal iyonları da rol oynar. Asıl olarak Fe^{+2} molekülünün de katıldığı Fenton reaksiyonu ile oluşur.[3] Fe^{+3}'ün $O_2^{\bullet-}$

ile indirgenmesi sonucu oluşan Fe^{+2}, H_2O_2 ile reaksiyona girerek $OH^{\bullet}$ radikalini meydana getirir. Bu reaksiyon 'Fenton Reaksiyonu' olarak adlandırılır.

$$Fe^{+3} + O_2^{\bullet -} \longrightarrow Fe^{+2} + O_2$$

$$Fe^{+2} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{+3} + OH^{\bullet} + OH^-$$

Ayrıca demirin katalizlediği Haber-Weiss reaksiyonuyla da $OH^{\bullet}$ oluşur.[27]

$$O_2^{\bullet -} + H_2O_2 \xrightarrow{Fe^{+2}} O_2 + OH^- + OH^{\bullet}$$

İyonize radyasyon etkisi ile de $OH^{\bullet}$ oluşur.[46]

$$H_2O \longrightarrow H^+ + OH^{\bullet}$$

2.5.1.3. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Oksijen molekülünün iki elektron alarak indirgenmesi veya yapıya iki hidrojen atomunun eklenmesiyle oluşur.[26] Süperoksit radikalinin yapısına bir elektron katılmasıyla da meydana gelmektedir. Biyolojik sistemlerde daha sık olarak iki süperoksit molekülü, iki protonla birleşerek hidrojen peroksit ve oksijen oluşturur.

$$O_2 + 2e^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2$$

$$O_2^{\bullet -} + e^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2$$

$$O_2^{\bullet -} + O_2^{\bullet -} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

H_2O_2 bir serbest radikal olmamasına karşın yüksüz bir molekül olduğundan hücre içerisine kolaylıkla girebilir.

H_2O_2, O_2 ' den iki elektronun sit p450, yağ-açil KoA oksidaz, asetil KoA oksidaz, ürik asit oksidaz, α-hidroksiasit oksidaz veya D-amino asit oksidaz ile

redüksiyonu ile oluşabilir. Ayrıca monoaminler (dopamin, epinefrin, norepinefrin), hemoglobinin otooksidasyonu ve glisin sentezinde de H_2O_2 oluşur.[45]

Peroksizomlar fazla miktarda oksidaz içerdiklerinden hücresel H_2O_2 için potansiyel kaynaktır. H_2O_2 özellikle Fe ve Cu gibi geçiş metal iyonlarının varlığında kolaylıkla yıkılır. Bu yıkım sonucu en reaktif radikal olan $OH^{\bullet}$ oluşur.[46]

2.5.1.4. Hipoklorik Asit (HOCl)

Nötrofiller, sitoplazmada bulunan myeloperoksidaz (MPO) enziminin katalizlediği reaksiyonla güçlü oksidatif bir yapı olan hipokloridi oluştururlar.[74]

$$H_2O_2 + Cl^- \xrightarrow{MPO} HOCl + OH^-$$

2.5.1.5. Singlet oksijen ($^1O_2$)

Yapısında ortaklanmamış elektron bulundurmaması sebebiyle serbest oksijen radikali olmayıp reaktif oksijen türleri grubunda yer alan bir moleküldür. Singlet oksijen serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına neden olması açısından önem taşımaktadır. $^1O_2$, oksijen elektronlarının dışardan enerji alması sonucu kendi dönüş yönünün ters yönündeki farklı bir yörüngeye geçmesi ile oluşabileceği gibi, $O_2^{\bullet}$ radikalinin dismutasyonu ve MPO'nun katalizlediği H_2O_2'nin HOCl ile reaksiyonu sonucunda da oluşabilir.[62]

2.5.1.6. Perhidroksil radikali ($OOH^{\bullet}$)

$O_2^{\bullet}$ radikali asidik ortamda daha reaktif olup protonlanarak kendisinden daha kuvvetli bir oksidan olan $OOH^{\bullet}$ radikalini oluşturur.[26]

$$O_2^{\bullet} + H^+ \xrightarrow{pH\downarrow} OOH^{\bullet}$$

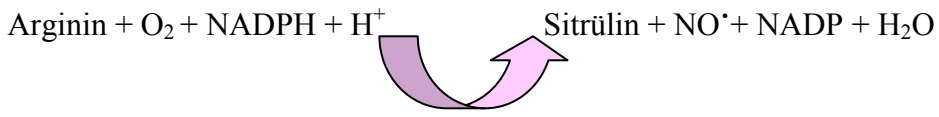
2.5.1.7. Peroksil radikali (ROO˙)

R˙ radikalleri hızlı bir şekilde oksijen ile reaksiyona girerek ROO˙yi oluştururlar.[26] ROO˙**,** lipid peroksidasyonunu başlatan radikal olup çok uzun ömürlüdür.

$$R^{\cdot} + O_2 \longrightarrow ROO^{\cdot}$$

2.5.1.8. Nitrik Oksit (NO˙)

Memeli hücrelerinde NO başlıca Nitrik Oksit Sentaz (NOS)'ın aktivitesi sonucu sentezlenir. NOS, oksijeni kullanarak L-arjinin amino asitinden; sitrülin ve NO'yu oluşturur. Bu olay, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), flavin mononükleotid (FMN), flavin adenin dinükleotid (FAD), tetrahidrobiopterin (BH_4) ve kofaktör olarak bir tiyol donörüne ihtiyaç duyar.[111]



Eşleşmemiş elektronu nedeniyle bir serbest radikal türü olarak bazı memeli hücre tiplerince üretilen NO; damar tonusunun kontrolünde, platelet agregasyonunda, lökosit adezyonunda, hücre aracılı immün sitotoksisitesinde, sinaptik geçirgenlikte sinyal molekülü olarak önem taşımaktadır.[111]

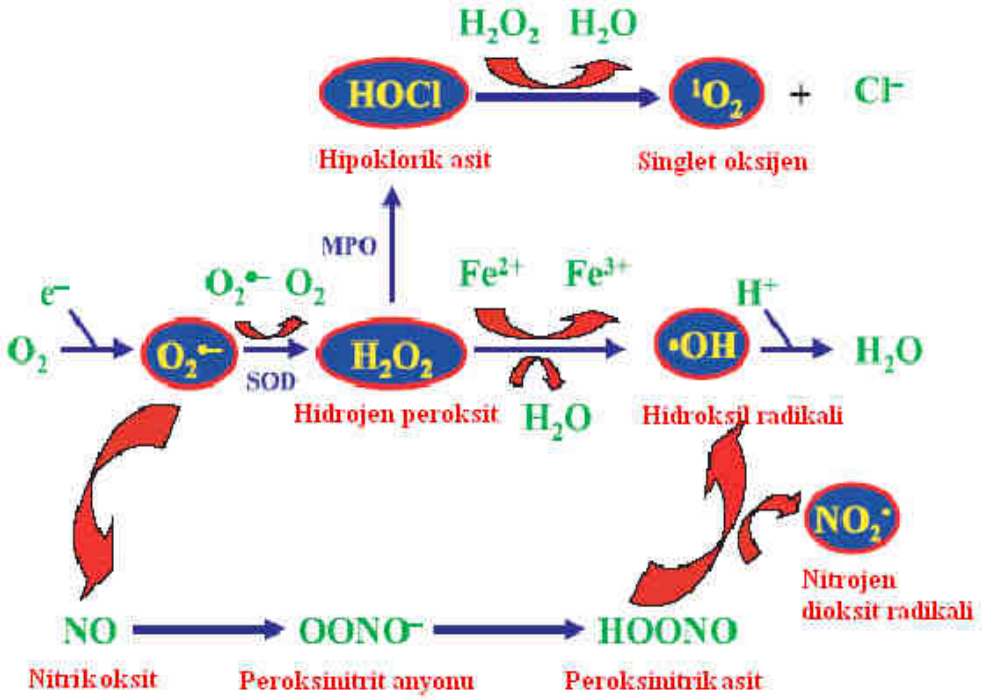
2.5.1.9.Peroksinitrit ($ONOO^-$)

Süperoksit radikali veya hidrojen peroksitin $NO^{\bullet}$ ile reaksiyona girmesi ile oluşur.[16]

$$O_2^{\bullet} + NO^{\bullet} \longrightarrow ONOO^-$$

$$H_2O_2 + NO^{\bullet} \longrightarrow ONOO^-$$

Oluşan peroksinitrit radikalinin oksidatif potansiyeli $O_2^{\bullet}$ ve H_2O_2'ye göre daha yüksektir.[46]



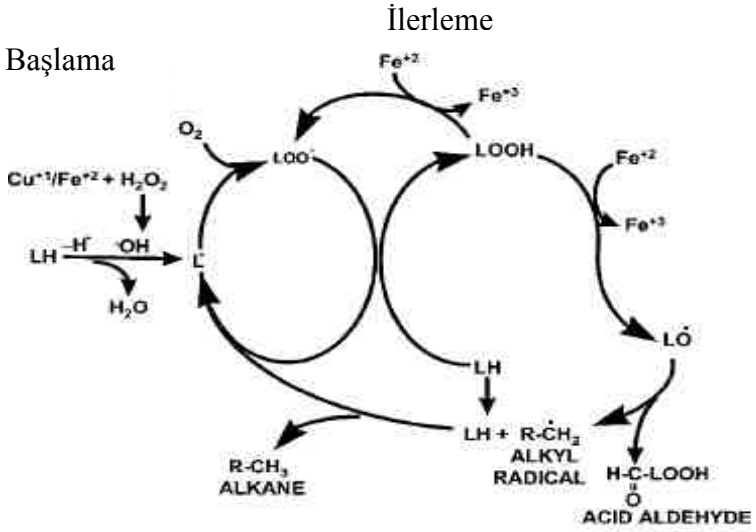
Şekil 4. ROS ve RNS'nin birbirleriyle etkileşimi [65]

2.5.2. Serbest Radikallerle Oluşan Lipid Peroksidasyonu

Organizmanın yaşam sürecinde karşılaştığı radikal türlerinin çeşitli olması nedeniyle, serbest radikallerin biyolojik etkilerini genelllemek zordur. Oluşan serbest radikaller, ortamdan uzaklaştırılamadığı takdirde pekçok yolla metabolik

bozukluklara, hücre hasarına ve hatta ölüme yol açarlar.[20] Serbest radikaller, kimyasal modifikasyonlarla protein, lipid, karbonhidrat ve DNA'da hasar oluştururlar.

Lipidler; reaktif oksijen türlerinin yıkıcı etkilerine en fazla maruz kalan biyolojik moleküllerdir. Hücre membranı serbest oksijen radikalleri ile hızla reaksiyona girebilen çoklu doymamış yağ asitlerinden oldukça zengindir. Bu yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle reaksiyona girip peroksidasyona neden olur (Şekil 5). Membran akışkanlığı, membran lipidlerinin yan zincirlerinde bulunan doymamış yağ asitleri ile sağlanır. Doymamış yağ asitlerinin hasarı, membran akışkanlığını azaltıcı etki gösterir.

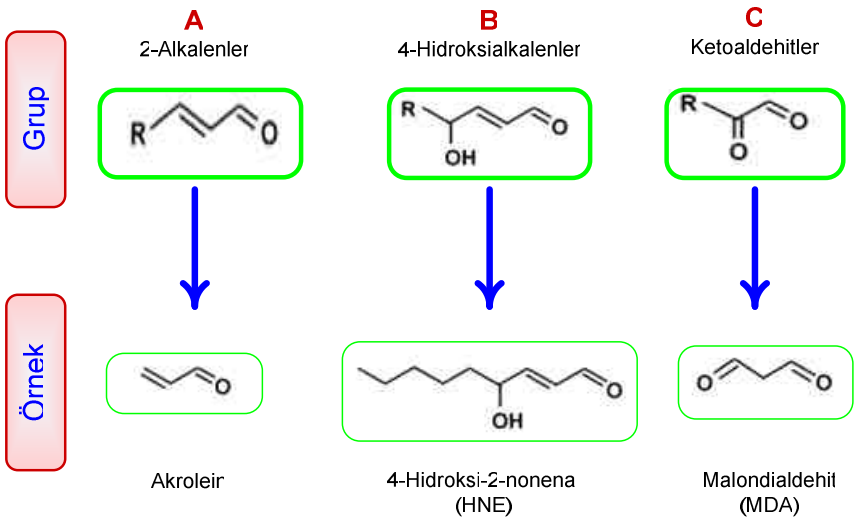


Şekil 5. Metallerin katalizlediği lipid peroksidasyonu [142]

Lipid peroksidasyonu, oksijen türevi serbest radikaller tarafından tetiklenen oksidatif stresin en önemli organik göstergelerinden birisidir. Üç karbonlu bir ketoaldehid olan Malondialdehid normal metabolik şartlarda, önce asetat veya malonata kadar okside olur, daha sonra krebs siklusu ile CO_2'e indirgenerek atılır. Fakat aşırı lipid peroksidasyonunda MDA konsantrasyonu artar ve dokulara hasar verir.[181]

Biyolojik sistemlerdeki oksidatif stresin ölçülmesinde günümüzde en yaygın metod MDA ölçümüdür. MDA, proteinlerin lizin rezidüleriyle ve fosfolipidlerin amin gruplarıyla reaksiyona girer.[180] MDA, kolaylıkla diffüze olabildiğinden, DNA bazlarıyla da reaksiyona girerek hasara neden olabilir.

Peroksidasyon sonucu oluşan reaktif aldehidler; serbest radikallere göre daha stabildirler. Hücre içinde veya hücreden dışarıya çıkarak daha uzak bölgelerdeki proteinlerin serbest amino grupları, fosfolipidler ve nükleik asitlerle reaksiyona girebilirler. Bunun sonucunda molekül içi ve moleküller arası 1-amino-3-imino propen (AIP) köprüleri kurabilir ve biyolojik moleküllerde yapısal modifikasyonlar oluşturabilirler (Şekil 6).



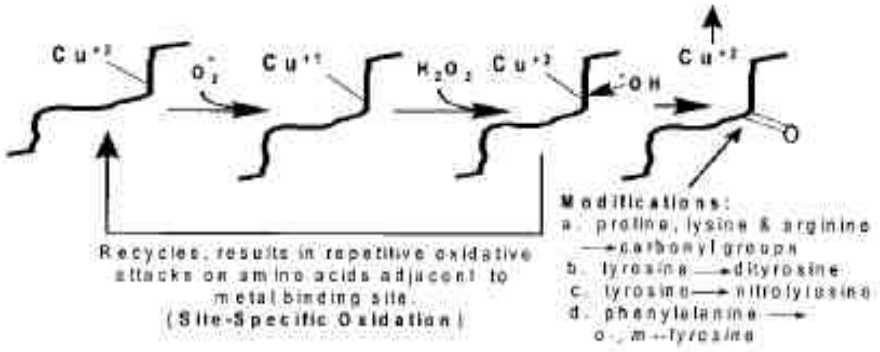
Şekil 6. Lipid peroksidasyonu ile oluşan aldehidler [180]

2.5.3. Serbest Radikallerle Oluşan Protein Oksidasyonu

Protein oksidasyonu; hem ROS ile direkt hem de oksidatif stresin sekonder ara ürünlerinin reaksiyonlarıyla indüklenen proteinlerin kovalent modifikasyonu olarak tanımlanmaktadır. Proteinlerde in vivo olarak meydana gelen oksidatif değişiklikler, proteinlerin rol oynadığı çeşitli hücresel fonksiyonları etkiler. Reseptörlerin, sinyal ileti mekanizmalarının, yapısal proteinlerin, transport

sistemlerinin ve enzimlerin rol oynadığı hücresel olaylar oksidatif protein hasarından etkilenirler.[147]

Protein oksidasyonu, bir çok mekanizmayla gerçekleşebildiği ve amino açil yan zincirlerinin hepsi oksidatif olarak modifiye olabildiği için çok farklı tipte oksidatif protein modifikasyonları vardır.[155] Oksidatif protein modifikasyonlarının biyokimyasal sonuçları; yan zincir gruplarının oksidasyonu, kırılmalar, çapraz bağlanmalar, yanlış katlanmalar, hidrofobik yapıda değişiklikler ve proteolitik enzimlerde aktivite kaybı olarak sıralanabilir[73] (Şekil 7).



Şekil 7. Metallerin katalizlediği bölge spesifik protein oksidasyonu.[142]

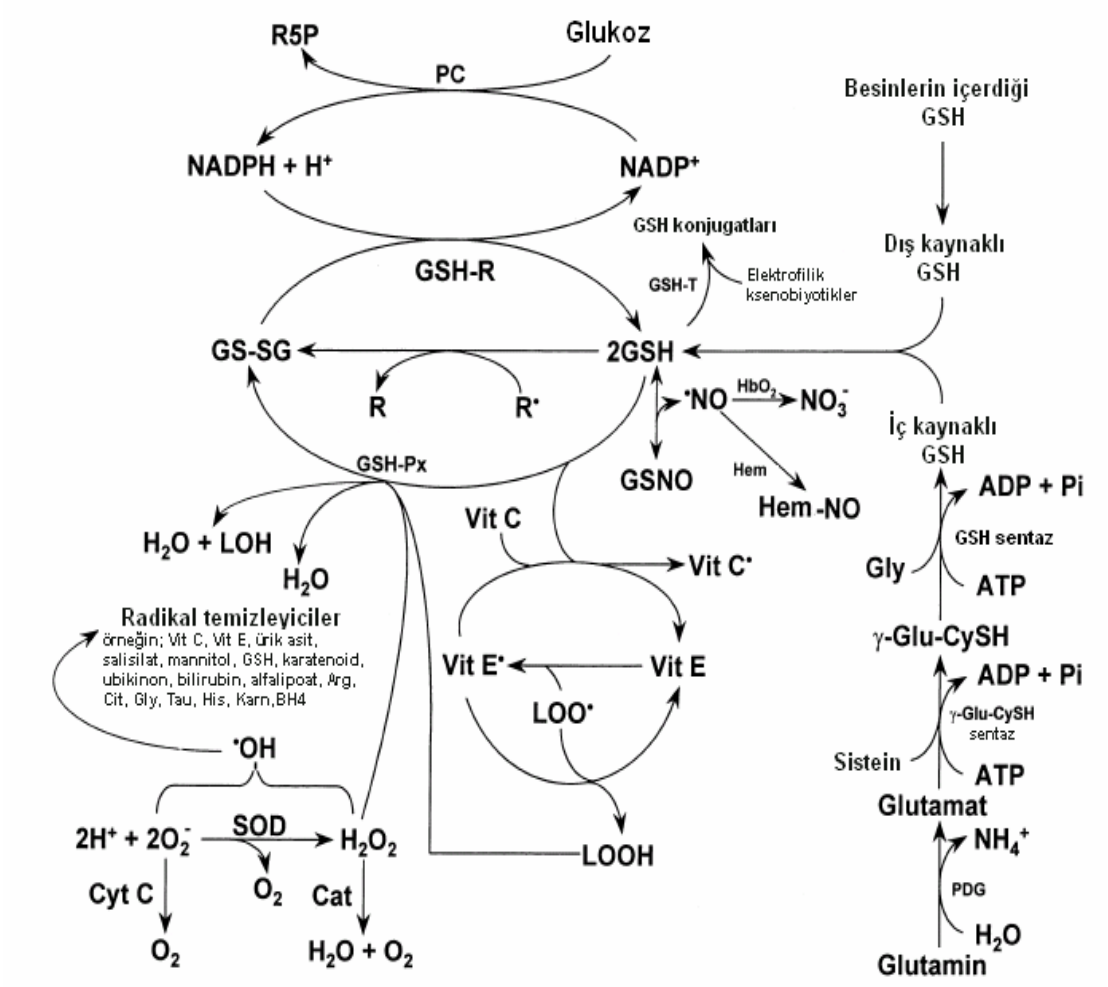
ROS'un proteinlerle etkileşimi sonucunda histidin, prolin, arjinin, ve lizin gibi çok sayıda aminoasit kalıntısında ve / veya peptid omurgasında meydana gelen hasar sonucunda protein karbonilleri (PCO) ürünleri meydana gelir. Protein oksidasyonunun en yaygın olarak ölçülen ürünü protein karbonilleridir. PCO düzeylerinin saptanması, oksidatif protein hasarını belirlemede duyarlı bir yöntem olmasına rağmen belirli bir aminoasit için spesifik değildir.[44]

2.6.Antioksidan savunma sistemleri

Vücutta reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı geciktirmek ya da önlemek için geliştirilen savunma sistemleri; antioksidanlar olarak bilinir. Antioksidanlar endojen (organizma tarafından sentezlenen) ve eksojen (dışarıdan besinlerle alınan) kaynaklı olmak üzere başlıca iki ana gruba ayrılabildiği

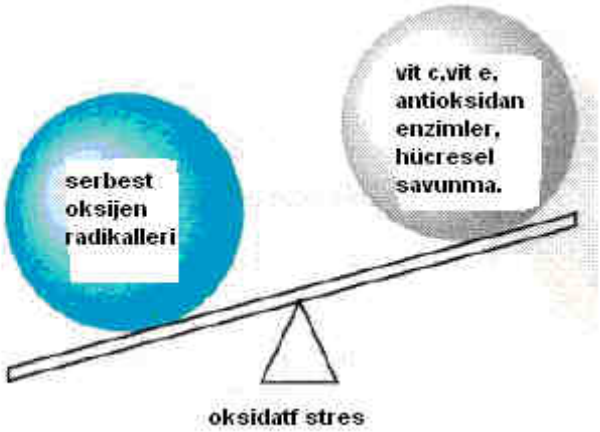
gibi; serbest radikalin meydana gelişini önleyenler ve mevcut olanları etkisiz hale getirenler şeklinde de sınıflandırılırlar.[66] Hücre dışında ve hücrede farklı organellerde yerleşerek savunma mekanizmasında rol oynayan antioksidanlar; enzimatik yapıda olabilecekleri gibi non-enzimatik yapıda da olabilirler.[88]

Hücre dışı savunma; albümin, bilirubin, seruloplazmin, ürik asit gibi molekülleri içermektedir. Asıl antioksidan savunmayı hücre içi serbest radikal toplayıcı enzimler sağlamaktadır. Bu enzimler süperoksit dismutaz, glutatyon-S-transferaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve katalazdır. Bu enzimlerin fonksiyonları için bakır, çinko ve selenyum gibi eser elementler gereklidir[68] (Şekil 8).



Şekil 8. Memeli Hücrelerinde Antioksidan Sistem.[46]

Organizmada; serbest oksijen radikalleriyle (oksidan) antioksidan savunma sistemleri arasındaki var olan dengenin, oksidanların lehine kayması değişik düzeylerde hücresel hasarlara neden olmaktadır (Şekil 9).[19]



Şekil 9. Oksidan-antioksidan dengesi.[19]

Antioksidanların; oksidatif hasardan koruma mekanizmaları şu şekilde özetlenebilir.[167]

Enzim aktivitesi üzerinden veya doğrudan kimyasal reaksiyonlar yoluyla,

Oksijenden türeyen moleküllerin oluşumunu en az düzeye indirerek,

Radikallerle doğrudan kimyasal yolla temasa geçerek,

Reaktif metabolitlerin temizlenmesini veya bu radikallerin daha az aktif ve toksik olmayan ürünlere dönüşümünü sağlayarak,

Zayıf reaktif türlerin daha zararlı türlere dönüşümü için gereksinim duyulan metal iyonlarını bağlayarak,

Hedef molekülde oluşan hasarı onarma yoluyla,

Hasar çok büyük olduğunda, hasara uğramış molekülü uzaklaştırarak.

Antioksidan ajanlar, oksidan moleküllere karşı etkilerini dört yolla göstermektedirler [20]

1) Süpürücü etki gösterenler: Oluşturdukları etki ile yeni radikal oluşumunu engelleyip; oluşmuş olan radikalleri daha az zararlı hale getirirler. Bu gruba örnek olarak süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz gibi enzimler; ferritin, serüloplazmin ve metallotionein gibi metal bağlayıcı proteinler verilebilir.

2) Giderici etki gösterenler: Oksidanlarla etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini inhibe eden bileşiklerdir. β-karoten, vitamin C ve vitamin E bu tür etkiye örnektir.

3) Zincir kırıcı etki gösterenler: Zincirleme olarak devam eden reaksiyonları belli yerlerinden kırarak, oksidan etkiyi durdururlar. Bunlara örnek olarak bazı vitaminler, mineraller, hemoglobin, ürik asit, bilirubin ve albümin verilebilir.

4) Onarıcı etki gösterenler: Bu gruba örnek olarak DNA tamir enzimleri ve metiyonin sülfoksit redüktaz verilebilir.

2.6.1.Antioksidanların sınıflandırılması

Tablo 7 ve 8'de enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlar toplu olarak gösterilmiştir.

Tablo 7. Enzimatik Antioksidanlar

Endojen Antioksidanlar
1-Enzimatik Antioksidanlar
Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz Sistemi
Süperoksit dismutaz(SOD)
Katalaz (KAT)
Glutatyon peroksidaz(GSH-Px)
Glutatyon redüktaz (GR)
Glutatyon S-transferaz (GST)
Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PDH)

Tablo 8. Nonenzimatik Antioksidanlar

a) Yağda çözünen radikal tutucuları: α-tokoferol (E vitamini), β-karoten, Bilirubin, Ubikinol.
b) Suda çözünen radikal tutucuları: Glutatyon, Askorbik asit (C vitamini) ürik asit.
c) Metal iyonlarını bağlayan proteinler: Ferritin, transferrin, haptoglobin, serüloplazmin, albumin.
d) NADPH oksidaz inhibitörleri: Adenozin, Ca^{+2} kanal blokörleri, lokal anestezikler
e) Ksantin oksidaz inhibitörleri : Allopürinol, oksipürinol, folik asit, tungsten
f) Fe redoks döngüsünün inhibitörleri : Desferoksamin, serüloplazmin
g) Sitokinler: TNF ve IL-1
h) Nötrofil adezyon inhibitörleri
ı) Barbituratlar
i) Stobadin

2.6.1.1. Enzimatik Yapıda Olan Antioksidanlar

Aerobik organizmalarda serbest oksijen radikallerinin yapmış olduğu hasarı önlemeye yardım eden enzimatik ve nonenzimatik savunma sistemleri vardır. Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (KAT), Glutatyon peroksidaz (GSH-Px), E vitamini, Glutatyon (GSH) ve C vitamini bu savunma sistemlerinin başlıcalarıdır.[57]

2.6.1.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1)

İki molekül süperoksit anyonunun iki molekül proton ile reaksiyonunu katalizleyerek; onları H_2O_2'e ve moleküler oksijene dismute eden bir metalloenzimdir.

$$O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \xrightarrow{\text{SOD}} H_2O_2 + O_2$$

İki reaktif oksijen türünü, radikal olmayan moleküllere dönüştürmesi nedeniyle antioksidan sistemin önemli öğelerinden birisidir. Oksijen kullanımı yüksek olan dokularda SOD aktivitesi fazladır ve doku PO_2 artışıyla artar . Buna karşılık hücre dışı sıvılarda SOD aktivitesi çok düşüktür. Katalaz ve Glutatyon Peroksidaz'dan farklı olarak serbest radikali substrat olarak kullanır. pH'nın sitozolik ve mitokondriyal SOD'ın aktiviteleri üzerine olan etkisi farklıdır. pH 7'de her ikisi de aktiftir. Fakat Cu-Zn SOD'ın aktivitesi pH 5.5-10 aralığında değişmezken; Mn SOD pH 7 nin üzerine çıktığında aktivitesini kaybeder.[71,114,109]

SOD gerçekte detoksifiye edici bir enzim değildir. Çünkü ürünü olan H_2O_2 toksik bir ajandır. Ancak bu reaksiyon reaktif oksijen radikallerinin detoksifikasyonuna giden yolun ilk basamağıdır. İkinci basamak katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri tarafından H_2O_2 'in suya dönüşmesini katalizler.[71]

Memelilerde üç çeşit SOD bulunmaktadır [101]

1) Sitozolik SOD (Cu-ZnSOD, SOD1): Genellikle sitozolde ve lizozomal fraksiyonlarda yer alır, fakat mitokondriyal boşlukta da bulunmaktadır. İki alt birimden oluşmaktadır. Kofaktörleri çinko ve bakırdır. Enzimin aktivitesinden bakır, stabilitesinden çinko sorumludur.

2) Mitokondrial SOD (Mn-SOD, SOD2): Mitokondride bulunur ve tetramerik yapıdadır. Kofaktörü mangandır.

3) Ekstrasellüler SOD (EC-SOD, SOD3): Tetramerik yapıdadır ve ekstrasellüler bölümlere salgılanır. Kofaktörleri çinko ve bakırdır. Ayrıca bazı bakterilerde Fe-SOD da saptanmıştır.

Poliakrilamid jel elektroforezi ile SOD tiplerini tanımlamak mümkündür.

SOD tayini için direkt ve indirekt ölçüm yöntemleri bulunmaktadır. Direk ölçüm yöntemleri; pulse radiolizis ve stopped flow olup mevcut tekniklerin en iyisi olarak kabul edilmektedir. Ancak bu metodlar için donanım her zaman bulunmamaktadır. İndirekt ölçüm yöntemlerinde kullanılan yaygın yaklaşım SOD varlığında süperoksit üreten bir sistem kullanılmasıdır (örneğin ksantin-ksantin oksidaz reaksiyonu). Bu tür metodolojilerde sitokrom c veya nitrotetrazolium (NBT) gibi optikçe hassas bir bileşiğin indirgenmesinin ölçümü söz konusudur. Diğer yöntemler ise sülfit veya epinefrin kullanan otooksidasyon tekniklerdir.[143]

2.6.1.1.2. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px; EC.1.11.1.9) ve Glutatyon Redüktaz (GR; EC.1.6.4.2)

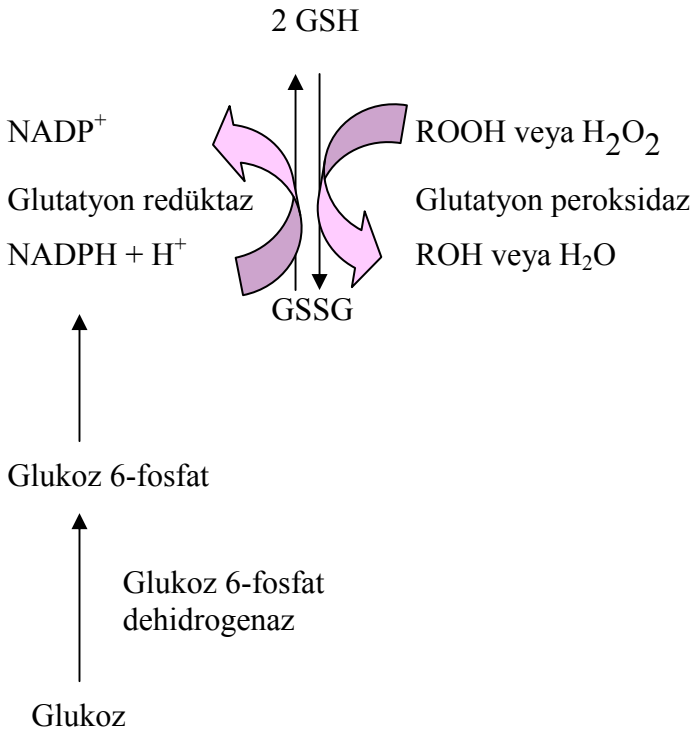
GSH-Px, hücrede H_2O_2' nin temizlenmesinden sorumlu iki enzimden birisidir. H_2O_2' in H_2O' ya redüksiyonunu katalizler, aynı zamanda organik hidroperoksitleride parçalar. Lipid peroksitlerini daha az toksik olan yağ asitlerine indirgerken, glutatyonu da kofaktör olarak kullanır. Bu nedenle aktif merkezinde

selenosistein bulunan GSH-Px aktivitesinin devamı için Glutatyon'un belli düzeyde olması gerekir.[13,47]

$$2GSH + H_2O_2 + NADP \xrightarrow{\text{GSH-Px}} GSSG + 2\,H_2O + NADPH$$

$$ROOH + 2GSH \xrightarrow{\text{GSH-Px}} ROH + GSSG + H_2O$$

Glutatyon disülfit (GSSG), NADPH'a bağımlı glutatyon redüktazın kalizlediği bir reaksiyonla, tekrar iki molekül GSH' ya dönüşür. NADPH, esas olarak pentoz fosfat yolundan sentezlenir. GSH-Px, bir çift H_2O_2 molekülüne etki eden katalazdan farklı olarak, tek molekül H_2O_2'nin ortadan kaldırılmasını sağlar.[4,52]



Şekil 10. Glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktazın katalizlediği reaksiyon

Genel olarak GSH-Px'ın H_2O_2'e karşı en belirgin savunma sistemi olduğu düşünülmektedir. Tetramerik yapıda olan enzim en çok karaciğer ve eritrositte aktif olarak bulunmaktadır. Kalp, akciğer ve beyinde orta, kasta ise düşük aktivitede bulunur. % 60-75'i stoplazmada, % 25-40'ı mitokondride yer alır.[116,47]

Selenyuma bağımlı ve bağımsız iki tipi mevcuttur. Selenyuma bağımlı olan GSH-Px (Se-GSH-Px) sitozol ve mitokondride bulunmaktadır. Hem H_2O_2 hem de lipid hidroperoksitleri metabolize eder. Selenyumdan bağımsız olan GSH-Px (non-Se GSH-Px) ise sadece lipid hidroperoksitleri metabolize eder. Bu fonksiyonu ile lipid peroksidasyonunun başlamasını ve ilerlemesini önlemektedir.[116]

Glutatyon Redüktaz; Hücresel GSH redox siklusundan sorumlu olup endojen peroksitlerin detoksifikasyonu için önemlidir.[38]

GSH-Px peroksitleri temizlemek için hidrojen donörü olarak GSH'a ihtiyaç duymaktadır. Okside formu olan GSSG, glutatyon redüktaz ile yeniden glutatyona dönüşmektedir. Gerekli olan NADPH pentoz fosfat yolundan sağlanmaktadır.[70]

2.6.1.1.3. Katalaz

Peoksizomlarda lokalize, dört tane hem grubu bulunan hemoproteindir. Karaciğer, böbrek ve eritrositlerde aktivitesi yüksektir. H_2O_2 'i oksijen ve suya parçalar.[59]

$$2\ H_2O_2 \xrightarrow{\text{Katalaz}} 2\ H_2O + O_2$$

Aynı zamanda fenol ve alkollerin de detoksifikasyonunu sağlayan katalaz; hidrojen peroksitin fenton reaksiyonları ile demir ve bakır iyonları tarafından reaktif hidroksil radikaline dönüşümünü engeller.[123]

2.6.1.1.4. Glutatyon-S-Transferaz (GST; EC 2.5.1.18)

Glutatyon-S-transferazlar; hücresel detoksifikasyon ve transporttan sorumlu iki protein alt birimden oluşan multifonksiyonel protein ailesidir. Genel olarak üç sitozolik ve bir de mikrozomal olmak üzere dört ana gruba ayrılır. GST ailesi hepatositlerdeki başlıca detoksifiye edici sistemdir.[160] GST'lerin homodimerik ve heterodimerik çok farklı yapıları ve izoenzim formlarının bulunduğu bilinmektedir. İzoenzim dağılımlarıyla ilgili belirgin bireysel farklılıklar görülmektedir. Karaciğer başta olmak üzere böbrek, adrenal korteks, akciğer, eritrosit, plasenta, testis, iskelet ve kalp kasında bulunurlar.[1,150] Ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda önemli rol oynamaktadırlar. Başta araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri olmak üzere lipid hidroperoksitlere karşı GST'ler, selenyumdan bağımsız GSH-Px aktivitesi gösterirler.

$$ROOH + 2\ GSH \xrightarrow{GST} GSSG + ROH + H_2O$$

GST'ler, glutatyonun reaktif metabolitlerle konjugasyonunu sağlayarak organizmadan uzaklaşmasını sağlamaktadır.[103] GST enzimleri; katalitik ve katalitik olmayan çok sayıda fonksiyona sahiptir. Hem detoksifikasyon yaparlar hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolleri vardır. Katalitik olarak yabancı maddeleri glutatyondaki sisteine ait –SH grubu ile bağlayarak onların elektrofilik bölgelerini nötralize ederler. Ürünün daha fazla suda çözünür hale gelmesini sağlarlar. Oluşan bu GSH konjugatları böylece organizmadan atılabilir. GSH'dan glutamat ve glisinin koparılmasından sonra sisteinin serbest amino grubu asetillenerek merkaptürik asitlere dönüştürülür. Ksenobiyotiklerin klasik atılım ürünleri olan merkaptürik asitler (N-asetil sisteinin S-alkile olmuş türevleri) daha sonra safra ile atılırlar. Bu yol GST'lerin kanserojen, mutajen ve diğer zararlı kimyasalların hücre içi detoksifikasyonunda rolleri olduğunu göstermektedir. Metabolize edilmeyen lipofilik-hidrofilik pek çok bileşiği bağlamaları bu enzimlerin hücre içinde sınırlı çözünürlüğe sehip moleküller için depo ve taşıma rolü üstlendiğini gösterir. Böylelikle GST'ler ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda da önemli rol oynarlar.[21,104,125,179]

2.6.1.1.5.Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz (G6PDH,EC 1.1.1.49)

Pentoz fosfat (heksoz monofosfat) yolunun oksidatif faz hız kısıtlayıcı enzimidir. ATP üretilmeyen bu yolun; indirgeyici reaksiyonlar (yağ asiti ve steroid biyosentezi gibi) için NADPH üretmek ve nükleik asit biyosentezi için 5 karbonlu üniteleri sağlamak gibi iki önemli işlevi vardır. Bu işlevlerinden dolayı hücresel metabolizma ve oksidatif stres arasında anahtar bir role sahiptir.[50] Glukoz tüketimindeki ana yollar glikoliz ve pentoz fosfat yoludur. Pentoz fosfat yolu; karaciğer, böbrek, eritrosit, adrenak korteks, yağ dokusu ve laktasyondaki meme bezinde aktiftir. Eritrositlerdeki pentoz fosfat yolunda üretilen NADPH; okside olmuş glutatyonun; FAD içeren flavoprotein enzimi olan glutatyon redüktaz ile indirgenmiş glutatyona çevrilmesini sağlar. Daha sonra indirgenmiş glutatyon; glutatyon peroksidaz enzimi tarafından katalizlenen bir tepkimeyle H_2O_2'i eritrositlerden uzaklaştırır. NADPH; thioredoksin redüktaz reaksiyonundaki indirgeyici ekivalanları sağlamakla birlikte katalaz aktivitesi için de gereklidir. G6PDH eksikliği; oksidan ajanların detoksifiye edilememesi sonucu oluşan hemolitik anemi ile karakterize X'e bağlı ressesif bir hastalıktır. İnsanlarda hastalığa neden olan en sık görülen enzim anomalisidir.[50]

2.6.1.2. Nonenzimatik Yapıda Olan Antioksidanlar

Non enzimatik yapıda olan antioksidanlar endojen ve ekzojen kaynaklı olabilir.

Endojen Kaynaklı Nonenzimatik Antioksidanlar: Hemoglobin, ferritin, miyoglobin, ürik asit, bilirubin, laktoferrin, transferrin, melatonin, askorbik asit, albumin ve glutatyondur.

Ekzojen Kaynaklı Nonenzimatik Antioksidanlar: β-karoten, vitamin C ve vitamin E'dir.

2.6.1.2.1.Suda çözünen radikal tutucuları

2.6.1.2.1.1. Askorbik asit (C vitamini)

Glukoz metabolizmasından gelen suda çözünen vitaminler grubundandır. Prolin, lizin ve dopamin beta hidroksilaz enzimlerinin kofaktörü olup; bu amino asitlerin hidroksilasyonunda ve kollajen fibrillerin sentezinde gereklidir.[115]

Güçlü bir indirgeyici ajan ve antioksidandır. Süperoksit, peroksil ve hidroksil radikalleri ile reaksiyona girerek bir ara ürün olan semidehidroaskorbat yoluyla metaboliti dehidroaskorbik asiti (DHA) oluştururken reaksiyona girdiğ radikali de etkisiz hale getirir. Membran içindeki ve ekstrasellüler dokulardaki lipid perokidasyonunu önler.[4] Askorbik asitin radikalik formu glutatyon sistemi tarafından askorbik asite yeniden dönüştürülür.[115]

2.6.1.2.1.2. Glutatyon (GSH)

GSH vücudun birçok hücresinde bulunan ve hücrenin fonksiyonel proteinlerini oksidan ajanlara karşı koruyan bir tripeptitdir.[23] Tabiatta yaygın bir şekilde bulunan bu sülfürlü bileşik 1921 yılında Hopkins tarafından keşfedilmiş; glutamil-sisteinden ibaret bir dipeptit olduğu zannedilmiştir. Ancak 1929 yılında kristal halde elde edildikten sonra yapısının tripeptit olduğu anlaşılmış ve 1935 yılında δ-L-glutamil-L-sisteinil-glisin halinde sentezlenmiştir.[56] GSH, hayvan hücrelerinin hemen hepsinde yüksek konsantrasyonda bulunur (0.1-10mM). Glutatyon disülfid (GSSG); GSH'daki sisteinin tiol grubunun oksidasyonu ile oluşmaktadır. Hücrede bulunan GSH'ın üçte bire yakın miktarı disülfid şeklinde ve tiol grubu içeren sistein, koenzim-A gibi bileşikler ile beraber bulunur.[195] GSH; DNA sentezinde ve hasarlı DNA parçalarının onarılmasında, metabolik fonksiyonların yerine getirilmesinde, zehirli maddelerin inaktif hale dönüştürülmesinde (detoksifikasyon) ve serbest radikallerin olası hasarlarının önlenmesinde görev yapmaktadır.[24] GSH'daki en aktif grup tiol grubudur. GSH'daki tiol grubunun oksitlenmesi ile oluşan GSSG antioksidan özelliğini kaybeder. Tiol grubunun asitliği GSH'ın kendi anyonu (RS^-) ile sulu çözeltilerde kuvvetli reaksiyon vermesine neden olur. Reaksiyonun oluşma sıklığı ortam pH'ının artışı ile doğru orantılıdır.[195]

GSH sentezi; L-glutamat ve L-sisteinin gama-glutamatilsistein sentetaz enzimi tarafından katalizlenmesi ile başlar. Oluşan gama-glutamatilsistein ve L-glisin ürünü GSH sentetaz enzimi tarafından GSH'a dönüştürülür. Bu reaksiyonlar sırasında iki ATP harcanır.İlk reaksiyon hızı belirleyen basamaktır.[30] Glutatyonun biyolojik fonksiyonları şu şekilde özetlenebilir.

a) GSH; glutatyon peroksidazın ön maddesidir.

GSH-Px; lipid hidroperoksitleri (ROOH) veya hidrojen peroksiti indirgeyerek (H_2O_2) serbest radikal oluşumun azalmasını sağlayan enzim olarak bilinmektedir. Bu enzim (ROOH)'ı indirgeyerek alkole (reaksiyon I) ve H_2O_2'i indirgeyerek suya dönüştürür (reaksiyon II).

$$2GSH + ROOH \longrightarrow GSSG + ROH + H_2O \quad (I)$$

$$2GSH + H_2O_2 \longrightarrow GSSG + 2H_2O \quad (II)$$

b) GSH; dehidroaskorbat redüktazın ön maddesidir.

GSH; dehidroaskorbat molekülünün dehidroaskorbat redüktaz enzimi katalizörlüğünde indirgenmesi reaksiyonuna katılır. Bu tepkime iyi bilinen bir antioksidan olan askorbatın meydana gelmesini sağlamaktadır (reaksiyon III).[106,195]

$$\text{Dehidroaskorbat} + 2GSH \longrightarrow GSSG + \text{askorbat} \quad (III)$$

c) GSH; glutatyon redüktaz tarafından katalizlenen reaksiyonun ürünüdür.

GSH ile GSSG arasındaki dinamik dengenin korunabilmesi için; glutatyonun oksitlenmiş formu (GSSG); glutatyon redüktaz enzimi ile GSH'a indirgenir ve kofaktör olarak NADPH kullanır (reaksiyon IV). Glutatyon redüktaz ayrıca GSH ve koenzim A'nın indirgenme reaksiyonlarını katalizler.[106,195]

$$GSSG + NADPH + H^+ \longrightarrow 2GSH + NADP^+ \quad (IV)$$

2.6.1.2.1.3.Ürik asit (Ürat)

Ürik asit; ksantin okidazın ksantin, hipoksantin gibi oksi pürinleri oksitlemesi ile oluşur. İnsan ve gelişmiş primatlarda pürin metabolizmasının son ürünüdür. Fizyolojik koşullarda singlet oksijen, hipoklorit ve hidroksil radikali gibi reaktif bileşikleri baskılar; fakat süperoksit radikali ile doğrudan reaksiyona girmez. Peroksit kaynaklı lipid peroksidasyonuna karşı korur. Bu da üratın antioksidan etkilerin olduğunun bir göstergesidir.[14]

2.6.1.2.1.4. Melatonin

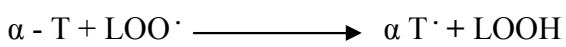
Triptofandan sentezlenir. Sirkadiyen ritmi düzenler.[9] Pineal bezden salgılanan direkt radikal temizleyici, indirekt olarak da antioksidan enzim düzeylerini arttıran ve nitrik oksit sentetaz gibi preoksidatif enzimleri baskılayan antioksidan bir hormondur.[96]

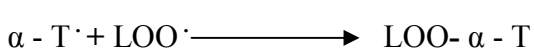
2.6.1.2.2. Yağda çözünen radikal tutucuları

2.6.1.2.2.1. E vitamini (α-tokoferol)

Yağda çözünen vitaminler arasında önemli bir yere sahip olan Vitamin E; özelikle membran ve lipoproteinlerin bileşenleri üzerinde zincir kırıcı antioksidan etkiye sahiptir. α-tokoferol; E vitamini türevlerinin en aktif olanıdır. Zincir reaksiyonları ile ilişkili peroksil radikalini temizleyerek lipid peroksidasyonunu önler.[171] Tokoferolün diyetteki yağda çözünmüş olması ve yağ sindirimi sırasında serbestleşip emilmesi nedeniyle yağ emilimindeki bozukluk E vitamini eksikliğine neden olur.[153] Molekülün aktif kısmını yapısındaki fenolik hidroksil grubuna sahip aromatik halka oluşturur ve moleküle antioksidan özellik kazandırır.[69] E vitamini membran lipidlerine kolayca diffüze olur ve doymamış yağ asitlerini indirgeyerek radikallerin membranlarda oluşturabileceği lipid peroksidasyonunu önler.[153] Her bir E vitamini molekülü iki oksidasyon zincirini durdurabilir. Singlet oksijenin kuvvetli

bir tutucusu olmakla birlikte peroksi, hidroksil ve süperoksit radikali ile direkt olarak reaksiyona girebilir. Oluşan tokoferoksil radikali glukuronik asitle konjuge edilerek safra yoluyla atılır.





Okside olan E vitamini, parçalanmadan önce askorbik asit ve glutatyon tarafından tokoferole geri çevrilebilir. Glutatyon peroksidaz ve E vitamini serbest radikallere karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler. Glutatyon peroksidazın bir komponenti olan selenyum; yağların sindirimi ve emiliminin sağlanmasında rol oynayan pankreas işlevi için gereklidir. E vitamini ise selenyuma olan gereksinimi; vücuttan selenyum kaybını önleyerek veya selenyumu etkin formda tutarak azaltır.[153]

2.6.1.2.2.2. Karotenoidler (Beta karoten)

Karotenoidler (beta karoten, likopen, zeaksantin, violaksantin, lutein) sarı ve turuncu renkli bileşiklerdir. Bazı bakteriler ve alglerde, çoğu zaman ise bitkilerde bulunan pigmentlerdir. İnsan ve hayvanlar karotenoid biyosentezini gerçekleştiremedikleri için bu bileşikleri diyetle alırlar. A vitamininin metabolik ön maddesi olan β karoten organizmada triplet uyarıcıların zararlı etkilerini ve singlet oksijeni baskılama; bazı oksijen radikallerini (süperoksit radikalini) temizleme gibi koruyucu etkilere sahiptir. Bu özelliklerine ek olarak düşük oksijen kısmi basıncında peroksi serbest radikallerinin dokulara hapsedilmesinde görev alarak antioksidan etkinlik gösterirler. Bununla birlikte karotenoidlerin lipid membranlara lokalizasyonu membranların oksidatif strese karşı hassasiyetini azaltır.[58]

2.6.1.2.2.3.Bilirubin

Hem katabolizmasının son ürünüdür. Singlet oksijen, peroksinitrit ve hipokloröz asit gibi reaktif oksijen ve nitrojen türevlerini baskılarken; peroksinitrit radikallerine karşı hidrojen donörü olarak davranarak lipid peroksidasyonunun zincir

devam ettirici radikalini de etkisiz hale getirir. Biliverdin biluribine göre daha etkili biçimde peroksil radikallerini baskılar.[172]

2.6.1.2.2.4. Ubikinon

Mitokondride aerobik koşullarda kinon (yükseltgenmiş); anaerobik koşullarda kinol (indirgenmiş) halinde bulunur. Mitokondriyal lipidlerin bir yapıtaşı olan ubikinonun membran fosfolipidlerini oksidatif hasardan koruduğu ve singlet oksijeni temizlediği düşünülmektedir.[98]

2.6.1.2.3. Stobadin (STB)

Reaktif oksijen türevlerinin oluşumunu önlemek veya zararlı etkilerini azaltabilmek için farklı etki mekanizmalarına sahip olarak geliştirilen antioksidanlar arasında Stobadin de bulunmaktadır. Heterosiklik indol türevlerinden bir pridoindol olan Stobadin ile ilgili olarak halen günümüzde devam etmekte olan birçok çalışma yapılmaktadır. Stobadin, (-) cis 2,8 dimetil 2,3,4,4a,5,9b hekzahidro 1H prido (4,3b-indol); 1983'de hazırlanmış bir moleküldür, ilaç değildir.[173]

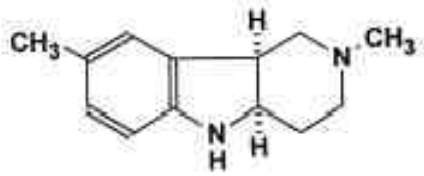


FIGURE 1. Stobadine (base).

Şekil 11. Stobadin'in yapısı

Stobadin'in baz formundan değişik fizikokimyasal özelliklere sahip tuzlar elde edilebilir. Stobadin'in dihidroklorid formunun; hem suda hem de yağda çözünebilmesi; biyolojik dokularda hem hidrofobik hem de hidrofilik fazlarda yer almasını sağlar. Buna karşılık stobadin'in dipalmitat tuzu (DP 1031) suda çözünmez. Oral alım için uygun olan dipalmitat tuzu kimyasal olarak dihidroklorid formuna

göre daha kararlıdır. Stobadin'in titrasyonuna bakıldığında dibazik asit (pKa_1=2.88 pKa_2=7.17) özelliğindedir. Elektron redoks potansiyelinin E_{70}=0,58 olması nedeniyle biyolojik sistemlerde güçlü bir antioksidandır. Bu özelliğinden dolayı biyolojik sistemlerde –SH gruplarının oksidasyonunu, amino asit oksidasyonunu ve singlet oksijen oluşumunu engeller. Düşük toksisiteye sahip olan stobadin; peroksil, alkoksil ve hidroksil radikalleri üzerinde temizleyici; singlet oksijen üzerinde ise baskılayıcı etkiye sahiptir. Süperoksit radikali üzerindeki etkisi ise önemsenmeyecek derecededir.[90,168] Stobadinin bu özellikleri indolik nitrojen üzerinde nitrojen merkezli stabil radikal oluşturma yeteneğinden kaynaklanır. Böylece oksidatif strese bağlı lipit peroksidasyonunu ve protein oksidasyonunu azaltır.[168,169]

Stobadin; kalp[79] ve merkezi sinir sistemi[175] üzerinde koruyucu etkilere sahipken; antiülserojenik,[117] antihistaminik[118] antimutajenik[28] antidisritmik[37] ve α adrenolitik[97] özellikleri yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.

Horakova ve arkadaşları 1994 'de stobadin'in reaktif oksijen türleri (ROS) 'ni temizleyici ve antioksidan etkilerini yayınlamışlardır.[80] Isoproterenolle oluşturulan kardiyomyosit hasarına karşı, stobadin'in kardiyak dokuda MDA konsantrasyonunu düşürdüğü; katalaz ve glutatyon redüktaz enzim aktivetelerinde artışa neden olduğu ayrıca protein tiyol gruplarında ve mitokondriyal redükte glutatyon / okside glutatyon oranında değişime neden olduğu bildirilmiştir.[126] Stobadin'in nöronal dokuda in vivo ve in vitro ortamda antioksidan ve koruyucu etki mekanizması aydınlatılmıştır.[76,77,78,79,99] Stobadin; hipoksi / reoksijenasyon, iskemi / reperfüzyon gibi deneysel çalışma modellerinde SOD, GSH-Px gibi enzimlerin aktivitelerindeki değişimi engelleyerek, konjuge dien oluşumunu ve doku MDA seviyelerini düşürerek lipid peroksidasyonunu azaltır. Ayrıca Stobadin; hipoksi / reoksijenasyon deney modelinde tavşan spinal kord ve hippokampal doku homojenatlarında MDA ve konjuge dien oluşumunu azaltır.[108,82] Stobadin serbest radikallerin neden olduğu endoplazmik retikulum membran akışkanlığındaki değişimi engelleyerek; Fe^{+2}'nin neden olduğu beyin sinaptosomal membranındaki Na^+K^+-ATP az ve Na^+ /Ca^{+2} değiştirici sistem aktivitelerindeki azalışı engeller.[93,94] Yapılan başka bir çalışmada Stobadin'in düşük konsantrasyonlarda tavşan beyin endoplazmik retikulumunda Ca^{+2} transfer hasarını engellediği gösterilmiştir.[144] Streptozotosin ile oluşturulan diabet

modelinde; Stobadin ve vitamin E kombinasyonunun beyin dokusunda diabetle artan glukoz 6 fosfat dehidrogenaz ve glutatyon peroksidaz enzim aktivitelerini baskıladığı; azalan glutatyon redüktaz ve glutatyon S transferaz enzim aktivitelerini normale döndürdüğü, aynı zamanda beyin MDA seviyelerini düşürerek lipid peroksidasyonunu baskıladığı gösterilmiştir. Aynı deney modelinde kalp, böbrek ve karaciğer gibi periferik organlarda diabetle gelişen serbest radikal hasarını engellediği gösterilmiştir.[133] Cu^{+2} ile ilişkili LDL oksidasyonu üzerine Stobadin'in antioksidan etkisi araştırılmış; Stobadin'in doz bağımlı olarak Cu^{+2}'nin neden olduğu LDL oksidasyonunu ve LDL'nin yapısında bulunan Apo B proteinindeki triptofan kalıntılarının oksidasyonunu engellediği gösterilmiştir.[81] Stobadin doza ve zamana bağlı olarak alloksan ile oluşturulan diabette hiperglisemiyi baskılar.[170] Ayrıca alloksan ile oluşturulan diabet modelinde stobadin; dimetilsülfoksit, dimetilüre, tiyoüre ve bütillenmiş hidrosiyanizol gibi diğer hidroksil radikal temizleyici ajanlara göre daha etkilidir.[32]

Farmakokinetik çalışmalarda gastrointestinal sistemden kolayca emildiği, kan-beyin bariyerini geçebildiği gösterilmiştir.[83,91] Hayvanlarda yapılan akut, subakut ve kronik toksisite çalışmalarında embriyojenik, teratojenik, mutajenik, genotoksik etkileri araştırılmış olan stobadin'in güvenilirliği belirlenmiştir.[169] Stobadin ile ilgili Faz I çalışmaları tamamlanmış olup sağlıklı kişilerde elektrokardiyogram (EKG) ve kalp ritminde değişim gözlenmez iken; tansiyonda hafif düşüklük, maksimum dozda ise hafif sedatif etki gözlenmiştir. Ayrıca anjina pektoris geçiren hastalarda uygulanan faz II çalışmalarında atak sayısını azalttığı, sistolik ve diastolik kan basıncını hafifçe düşürdüğü belirtilmektedir.[83]

3. MATERYEL VE YÖNTEM

Bu çalışma; Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda ve Gazi Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde (GÜDAM) gerçekleştirilmiştir.

3.1. Kullanılan Gereçler

3.1.1 Deney Grupları

Çalışmamızda Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulundan onay alınmıştır. Deneylerde GÜDAM'dan temin edilen 250-300 gr ağırlığında sağlıklı wistar albino cinsi 40 adet erkek rat kullanılmıştır. Standart rat diyetiyle beslenen denekler 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık sürecinde tutulmuştur.

3.1.2. Kullanılan Aletler

Hassas terazi (Schimadzu, Libror, AEG 220)

Homojenizatör (Heidolph DIAX 900)

Vorteks (Heidolf Reax 2000)

Benmari (Heto)

Santrifuj (Hermle Z 380K)

Soğutmalı santrifuj(Damon IEC,B-20A soğutmalı,Hermle Z 323K

pH metre (Jenway)

Spektrofotometre (Schimadzu, UV1601)

3.1.3. Kullanılan Kimyasallar

Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4), Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) trikloroasetikasit (TCA), tiobarbitürik asit (TBA), karbon tetraklorür (CCl_4), stobadin, etanol kloroform, 1,1,3,3-tetraetoksi propan (TEP), bovin serum albumin (BSA), Folin-Ciocalteau-fenol, bakır sülfat ($CuSO_4.5H_2O$), sodyum sitrat (Na_3-Sitrat), sodyum karbonat (Na_2CO_3), sodyum hidroksit (NaOH), nitroblue tetrazolium (NBT), ksantin, $EDTANa_2$, ksantin oksidaz (XO), amonyum sülfat $(NH_4)_2SO_4$, bakır klorür ($CuCl_2$) , redükte glutatyon (GSH), NADPH, hidrojen peroksit (H_2O_2), sodyum azid (NaN_3), glutatyon redüktaz (GSH-red), hidroklorik asit (HCl), % 0.9 NaCl, karboksimetil selüloz (KMS).

Alfamine (Ketamin Hidroklorür, %10, Egevet İlaç), Alfazyne (Xylazin HCl, %2 ,Egevet İlaç) kullanılmıştır.

3.2. Uygulanan Yöntemler

3.2.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması

Çalışmada hayvanlar 4 eşit gruba ayrıldı.

Grup I-(Kontrol grubu: K) (n=10): Ratlara 8 hafta boyunca standart rat diyeti verilmiştir.

Grup II –(Stobadin grubu: S) (n=10): Ratlara 8 hafta boyunca haftada 3 kez oral yolla %0,5 Avicel (karboksimetil sellüloz) solusyonu [121] içinde çözülmüş 24.7mg/kg/gün Stobadin verilmiştir.[194]

Grup III-(CCl_4 grubu: C) (n=10): Ratlara 8 hafta boyunca haftada 3 kez intraperitoneal olarak 1/10 (v/v) oranında zeytinyağı içinde çözülmüş CCl_4 verilmiştir. CCl_4 ;

1.hafta: 0.3ml/kg

2.hafta: 0.7ml/kg

Sonraki 6 hafta boyunca: 1ml/kg CCl_4 verilmiştir.[149]

Grup IV - (Stobadin+ CCl_4 grubu: SC) (n=10): Ratlara 8 hafta boyunca haftada 3 kez oral yolla %0,5 Avicel (karboksimetil sellüloz)[121] solusyonu içinde çözülmüş 24.7mg/kg/gün Stobadin[194] ve intraperitoneal olarak 1/10 (v/v) oranında zeytinyağı içinde çözülmüş; 1.hafta: 0.03ml/kg, 2.hafta: 0.07ml/kg ve sonraki 6 hafta boyunca:1 ml/kg intraperitoneal CCl_4 verilmiştir.[149]

Son uygulamadan 24 saat sonra ratlar genel anestezi ve kas gevşetici (40 mg/kg, Alfamin ve 2,5 mg/kg Alfazyne karıştırılarak, intramüsküler uygulanmıştır) uygulanarak feda edildi, kardiyak kan örnekleri alındı, batın açılarak karaciğer dokuları çıkartıldı. Dokular, %0,9'luk NaCl ile yıkandıktan sonra biyokimyasal inceleme için alüminyum folyoya sarılarak sıvı azotta dondurulduu.

Deneyde kullanılacak karaciğer dokuları Heidolph DIAX900 marka homojenizatör ile homojenize edilerek ham ekstraktlar elde edildi. Ekstraktlar santrifüj edilerek süpernatantları enzim ve diğer parametreler için ayrıldı. Çalışma esnasında elde edilen süpernatantlar ayrı ayrı ependorf tüplerine konularak -80° C' de analiz gününe dek saklandı.

3.2.2. Yöntemlerin Uygulanması

3.2.2. 1. Karaciğer doku örneklerinin homojenize edilmesi

Karaciğer doku örnekleri enzim aktivitesi çalışılacağı zaman derin dondurucudan çıkarıldı. 1000 mg doku 1/5 oranında(w/v) serum fizyolojik ile karıştırıldı ve buzlu su banyosu içinde 1-1.5 dakika 4000 devirde homojenize edildi. Ham ekstrakt (homojenat) soğutmalı santrifüjde 12.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatantların bir kısmı MDA, katalaz enzim aktivitesi ve protein tayini için ayrıldı. Kalan süpernatantlar 5/3 (v/v) etanol/kloroform karışımı ile 1/1 oranında karıştırıldı. Soğutmalı santrifüjde 12.000 rpm'de 20 dakika tekrar santrifüj edildi. Üst tabaka SOD ,GSH-Px enzim aktiviteleri ile protein tayini için ayrıldı.

3.2.2. 2. Rat karaciğer doku örneklerinde Malondialdehid (MDA) tayini

Malondialdehit tayini Van Ye TM ve arkadaşlarının tarif ettiği metoda göre çalışıldı.[185]

Metodun prensibi: İki mol tiobarbitürik asit (TBA) asidik ortamda ve 85-100 ºC sıcaklıkta bir mol MDA ile birleşerek mor renkli TBA-MDA kompleksini oluşturur. Bu kompleksin verdiği absorbans 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür.

Kullanılan Reaktifler

1.Fosfat Tamponu: 100 mM, pH: 6 izotonik (Na_2HPO_4 / KH_2PO_4)

2.% 20'lik TCA çözeltisi

3.%1'lik TBA çözeltisi

4.MDA standartı: 1,1,3,3-tetraetoksi propan standart çözelti olarak kullanıldı. 1,1,3,3-tetraetoksi propandan önce 10 mM'lık stok çözelti hazırlandı, stok çözeltiden uygun seyreltmelerle 10,25,50,75 ve 100µM'lık standart çözeltiler hazırlanarak standart grafik çizildi. Absorbans=f (Konsantrasyon) grafiğinin eğiminden de numunelerdeki MDA miktarları hesaplandı.

Deneyin yapılışı

Daha önce hazırlanan süpernatant örneklerinden MDA düzeyleri çalışıldı.

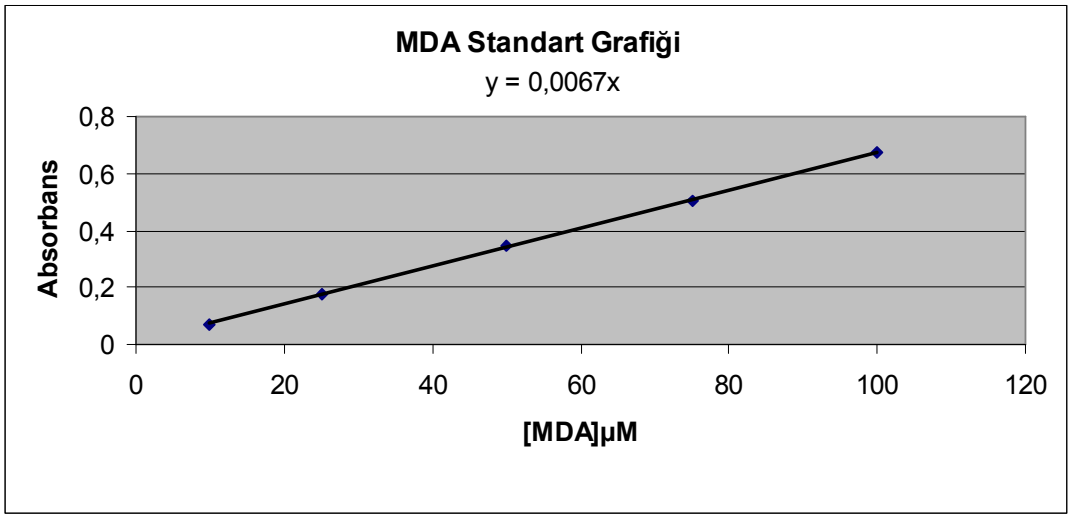
Her bir numune ve standart için kör çalışıldı. Numune ve standart tüplerine sırasıyla; tampon çözelti, etanol, TBA, TCA ve numune/standart eklenirken; kör

tüplerine TBA hariç diğerleri eklendi. 60 dakika kaynar su banyosunda (85-100°C) bekletildikten sonra çeşme suyu altında soğutuldu. 5000xg'de 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar ayrıldı. Daha sonra standart ve numune kör tüplerine TBA eklendi. İyice karıştırıldı ve 532 nm'de her bir tüpün absorbansı distile suya karşı okundu. MDA çalışma şeması aşağıda verilmiştir.

	Tampon	Etanol	TBA	TCA	Numune/Standart
Numune	1 ml	200µl	1 ml	1 ml	100 µl
Numune körü	1 ml	200µl	-	1 ml	100 µl
Standart	1 ml	200µl	1 ml	1 ml	100 µl
Standart körü	1 ml	200µl	-	1 ml	100 µl

Hesaplama: MDA(µ mol/L)**:** $\{ (Abs)_N / (Abs)_{St} \} x F$

Numunelerdeki MDA miktarları standart eğri kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar elde edilen protein miktarlarına bölünerek; µmol MDA / mg protein olarak ifade edildi.



Şekil 12. MDA Standart eğrisi

3.2.2.3. Rat karaciğer doku örneklerinde protein tayini

Homojenat ve süpernatantlardaki protein miktarı Lowry metoduna göre yapıldı.[104] Protein standartı olarak BSA (Sigma) kullanıldı. 0.02-0.2 mg/ml konsantrasyon aralığında standartlar kullanılarak standart grafik çizildi ve eğimden numunelerdeki protein miktarları hesaplandı.

Metodun prensibi: Alkali ortamda proteinler Cu^{2+} ile Cu^{2+}-protein kompleksi oluştur ve fosfo molibdat-fosfo tungstat reaktifini (Folin-Ciocalteau-Phenol reaktifini) redükleyerek mavi-mor renkli ürün oluştururlar. Rengin koyuluğu ortamdaki protein konsantrasyonuyla doğru orantılıdır.

Kullanılan reaktifler

1-$CuSO_4.5H_2O$ ve Na_3-Sitrat (A reaktifi).

2-Na_2CO_3 ve.NaOH (B reaktifi).

3-B reaktifi ve A reaktifi karıştırılır (C reaktifi).

4- Folin-Ciocalteau çözeltisi (D reaktifi) .

(Önceden hazırlanan reaktif deiyonize suyla eşit oranda dilüe edilerek kullanıldı).

Deneyin yapılışı

Reaktif	Kör	Numune
C reaktifi	2.5 ml	2.5ml
Numune	-	10 µl
Distile su	500 µl	490µl

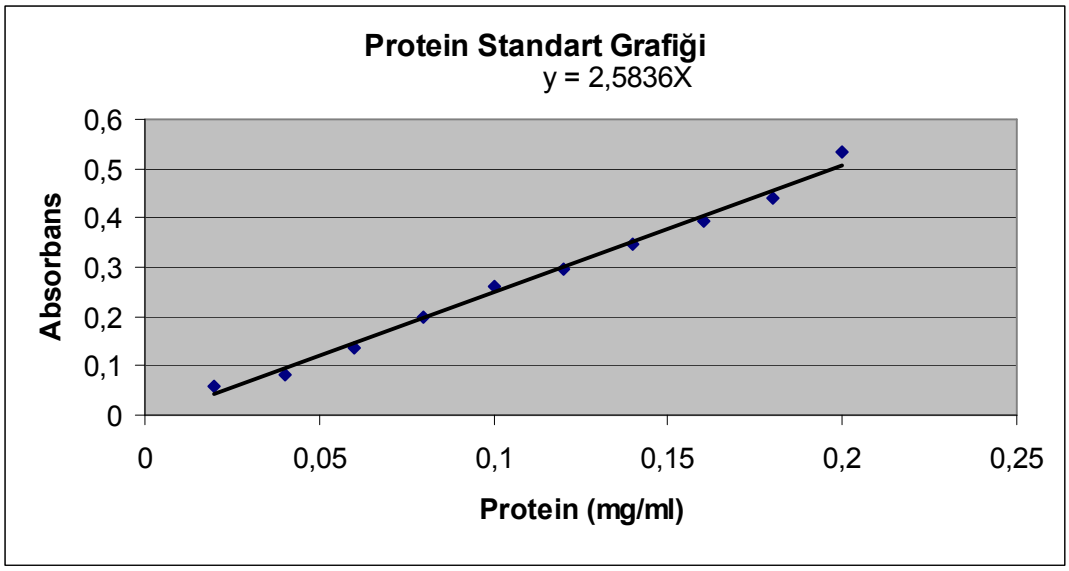
Karıştırıldı. Laboratuvar sıcaklığında 5-10 dakika bekletildi. Daha sonra kör ve numune tüplerine D reaktifi ilave edildi. Tekrar karıştırıldı. Laboratuvar sıcaklığında 20-30 dakika daha bekletildikten sonra 700 nm'de köre karşı numunenin absorbansı okundu.

Hesaplama:

Protein miktarı: Numune absorbansı x F

Standart absorbansı

Sonuçlar mg/ml olarak verildi.



Şekil 13. Protein Standart eğrisi

3.2.2.4. Rat karaciğer doku örneklerinde SOD aktivitesinin ölçümü

Karaciğer doku örneklerinde total SOD aktivitesi; Durak İ ve arkadaşlarının tarif ettiği metoda göre çalışıldı.[39]

Metodun prensibi: Ksantin oksidaz enziminin ksantini metabolize etmesi esnasında ortaya çıkan $O_2^{\cdot -}$ radikalinin NBT'yi redüksiyonu sonucunda oluşan mavi rengin şiddetinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

$$\text{Ksantin} \xrightarrow{\text{Ksantin oksidaz}} O_2^{\cdot -}$$

$$O_2^{\cdot -} + \text{NBT} \longrightarrow \text{Renkli bileşik}$$

Kullanılan reaktifler

1-Ölçüm reaktifi

a)Ksantin (0.30mM)

b)EDTANa_2 (0.60mM)

c)NBT (150μM)

d)Na_2CO_3 (400mM)

e)BSA (1g/l)

2-XO (167U/l)

3-$CuCl_2$ (8mM):

Deneyin yapılışı:

Daha önce bahsedilen süpernatatlardan enzim çalışması yapıldı.

Her bir numune için kör çalışıldı. Numune tüplerine ölçüm reaktifi, numune ve ksantin oksidaz enzimi; kör tüplerine ise ölçüm reaktifi ve ksantin oksidaz enzimi konuldu. Tüpler 25°C'da 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra numune tüplerine 0.100 ml $CuCl_2$; kör tüplerine 0.100 ml $CuCl_2$ ve numune eklendi. İyice karıştırıldıktan sonra her bir tüpün absorbansı 560 nm'de distile suya karşı okutuldu. SOD enziminin çalışma şeması aşağıda verilmiştir.

Reaktif (ml)	**Kör**	**Numune**
Ölçüm reaktifi	2.850	2.850
Numune	-	0.100
XO	0.050	0.050

Hesaplama:.

T-SOD aktivitesi (U/ml)= [(A_K-A_N/A_K)x20] eşitliğinden hesaplandı.

% inhibisyon = (Kör abs - Numune abs) x 100
Kör abs

Metodun prensibine göre; %50 inhibisyon 1 Ü aktiviteye karşılık gelir. SOD enzim tayini sonucu elde edilen sonuçlar protein miktarlarına bölünerek Ü/mg protein olarak verildi.

3.2.2.5. Rat karaciğer doku örneklerinde Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesinin ölçümü

GSH-Px aktivitesi Paglia DE ve arkadaşlarının metoduna göre çalışıldı.[130]

Metodun prensibi: 340 nm dalga boyunda NADPH'ın NADP'ye dönmesi sonucu karışımın optik dansitesinin azalması prensibine dayanır.

Kullanılan Reaktifler:

GSH: (150 mM)
NADPH: (3mM)
H_2O_2: (100mM)
NaN_3: (2M)
EDTA : (5 mM)
Fosfat tamponu (pH: 7,0; 50 mM)
GSH-red : Sıvı enzimden $(NH_4)_2SO_4$ ile seyreltilerek kullanılır.

Deneyin yapılışı:

Numune tüplerine Fosfat tamponu + EDTA, NaN_3, GSH, NADPH, GSH-red ve numune konuldu. 340 nm'de suya karşı sıfırlandıktan sonra, 1-2 dakika absorbans değişimi takip edildi. Bu kör olarak değerlendirildi. Absorbans değişimi durduğunda ve ortama H_2O_2 ilave edilir edilmez absorbans azalması 0.,1.,2.,3., dakikalarda okundu. GSH-Px'in Çalışma şeması aşağıda verilmiştir.

Reaktif (ml)	**Numune**
Fosfat tamponu + EDTA	2.560
NaN_3	0.030
GSH	0.100
NADPH	0.100
GSH-red	0.010
Numune	0.100

Hesaplama:

GSH-Px Aktivitesi (IÜ/ml): ΔAbs/dak. $[(V_T/V_N).\ (1/\varepsilon.l)]$ eşitliğinden hesaplandı.

NADPH için molar absorbsiyon katsayısı 6,22 x 10^3 M^{-1} cm^{-1} kullanılarak dakika başına okside olan NADPH hesaplandı. Glutatyon peroksidaz aktivitesi spesifik aktivite (IÜ/mg protein) olarak verildi.

3.2.2.6. Rat karaciğer doku örneklerinde Katalaz aktivitesinin ölçümü

Karaciğer doku örneklerinde katalaz aktivitesinin ölçümü; Aebi H ve arkadaşlarının metoduna göre yapıldı.[2]

Metodun prensibi: 240 nm'de katalaz tarafından yıkılan hidrojen peroksitin izlenmesi esasına dayanmaktadır.

Kullanılan reaktifler

Fosfat tamponu (50mM, pH=7)

Tamponlanmış H_2O_2 çözeltisi

Deneyin yapılışı:

Spektrofotometre küvetine tamponlanmış H_2O_2 çözeltisi konuldu. 240 nm'de absorbans değişimi bir süre takip edildi. Absorbans değişimi durduktan sonra numune ilave edilerek karıştırıldı. Absorbans değişimi 0. ve 5. dakikalar arasında takip edildi. İlk okunan (0. dakika) absorbans kör olarak değerlendirildi. Katalaz tayini sonucu elde edilen sonuçlar protein miktarlarına bölünerek spesifik aktivite (IÜ/mg protein) olarak verildi.

Reaktif(ml)	**Numune**
Tamponlanmış H_2O_2 çözeltisi	2.99
Numune	0.01

3.2.2.7. Histopatolojik inceleme

Deneklerden elde edilen karaciğer dokuları serum fizyolojikle yıkanarak %10'luk formol solüsyonunda tespit edildiler. Ardından alışılagelmiş histolojik doku takip yöntemlerinden geçirilerek parafin bloklara gömüldüler.

3.2.2.7.1. Hematoksilen-Eozin Boyası

5 mikron kalınlığında alınan kesitler 60 ˚C de etüvde ve ksilolde deparafinize edildikten sonra azalan alkol serilerinden geçirilerek rehidrate edildiler. Havada kuruyan doku kesitleri hematoksilende 10 dk boyandıktan sonra musluk suyunda yıkandı ve %3'lük amonyaklı suya daldırılarak mordantlandı. Yeniden yıkanan dokular 10 dk eozin ile boyandılar. 10 dk'lık musluk suyunun ardından artan alkol serilerinden geçirilip dehidrate olan dokular ksilolde 45 dk bekletildikten sonra entellan ile kapatıldılar.

3.2.2.7.2. Masson-Trikrom Yöntemi

Dokulara Bio-Optica'nın anilin mavili Mason trikrom boyası uygulandı. (Bio-Optica Mason tricromica Cat no: 04-010802, Milano S.p.a, via San Faustino, 58, 20134 Milano, ITALIA). Doku kesitleri azalan alkol gradientinden geçirilerek distile suya kadar indirgendiler. Eşit hacimde Weigert's demirli hematoksilen A ve B solüsyonları karıştırılıp kesitlerin üzerine damlatılarak 10 dk bekletildiler. Ardından solüsyon drene edilerek Pikrik asit alkolik solüsyonu 4 dk süreyle uygulandı. 3-4 saniye distile suda yıkanan kesitlere Mallory'nin Ponceau Asit Fuksin boyası 4 dk süreyle bekletildi. Ardından distile suda yıkanan kesitlere Fosfomolibdik asit solüsyonu damlatılıp 10 dk bekletildi. Solüsyon drene edildikten sonra Masson'un anilin blue boyası 5 dk süreyle uygulanarak kesitler distile suda yıkandı. Artan alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edilen kesitler ksilende parlatılarak entellan ile kapatıldı.

3.2.2.7.3. İmmünhistokimyasal Yöntem

Parafin bloklara gömülen doku kesitleri polilizinli camlara alındı. 37 ˚C'lik etüvde 1 gece, deparafinize edilen lamlar 2 kez 15'er dakika ksilolde, 10'ar dakika %100, 96, 80'lik etil alkolde dehidrate edilerek distile suya kadar indirgendiler. Ardından (Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA) primer antikoru ile boyanacak kesitlere %10'luk sitrat tamponu (0.1 M) solüsyonunda yüksek dereceli mikrodalgada 20 dk retreival aşaması uygulandı. Dokular oda ısısına kadar soğutulduktan sonra, 2 kez distile sudan geçirilip fosfatlanmış tuz tampon solüsyonunda (PBS) yıkandılar. Bu aşamada dokuların etrafı hidrofobik kalemle (Pap Pen, LabVision, Fremont, CA, USA) sınırlandı ve ardından hidrojen peroksitte 15 dk inkübe edilerek 3 kez 5'er dk PBS'de yıkandılar. Ultra V blokta 5 dk bekletilen dokulara TGF-β_3 primer antikoru 1:100 oranında dilüe (Ultra Ab Dilüent, LabVision) edilerek uygulandı. Primer antikor aşamasında dokular oda ısısında 1 saatlik süreyle inkübe edildiler. Ardından tekrar PBS ile yıkanan dokulara 15 dk süreyle biotinile sekonder antikor ve peroksidaz uygulandı. Kromojen aşamasında AEC'de 10 dk bekletilen dokular yeniden PBS ile yıkanarak Mayer's hematoksilen (LabVision) ile zıt boyama aşamasına alındılar. Akan çeşme suyunun altında yıkanan dokular ultra mount ile kapatılarak Leica DM 4000 B imaj analizörlü fotoışık mikroskobunda değerlendirildi.

3.3. İstatistiksel analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi ve grafiklerin çizimi istatistik paket programı SPSS (Statistical Package for the Social Sciences Program, for windows 15.0) ile Microsoft Excel (for windows XP) kullanılarak yapılmştır ve ortalama ± 2 standart sapma (X ± SD) olarak sunulmuştur. Değerlendirmede Kruskal-Wallis varyans analizi ve gruplar arasındaki farklılığı tespit etmek için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. $p<0.05$ istatiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

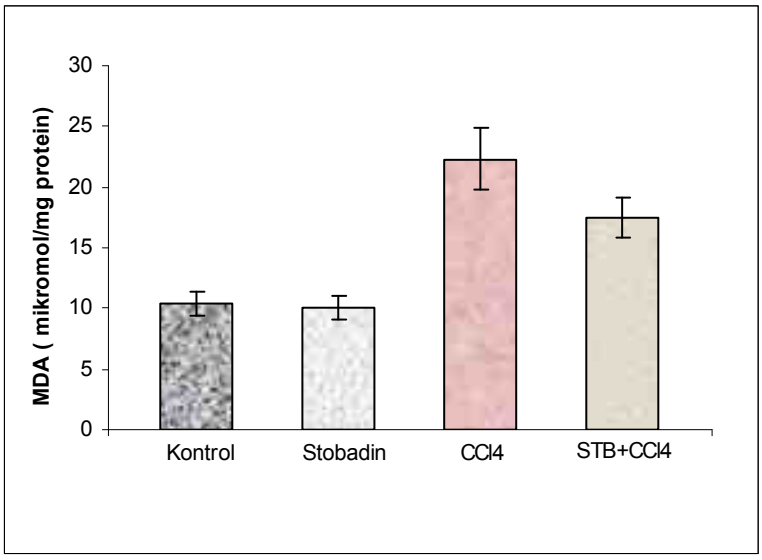
Tüm gruplara ait karaciğer dokusu MDA düzeyleri ile SOD, GSH-Px ve katalaz enzim aktivitelerinin istatistiksel sonuçları tablo 10'da sunulmuştur. Histolojik bulgular Resim1-13 arasında verilmiştir.

4.1. Biyokimyasal Bulgular

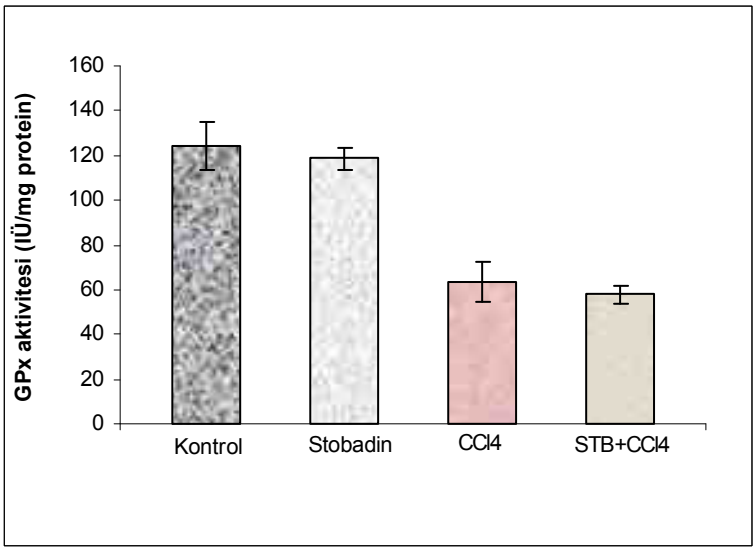
Tablo 9. Karaciğer dokusu SOD, Katalaz ve GSH-Px enzim aktiviteleri ile MDA düzeyleri (ortalama±standart hata = X ±SD)

Biyokimyasal Parametreler	**Gruplar**			
	Grup I (K)	**Grup II (S)**	**Grup III (C)**	**Grup IV(SC)**
SOD (Ü/mg pro) X ±SD	536,77±37,74	479,68±18,43 [a]	392,37±16,19 [a,b]	221,67±11,59[a,b,c]
GSH-Px (İÜ/mg pro) X ±SD	124,42±10,61	118,45±4,82	63,82±8,87[a,b]	58,01±4,04[a,b]
Katalaz (İÜ/mg pro) X ±SD	3247,48±275,52	3951,25±686,97[a]	2404,26±286,02[a,b]	4496,05±300,16[a,,b,c]
MDA (µmol/mg pro) X ±SD	10,38±0,95	10,07±1,04	22,32±2,52[a,b]	17,52±1,63[a,b,c]

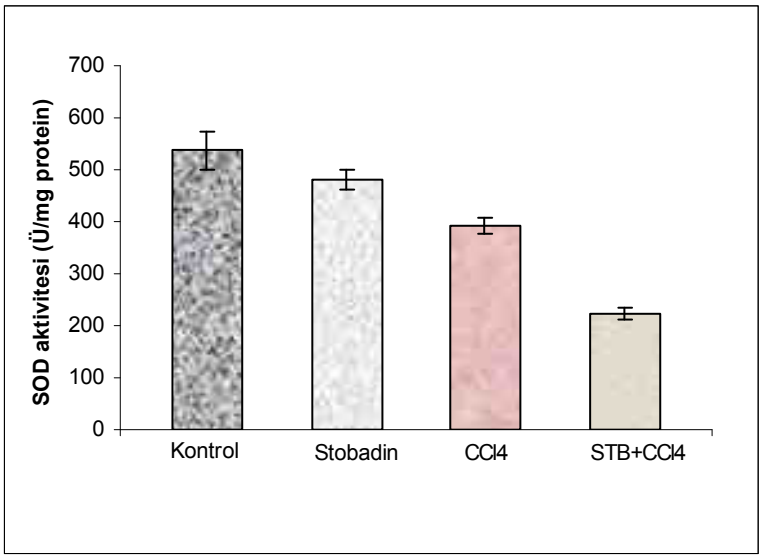
a: Grup I'in Grup II,III,IV ile karşılaştırılması ($p<0,05$)
b: Grup II'nin Grup III ve IV ile karşılaştırılması ($p<0,05$)
c: Grup III'ün Grup IV ile karşılaştırılması ($p<0,05$)
Grup I-Kontrol grubu
Grup II-Stobadin grubu
Grup III-CCl_4 grubu
Grup IV-Stobadin + CCl_4
$P<0.05$: istatistiksel olarak anlamlı



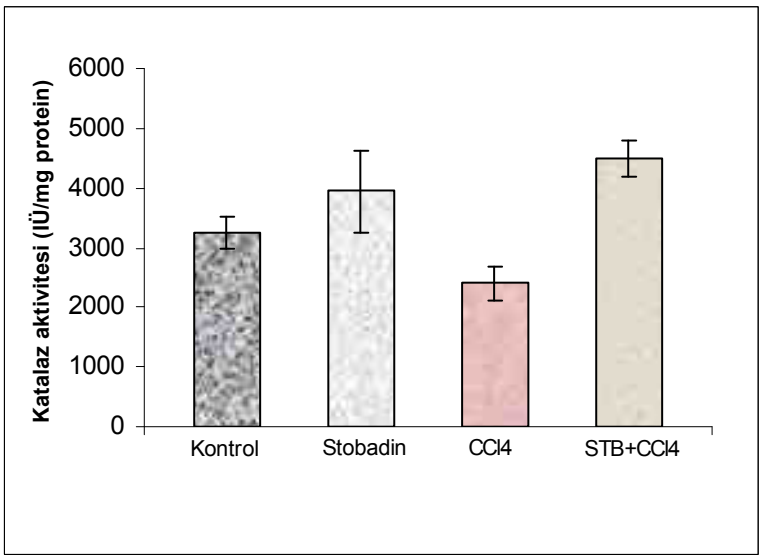
Grafik1: Karaciğer dokusu MDA (µmol / mg prot) düzeyleri (X±SD)



Grafik 2: Karaciğer dokusu GSH-Px (IÜ / mg prot) aktivitesi sonuçları (X ±SD)



Grafik 3: Karaciğer dokusu SOD (Ü / mg prot) aktivitesi sonuçları (X ±SD)



Grafik 4: Karaciğer dokusu katalaz (IÜ / mg protein) aktivitesi sonuçları (X ±SD)

Tablo 9 ve grafik 1-4 ‘den de görüldüğü gibi çalışmamızda CCl_4 ile siroz oluşturulan grupta kontrol grubuyla karşılaştırdığımızda; SOD, katalaz ve GSH-Px enzim aktiviteleri istatistiksel olarak anlamlı derecede azalırken ($p< 0.05$); MDA düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p< 0.05$). Stobadin + CCl_4 verilen grupta kontrol grubuyla karşılaştırdığımızda; SOD ve GSH-Px enzim

aktiviteleri istatistiksel olarak anlamlı derecede azalırken ($p<0.05$); katalaz enzim aktivitesi ve MDA düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$). Yalnız stobadin verilen grubu kontrol grubuyla karşılaştırdığımızda; SOD enzim aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı derecede azalırken ($p<0.05$); katalaz enzim aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$). Aynı grupta GSH-Px enzim aktivitesi ile MDA düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir ($p>0.05$). Yalnız stobadin verilen grubu CCl_4 grubuyla karşılaştırdığımızda; SOD, GSH-PX ve katalaz enzim aktiviteleri istatistiksel olarak anlamlı derecede azalırken ($p<0.05$); MDA düzeyi istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$). Yalnız stobadin verilen grubu Stobadin + CCl_4 grubuyla karşılaştırdığımızda SOD ve GSH-Px enzim aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı derecede azalırken ($p<0.05$); aynı grupta katalaz enzim aktivitesi ve MDA düzeyi istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$).

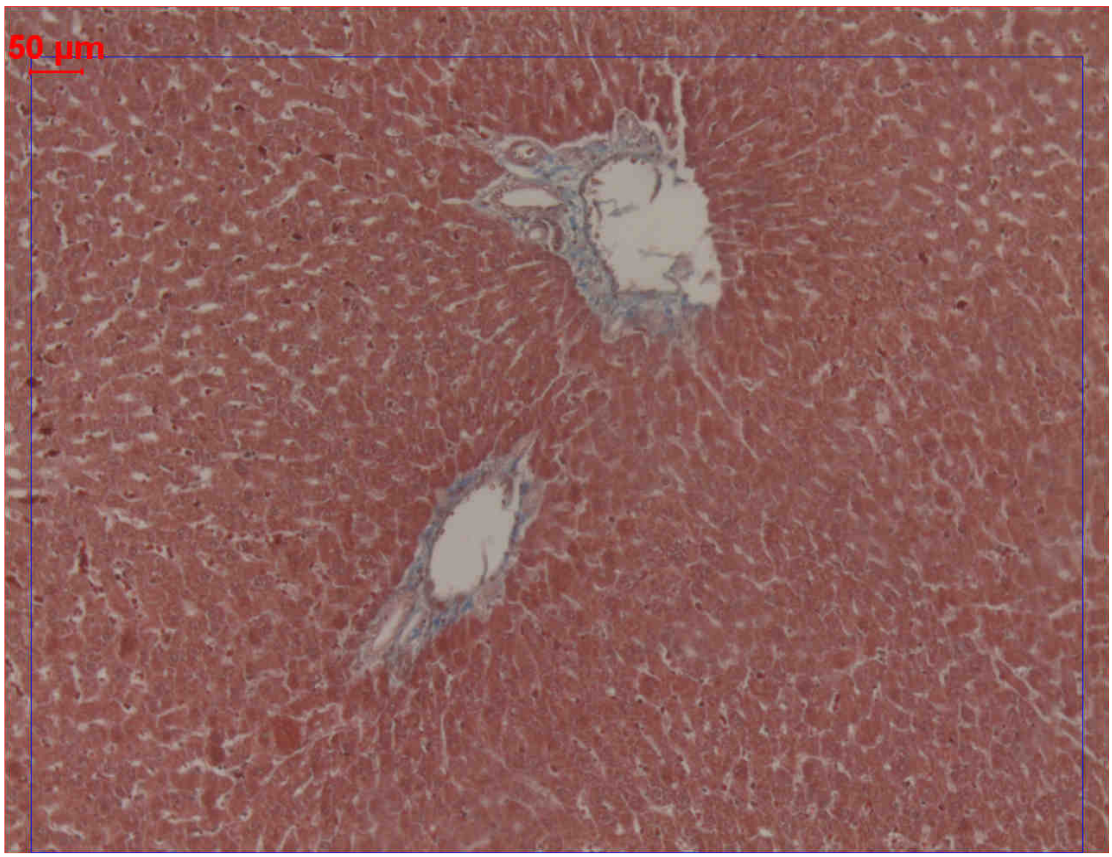
CCl_4 grubuyla Stobadin + CCl_4 grubunu karşılaştırdığımızda SOD enzim aktivitesi ve MDA düzeyi istatistiksel olarak anlamlı derecede azalırken ($p<0.05$); katalaz enzim aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$). Aynı grupta GSH-Px enzim aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir ($p> 0.05$).

4.2. Histopatolojik Bulgular

4.2.1. Masson-trikrom ile boyanmış karaciğer dokusu kesitleri

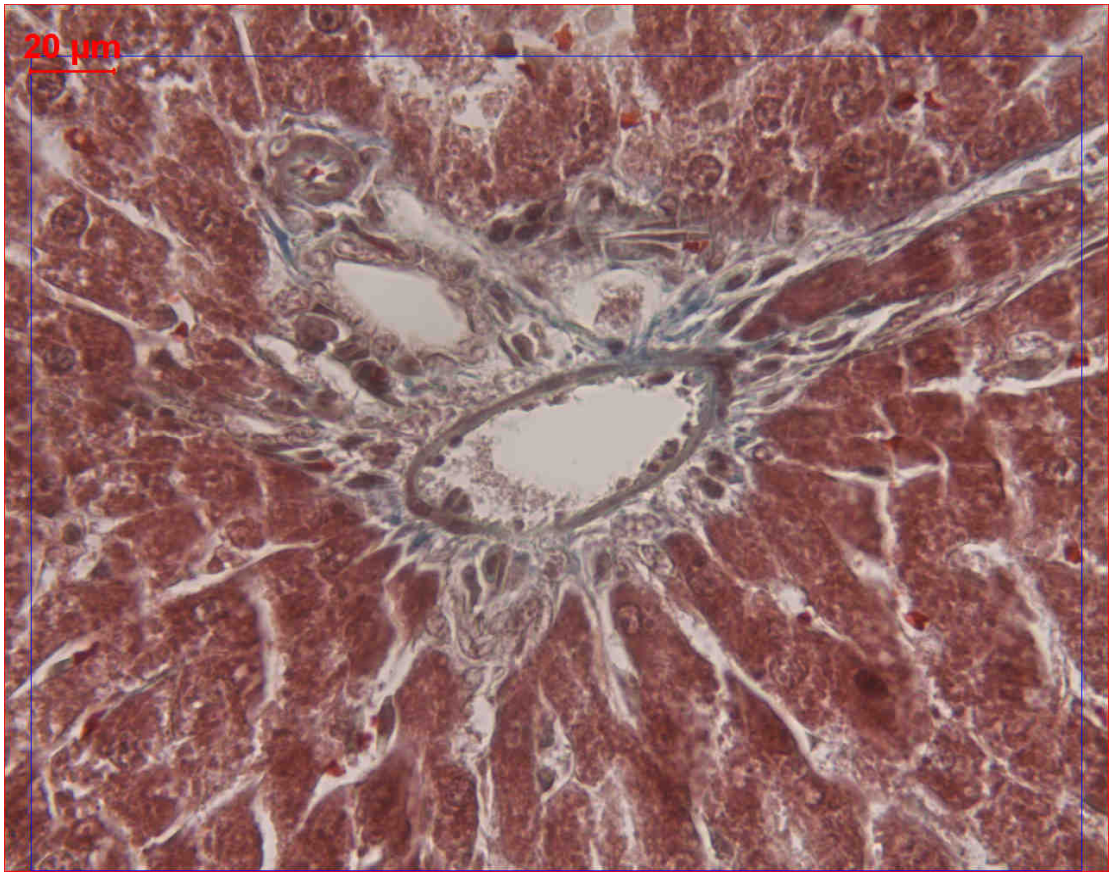
4.2.1.1. Kontrol Grubu (Grup I)

Kontrol grubuna ait masson-trikrom ile boyanmış kesitlerde; küçük büyültmede normal karaciğer lobül yapısı içinde ortada v.centralis ile çevresinde ışınsal şekilde düzenlenim gösteren karaciğer parankim hücreleri (hepatositler) ve aralarındaki karaciğer sinüzoidleri dikkati çekti (Resim-1).



Resim-1. Kontrol grubu. Ortada v.centralis ile çevresinde ışınsal düzenlenim gösteren hepatositler ve aralarındaki karaciğer sinüzoidleri (masson-trikrom , x 100).

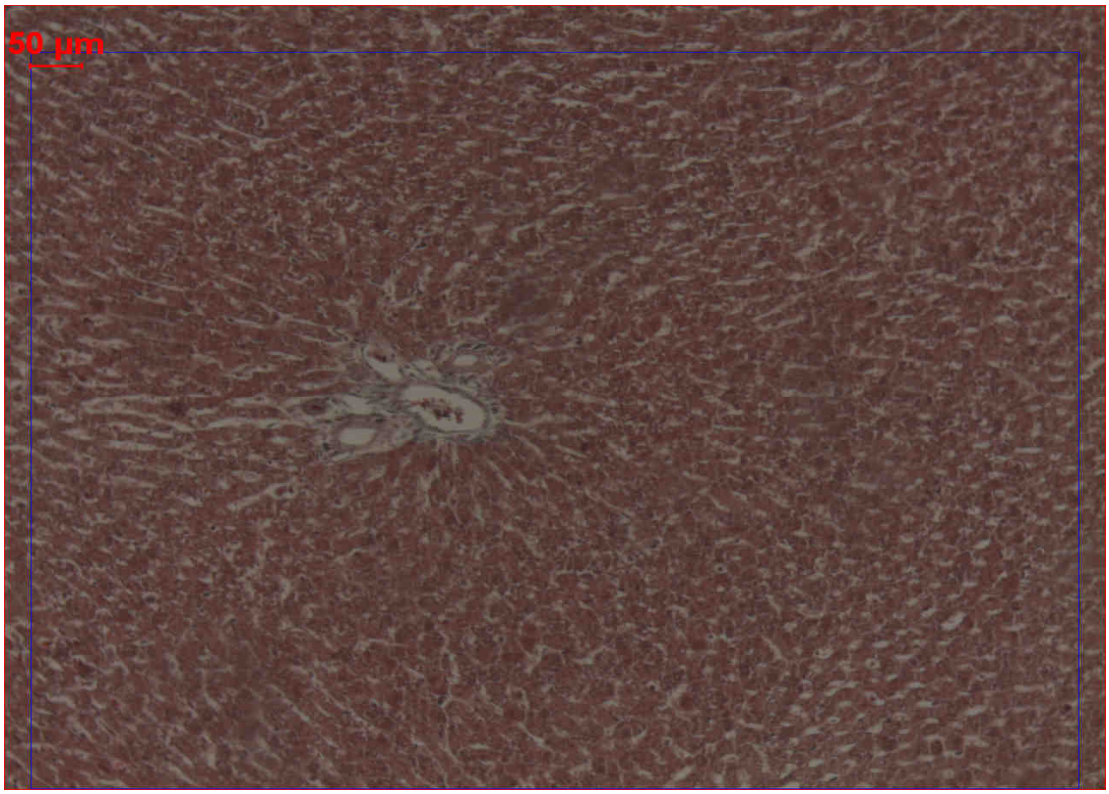
Büyük büyültmede; hepatositler poligonal şekilleri, yuvarlak ökromatik çekirdek yapıları ile seçildi. V. porta, a. hepatica'nın dalları ve safra kanalı ile çevresindeki kollajen liflerin düzenlenimi ve miktarlarında bir patoloji saptanmadı (Resim-2).



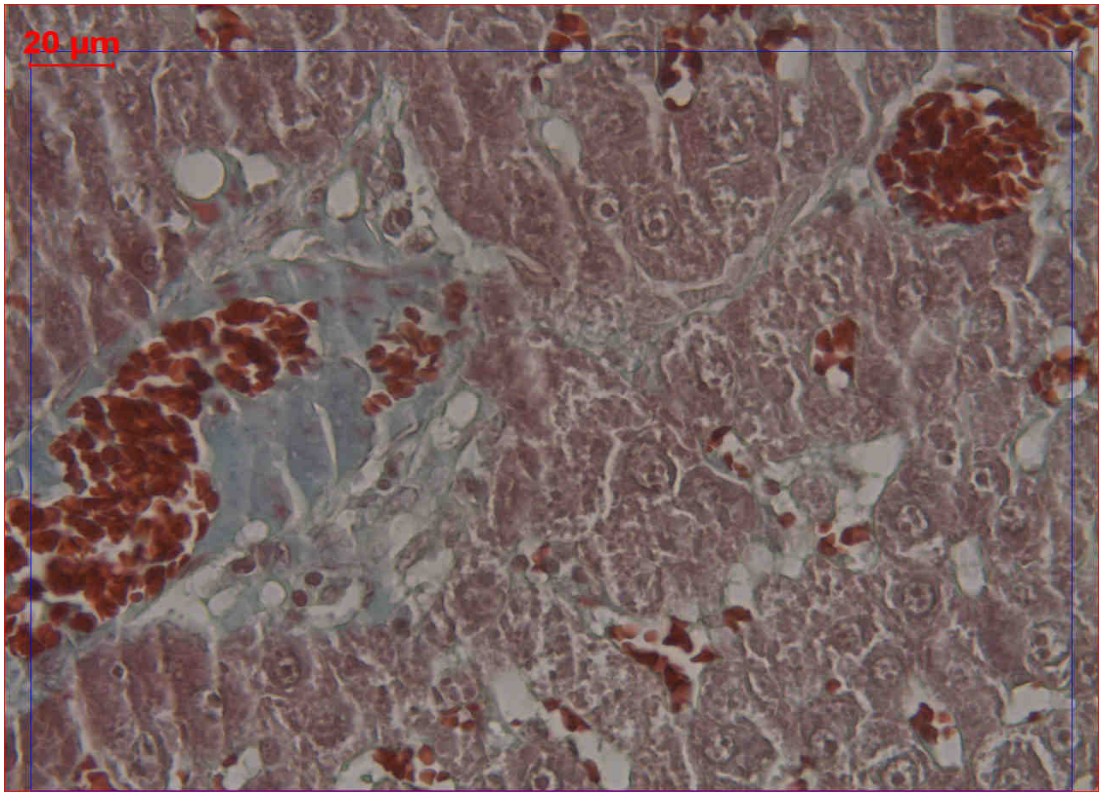
Resim-2. Kontrol grubu.V.porta,a.hepatica dalları,safra kanalı ve çevresindeki kollajen lifler (masson-trikrom , x 400).

4.2.1.2. Stobadin Grubu (Grup II)

Stobadin uygulanmış gruba ait masson-trikrom ile boyanmış kesitlerde; Küçük ve büyük büyültmede karaciğer parankim hücrelerinde, sinüzoidlerde, vasküler yapılarda kontrol grubuna yakın bir görünüm dikkati çekti (Resim 3-4).



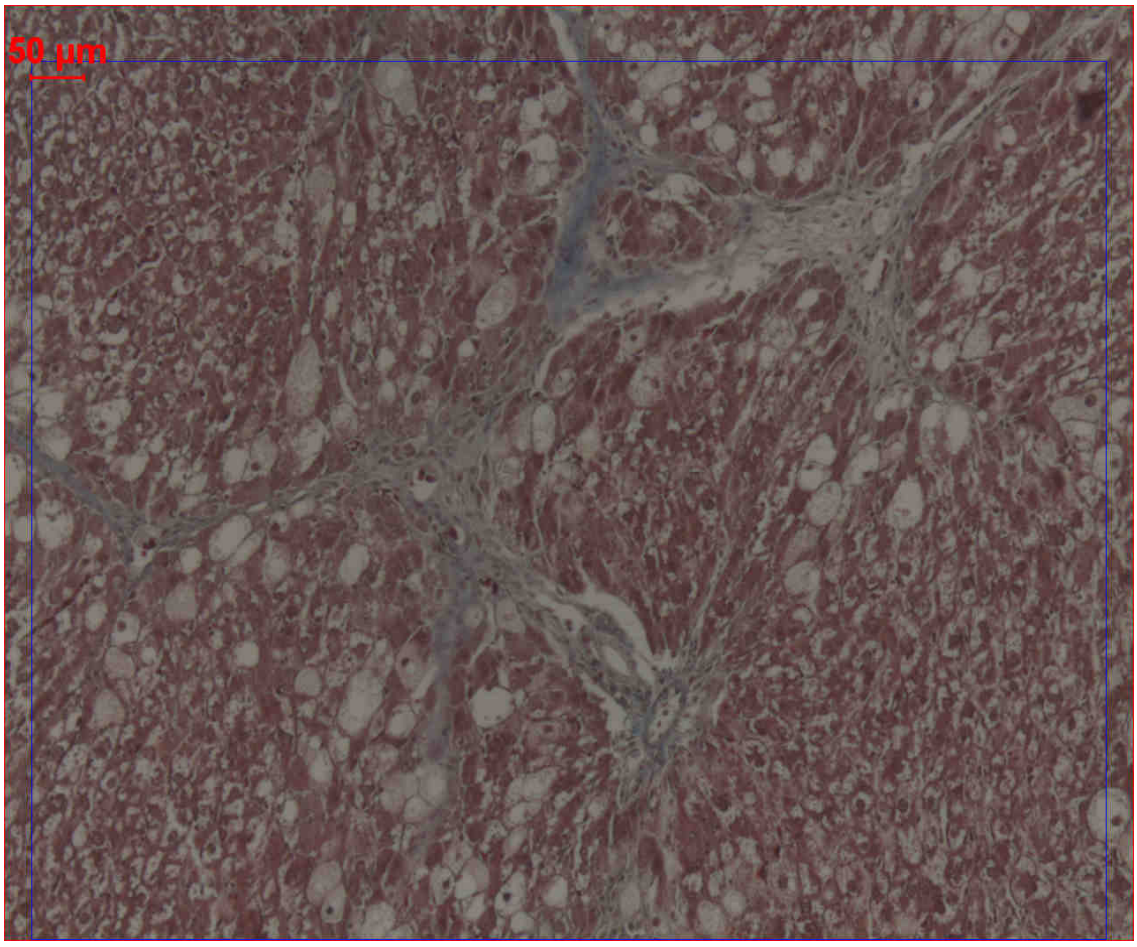
Resim-3. Stobadin grubu. Karaciğer parankim hücreleri, sinüzoidler ve vasküler yapılar (masson-trikrom x100).



Resim-4. Stobadin grubu. Karaciğer parankim hücreleri, sinüzoidler ve vasküler yapılar (masson-trikrom x400).

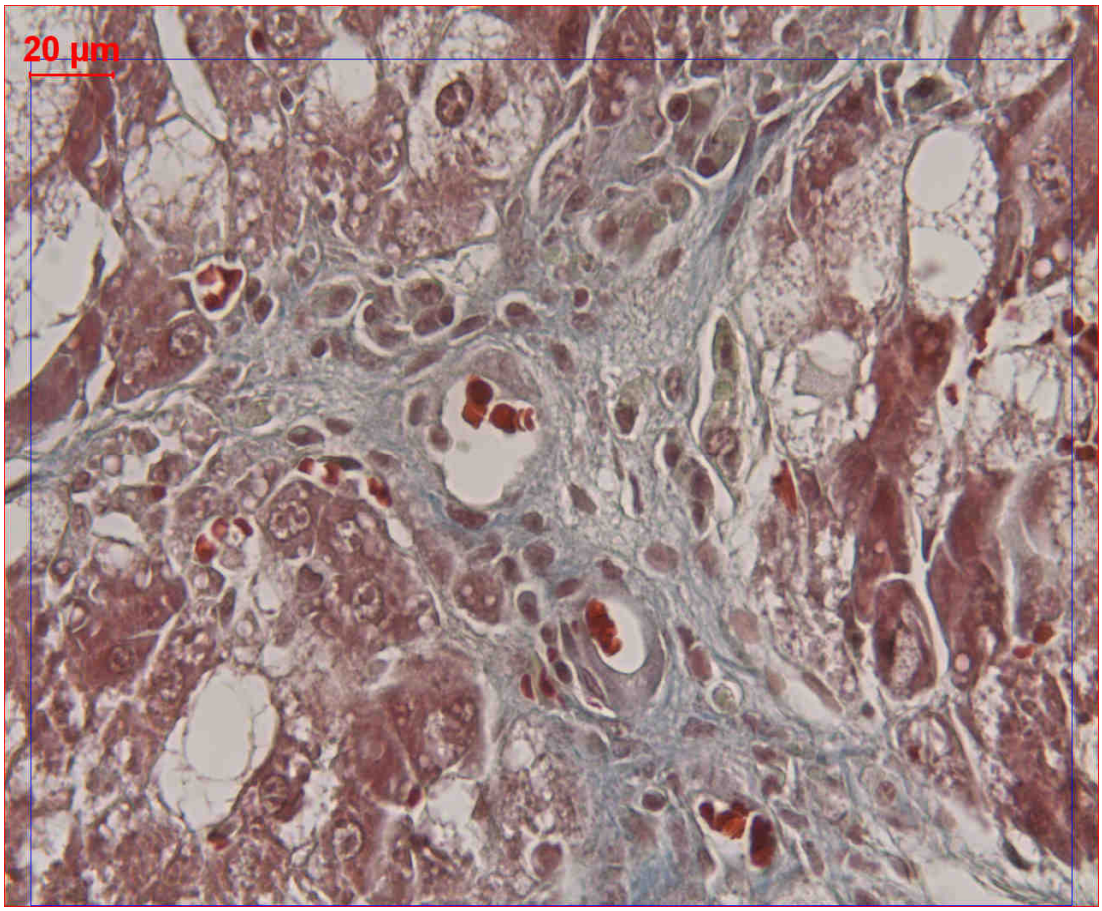
4.2.1.3. CCl_4 Grubu (Grup III)

CCl_4 uygulanmış gruba ait masson-trikrom ile boyanmış kesitlerde; küçük büyültmede karaciğer parankim hücrelerinin normal yapı ve şekillerini kaybettikleri, parankimal dokuda ileri derecede yağ nekrozunun geliştiği ve bunların çoğu yerde yağ vakuolleri şekline dönüştüğü dikkati çekti. Parankimal hücreler arasında fibrozisin ileri derecede arttığı, yer yer oluşan septumlar ile pseudolobül görünümünün oluştuğu saptandı (Resim-5).



Resim-5. CCl_4 Grubu. Normal yapı ve şekillerini kaybetmiş, karaciğer parankim hücreleri , nekroza giden hücrelerin yer yer yağ vakuollerine dönüşümü, ileri derecede fibrozis (masson-trikrom x100).

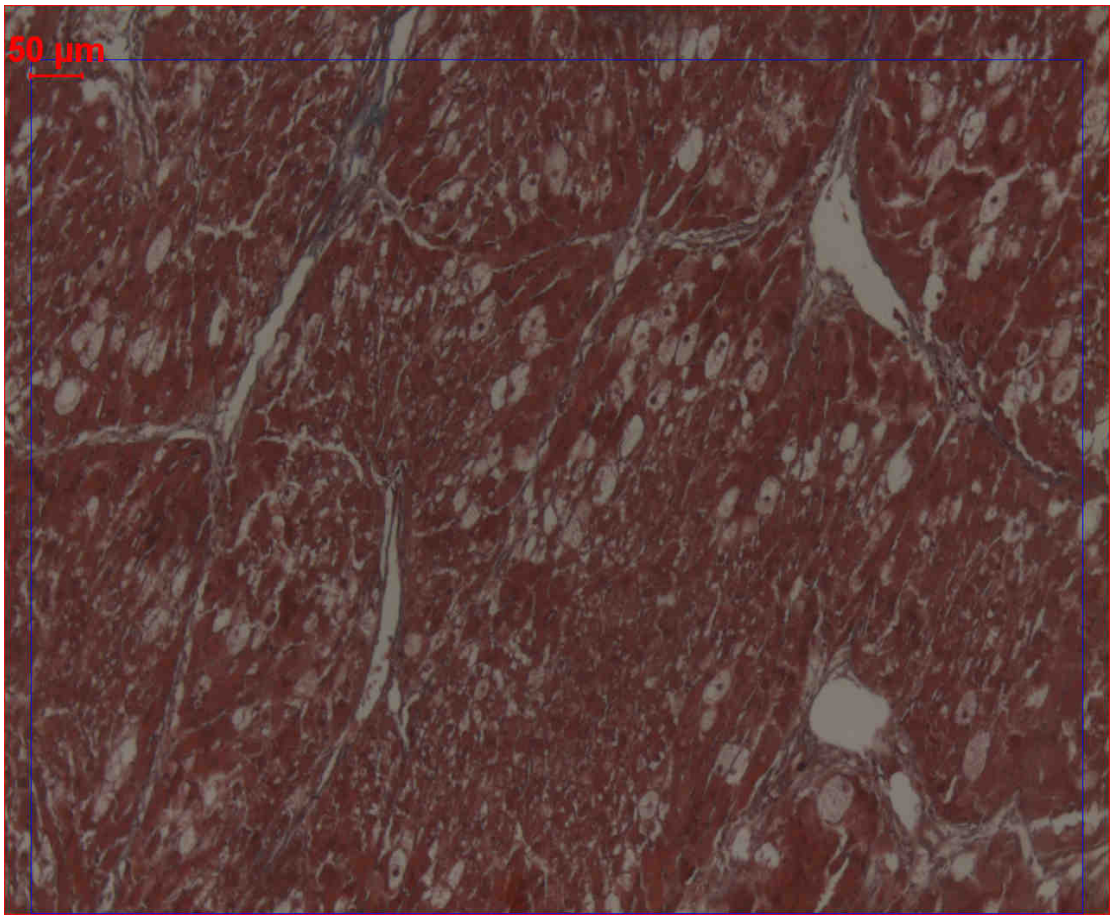
Büyük büyültmede; parankimal dokuda ileri derecede gelişen yağ nekrozunun yanısıra, bağ dokusu hücrelerinin proliferasyonu ve aşırı kollajen lif yapımı ile giden fibrozis belirlendi (Resim-6).



Resim-6. CCl_4 Grubu. İleri derecede yağ nekrozunun geliştiği, parankimal doku ve septum oluşumu ile giden fibrozis (masson-trikrom x400).

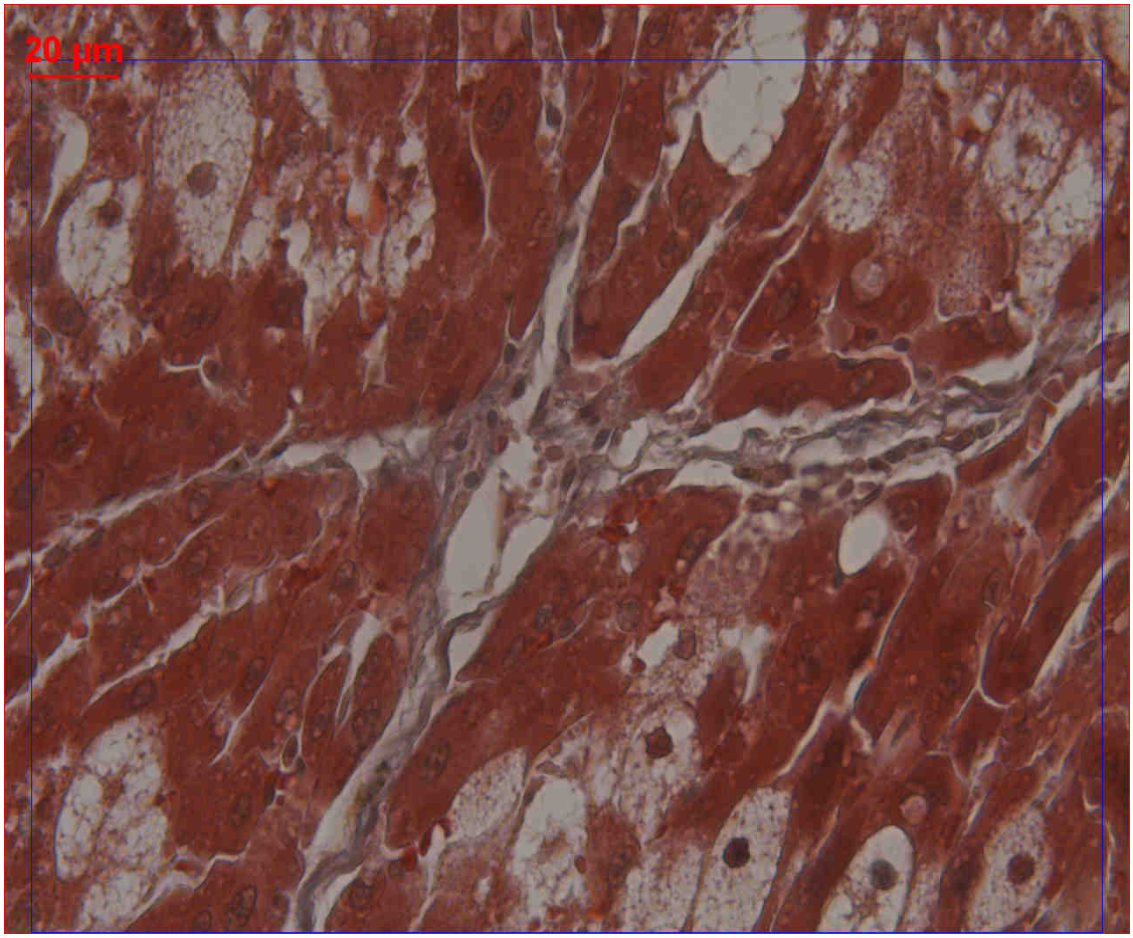
4.2.1.4. Stobadin + CCl_4 Grubu (Grup IV)

Hem Stobadin hem de CCl_4 uygulanmış gruba ait masson-trikrom ile boyanmış kesitlerde; küçük büyültmede CCl_4 uygulanmış gruba göre daha az oranda hücresel nekroz, yağ vakuolü oluşumu görüldü. Ancak fibrozis bulgularının devam ettiği dikkati çekti (Resim-7).



Resim-7. Stobadin + CCl_4 Grubu . CCl_4 Grubuna göre azalmış yağ nekrozu ve fibrozis (masson-trikrom x100).

Büyük büyültmede; poligonal şekilli, yuvarlak çekirdekli normal görünümdeki karaciğer parankim hücrelerinin yanısıra yağ nekrozunun görüldüğü hücreler ile CCl_4 uygulanmış gruba göre daha az oranda septal fibrozise rastlandı (Resim-8).



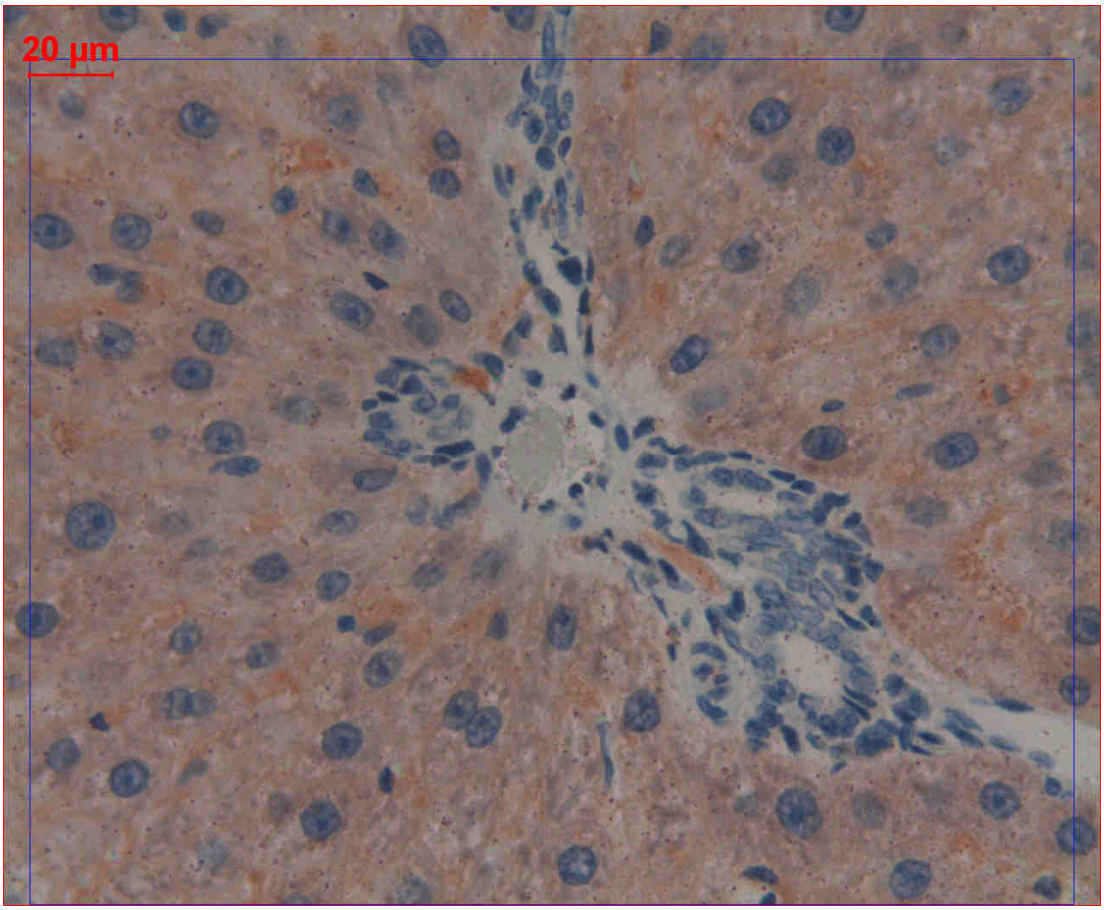
Resim-8. Stobadin + CCl_4 Grubu.Poligonal şekilli, yuvarlak çekirdekli karaciğer hücreleri ile beraber yağ nekrozuna giden hücreler.Az oranda fibrozis (masson-trikrom x400)**.**

4.2.2. İmmünhistokimyasal yöntemle boyanmış karaciğer dokusu kesitleri

Gruplar arasında; karaciğer fibrozisini karşılaştırmak amacıyla immünhistokimyasal yöntemle TGF-β_3 antikoru kullanılarak boyama yapıldı .

4.2.2.1. Kontrol grubu (grup I)

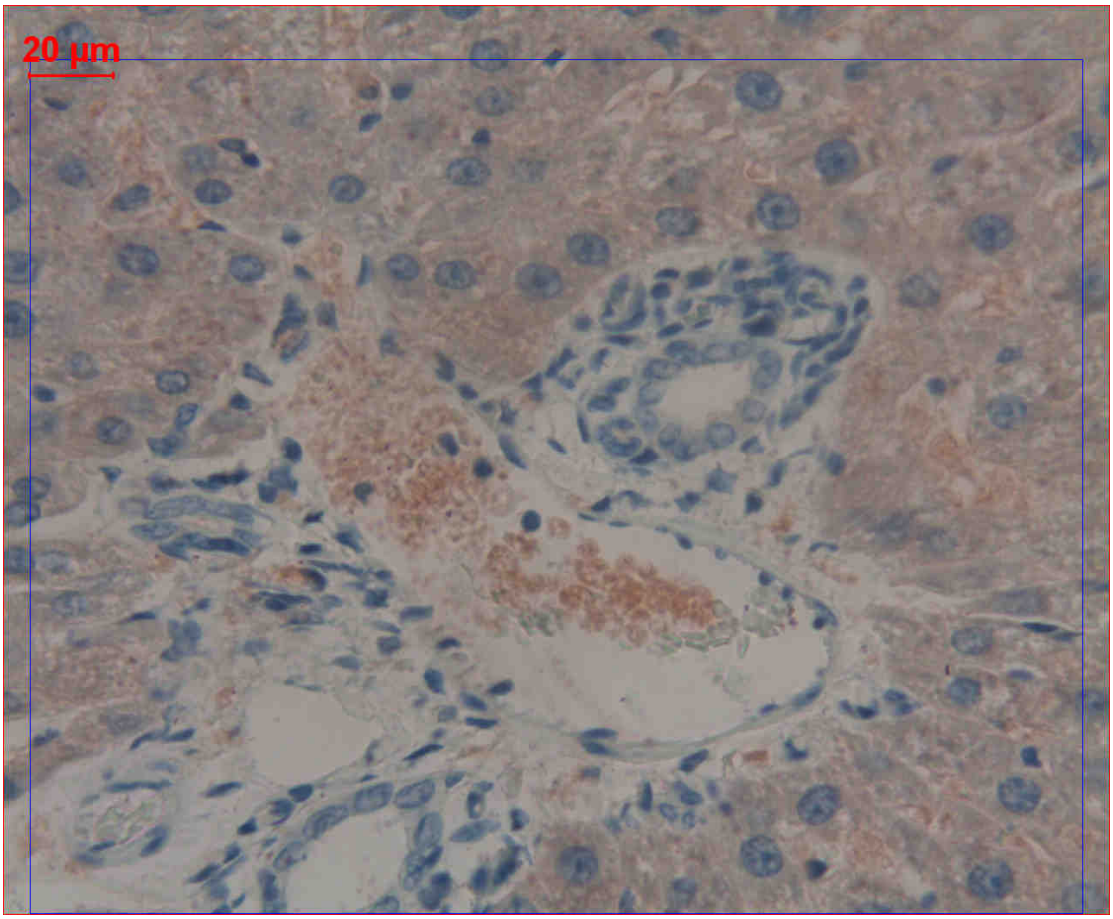
Yalnız stobadin uygulanan grupta olduğu gibi TGF-β_3 immün reaktivitesinin zayıf olduğu görüldü (Resim- 9) .



Resim-9. Kontrol grubu (Anti TGF-β_3 , x 400).

4.2.2.2. Stobadin grubu (grup II)

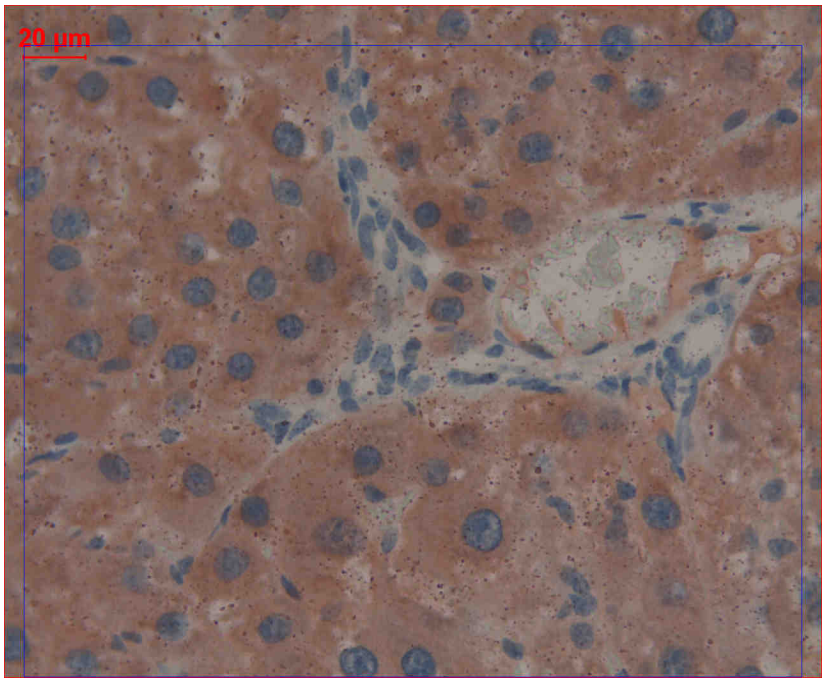
Grup III ve Grup IV'e göre TGF-β $_3$ immün reaktivitesinin zayıf olduğu görüldü (Resim- 10).



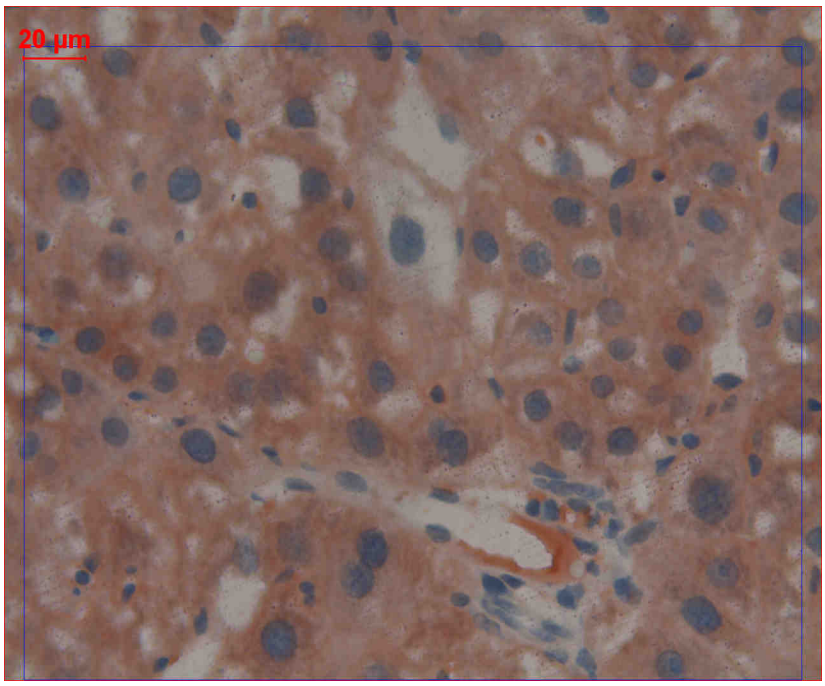
Resim-10. Yalnız stobadin uygulanan grup (Anti TGF-β $_3$, x 400).

4.2.2.3. CCl_4 grubu (grupIII)

Karaciğer parankim hücreleri ile septal yapılarda TGF-β_3 immünreaktivetisinin belirgin olarak arttığı dikkati çekti (Resim 11-12).



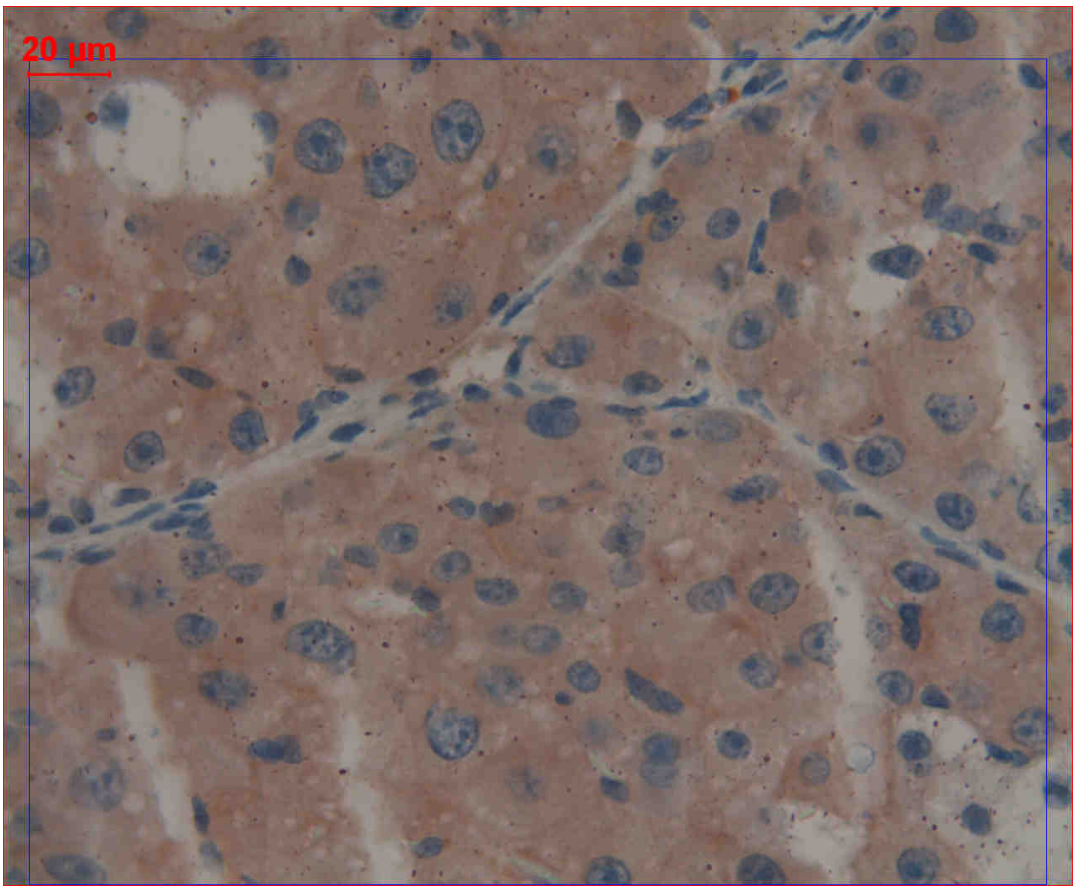
Resim-11. CCl_4 uygulanan grup (Anti TGF-β_3 , x 400).



Resim-12. CCl_4 uygulanan grup (Anti TGF-β_3 , x 400).

4.2.2.4. Stobadin + CCl_4 grubu (grup IV)

Stobadin + CCl_4 grubunda orta derecede TGF-β_3 immün reaktivitesi izlendi (Resim-13).



Resim-13. Stobadin + CCl_4 uygulanan grup (Anti TGF-β_3 , x 400).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Değişik kimyasal ajanlara bağlı olarak serbest radikal oluşumunun artışı; karaciğer hücrelerinde lipid peroksidasyonu ve buna bağlı olarak karaciğer fibrozisinin gelişmesine yol açabilmektedir.[148,196,157,51]

CCl_4; deneysel amaçlı olarak karaciğer fibrozisi geliştirmesi bakımından literatürde çok sık kullanılmaktadır.[11,86,184,119,107,187,87,5,190,183,,42,29,193] Karbon tetraklorür (CCl_4)'ün karaciğerde mitokondriyal monooksijenaz (P_{450} 2E1) sistemi tarafından metabolize edilmesi esnasında triklorometil ($CCl_3^{\cdot -}$) serbest radikali oluştuktan sonra lipidler ve proteinler ile kovalent bağlar oluşturarak hızla triklormetil peroksite ($CCl_3O_2^{\cdot -}$) veya hidrojen atomlarını kaybetmiş olan kloroform formuna dönüşür.[6,35,139] CCl_4 'ün metabolizması sonucu ortaya çıkan ($CCl_3^{\cdot -}$) ve ($CCl_3O_2^{\cdot -}$) serbest radikalleri toksisitesinden sorumlu tutulmaktadır.[4,140]

Serbest radikallerin ortaya çıkardığı doku hasarının tespiti, radikal hasarının engellenmesi veya ortadan kaldırılması amacıyla birçok antioksidan molekül denenmiştir.

CCl_4 'ün ortaya çıkardığı karaciğer harabiyetini önlemede izoflavonların önemli bir antioksidan olarak olumlu bir etki yaptığını gösteren literatürler bulunmaktadır.[11,86,184]

Yapısında major olarak flavonoid ve terpenoidleri içeren Gingko biloba ekstraktı (EgB761) uygulamasının, CCI_4 ile deneysel karaciğer hasarı oluşturulmuş ratlarda lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği rapor edilmiştir.[11] Yine ratlarda CCI_4 ile oluşturulan hepatoksisiteye karşı Ginseng bileşiklerinin de koruyucu antioaksidan özellikler gösterdiği rapor edilmiştir.[86]

Üstündağ B ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada; soy izoflavonların deneysel olarak oluşturulmuş CCI_4 hasarına bağlı olarak gelişen karaciğer

harabiyetini önlemede etkili olduğu, artmış olan lipid peroksidasyon ürünlerini azalttığı ve soy izoflavonların antioksidan özelliğe sahip paraoksonaz enzimini stimule edici etkisi olduğu gösterilmiştir.[184]

İzoflavonlar dışında başka antioksidan moleküllerinde CCl_4 kullanımına bağlı karaciğer toksisitesini engellediği belirtilmektedir.[190,183,42] Yapılan çalışmalarda profilaktik olarak E vitamini verilmesinin kronik CCl_4 uygulanmasıyla oluşan karaciğer hasarından ratları koruyacağı öngörülmektedir .[190,183] Erdoğan ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ratlarda CCl_4 ile oluşturulan akut karaciğer hasarı modelinde vitamin C ve vitamin E'nin karaciğer hasarını önleyici etkilerinin olduğunu biyokimyasal ve histopatolojik olarak göstermişlerdir.[42] Oksidatif stres sonucu açığa çıkan serbest oksijen radikallerine bağlı olarak hücresel hasarın; kanser, aterosklerotik kalp hastalıkları, karaciğer hastalıkları ve toksik hücre hasarlarında patogenezden sorumlu olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda CCl_4 uygulanmış ratlarda oksidatif stres ve karaciğerdeki kupffer hücre inaktivasyonunun karaciğer fibrozisinde önemli bir rol oynadığı görülmektedir.[119,107] Bu nedenle karaciğer fibrozisini engellemek amacıyla bazı antioksidan maddeler denenmiştir. Wang ve arkadaşlarının melatonin uygulaması ile CCl_4 uygulanmış ratlarda, karaciğerde fibrozisin gerilediğini ve antioksidan enzimler olan superoksid dismutaz (SOD) ile Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) düzeylerinde artış olduğunu rapor etmektedirler.[187] Bir başka çalışmada akut CCl_4 uygulamasında bakteri hücre duvarlarında ve bitki duvarlarında bulunan kitin yapısında katyonik bir polisakkarit olan Chitosan'ın lipid peroksidasyonu azalttığı, antioksidan enzimlerden SOD ve katalaz enzim aktivitelerini ise arttırdığı bildirilmektedir.[87]

Aneja ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, fitoöstrojenlerden Genistein ve daidzein uygulaması sonucunda CCl_4'e bağlı karaciğer hasarından; hepatik glutatyon-S transferaz ve antioksidan hepatik glutatyon aracılığı ile korunulduğu ve lipid peroksidasyonunun önlendiği rapor edilmektedir.[5]

Yapılan çalışmalarda CCl_4 kullanımına ve alkolik karaciğer hastalığına bağlı olarak karaciğer hasarı oluşumu sırasında ROS üretiminde meydana gelen aşırı artış ve buna bağlı olarak antioksidan enzimler olan SOD ve GSH-Px düzeylerinde

anlamlı azalmalar olmaktadır. Dolayısı ile antioksidan enzimler ile karaciğer hasarı, fibrozis ve lipid peroksidasyon düzeyleri arasında ters bir korelasyon olduğu gözlenmektedir.[22,138,192] Yılmaz ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada; CCl_4 ile siroz oluşturulmuş ratlarda GSH-Px ve G6PDH enzim düzeylerindeki düşmeye bağlı olarak süperoksit radikallerinin aşırı düzeyde biriktiğini ve serbest radikallerin siroz gibi karaciğer hastalıklarının patogenezinde rol oynayabileceğini göstermişlerdir.[192]

Artmış radikal seviyelerinin enzim aktiviteleri üzerine olan negatif etkisi; antioksidan enzim düzeylerinin baskılanmasıyla ilişkilendirilmiştir.[22,138]

Yine yapılan çalışmalarda radikal hasarının bir göstergesi olan lipid peroksidasyonu artmış MDA seviyeleri ile açıklanmaktadır. CCl_4 kullanımına bağlı olarak ortaya çıkan lipid peroksidasyonu, artmış MDA seviyeleriyle pozitif korelasyon göstermektedir.[29,128,145]

Cluet ve arkadaşlarının ratlara deneysel olarak 3 gün süreyle fenobarbiton ve CCl_4 verildiginde CCl_4'ün alken (etan, pentan) salgısına yol açtığını, fakat fenobarbitonun endojen lipid peroksidasyon da etkili olmadığını bulmuşlardır. Fenobarbiton ve CCl4 kombine etki ile ratlarda karaciger sirozuna neden olmaktadır. Her iki ksenobiyotik; hepatik antioksidan enzimler olan katalaz ve GSH-Px enzim aktivitelerini baskılamıştır.[29]

CCl_4'e maruz kalan rat hepatositlerinde MDA oluşumu artar ve karaciğerde yağlı dejenerasyonla birlikte sentrilobüler nekroz gözlenir.[128] Sirozda oluşan lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzimlerde olan değişikliklerin karaciğerde meydana gelen hasarın derecesine bağlı olduğu ileri sürülmektedir. Recknagel; CCl_4'ün yol açtığı karaciğer hasarının genellikle karaciğer mikrozomlarındaki lipid peroksidasyonuna bağlı olduğunu bildirmiştir.[145]

Literatürde yapılan birçok çalışmada değişik modeller kullanılarak Stobadin'in antioksidan etkisi araştırılmıştır.[80,126,76,77,78,79,100,174,108,82,182,133,81,170,32] Stobadin düşük toksisitesi, hidroksil, peroksil, alkoksil radikallerini süpürücü ve singlet oksijeni baskılayıcı etkisi sebebiyle oksidatif stresle ilgili birçok hayvan çalışmasında kullanılmıştır.[90,168] Literatürde Stobadin'in diabetik rat modellerinde

diabet ile ortaya çıkan radikal hasarını engellemede antioksidan olarak kullanıldığını görmekteyiz. Stobadin'in lipid peroksidasyonu üzerine olan etkileriyle ilgili yeterli çalışma bulunmamakla birlikte alloksan ve streptozotosin ile oluşturulan diabet modellerinde stobadinin diabette gelişen hiperglisemiyi baskıladığı ve protein glikasyonunu engellediği gösterilmiştir.[61,99,170] Jang Y.Y ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada; lipid peroksidasyonunun göstergesi olan malondialdehid düzeylerini streptozotosin ile diabet oluşturulmuş ratların karaciğer ve böbrek dokularında kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır.[85]

Ulusu ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada; diabetik ratların beyin ve kalp dokularında MDA düzeylerini kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulmuşken; böbrek dokusunda anlamlı bir artış gözleyememişlerdir. Aynı çalışmada stobadin uygulanmış ratlarda MDA düzeyleri her üç dokuda da anlamlı derecede azalmış bulunmuştur.[181]

Çalışmamızda; CCl_4 kullanımının ortaya çıkardığı fibrotik-sirotik proçes hem antioksidan enzim seviyeleriyle takip edilmeye çalışılmış hem de histopatolojik ve immünhistokimyasal boyama teknikleriyle değerlendirilmiştir. CCl_4'nün neden olduğu radikal hasarının engellenmesi amacıyla yeni bir antioksidan molekül olan Stobadin kullanılmıştır.

CCl_4 kullanımına bağlı olarak ortaya çıkan serbest radikal hasarının engellenmesi amacıyla stobadin'in antioksidan olarak kullanıldığı bir literatür çalışmasına rastlanılmamıştır. Bu açıdan çalışmamız Stobadin'in CCl_4'ün oluşturduğu radikal hasarı üzerine etkisini araştıran ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır. Çalışmamızda CCl_4 verilen grup kontrol grubuyla karşılaştırıldığında SOD, GSH-Px ve katalaz enzim aktiviteleri anlamlı derecede baskılanırken; MDA seviyeleri anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu sonuç CCl_4 kullanımının ortaya çıkardığı aşırı radikal üretiminin antioksidan enzimler üzerindeki negatif etkisini göstermektedir. Bu baskılanma sonucu MDA artışı ise antioksidan enzim düzeylerinin baskılanması ve artan lipid peroksidasyonuyla pozitif bir korelasyon göstermektedir. CCl_4 türevi radikallerin aşırı artışı organizmada oksijen türevi radikallerinde birikimine yol açabilir. Oksijen türevi radikallerin birikimi; süperoksit

radikali ve hidroksil radikaline kaynak sağlayan hidrojen peroksitin artışına ve bunlara bağlı oluşan MDA seviyelerinin artışına yol açmış olabilir. MDA seviyelerinin artışı karaciğer hücrelerindeki aşırı lipid peroksidasyonunun bir göstergesidir. Bu biyokimyasal sonuçları destekleyen en önemli bulgu CCl_4 grubunda masson-trikrom boyama ile yapılan histopatolojik çalışma sonuçlarıdır. CCl_4 grubundaki histopatolojik sonuçlara göre; karaciğer parankimal dokudaki yağ nekrozu ve aşırı kollajen lif yapımı ile giden septal fibrozis enzimatik çalışmalarımızı ve MDA sonuçlarımızı açıklayıcı mahiyettedir (resim 5-6).Yine çalışmamızda TGF β_3 antikoru kullanılarak yapılan immünhistokimyasal boyamada karaciğer parankim hücreleri ile septal yapılarda TGF-β_3 immünreaktivitesinin belirgin olarak artışı biyokimyasal sonuçlarımızı destekleyen diğer bir bulgudur (resim 11-12). Çalışmamızın sonuçları CCl_4 kullanımının ortaya çıkardığı radikalik hasarı hem enzimatik hem de histopatolojik açıdan göstermesi bakımından değer taşımaktadır.

Çalışmamızda kullanılan Stobadin'in CCl_4 kullanımının ortaya çıkardığı radikal hasarı üzerine olan etkisini değerlendirdiğimizde; Stobadin + CCl_4 uygulanan grupta kontrol grubuyla karşılaştırdığımızda; SOD ve GSH-Px enzim aktiviteleri baskılanmış, katalaz enzim aktivitesinin arttığı gözlenmiştir. Stobadin + CCl_4 uygulanan grupta SOD ve GSH-Px enzim aktivitelerindeki baskılanma CCl_4 uygulanan gruba göre değerlendirildiğinde; SOD'da daha şiddetli iken GSH-Px için istatistiksel olarak anlamlı değildir. Buna karşılık Stobadin + CCl_4 uygulanan grupta katalaz enzim aktivitesi CCl_4 uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. MDA için çalışma sonuçlarımızı değerlendirdiğimizde; Stobadin + CCl_4 uygulanan grupta kontrol grubuna göre MDA seviyeleri yüksek iken CCl_4 uygulanan gruba göre düşük olduğu gözlenmektedir. Stobadin + CCl_4 uygulanan grupta MDA seviyelerinin kontrol grubuna göre yüksek; CCl_4 uygulanan gruba göre ise düşük olmasının sebebi Stobadin + CCl_4 uygulanan grupta SOD ve GSH-Px enzim aktivitelerinin baskılanmasına rağmen katalaz enzim aktivitesinin artışıyla ilişkili olabilir. Artan katalaz enzim aktivitesi MDA seviyelerini kontrol grubu değerlerine çekememesine rağmen CCl_4 uygulanan gruba göre bir koruma sağlamıştır. Bu bulgularımız histopatolojik çalışma sonuçlarıyla da uyumluluk göstermektedir. Hem Stobadin hem de CCl_4 uygulanmış grubun masson-trikrom boyama ile yapılan histopatolojik çalışma sonuçlarında; CCl_4 uygulanmış

gruba göre daha az oranda hücresel nekroz,yağ vakuolü oluşumu ve septal fibrozise rastlanılmıştır (resim 7-8). TGF β_3 antikoru kullanılarak yapılan immünhistokimyasal boyamada; CCl_4 uygulanmış gruba göre TGF-β_3 immünreaktivitesinde bir azalma tespit edilmiştir (resim-13). Histopatolojik sonuçlar enzimatik sonuçlarımızı destekler niteliktedir.

Çalışmamızda yalnız Stobadin verilen gruptaki sonuçlara baktığımızda; Stobadin verilen grubu kontrol grubuyla karşılaştırdığımızda; SOD enzim aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı derecede azalırken; katalaz enzim aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır. Aynı grupta GSH-Px enzim aktivitesi ile MDA düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir . Stobadin verilen grubu CCl_4 grubuyla karşılaştırdığımızda; SOD, GSH-PX ve katalaz enzim aktiviteleri istatistiksel olarak anlamlı derecede azalırken; MDA düzeyi istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır. Stobadin verilen grubu Stobadin + CCl_4 grubuyla karşılaştırdığımızda SOD ve GSH-Px enzim aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı derecede azalırken aynı grupta katalaz enzim aktivitesi ve MDA düzeyi istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır. Stobadin uygulanmış grubun masson-trikrom boyama ile yapılan histopatolojik çalışma sonuçlarında karaciğer parankim hücrelerinde, sinüzoidlerde, vasküler yapılarda kontrol grubuna yakın bir görünüm dikkati çekmiştir (resim 3-4). TGF β_3 antikoru kullanılarak yapılan immünhistokimyasal boyamada; yalnız CCl_4 uygulanmış ve hem Stobadin hem de CCl_4 uygulanmış gruba göre TGF-β_3 immün reaktivitesinin zayıf olduğu görülmüştür (resim 10). Bu bulgu bize Stobadin'in tek başına kullanımı esnasında ortaya çıkan enzim aktivite değerlerindeki değişikliğin histopatolojik olarak kontrol grubuna göre bir farklılık ortaya çıkarmadığını göstermektedir. Stobadin'in SOD enzim aktivitesini azaltması H_2O_2 oluşumunun azalmasına yol açarken; kontrol grubuna göre GSH-Px enzim aktivitesinin aynı kalması; buna karşılık CAT enzim aktivitesinin artması, MDA seviyelerinin kontrol grubuna göre değişmemesi ve Stobadin'in tek başına kullanımının histopatolojik olarak kontrol grubuna yakın bir sonuç vermesi; enzimatik sonuçlar ve MDA değerleriyle uyum halindedir. Buna karşılık Stobadin'in CCl_4 kullanımının ortaya çıkardığı histopatolojik değişimleri ortadan kaldırmadığı gözlenmektedir. Stobadin +CCl_4 verilen grupta kontrol grubuna göre GSH-Px aktivitesinin baskılanması çalışmamız açısından çok anlamlıdır.

Özellikle Stobadin'in katalaz enzim aktivitesi üzerine olan pozitif etkisi kinetik olarak da incelenmesi gereken bir konu olabilir. Çalışmamızda Stobadin + CCl_4 uygulanan grupta katalaz enzim aktivitesinin artışına rağmen ciddi lipid peroksidasyonu ve histopatolojik değişikliklerin gözlenmesi hidrojen peroksitin katalizinde GSH-Px'in daha önemli olduğu sonucuna ulaşmamızı sağlamıştır. Glutatyon peroksidaz eritrositlerde oksidatif strese karşı en etkili antioksidan olup hidrojen peroksit ve lipid peroksitlein redüksiyonunu katalizleyen bir enzimdir. GSH-Px aktivitesindeki azalma hidrojen peroksit düzeylerinin yükselmesine ve hücre hasarına yol açmaktadır.[29,128] Yılmaz ve arkadaşlarınınnın yaptıkları bir çalışmada CCl_4 kullanımına bağlı toksisitenin ortadan kaldırılmasında GSH-Px'in önemli olduğu sonucuna varılmaktadır.[193] Hidrojen peroksit yüksüz olması nedeniyle hücre içine kolaylıkla girebilir. H_2O_2 bir radikal olarak kabul edilmese de organizmada hidroksil radikalinin en önemli kaynağıdır. GSH-Px ve katalaz H_2O_2'in katalizinde önemli olan iki enzimdir. Çalışmamızdaki bulgular bize yüksek seviyedeki H_2O_2 oluşumu durumunda GSH-Px'in baskılanmasının ciddi hasarlara yol açabileceğini göstermektedir. CCl_4 'ün metabolizması sonucu ortaya çıkan ($CCl_3^{\cdot}$) ve ($CCl_3O_2^{\cdot}$) serbest radikallerinin yanısıra hücre içinde ortaya çıkan aşırı hidroksil radikali oluşumu da CCl_4 kullanımına bağlı olarak ortaya çıkan hasardan sorumlu olabilir. Çalışmamızın değişik hayvan modelleri ve antioksidanlar ile genişletilmesinin bu metabolizmanın anlaşılmasına katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

6. ÖZET

Çalışmamızda; CCl_4 ile deneysel olarak siroz oluşturulan rat karaciğer dokularında oksidatif stres ve lipid peroksidasyonunu incelemek için malondialdehid (MDA) seviyeleri ve radikal metabolizmasında koruyucu role sahip antioksidan enzimlerden süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (CAT) enzim aktiviteleri çalışılarak, oluşturulmaya çalışılan fibrozis üzerine güçlü bir antioksidan olan Stobadin'in etkisi incelendi.

Çalışmamızda yaklaşık 250-300 gr ağırlığında, wistar albino cinsi toplam 40 adet erkek rat kullanıldı. Ratlar; Grup I- Kontrol (K), Grup II -Stobadin grubu (S) , Grup III -CCl_4 (C) ve Grup IV-Stobadin+ CCl_4 (SC) olmak üzere 4 eşit gruba bölündü. Siroz oluşumu CCl_4 'ün 8 hafta boyunca artan dozlarda intraperitoneal olarak verilmesiyle; Stobadin tedavisi 8 hafta boyunca oral olarak 24.7mg/kg/gün stobadin verilerek yapıldı. Tüm parametreler spektrofotometrik olarak çalışıldı.

Çalışmamızda CCl_4 ile siroz oluşturulan grupta kontrol gubuyla karşılaştırdığımızda; SOD, KAT ve GSH-Px enzim aktiviteleri istatistiksel olarak anlamlı derecede azalırken ($p< 0.05$); MDA düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$). Aynı zamanda histopatolojik olarak CCl_4 grubunda ciddi fibrotik değişiklikler gözlenmiştir. Stobadin + CCl_4 verilen grubu kontrol grubuyla karşılaştırdığımızda SOD ve GSH-Px enzim aktiviteleri istatistiksel olarak anlamlı derecede azalırken ($p<0.05$) ; KAT enzim aktivitesi ve MDA düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$). Stobadin +CCl_4 grubunda histopatolojik olarak CCl_4 grubuna göre bir düzelme olmasına rağmen; aynı grubu kontrol grubuyla karşılaştırdığımızda karaciğer hasarının devam ettiği gözlenmektedir. Yalnız stobadin verilen grubu kontrol grubuyla karşılaştırdığımızda; SOD enzim aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı derecede azalırken ($p<0.05$); CAT enzim aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$). Aynı grupta GSH-Px enzim aktivitesi ile MDA düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik

gözlenmemiştir ($p>0.05$). Yalnız stobadin verilen grubu CCl_4 grubuyla karşılaştırdığımızda; SOD, GSH-Px ve KAT enzim aktiviteleri istatistiksel olarak anlamlı derecede azalırken ($p<0.05$); MDA düzeyi istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$). Yalnız stobadin verilen grubu Stobadin + CCl_4 grubuyla karşılaştırdığımızda SOD ve GSH-Px enzim aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı derecede azalırken ($p<0.05$); aynı grupta KAT enzim aktivitesi ve MDA düzeyi istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$).

CCl_4 grubuyla Stobadin + CCl_4 grubunu karşılaştırdığımızda SOD enzim aktivitesi ve MDA düzeyi istatistiksel olarak anlamlı derecede azalırken ($p<0.05$); KAT enzim aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$). Aynı grupta GSH-Px enzim aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir ($p> 0.05$).

Çalışmamızda Stobadin + CCl_4 uygulanan grupta katalaz enzim aktivitesinin artışına rağmen ciddi lipid peroksidasyonu ve histopatolojik değişikliklerin gözlenmesi hidrojen peroksitin katalizinde GSH-Px'in daha önemli olduğu sonucuna ulaşmamızı sağlamıştır.

7. SUMMARY

In this study, a rat model of CCl_4 -induced experimental cirrhosis was used in rats to examine the level of MDA in order to investigate the oxidative stress and lipid peroxidation. Levels of SOD GSH-Px, CAT enzymes, which prevent free radical injury, were also measured to investigate the effect of stobadinin which is a strong antioxidant.

Forty male Wistar-albino rats weighing approximately 250-300 grams were used in the study. The rats were divided into 4 groups: group 1-control (K), group 2-stobadin (S), group 3- CCl_4,(C) and group 4-stobodin+ CCl_4 (SC).

Cirrhosis was achieved by giving CCl_4 intraperitionealy in sequentially increasing doses. Stobadin treatment was applied orally at a dose of 24.7 mg/kg/day over an 8 week period. All the parameters were measured by using a spectrophotometer.

When compared to the control group, while SOD, CAT and GSH-Px enzyme activities decreased statistically significantly ($p<0.05$), levels of MDA increased statistically significantly ($p<0.05$).

When compared to the control group, while SOD and GSH-Px activities statistically significantly decreased ($p<0.05$), CAT enzyme activity and levels of MDA increased statistically significantly ($p<0.05$) in the group that was given CCl4+Stobadin.

When the group that was only given stobadin was compared to the control group, SOD enzyme activity statistically significantly decreased ($p<0.05$) while CAT enzyme activity statistically significantly increased ($p<0.05$). No statistically significant changes were observed in GSH-Px enzyme activity and levels of MDA in the same group ($p>0.05$).

When we compared the group that was only given stobadin with CCl_4 group, SOD GSH-Px and CAT enzyme activities statistically significantly decreased ($p<0.05$) and the level of MDA statistically significantly increased ($p<0.05$).

When we compared the group that was only given stobadin with stobadin+CCl4 group, SOD, GSH-Px and enzyme activities statistically significantly decreased ($p<0.05$) and the CAT enzyme activity and the level of MDA statistically significantly increased ($p<0.05$).

When we compared the group that was only given CCl_4 with stobadin + CCl4 group, SOD enzyme activity and the level of MDA statistically significantly decreased ($p<0.05$) and CAT enzyme activity statistically significantly increased ($p<0.05$).

In the same group, no statistically significant changes were observed in GSH-Px enzyme activity ($p>0.05$).

We suggested that GSH-Px enzyme more important antioxidant enzyme in this study compared with catalase enzymes levels because of GSH-Px activities supressed; but CAT activities increased in group stobadine +CCl_4

The severe fibrosis was observed in histopathological differences in group CCl_4

In group stobadine +CCl_4; when compared to CCl_4 group and control group; there was a statistically significant improvement was observed althought there wasn't any compared to control group.

8. KAYNAKLAR

1. Adachi Y., Honi K., Takahashi Y., Serum GST activity in liver disease., Clin. Chim. Acta. 106: 243-255, 1990.

2. Aebi H., Catalase, In: H.U.Bergmeyer, (Ed): Methods of Enzymatic Analysis, Academic Press, New York and London, pp: 673-677, 1974.

3. Agarwal R., Chase S.D., Rapid fluorimetric-liquid chromatographic determination of malonaldehyde in biological samples, J. Chromatogr. B., 775:121-126, 2002.

4. Akkus I., Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, 1.Baskı, Mimoza Yayınları, Konya, 13-19, 1995.

5. Aneja R., and Upadhyaya G., Ameliorating effect of Phtoestrogens on CCl_4-induced oxidative stres in the livers of male wistar rats, Artificial Cells, Blood substitues and Biotechnology, 201-213, 2005.

6. Arii S., Monden K., Hai S., Sasaoki T., Adachi Y., Funaki N., Higashitsuji H.,Tobr T., Depressed function of kupffer cells in rats with CCl_4 –induced liver cirrhosis, Res. Exp. Med., 190:173-182, 1990.

7. Armbrust T., Batusic D., Ringe B. and Ramadari G, Mast Cells Distribution in Human Liver Disease and Experimental Rat Liver Fibrosis. Indications for Mast Cell Participation in Development of Liver Fibrosis, J Hepatol, 26: 1042-1054, 1997.

8. Aslan Diler, Tietz,''Klinik Kimyada Temel İlkeler'', Beşinci Baskıdan Çeviri, Palme Yayıncılık, 748-760, 2005.

9. Aydogan S., Yerer Betül M., Goktas A., Melatonin and nitric oxide, Journal of Endocrinological Investigation, 29(3): 281, 2006.

10. Aytekin Y.,Solakoğlu S.,Temel Histoloji, sayfa:332-347, 2006.

11. Bahçecioglu IH., Üstündağ B., Özercan IH., et al, Protective effect of Ginkgo Biloba extract on CCl_4- induced liver damage, Hepatology Research 15: 215-224, 1999.

12. Balistreri W F., Rej R., Liver Function,''Tietz Textbook of Clinical Chemistry'', Burtis CA and Ashwood ER (Editörler), W B Saunders Company, Pennysylvania, Philadelphia. pp:562-563, 1996.

13. Basaga H.S., Biochemical Aspects of Free Radicals, Biochem. Cell. Biol., 68, 989-998, 1990.

14. Becker BF., Reinholz N., Leipert B., Raschke P., Permanetter B., Gerlach E., Role of uric acid as an endogenous radical scavenger and antioxidant, Chest., 100: 176-181, 1991.

15. Beckman K.B., Ames B.N., The free radical theory of aging matures, Physiol. Rev., 78:547-581, 1998.

16. Berlett B.S., Stadtman E.R., Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress, J. Biol. Chem., 272:213-216, 1997.

17. Bhagavan N V., Medical Biochemistry, Jones and Bartlett Publishers, Boston, 1996.

18. Bissel DM., Roll J., Connective tissue metabolism and hepatic fibrosis, Zakim D., Boyer TD., (ed), Hepatology, Philadelphia, W.B Saunders Comp, 2nd ed, 425-439, 1989.

19. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. Ann Bot (Lond). 91: 179–94, 2003.

20. Boyunağa H., Çelik C., Serbest radikaller ve hücresel denge, Bilim Teknik Dergisi, 347:98-100, 1996.

21. Canuto RA., Muzio G., Maggiora M., Biocca ME., Dianzani MU, Glutathione S Transpherase, alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase activities during diethylnitrosamine carsinogenesis in rat liver, Cancer Letters, 68:177-183,1993.

22. Castilla Cortazar I., Garcia M., Muguerza B., et al., Hepatoprotective effects of insuline like growth factor I in rats with carbon tetrachloride induced cirrhosis, Gastroenterology, 113 (5): 1682-1691, 1997.

23. Champe P.C., Harvey R.A., Glikozaminoglikanlar.,Tokullugil A., Dirican M., Ulukaya E., Lippincott's illustrated reviews serisinden, Biyokimya, İkinci baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 147-156, 1997.

24. Chavan S., Sava L., Saxena V., Pillai S., Sontakke A., Ingole D., Reduced glutathione: Importance of specimen collection, Indian Journal of Clinical Biochemistry, 20(1):150-152, 2005.

25. Cheeseman K.H.,General Mechanisms of toxic liver injury with special reference to free radical reactions. Advances in Inflamation Research, Eds; KD Rainsford and GP Velo, 6: (179-188), 1984.

26. Cheeseman K.H., Slater T.F., An introduction to free radical biochemistry, Brit. Med. Bulletin, 149:481-493, 1993.

27. Chen S., Schopfer P., Hydroxyl-radical production in physiological reactions a novel function of peroxidase, Eur. J. Biochem., 260:726-735, 1999.

28. Chorvatovicova and Bauer V., Stobadine: Inhibitor of cyclophophamide-induced micronuclein mice, mutagenesis, 9:241-244, 1994.

29. Cluet JL., Biosset M., and Boudene C., Effect of Pretreatment with Cimetidine or Phenobarbital on Lipoperoxidation in Carbon tetrachloride and Trichloroethylene Dosed Rats, Toxicology, 38: 91, 1986.

30. Cochrane C.G., Cellular injury by oxidants, Am. J. Med., 23-30, 1991.

31. Costante G., Sand G., Reding P., Glinoer D., Absence of circulating desialylated tlıyroxinebinding globulin in patients with hepatobiliary diseases. Acta. Endocrinol. 108: 392-400, 1985.

32. Cowden WB., Lewis-Hughes PH., Clark IA., Protection against alloxan-induced diabetes in mice by the free radical scavenger butylated hydroxyanisole, Biochem. Pharmacol, 34 (19): 3601-3603,1985.

33. Çolakoğlu S., Siroz ‘’Gastroenteroloji ‘’, Telatar H., (Editör), Hekimler Yayın Birliği ,Ankara, Sayfa 748-755, 1993.

34. Dashti H., Jeppsson B., Hagerstrand I., Hultberg B., Srinivas U., Abdulla M., Bengmark S., Thioacetamide and carbon tetrachloride induced liver cirrhosis, Eur. Surgical Research, 21:83-91, 1989.

35. Dashti H M., Al Sayer H., Behbehani A., Madda J., Christenson J T., Liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride and the effect of superoxide dismutase and xantine oxidase inhibitör treatment, J R Coll. Surg. Edinburgh, 37:23-28, 1992.

36. Dianzani MU., The role of free radicals in medicine and biology,Acta Physiol, Scand, 492:153-168,1980**.**

37. Drabikova K., Pecivova J., Nosal R., Effect of stobadine on stimulated isolated mast cells, Agent Actions, 23(3-4): 188-190, 1988.

38. Dringen R., Pawlowski P.G., Hirrlinger J., Peroxide detoxification by brain cells, J. Neurosci. Res., 79:157-165, 2005.

39. Durak I., Canbolat O., Kavutcu M., Öztürk HS., Yurtarslanı Z., Activities of total, cytoplasmic and mihochondrial superoxide dismutase enzymes in sera and pleural fluids from patient with lung cancer, J. Clin . Lab. Anal., 10: 17-20, 1996.

40. Engin A.,Bozkurt BS., Altan N., Memiş L., Bukan N.,Nitric oxide mediated liver injury in presence of experimental bileduct obstruction.World journal of Surgery 27(3), 253-255, 2003.

41. Engin A., Altan N., Işık E.,Erytrocyte glutathione levels in lithium- induced hypothroidism, Drugs R D, 6(1), 35-40, 2005.

42. Erdoğan E., Kaya A., Rağbetli MÇ., Özbek H.,Cengiz N., Anason (Pimpinella anisum) Ekstresinin Deneysel Akut Karaciğer Hasarında Karaciğer Koruyucu Etkisi Var Mı? Van Tıp Dergisi, 11 (3):69-74, 2004.

43. Esterbauer H., Aldehydic products of lipid peroxidation, Free radicals, lipid peroxidation and cancer, Eds: DCH McBrien and TF Slater, Academic Press, London,101-128 ,1982.

44. Evans P., Lyras L., Halliwell B., Measurement of protein carbonyls in human brain tissue, Methods Enzymol., 300:145-156, 1999.

45. Evans P., Halliwell B., Micronutrients: Oxidant/antioxidant status, Br. J. Nutr., 85:67, 2001.

46. Fang Y.Z., Yang S., Wu G., Free radicals, antioxidants and nutrition, Nutrition, 18:872-879, 2002.

47. Fantone J.C., Ward P.A., Polymorphonuclear Leukocyte Mediated and Tissue Injury, Human Pathology, 16: 973-978, 1985.

48. Farrell G C., Liver Disease Caused by Drugs, Anesthetics and Toxins,'' Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease'' 2.cilt, Feldman M., Sleisenger M H., (Editörler), W B Saunders Company, Pennsylvania, Philadelphia, 1998.

49. Fauerholdt L., Schlichting P., Christensen E., Conversion of micronodular cirrhosis into macronodular cirrhosis, Hepatology, 3 :928-931, 1983.

50. Felix K., Rockwood LD., Pretsch W.,Nair J., Bartsch H.,Bornkamm GV.,Janz S.,Moderate G6PD deficiency increases mutation rates in the brain on mice, Free Radical Biology & Medicine, 32(7): 663-673, 2002.

51. Foulis PR., Sandford BH., Gottfried M., Drug induced morphologic changes in the liver, Ann. Clin. Lab. Sci., 18: 215-228, 1988.

52. Frei B., Reactive Oxygen Species and Antioxidants Vitamins mechanisms of action, The American Journal of Medicine, 97: 5-13, 1994.

53. Freidovich I., Fundamental aspects of reactive oxygen species or what's the matter with oxygen?, Ann. N.Y. Acad. Sci., 893:13, 1999.

54. Fujiwara K., Oka Y., Ogata I., Ohta Y.,Takatsuki K., Oka H., Sato Y., Masaki N., Exchange blood transfusion for acute hepatic failure; it's limited avaliability depending on the type of injury in rat's. Artif. Organs.,12:227-233,1988.

55. Gilbert D.L., Fifty years of radical ideas, Ann. N.Y. Acad. Sci., 899:1, 2000.

56. Gözükara E.M., Biyokimya.,Evin Matbaası, İstanbul, 1997.

57. Groot H., Reactive oxygen species in tissue injury, Hepato gastroenterology 41:328-332, 1994.

58. Gruszecki WI., Strzalka K., Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties, Biochim. Biophys. Acta., May 30, 1740 (2): 108-115, 2005.

59. Guemori L., Arthur Y., Herbeth B., Jeandel C., Cunny G., Siest G.,Biological variability of süperoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in blood, Clin.Chem., 37:1932-1937,1991.

60. Guido M., Rugge M., Leandro G. et al, Hepatic stellate cell immunodetection and cirrhotic evolution of viral hepatitis in liver allografts, Hepatology, 26: 310-314, 1997.

61. Gunes A, Ceylan A, Sarioglu Y, Stefek M, Bauer V, Karasu C. The Antioxidants in Diabetes-induced Complications (ADIC) Study Group. Reactive oxygen species mediate abnormal contractile response to sympathetic nevre stimulation and noradrenaline in the vas deferens of chronically diabetic rats: effect of in vivo treatment with antioxidants. Fundam. Clin Pharmocol. 19 (1): 73-79, 2005.

62. Gutteridge J.M., Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage, Clin. Chem., 41:1819-1828, 1995.

63. Gürdol F.,Ademoğlu E., Biyokimya, Nobel Tıp Kitabevleri, 1 baskı, 817-827,2006.

64. Güzel C., Bir organ olarak karaciğer,''Tıbbi Fizyoloji'',(Guyton and Hall Textbook ofmedical Physiology), Çavuşoğlu H., (Çeviri Editörü), Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, Sayfa 884, 1996.

65. Haddad J.J., Oxygen sensing and oxidant/redox-related pathways, Biochemical and Biophysical Research Communications, 316:969-977, 2004.

66. Halliwell B., How to characterize a biological antioxidant, Free radic. Res. Commun,1:1-32,1990.

67. Halliwell B.,Gutteridge JMC.,Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease, An overview, Methods Enzymol, 186:1-85,1990.

68. Halliwell B., Antioxidant characterization: Methodology and mechanism, Biochemical Pharmacology, 49:1341-1348, 1995.

69. Halliwell B., Antioxidants in human health and disease, Annu. Rev. Nutr.,16: 33-50, 1996.

70. Halliwell B., Gutteridge J.M., Free Radical in Biology and Medicine, Third ed., Oxford University Press, Oxford, 160-165, 2000.

71. Harris E.D.,Regulation of antioxidant enzyrnes, Faseb. J., 6: 2675-2683, 1992.

72. Hasanoğlu E., altan N.,sindel P.,Ongun CÖ., Bali M.,Altıntaş E.,The relationship between erythrocyte süperoxide dismutase activity and plasma levels of some trace elements (Al,Cu,Zn) of dialysis patients,General Pharmacology 25(1),107-110,1994.

73. Hawkins C.L., Davies M.J.,Generation and propagation of radical reactions on proteins, Biochem. Biophys. Acta, 1504:196-219, 2001.

74. Hawkins C.L., Pattison D.I., Davies M.J., Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins, Amino Acids, 25:259-274, 2003.

75. Hernandez –Munoz R., Diaz-Munoz M., Lopez V., Lopez –Barrera F., Yanez L.,Virdio S., Aranda –Fraustro A., Chagoya de Sanchez V., Balance between oxidative damage and proliferative potential in an experimental rat model of CCl_4 –induced cirrhosis, Protective role of adenosine administration, Hepatology, 26:1100-1110, 1997.

76. Horakova L., Lukovic L., Stolc S., Effect of stobadine and vitamin E on the ischemic reperfused brain tissue, Pharmazie, Mar, 45 (3): 223-224, 1990.

77. Horakova L., Uraz V., Ondrejickova O., Lukovic L., Juranek I., Effect of stobadine on brain lipid peroxidation induced by incomplete ischemia and subsequent reperfusion, Biomed. Biochim. Acta, 50 (8): 1019-1025, 1991.

78. Horakova L., Briviba K., Sies H., Antioxidant activity of the pyridoindole stobadine in liposomal and microsomal lipid peroxidation, Chem. Biol. Interact, Jun 15, 83(1): 85-93,1992

79. Horakova L., Ondrejickova O., Uraz V., Lukovic L., Juranek I., Short cerebral ischemia and subsequent reperfusion and treatment with stobadine, Experientia, Sep 15, 48(9):872-874, 1992.

80. Horakova L., Sies H., and Steenken S., Antioxidant action of stobadine, In Methods in Enzymology.,Academic Press 234; 572-581, 1994.

81. Horakova L., Giessauf A., Raber G., Esterbauer H., Effect of stobadine on Cu^{+2}-mediated oxidation of low-density lipoprotein. Biochem. Pharmacol, May 17, 51 (10): 1277-1282, 1996.

82. Horakova L., Stolc S., Chromikova Z., Pekarova A., Derkova L., Mechanisms of hippocampal reoxygenation injury, Treatment with antioxidants, Neuropharmacology, Feb, 36 (2): 177-184, 1997.

83. Horakova L., Stolc S, Antioxidant and pharmacodynamic effects of pyridoindole stobadine, Gen Pharmacol, May, 30 (5): 627-38,1998.

84. İnfante-Rivard C., Esnaola S., Villeneuve J P., Clinical and statistical validity of conventional prognostic factors in predicting short term survival among cirrhotics, Hepatology,7: 660-664, 1987 .

85. Jang YY, Song JH, Shin YK, Han ES, Lee CS, Protective effect of bolding on oxidative mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabetic rats. Pharmacol Res. 42(4):361-371, 2000.

86. Jeon Tae IL., Hwang SG., Park NG., et al, Antioxidative effect of Chitosan on chronic con tetrachloride induced heaptik injury in rats, Toxicology, 187: 67-73, 2003.

87. Jeong TC., Kim HJ., Park J., Ha CS., et al, Protective effects of red ginseng saponins against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in sprague dawley rats, Planta Med., 63:136-140. 1996.

88. Jerry P., Liu L., Zeng M., Stamler J.S., An apoptotic model for nitrosative stress, Biochemistry, 39:1040-1047, 2000.

89. Kadayıfçı A., Karaciğer hastalıkları,''İç hastalıkları El Kitabı'' ,Kadayıfçı A., Karaaslan Y., (Editörler), Hekimler Yayın Birliği, 1998.

90. Kagan VE, Tsuchiya M, Serbinova E, Packer L, Sies H. Interaction of the pyridoindole stobadine with peroxyl, superoxide and chromanoxyl radicals. Biochem. Pharmacol. 26; 45(2): 393-400, 1993.

91. Kallay Z., Soltes L., Trnovec T., Pharmacokinetics of stobadin and of the sum of its metabolites in rats during repeated administration, Biopharm. Drug. Dispos, Apr, 12(3): 201-205, 1991.

92. Kaneda H., Taguchi J., Ogasawara K., Aizawa T., Ohno M., Increased level of advanced oxidation protein products in patients with coronary artery disease, Atherosclerosis, 162:221-225, 2002.

93. Kaplan P., Racay P., Lehotsky J., Mezesova V., Change in fluidity of brain endoplasmic reticulum membranes by oxygen free radicals: a protective effect of stobadine, alpha-tocopherol acetate, and butylated hydroxytoluene, Neurochem. Res, Jul, 20 (7): 815-820, 1995.

94. Kaplan P., Matejovicova M., Mezesova V., Iron-induced inhibition of Na^+-K^+ ATPase and Na^+ /Ca^{+2} exchanger in synaptosomes: protection by the pyridoindole stobadine, Neurochem. Res, Dec, 22 (12): 1523-1529, 1997.

95. Kayaalp O., Tıbbi Farmakoloji, 1.Cilt, Feryal Matbaacılık, Ankara, 1991.

96. Kılınç K.,Oksijen radikalleri, üretilmeleri, fonksiyonları ve toksik etkileri, Biyokimya Dergisi; 10:60-89, 1985.

97. Kovacs P., Baricova L., Kovalova M., Dostal J., Stancovicova T.,Svec P., Pharmacologic control of reperfusion dysrhytmias, Ceska. Slov. Pharm.,44(5):257-260,1995.

98. Kvaltinova Z, Lukovici L, Machova J. Alpha 1-adrenoceptor blocking action of DH 1011. J Pharmac. 17;187, 1986.

99. Kvaltinova Z., Stolc S., Effect of stobadine on N-methyl-D-aspartate binding sites in rat hippocampus under oxidative stress, In Trends in Drug Research, May 23-27, 29, 1993.

100. Lai C.C., Huang W., Askari A., Wang Y., Differantial regulation of superoxide dismutase in copper deficient rat organs, Free Radic. Biol. Med., 16:613-620, 1994.

101. Lee RG., Fibrosis and cirrhosis, Diagnostic Liver Pathology, First Ed, Mosby-ear Book Inc, 280-304,1994.

102. Liebert J., Matlawska I., Bylka W., Murias M., Protective effect of aquilegia vulgaris on APAP induced oxidative stress in rats, J. Ethnopharm., 97:351-358, 2005.

103. Listowsky I., Abramowitz M., Hama H., Niitsu Y., Intracelluler binding and transport of hormones and xenobiotics by GST, Rev., Drug Metab. Rev.,19:305-318, 1988.

104. Lowry O., Rosenbraugh N.,Farr L.,Randall R.,Protein measurement with folin phenol reagent,J. Biol. Chem., 182:265-275, 1951.

105. Luberda Z., The role of glutathione in mammalian gametes, Reproductive biology, 5(1): 5-17, 2005.

106. Luckey SW., Peterson DR., Activation of kupffer cells during the course of carbon tetrachloride induced liver injury and fibrosis in rats, Experimental and Molecular Pathology 71 (3): 226-240, 2001.

107. Lukacova N., Chavko M., Halat G., Effect of stobadine on lipid peroxidation and phospholipids in rabbit spinal cord after ischaemia, Neuropharmacology, May, 32 (3): 235-241, 1993.

108. Markiund S.L., Extracellular Superoxide Dismutase in Human Tissue and Human Cell Lines, J. Clin. Invest., 74, 1398-1403, 1984.

109. Masaki N., Yamada S., Ogata I., Ohta Y., Fujiwara K., Enhancement of carbon tetrachloride-induced liver injury by glucagon and insulin treatment, Res. Exp. Med., 188:27-33, 1988.

110. Mayer B., Hemmens B., Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells, TIBS, 22:477-481, 1997.

111. Mayne P D., Clinical Chemistry in Diagnosis and Teratment, Oxford University Press, New York, 1992.

112. Mc Gee S.A., Wıggins S.A., Pierce J.D., What advanced practise nurses to know about free radicals, The internet journal of advanced nursing practice, 6:1-10, 2003.

113. Mccormick M., Denning G.M., Reszka G.M., Bilski P., Buettners G.R., Rasmussen G.T., Railsback M.A., Britigan B.E, Biological effects of menadione photochemistry: effects of menadione on biological systems may not involve classical oxidant production., Biochem. J., 350:797-804, 2000.

114. McCotd JM, Fridovich I. Thr biology and pathology of oxygen radieals. Annals of Internal Med. 89: 122- 128, 1978

115. Mendiratta S., Zhi-chao Qu., James M., Enzyme Dependent Ascorbate Recycling in Human Erythrocytes: Role of Thioredoxin Reductase,Free Radical Biology and Medicine,Jul, .25(2): 221-228,1998.

116. Michiels C., Raes M., Toussaint O., Remacle J., Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, Cu-Zn superoxide dismutase for cell survival against oxidative stress, Free Radic. Biol. Med., 17:235-248, 1994.

117. Mirossay L., Kohut A., Antiulcerogenic effect of pentacaine, chlorpromazine and stobadine on ethanol and indomethacin induced stomach lesions in rats, Physiol. Res. ,40(4): 441-444,1991.

118. Mirossay L., Kohut A., Effect of stobadine on indomethacin and ethanol induced stomach lesions and gastric secretion, Physiol. Res., 40:437-440, 1991.

119. Muriel P., Escobar Y., Kupffer cells are responsible for liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride, Journal of Applied Toxicology, 23 (2): 103-108, 2003.

120. Nadkarni GD., Souza NB., Hepatic antioxidant enzymes and lipid peroxidation in carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis in rats, Biochem Med and Met Biol, 40: 42-5, 1988.

121. Necas J., Bartosíková L., Benes L., Janostíková E., Bartosík T., Klusáková J., Florian T., Frydrych M., Jurica J., Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub. Dec;149(2):385-388, 2005.

122. Nishiyama Y., Ikeda, H., Haramaki N., Oxidative stress is related to exercise intolerance in patients with heart failure, Am. Heart J., 135:115, 1998.

123. Nordberg J., Arner ES., Reactive oxygen species; antioxidants and the mammalian thioredoxin system, Free Radic. Biol. Med., Dec 1, 31 (11): 1287-1312, 2001

124. Oberley LW., Free radicals and diabetes, Free Rad. Biol. Med, 5:113-124,1988.

125. Onat T., Emerk K., Karbohidratlar Temel Biyokimya,1.baskı, Emerk K(Ed). Saray, İzmir, 289-409,1996.

126. Ondrejickova O., Dzurba A., Sedlak J., Tokarova J., Macickova T., Benes L., Processes linked to the formation of reactive oxygen species are not necessarily involved in the development of isoproterenol-induced hypertrophy of the heart, The effect of stobadine. Biomed. Biochim. Acta, 50 (12): 1251-1254, 1991.

127. Özenirler S., Tuncer C.,Ongun CÖ.,Altan N.,Kandilci U., Activity of süperoxide dismutase in erythrocyte of nonalcoholic chronic liver diseases,General Pharmacology 25(7):1349-1351,1994.

128. Özenirler S., DinçerS., Akyol G., ÖzI., Kandilci U., and Babül A., CCl_4'ün Oluşturduğu Karaciger Hasarına Ginkgo Biloba'nın etkisi, 13. UGK Antalya, Sözlü Bildiriler, 138, 1996.

129. Özoran Y., Hücre zedelenmesi ve Adaptasyonu,''Patoloji'' (Robbins and Kumar Basic Pathology), Uluoğlu Ö (Çeviri Editörü), Güneş Kitabevi, Ankara, Sayfa 9-10, 1987.

130. Paglia DE., Walantine WN., Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase, J. Lab. Clin. Med., 70:158-169, 1967.

131. Paradise V., Dargere D., Vidaud M. et al, Expression of connective tissue growth factor in experimental rat and human liver fibrosis, Hepatology, 30: 968-976, 1999.

132. Parola M., Rubio M., Varela G., et al, Effects of S adenosylmethionine on lipid peroxidation and liver fibrogenesis in carbon tetrachloride-induced cirrhosis, J Hepatol, 25: 2000- 2005, 1996.

133. Pekiner B., Ulusu NN., Das-Evcimen N., Sahilli M., Aktan F., Stefek M., Stolc S., Karasu C., Antioxidants in Diabetes-Induced Complications Study Group. In vivo treatment with stobadine prevents lipid peroxidation, protein glycation and calcium overload but does not ameliorate Ca^{+2}-ATPase activity in heart and liver of streptozotocin-diabetic rats: comparison with vitamin E, Biochim. Biophys. Acta, Oct 9, 1588 (1): 71-78, 2002.

134. Pieper G.M., Siebeneich W., More-Hilton M., Roza A.M., Reversal by L-Arginin of a dysfunctional arginine/nitric oxide pathway in the endothelium of the genetic diabetic rat, Diabetologia, 40:910-915, 1997.

135. Pincus M R., Schaffner J A., Assessment of Liver Function,'' Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, Henry J B., (Editör), W B Saunders Company ,Philadelphia, Pennysylvania, sayfa 253-267, 1996.

136. Pitkanen OM., Martin JM., Hallman M., Akerblom HK.,Sariola H and Anderson SM.,Free radical activity during development of insulin dependent diabetes mellitus in the rat,Life Sci,50:335-339,1991.

137. Podolsky D K., Isselbacher K J., Cirrhosis of the Liver ,''Harrison 's Principles of İnternal Medicine'' Wilson J D., Braunwald E., Isselbacher K J., Petersdorf R G., Martin J B., Fauci A S., Root R K., (Editörler), McGraw-Hill, New York, sayfa 1340-1350, 1991.

138. Polavarapu R., Spitz DR., Sim JE., et al., Increased lipid peroxidation and impaired antioxidant enzyme function is associated with pathologicall liver injury in experimental alcholic liver disease in rats fed diets high in corn oil and fish oil, Hepatology, 27 (5): 1317-1323, 1998.

139. Poli G., Cottalasso D.,Pronzato M A.,Chiarpotto E.,Marinari U M., Lipid peroxidation and covalent binding in early functional impairement of liver golgi apparatus by carbon tetrachloride, Cell. Biochem. Func., 8-10,1990.

140. Poli G., Liver damage due to free radicals,'' Free Radicals in Medicine'', Cheeseman K H, Slater T F (Editörler), British Medical Bulletin, London, 1993.

141. Poper H., Piez KA., Collagen metabolism in the liver, Dig Dis, 23: 648, 1978.

142. Powell S.R., The antioxidant properties of zinc, J. Nutr., 130:1447-1454, 2000.

143. Powers S.K., Leeuwenburgh C., Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity, Med. Sci. Sports. Exerc., 31: 987-997, 1999.

144. Racay P., Kaplan P., Lehotsky J., Mezesova V., Rabbit brain endoplasmic reticulum membranes as target for free radicals, Changes in Ca^{+2} transport and protection by stobadine, Biochem. Mol. Biol. Int, Jul, 36 (3): 569-577, 1995.

145. Recknagel RO., Carbon Tetrachloride Hepatotoxicity, Pharmacol. Rev. 19: 145-208, 1967.

146. Recknagel R., Glende EA., Dolak JA., Waller RL., Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity, Pharma Ther, 43: 139-154,1989.

147. Reznick A.Z., Packer L., Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay, Methods Enzymol., 233:357-363, 1994.

148. Robbins SL., Cotran RS Kumar.,V Basic Pathology, 6th Ed, Philadelphia, WB Saunders Company, 516-519, 2000.

149. Rozga J., Animal models of liver regeneration, İn W.W. and D.G.Souba (Eds.), Surgical Research, Wilmore California, Academic Press, pp.703-707, 2001.

150. Sacks DB., Tietz Textbook of Clinical Chemistry: Carbonhydrates, 2nd edition,WB Saunders ,Philadephia,928-10001, 1994.

151. Sanlı Y., Veteriner Farmakoloji, Ankara Üniv. Vet. Fak. Yay.,No:412, Ankara, 1988.

152. Scheuer P J., Lefkowitch J H., Liver biopsy interpretation, W B Saunders Company, London, sayfa 135, 1994.

153. Seven A., Candan G., Antioksidan Savunma Sistemleri, Cerrahpaşa J. Med., 27:41-50, 1996.

154. Sezer R., Sindirim sistemi hastalıklarında yaklaşım ve kısa semptomatoloji, İç hastalıkları ‘’İç Hastalıkları’’, Büyüköztürk K .,(Editör), Tayf ofset, sayfa 799-800, 1992.

155. Shacter E., Quantification and significance of protein oxidation in biological samples, Drug Met. Rev., 32:307-326, 2000.

156. Sherlack S. and Dooley J., Diseases of the Liver and Biliary System, Hepatic Cirrhosis, 9th Ed, London, Blackwell Scientific Publications, 371-384, 1987

157. Sherlock S., The spectrum of hepatotoxicity due to drugs, Lancet, 2: 440-444, 1986.

158. Sherlock S., Dooley J., Hepatic Cirrhosis ,’’Disease of the Liver and Biliary System’’, Black well science,London ,371-383,1997.

159. Shibayama Y., Nakata K., The role of sinusoidal stenoses in hypertension of liver cirrhosis, J. Hepatol., 8:60, 1989.

160. Shidhu P., Protective role of zinc in nickel induced hepatotoxicity in rats, Chemico-Biological Interactions, 150:199-209, 2004.

161. Shimiziu I., Antifibrogenic therapies in Chronic HCV infection, Current Drug Targets Infectious Disorders, 1(2): 227-240, 2001

162. Shimiziu I, Impact of estrogens on the progression of liver disease, Liver International, 23 (1):63-69, 2003

163. Sies H., Oxidative stress: from basic research to clinical application, Am. J. Med., 91:31-38, 1991.

164. Sinclair AJ., Lunec J., Girling AJ. and Barnett AH, Modulators of free radical activity in diabetes mellitus, Role of ascorbic acid, Free Radicals and Saging, Ed:I, Emirit and B Chance, Birkhauser Verlag, Basel, 342-352, 1992.

165. Slater TF., Free radicals as reactive intermediates in injury., Snyder IR., Parke DV., Kocsis JJ., Jollow DJ., Gebson GG., Witmer CM (Eds), Biological Reactive Intermediates II, Chemical Mechanisms and Biological Effects, New York, Plenum Press, 575-589,1982.

166. Sodergen E., Lipid peroxidation in vivo, Uppsala University, Uppsala, 2000.

167. Splettstoesser W.D., Werner S.P., Oxidative stress in phagocytes 'The Enemy Within', Microscopy Research And Technique, 57:441-455, 2002.

168. Stasko A.,OndriasK., Misik V., Szöchova H. and Gergel D, Stobadine: a novel scavenger of free radicals,Chem. 44: 493-500,1990**.**

169. Steenken S., Sundwuist A. R., Jovanovic S. V., Crockett R. and Sies H, Antioxidant activity of the pyridoindole stobadine: pulse radiolytic characterization of one electron oxidized stobadine and wuenching of singlet moleculer oxygen, Chem. Res. Toxicol, 5:355-360, 1992.

170. Stefek M., Trnkova Z., Inhibition of alloxan-induced hyperglycaemia in mice by the pyridoindole stobadine, Pharmacol. Toxicol, Nov, 77 (5): 320-322, 1995.

171. Steinberg D., Is there a potential therapeutic role for vitamin E or other antioxidants in atherosclerosis? Curr .Opin. Lipidol., Dec, 11(6): 603-607, 2000Stocker R., Antioxidant Activities of BilePigments, Antioxidants & redox signaling, 6: 5, 2004.

172. Stolc S., Bauer V., Benes L., Tichy, Medicine with antiarrhytmic, antihypoxic activity and its method of preparation, 1983.

173. Stolc S., Horakova L., Effect of stobadine on postischemic lipid peroxidation in the rat brain, In New Trends in Clinical Pharmacology, 59-63, 1988.

174. Stolc S., Vlcolinsky R, Pavlasek J., Neuroprotection by the pyridoindole stobadine: a minireview, Brain.Res. Bull., 42(5):335-340,1997.

175. Synder R., Rews L.,Casarattand Doull's Toxicology, Pergaman Press, sayfa 681-772, 1992.

176. Şişmanoğlu M., Karaciğer ve Biliyer Sistem hastalıkları, ''Cecil Essentials of Medicine'' Tuzcu M.(Çeviri Editörü) ,Yüce Yayınları, İstanbul, sayfa 336-342, 1995.

177. Tankurt E, Karaciğer sirozu ve Komplikasyonları, ''Temel İç Hastalıkları'', İliçin G, Ünal S., Berberoğlu K., Akalın S., Süleymanlar G., (Editörler), Güneş Kitabevi, İstanbul, Sayfa 1114-1154, 1996.

178. Thomas H.,Scladht L., Knehr M.,Oesch F., Effect of diabetes and starvation on the activity of rat liver epoxide hydrolases glutatione S transferases and peroxisomal β- oxidation. Biochem. Pharmacol. 38: 4291-4297,1989.

179. Uchida K., Role of reactive aldehyde in cardiovasculer diseases, Free Radical Biology and Medicine, 28:1685-1696, 2000.

180. Uchida K., 4-Hydroxy-2-Nonenal: A product and mediator of oxidative stress, Progr. Lip. Res., 569:1-26, 2003.

181. Ulusu NN., Sahilli M., Avci A., Canbolat O., Ozansoy G., Ari N., Bali M., Stefek M., Stolc S., Gajdosik A., Karasu C., Pentose phosphate pathway, glutathione-dependent enzymes and antioxidant defense during oxidative stress in diabetic rodent brain and peripheral organs: effects of stobadine and vitamin E, Neurochem. Res, Jun, 28 (6): 815-823, 2003.

182. Urano S. and Matsuo M., Membrane stabilizing effect of Vitamin E, Ann. NY. Acad. Sci., 570:7-22, 1989.

183. Uzun K., Vural H., Öztürk T., Özer F., İmecik İ., Diagnostic value of lipid peroxidation in lung cancer, Eastern Journal of Medicine, 5(2):48-51, 2000.

184. Üstündağ B., Bahçecioğlu İH., Şahin K., Gülcü F., Düzgün S., Özercan İH., Gürsu MF.,F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi, 19(4), 263-271, 2005.

185. Van Ye TM., Roza AM., Pieper GM.,Henderson J Jr., Johnson JP., Adams MB.,Inhibition of intestinal lipid peroxidation does not minimize morphological damage, J. Surg. Res. 55:553-558, 1993.

186. Vural N., Toksikoloji, Ankara Üniv. Eczacılık Fak. Yay., No: 56, Ankara, 1984.

187. Wang H., Wei W., Wang NP., et al, Melatonin ameliorates carbontetrachloride-induced hepatic fibrogenesis in rats via inhibition of oxidative stres, Life Sci., 77:1902-1915, 2005.

188. Wu D., Cederbaum A.I. Alcohol, oksidative stres and free radical damage, Alcohol Research & Health, 27(4):277-284, 2003.

189. Yao T., Esposti SD., Huang L., Amon R., Spangenberger A., and Zern MA., Inhibition of carbon tetrachloride induced liver injury by liposomes containing Vitamin E, Am. J. Physiol., 30: 476-484, 1994.

190. Yardım-Akaydın S., Sepici A., Özkan Y., Şimşek B., Sepici V., Evaluation of Allontoin levels as a new marker of oxidative stress in Behçet's disease. Scandinavian Journal of Rheumatology 35(1),61-64, 2006.

191. Yardım-Akaydın S., Sepici A., Özkan Y., Torun M., Şimşek B., Sepici V., Oxidation of uric acid in Rheumatoid Arthritis: Is Allontoin a marker of oxidative stress? Free Radical Researche 38(6),623-628, 2004.

192. Yılmaz S., Bahçecioğlu IH. , Karbon tetraklorür ile Siroz Oluşturulmuş Ratlarda Lipid Peroksidasyonu, Antioksidan Enzim ve Piruvat Kinaz Aktiviteleri, Turk. J. Vet. Anim. Sci. 24: 25–28, 2000.

193. Yülek F., Or M., Ozoğul C., Isik AC., Ari N., Stefek M., Bauer V., Karasu C**.,** Arch. Med. Res. Jul; 38(5):503-511, 2007.

194. Zhao L., Glutathione a ubiquitous thiol., Free radical and radiation biology graduate program, Iowa, 2001.

195. Zimmerman HJ., The adverse effects of drugs and other chemicals in the liver hepatotoxicity, NewYork, Appleton Century Crofts, 1978.