

T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ALKOLİK RATLARDA, SİLİMARİN,  
RESVERATROL VE  
E VİTAMİNİNİN HEPATOPROTEKTİF  
ÖZELLİKLERİNİN KIYASLANMASI**

**DOKTORA TEZİ**

**Nilay AYDOĞAN**  
**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİMDALI**

**TEZ DANIŞMANI**  
**Prof. Dr. İsmail TEMEL**

**MALATYA 2013**

T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ALKOLİK RATLARDA, SİLİMARİN,  
RESVERATROL VE  
E VİTAMİNİNİN HEPATOPROTEKTİF  
ÖZELLİKLERİNİN KIYASLANMASI**

**Nilay AYDOĞAN**  
**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİMDALI**

**Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. İsmail TEMEL**

**Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi  
tarafından 2008/74 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**MALATYA 2013**

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

Jüri Başkanı, Danışman: Prof. Dr. İsmail TEMEL  
İnönü Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Tayfun GÜLDÜR  
İnönü Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Saim YOLOĞLU  
İnönü Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Bilal ÜSTÜNDAĞ  
Fırat Üniversitesi



Üye: Doç. Dr. M. Çağatay TAŞKAPAN  
İnönü Üniversitesi



ONAY :

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu ...../...../ 2013 tarih ve 2013 /..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Sedat YILDIZ  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

İnönü Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında yapmış olduğum yüksek lisans ve doktora eğitimim süresince, her zaman yanımda olan, desteğini, deneyimini ve engin bilgisini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. İsmail TEMEL'e, doktora tez çalışmam süresince yardımlarını ve bilgisini esirgemeyen değerli arkadaşım Dr. Şule GÜRSOY'a, tezimin istatistik çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Saim YOLOĞLU'na, dokuların histopatolojik değerlendirilmeleri konusunda bize yardımcı olan değerli hocam Doç. Dr. Mehmet GÜL'e, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı personeline ve değerli ablam Dr. Fatma ÖZYALIN'a, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi personeline, İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim Merkezi personeline ve İnönü Üniversitesi Eğitim Fakültesindeki değerli hocalarım ve çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Yüksek lisans ve doktora eğitimim süresince, desteği ve sevgisi ile her zaman yanımda olan sevgili eşim Hakan AYDOĞAN'a ve hayatımın her döneminde, aldığım her kararda yanımda olan, sevgi ve destekleri her zaman benimle olan canım annem, babam ve abime teşekkür ve minnetlerimi sunarım.



## ÖZET

Alkol kullanımı günümüzde birçok toplumda önemli bir sağlık problemi haline gelmiştir. Kronik alkol alımı başta karaciğer yetmezliği olmak üzere çeşitli hastalıklara yol açmaktadır. Alkolün metabolize edildiği başlıca yerin karaciğer olması, kronik alkol kullanımında karaciğerde önemli hasarlar oluşmasına neden olmaktadır. Alkolik karaciğer hasarı günümüzde karaciğer hastalıklarının başında gelmektedir.

Çalışmamızda, kronik alkol kullanımına bağlı olarak gelişen ve oksidatif stres nedeni ile ortaya çıkan karaciğer hasarında, her biri güçlü antioksidanlar olan silimarin, resveratrol ve E vitamininin koruyucu etkilerini kıyaslamak amacıyla, 40 adet erkek rat 5 eşit gruba (n=8) bölündü; 1. grup: kontrol grubu (K), 2. grup: alkol grubu (AK) ve 3. grup: resveratrol grubu (RSV), 4. grup: silimarin grubu (SLY), 5. grup: E vitamini grubu (E VİT). Çalışmamız 4 hafta sürdü. Bütün ratlar Modifiye Sıvı Diyet (MSD; inek sütü + glukoz) ile beslendi. Kontrol grubu hariç, diğer bütün gruplara % 7,2 oranında etanol içeren MSD verildi. 3.ncü gruptaki ratlara 50 mg/kg/gün dozunda resveratrol, 4.ncü gruptaki ratlara 150 mg/kg/gün dozunda silimarin, 5.nci gruptaki ratlara ise 300 mg/kg/gün dozunda E vitamini günlük olarak gavaj ile verildi. Çalışmanın sonunda, tüm gruplardaki ratların kanları ve karaciğer dokuları alındıktan sonra sakrifiye edildiler. Alınan kanların serumu ayrıştırıldıktan sonra serumlar ve doku örnekleri derin dondurucuda -70 °C saklandı. Serum örneklerinde, AST, ALT, ALP, TP, HDL-K, TBARS, PON1 parametreleri, karaciğer örneklerinde ise TBARS, GSH, MPO ve PON1 parametreleri çalışıldı.

Karaciğer hasarını önlemek için uygulanan tedaviler sonunda tedavi grupları ile kontrol ve alkolik kontrol grupları arasında serum AST, ALT, PON1 ve TBARS düzeyleri yönünden anlamlı farklar tespit edildi. Benzer şekilde, karaciğer doku örneklerinde TBARS ve MPO analizleri açısından tedavi ve kontrol grupları arasında anlamlı farklar bulunmuştur.

Buna göre, alkolik karaciğer hasarına karşı koruyucu etkilerini kıyaslamaya çalıştığımız antioksidanlardan resveratrol, doku örneklerinde MPO ve PON1 bakımından, serum örneklerinde PON1 ve ALT bakımında diğerlerine göre daha güçlü iyileşme sağlamıştır. Silimarin, serum örneklerinde AST bakımından diğer antioksidanlara göre daha güçlü iyileşme sağlamıştır. E vitamini ise hem karaciğer hem de serum örneklerinde TBARS bakımından diğer antioksidanlara kıyasla daha güçlü iyileşme sağlamıştır.

Sonuç olarak, ratlarda alkol tüketimine bağlı olarak ortaya çıkan karaciğer hasarının önlenmesinde resveratrolün, silimarin ve E vitaminine kıyasla daha güçlü bir hepatoprotektif etki gösterdiğini söyleyebiliriz.

**Anahtar Kelimeler:** Alkolik rat, silimarin, resveratrol, E vitamini, TBARS.

## ABSTRACT

### COMPARISON OF THE HEPATOPROTECTIVE PROPERTIES OF SILYMARIN, RESVERATROL AND VITAMIN E IN ALCHOLIC RATS.

Alcohol usage is became an important health problem in many population in nowadays. Because of the liver is the main place of the alcohol metabolism, chronic alcohol uptake cause to many serious disease mainly in liver. Alcoholic liver disease is one of the important liver diseases.

For the purpose of comparing the protective effects of silymarine, resveratrol and vitamin E, that are strong antioxidants, in liver disease which is improve due to chronic alcohol usage and described with oxidative stres; 40 male rats were divided in 5 groups (n=8). Grp 1: control group (K), grp 2: alcohol group (AK), grp 3: resveratrol group (RSV), grp 4: silymarine group (SLY), grp 5: vitamin E group (E VIT). Our study last 4 weeks. All of the rats were feeded with Modified Liquid Diet (MSD) (cow milk + glucose). Except control group, %7,2 ethanol was added to MSD. In group 3; 150 mg/kg/day silymarine, in group 3; 50 mg/kg/day resveratrol and in group 5; 300 mg/kg/day vitamin E was given with gavage daily. At the end of the study, all groups blood samples and liver tissues were taken and the rats were sacrificed. The serums and the tissues were stored at -70<sup>0</sup>C until analysis. In serum samples, AST, ALT, ALP, TP, HDL-K, TBARS and PON1 were measured. In liver tissues, TBARS, GSH, MPO and PON1 were measured.

The antioxidant treatment, that was performed to prevent the liver disease due to chronic alcohol usage, was statistical significant in respect to AST, ALT, PON1 and TBARS in serum samples. In liver samples, treatment was statistical significant in respect to TBARS and MPO.

According to this, resveratrol which is one of the antioxidants that we tried to compare the protective effects against to alcoholic liver disease, provided stronger healing on MPO and PON1 levels in tissue samples and on PON1 and ALT levels in serum samples comparing with silymarine and vitamin E. silymarine was provided stronger healing in respect to AST levels comparing with the other antioxidants.

Vitamin E was provided stronger healing in respect to TBARS levels both in serum and tissue samples comparing with silymarine and resveratrol.

In conclusion, we can say that, resveratrol has a stronger hepatoprotective effect on preventing liver disease based on alcohol consumption in rats, in comparison to silymarine and vitamin E.

**Keywords:** Alcoholic rat, silymarin, resveratrol, vitamin E, TBARS.

**İÇİNDEKİLER**

|  | <b>Sayfa</b> |
|--|--------------|
| <b>ONAY SAYFASI</b>                                      | <b>iii</b>   |
| <b>TEŞEKKÜR</b>  | <b>iv</b>    |
| <b>ÖZET</b>  | <b>v</b>     |
| <b>ABSTRACT</b>  | <b>vii</b>   |
| <b>İÇİNDEKİLER</b>                                       | <b>ix</b>    |
| <b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b>                    | <b>xiii</b>  |
| <b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>                                   | <b>xv</b>    |
| <b>TABLolar DİZİNİ</b>                                   | <b>xvi</b>   |
| <b>1. GİRİŞ</b>  | <b>1</b>     |
| <b>2. GENEL BİLGİLER</b>                                 | <b>3</b>     |
| 2. 1. Karaciğerin Yapısı                                 | 3            |
| 2. 2. Karaciğerin Biyokimyasal Fonksiyonları             | 3            |
| 2. 2. 1. Karbonhidrat Metabolizması                      | 4            |
| 2. 2. 2. Lipid Metabolizması                             | 4            |
| 2. 2. 3. Detoksifikasyon Fonksiyonu                      | 4            |
| 2. 2. 4. Depo Fonksiyonu                                 | 5            |
| 2. 2. 5. Safra Tuzlarının Sentezi                        | 5            |
| 2. 3. Alkol  | 6            |
| 2. 3. 1. Alkol Metabolizması                             | 6            |
| 2. 3. 1. 1. Alkol Dehidrogenaz Yolağı                    | 7            |
| 2. 3. 1. 2. Mikrozomal Etanol Okside Edici Sistem (MEOS) | 7            |
| 2. 3. 1. 3. Katalaz Yolağı                               | 8            |

|   |    |
|---|----|
| 2. 3. 2. Alkolik Karaciğer Hastalığı                                  | 9  |
| 2. 3. 3. Alkolik Karaciğer Hastalığı Tipleri:                         | 9  |
| 2. 3. 3. 1. Yağlı Karaciğer   | 10 |
| 2. 3. 3. 2. Alkolik Hepatit   | 11 |
| 2. 3. 3. 3. Alkolik Siroz   | 11 |
| 2. 4. Silimarin   | 11 |
| 2. 4. 1. Fonksiyonları  | 12 |
| 2. 4. 1. 1. Antioksidan Özelliği                                      | 12 |
| 2. 4. 1. 2. Karaciğer Üzerine Etkisi                                  | 13 |
| 2. 4. 1. 3. Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkisi                     | 13 |
| 2. 4. 1. 4. Antiinflatuar ve Anti-karsinojenik Etkisi                 | 14 |
| 2. 5. Resveratrol   | 14 |
| 2. 5. 1. Tarihçe  | 14 |
| 2. 5. 2. Sentezi  | 15 |
| 2. 5. 3. Etkileri   | 16 |
| 2. 5. 4. Sağlık Üzerine Etkileri                                      | 17 |
| 2. 5. 4. 1. Antikanserojen Aktivite                                   | 17 |
| 2. 5. 4. 2. Antioksidan Aktivite                                      | 18 |
| 2. 5. 4. 3. Antiinflatuar Aktivite                                    | 18 |
| 2. 5. 4. 4. Östrojenik Aktivite                                       | 19 |
| 2. 5. 4. 5. Hepatoprotektif Aktivite                                  | 19 |
| 2. 5. 4. 6. Antiplatelet Aktivite                                     | 19 |
| 2. 5. 4. 7. Vazorelaksan Aktivite                                     | 20 |
| 2. 5. 4. 8. Lipid ve Lipoprotein Metabolizmasını Düzenleyici Aktivite | 20 |
| 2. 6. E Vitamini  | 20 |
| 2. 6. 1. E Vitamininin Metabolizması                                  | 22 |

|   |           |
|---|-----------|
| 2. 7. Antioksidan Savunma Sistemleri          | 22        |
| 2. 7. 1. Serbest Oksijen Radikalleri          | 23        |
| 2. 8. Paraoksonaz                             | 28        |
| 2. 8. 1. Kimyasal Yapısı ve Substratları      | 28        |
| 2. 8. 2. Sentez ve Salınımı                   | 31        |
| 2. 8. 3. Fonksiyonları                        | 32        |
| 2. 9. Miyeloperoksidaz                        | 34        |
| <b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>                     | <b>36</b> |
| 3. 1. Deney Hayvanları                        | 36        |
| 3. 2. Çalışma Grupları                        | 36        |
| 3. 3. Silimarin Çözeltisinin Hazırlanışı      | 37        |
| 3. 4. Resveratrol Çözeltisinin Hazırlanışı    | 37        |
| 3. 5. E Vitamini Çözeltisinin Hazırlanışı     | 38        |
| 3. 6. Biyokimyasal Analizler                  | 38        |
| 3. 6. 1. Miyeloperoksidaz Aktivitesi Tayini   | 38        |
| 3. 6. 2. TBARS Tayini                         | 40        |
| 3. 6. 3. GSH Analizi                          | 41        |
| 3. 6. 4. Paraoksonaz Analizi                  | 43        |
| 3. 6. 5. Protein Tayini                       | 44        |
| 3. 6. 6. ALP, AST, ALT, TP Tayini             | 46        |
| 3. 6. 7. Serum HDL-K Düzeyleri Tayini         | 46        |
| 3. 6. 8. Dokuların Histopatolojik İncelenmesi |           |
| 3. 7. İstatistiksel Analizler                 | 46        |
| <b>4. BULGULAR</b>                            | <b>47</b> |
| 4. 1. Serum AST Düzeyleri                     | 47        |
| 4. 2. Serum ALT Düzeyleri                     | 47        |

|  |    |
|--|----|
| 4. 3. Serum ALP Düzeyleri                            | 48 |
| 4. 4. Serum Paraoksonaz Düzeyleri                    | 48 |
| 4. 5. Serum TBARS Düzeyleri                          | 49 |
| 4. 6. Serum HDL-K Düzeyleri                          | 50 |
| 4. 7. Serum TP Düzeyleri                             | 51 |
| 4. 8. Karaciğer TBARS Düzeyleri                      | 51 |
| 4. 9. Karaciğer GSH Düzeyleri                        | 52 |
| 4. 10. Karaciğer MPO Düzeyleri                       | 53 |
| 4. 11. Karaciğer PON1 Düzeyleri                      | 53 |
| 4. 12. Serum PON1 ve HDL-K Arasındaki Korelasyon     | 54 |
| 4. 13. Serum PON1 ve TBARS Arasındaki Korelasyon     | 55 |
| 4. 14. Karaciğer PON1 ve TBARS Arasındaki Korelasyon | 56 |
| 4. 15. Karaciğer Histopatolojik Bulguları            | 58 |
| 4. 15. 1. Kontrol Grubu                              | 58 |
| 4. 15. 2. Alkol Kontrol Grubu                        | 59 |
| 4. 15. 3. Resveratrol Grubu                          | 59 |
| 4. 15. 4. Silimarin Grubu                            | 60 |
| 4. 15. 5. E Vitamini Grubu                           | 60 |
| 4. 16. Karaciğerin Histopatolojik Değerlendirilmesi  | 61 |
| <b>5. TARTIŞMA</b>                                   | 63 |
| <b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>                          | 70 |
| <b>KAYNAKLAR</b>                                     | 72 |
| <b>ÖZGEÇMİŞ</b>                                      | 83 |
| <b>EK : Deney Hayvanları Etik Kurulu Kararı</b>      | 84 |



**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| ALP                           | : Alkale Fosfataz                       |
| ALT                           | : Alanin Transaminaz                    |
| AST                           | : Aspartat Transaminaz                  |
| ADH                           | : Alkol Dehidrogenaz                    |
| ALDH                          | : Aldehit Dehidrogenaz                  |
| Asetil CoA                    | : Asetil Koenzim A                      |
| cGMP                          | : Siklik Guanozin Monofosfat            |
| E VİT                         | : E Vitamini                            |
| HCO <sub>3</sub>              | : Bikarbonat                            |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | : Hidrojen peroksit                     |
| HDL                           | : Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein         |
| HPETE                         | : Hidroperoksiieikosatetraenoik Asit    |
| HETE                          | : Hidroksiieikosatetraenoik Asit        |
| LDL                           | : Düşük yoğunluklu lipoprotein          |
| MDA                           | : Malondialdehit                        |
| MEOS                          | : Mikrozomal Etanol Okside Edici Sistem |
| NAD                           | : Nikotinamid Adenin Dinükleotid        |
| NADP                          | : Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat |
| NO                            | : Nitrik Oksit                          |
| NOS                           | : Nitrik oksit sentetaz                 |
| O <sub>2</sub> .-             | : Süperoksit radikali                   |
| OH                            | : Hidroksil radikali                    |

|               |   |
|---------------|---|
| PON1          | : Paraoksonaz                           |
| RSV           | : Resveratrol                           |
| SLY           | : Silimarin                             |
| TBARS         | : Tiobarbitürik Asit Reaktif Substances |
| MPO           | : Miyeloperoksidaz                      |
| COX-2         | : Siklooksijenaz-2                      |
| TNF- $\alpha$ | : Tümör Nekroz Faktörü                  |
| DFP           | : Diizopropil Florofosfat               |
| SR-B1         | : Scavenger Reseptör B1                 |
| PUFA          | : Poliunsature Yağ Asitleri             |
| TRIG          | : Trigliserid                           |
| VLDL          | : Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein       |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1.1.** Alkol dehidrogenaz yolağı
- Şekil 1.2.** Mikrozomal Etanol Okside Edici Sistem
- Şekil 1.3.** Silimarinin kimyasal formülü
- Şekil 1.4.** Resveratrolün yapısı
- Şekil 1.5.** Resveratrolün sentezi
- Şekil 1.6.** Paraoksonazın yapısı
- Şekil 1.7.** Hücre membranında bulunan PON1'in HDL'ye transferi
- Şekil 3.1.** TBARS kalibrasyon grafiğı
- Şekil 3.2.** GSH kalibrasyon grafiğı
- Şekil 3.3.** Lowry yöntemi ile protein analizi kalibrasyon grafiğı
- Şekil 4.1.** Serum AST düzeyleri
- Şekil 4.2.** Serum ALT düzeyleri
- Şekil 4.3.** Serum ALP düzeyleri
- Şekil 4.4.** Serum PON1 düzeyleri.
- Şekil 4.5.** Serum TBARS düzeyleri
- Şekil 4.6.** Serum HDL düzeyleri
- Şekil 4.7.** Serum TP düzeyleri
- Şekil 4.8.** Karaciğer TBARS düzeyleri
- Şekil 4.9.** Karaciğer GSH düzeyleri.
- Şekil 4.10.** Karaciğer MPO düzeyleri
- Şekil 4.11.** Karaciğer PON1 düzeyleri.
- Şekil 4.12.** Serum PON1 ve HDL-K dağılım grafiğı
- Şekil 4.13.** Serum PON1 ve TBARS dağılım grafiğı
- Şekil 4.14.** Karaciğer PON1 ve TBARS dağılım grafiğı

- Şekil 4.15.1A.** Kontrol grubu karaciğer histopatolojik incelemesi, H-E, x20
- Şekil 4.15.1B.** Kontrol grubu karaciğer histopatolojik incelemesi, H-E, x10
- Şekil 4.15.1C.** Kontrol grubu karaciğer histopatolojik incelemesi, H-E, x40
- Şekil 4.15.1D.** Kontrol grubu karaciğer histopatolojik incelemesi, H-E, x40
- Şekil 4.15.2A.** Alkol Kontrol grubu karaciğer histopatolojik incelemesi, H-E, x20
- Şekil 4.15.2B.** Alkol Kontrol grubu karaciğer histopatolojik incelemesi, H-E, x40
- Şekil 4.15.2C.** Alkol Kontrol grubu karaciğer histopatolojik incelemesi, H-E, x20
- Şekil 4.15.3A.** Resveratrol grubu karaciğer histopatolojik incelemesi, H-E, x20
- Şekil 4.15.3B.** Resveratrol grubu karaciğer histopatolojik incelemesi, H-E, x20
- Şekil 4.15.3C.** Resveratrol grubu karaciğer histopatolojik incelemesi, H-E, x20
- Şekil 4.15.4A.** Silimarin grubu karaciğer histopatolojik incelemesi, H-E, x20
- Şekil 4.15.4B.** Silimarin grubu karaciğer histopatolojik incelemesi, H-E, x40
- Şekil 4.15.4C.** Silimarin grubu karaciğer histopatolojik incelemesi, H-E, x20
- Şekil 4.15.5A.** E vitamini grubu karaciğer histopatolojik incelemesi, H-E, x20
- Şekil 4.15.5B.** E vitamini grubu karaciğer histopatolojik incelemesi, H-E, x20
- Şekil 4.15.5C.** E vitamini grubu karaciğer histopatolojik incelemesi, H-E, x20
- Şekil 4.16.** Karaciğer histopatolojik verilerinin gruplara göre değişimi

**TABLÖLAR DİZİNİ**

**Tablo 4.1.** Serum parametreleri gruplara göre tanımlayıcı istatistiksel ölçütleri

**Tablo 4.2.** Karaciğer parametreleri gruplara göre tanımlayıcı istatistiksel ölçütleri

**Tablo 4.3.** Karaciğer histopatolojik skörlama

## 1. GİRİŞ:

Alkol kullanımı günümüzde birçok toplumda önemli bir sağlık problemi haline gelmiştir. Kronik alkol alımı çeşitli hastalıklara yol açmaktadır. Alkolün vücutta metabolize edildiği yerin başlıca karaciğer olması, kronik alkol kullanımında karaciğerde önemli hasarlar oluşmasına neden olmaktadır. Alkolik karaciğer hasarı günümüzde karaciğer hastalıklarının başında gelmektedir.

Kronik alkol kullanımı karaciğerde üç farklı tablo gelişmesine neden olmaktadır. Bunlar karaciğer yağlanması, alkolik hepatit ve alkolik sirozdur. Karaciğer yağlanması alkolik karaciğer hasarının ilk tablosudur. Karaciğer yağlanmasından sonra ortaya çıkan tablo alkolik hepatittir. Alkolik hepatit, bağırsaktan karaciğere geçen artmış lipopolisakkaritler, nötrofil ve makrofajların infiltrasyonunu başlatır ve inflamasyon oluşmasıyla ortaya çıkar. Alkolik karaciğer hasarının son tablosu alkolik sirozdur. Alkolik hepatitten siroza geçiş için belli bir süre yoktur, çok hızlı ya da uzun sürede oluşabilir (1, 2).

Alkol kullanımında ortaya çıkan karaciğer hasarının patogenezinde, artmış NADH oluşumu, asetaldehit birikimi ve asetaldehitin ileri metabolizması sonucu oluşan serbest radikaller vasıtasıyla oksidatif stres etkilidir.

Alkol kullanımı, alkolik karaciğer hasarı ve oksidatif stres arasındaki ilişkiyi tanımlayabilmek için birçok çalışma yapılmıştır (1,2,17). Bu çalışmalarda genellikle antioksidanların alkolik karaciğer hasarını önlemedeki güçleri araştırılmıştır. Literatürde alkolik karaciğer hasarını önlemede en etkili antioksidanlardan biri silimarin olarak belirtilmiştir (3).

Silimarin devedikeni bitkisinden elde edilen bir flavonoiddir. Karaciğer hastalıklarının tedavisi üzerine en çok çalışılan maddedir. Silimarin lipid peroksidasyonunu önleyerek ve serbest radikalleri süpürerek antioksidan özellik göstermektedir (3).

Resveratrol, asmanın yaprak ve tane kabuğunda yüksek miktarda sentezlenen ve fitoaleksinin özelliği gösteren bir stilben grubu bileşiktir. Resveratrolün serbest radikallerin sebep olduğu hücre hasarını engellemeye yardımcı olabilen güçlü bir antioksidan olduğu gösterilmiştir (4). Son yıllarda resveratrolün karaciğer hasarına karşı koruyucu etkilerini araştıran çalışmalar yapılmaktadır.

E vitamininin antioksidan özelliği, serbest radikallerin başlattığı lipid peroksidasyonunu inhibe etmesinden ileri gelir. Tokoferoller, alkoksil radikalleri, singlet oksijen, nitrojen dioksit, peroksinitrit, ozon ve süperoksit gibi diğer reaktif oksidanlarla da tepkimeye girer. Singlet oksijen hariç,  $\alpha$ -tokoferol, bu diğer oksidanları süpürmede, göreceli olarak küçük kinetik üstünlüğe sahiptir (6,61).

Çalışmamızda, kronik alkol kullanımına bağlı olarak gelişen ve oksidatif stres ile açıklanan karaciğer hasarında, koruyucu etkileri bilinen ve her biri güçlü antioksidanlar olan silimarin, resveratrol ve E vitamininin koruyucu etkilerini kıyaslamayı amaçladık.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Karaciğerin Yapısı Ve Fonksiyonları:**

Karaciğer karın boşluğunun üst kısmında yer alan çok büyük bir organdır. Hemen hemen tamamı kemik ve kıkırdak kaburgaların altında uzanır ve regio epigastrica'yı çaprazlayarak yerleşir. Erişkin erkekte 1.4-1.5 kg, erişkin kadında 1,2-1,4 kg ağırlığa sahiptir. Diyaframın altında, karnın sağ üst çeyreğinde bulunmakta ve kaburga kemikleri tarafından korunmaktadır. Sağ ve sol olmak üzere iki anatomik loba ayrılmıştır. Karaciğer hepatik arter ve portal venin sağ ve sol kolları tarafından beslenmektedir (8,9).

Karaciğer, abdominal organlar içinde çift kan dolaşımına sahip tek organdır:

1. Sindirim sisteminin kapiller yatağından besin maddelerince zengin kanı taşıyan portal ven
2. Merkezi dolaşımdan karaciğere bol oksijenli kanı taşıyan hepatik arter.

Hepatositlerde sentezlenen safra, safra kanalcıklarına, ordan daha geniş intrahepatik safra kanallarına, sonunda sağ ve sol hepatik safra kanallarına akar. Hepatik safra kanalları, safra kesesinden safra kanalı ile birleşerek ortak safra kanalını oluşturur (8).

### **2.2. Karaciğerin Biyokimyasal Fonksiyonları:**

Karaciğerin önemli sentetik ve metabolik fonksiyonları vardır. Detoksifikasyon veya böbreklere benzer şekilde son metabolik ürünün ekskresyonu yanında fagositik fonksiyona sahip retikuloendotelial sistem hücreleri olan hepatik makrofajlar ve kuppfer hücreleri de organdaki kan damarlarının duvarı boyunca yerleşmişlerdir.



Karbonhidrat, lipid, protein metabolizması, glukoneogenez ve  $\beta$ -oksidasyon gibi çok önemli metabolik olaylarda karaciğer santral rol oynamaktadır (10).

### **2.2.1. Karbonhidrat Metabolizması:**

Karaciğer, glukoz konsantrasyonunun sürekliliğın sağlanmasında rol alır. Yemek sonrası, portal vendeki glukoz konsantrasyonu yüksek ise glikojen sentezlenir ve depo edilir, glukoz yağ asitlerine çevrilir ve adipoz dokuya taşınır. Açlık esnasında ise sistemik glukoz düzeyinin sabit kalması için glikojeneze ara verilir ve glukoneogenetik yolla gliserol, laktat, amino asit gibi substratlardan glukoz sentezlenir. Yağ asitleri lipolizle depolardan karaciğere ulaşır. Burada önce ikişer karbon birimlerine ayrılır, daha sonra trikarboksilik asit siklusunda okside olur (10).

### **2.2.2. Lipid Metabolizması:**

Karaciğer, karbonhidrat ve proteinlerden, yağ asitlerinin başlıca sentezlendiği bölgedir. Yağ asitlerinin  $\beta$  oksidasyonu ve fiziksel egzersizler ya da açlık süresince dokuların devamlılığı için enerji sağlamak için asetil CoA'dan asetoasetik asit oluşumu için en aktif yerdir. Hücre membranının yapısı için önemli olan fosfolipid ve lipoproteinler karaciğerde sentezlenir (11).

Karaciğer, kolesterol sentezinin % 80'inin gerçekleştiği organdır. Kolesterol, hücre membranı, safra asitleri ve steroid hormonların sentezi için kullanılır. Bir kısmı ise yağ asitleri ile esterifikasyonun ardından lipid damlacıkları halinde depolanır. Geri kalan önemli bir kısmı serbest ya da esterleşmiş yapıda VLDL'in yapısına katılır ve kana verilir (2,10).

### **2.2.3. Detoksifikasyon Fonksiyonu:**

Karaciğer, hem vücuda dışarıdan giren hem de metabolizma sonucunda ortaya çıkan çeşitli metabolitlerin ekskresyonundan ve detoksifikasyonundan sorumludur.

Amino asitlerin deaminasyonu sonucu açığa çıkan amino grubu amonyağa dönüşür. Bu amonyak portal ven yoluyla karaciğere gelir ve burada üreye çevrilir.

Steroid hormonlar, karaciğer tarafından metabolize edilirken glukoronat ve sülfatla konjüge edilerek inaktive edilirler, suda çözünebilen forma dönüştürülerek idrarla atılırlar.

İlaçların çoğu, endoplazmik retikulum enzimleri tarafından metabolize ve inaktive edilir. Bazıları safraya ekskrete edilir (10).

Hemoglobin yıkımından sonra açığa çıkan ve retikuloendotelyal sistemde sentezlenen bilirubin de karaciğerde glukoronik asitle konjüge edilerek suda erir hale getirilir ve safra ile atılır (2,11).

#### **2.2.4. Depo Fonksiyonu:**

Karaciğerin, karbonhidratlar dışında, vitaminleri depo etme özelliği vardır. En çok depo edilen vitamin, A vitamindir. A vitamini eksikliğini uzun bir süre engellemeye yetecek kadar A vitaminin depo edilir. D, E, K, B9, B12 vitaminleri de yine karaciğerde depo edilir.

Vücutta, kandaki hemoglobin dışında, demirin büyük bölümü karaciğerde ferritin şeklinde depo edilir. Karaciğer hücrelerinde, demirle birleşebilen apoferritin bol miktarda bulunur. Böylece vücut sıvılarında demir miktarı arttığı zaman, apoferritin ile birleşerek ferritin oluşturur ve gerektiğinde başka bir yerde kullanılmak üzere saklanır. Dolaşımdaki demir düşük bir düzeye indiğinde ferritin demiri serbest bırakır. Böylece karaciğerdeki apoferritin-ferritin sistemi bir demir deposu görevi yaptığı gibi kan demirinin tamponu işlevini de yürütür.

Karaciğer, demir dışında bakır'ı da depo eder (12).

#### **2.2.5. Safra Tuzlarının Sentezi:**

Safra tuzları, karaciğerde, kolesterolden sentezlenir. Karaciğerden salgılanan safra tuzları, % 65 safra asitleri, % 20 fosfolipidler, % 4 kolesterol, % 5 proteinler, % 0.3 safra pigmentleri ve bilirubinün karışımı şeklindedir. Safra asitleri, başlıca glisin ve taurin ile konjüge durumdadır. Salgılanan safranın % 50' si eşit miktarda Na ve K içeren H<sub>2</sub>O'dur, bununla beraber, plazmada majör anyon Cl<sup>-</sup> iken, safrada HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 'dür, bu nedenle izotoniktir. Safra asitleri, lipid sindirimi ve emiliminde önemlidir.

Ayrıca yağda çözünen tüm vitaminler safra tuzlarının yardımı ile emilirler. Safra sekresyonundaki defekt, birkaç gün içinde K vitamini eksikliğine ve buna bağlı olarak karaciğerde, koagülasyon faktörlerinin sentezinde bozulmaya neden olur (13).

### **2.3. Alkol:**

Alkol, eski çağlardan beri insan yaşantısını olumsuz yönde etkileyen önemli bir madde olmuştur. Özellikle alkollü içkilerin ortaya çıkışı bireysel, toplumsal, ekonomik ve sağlık sorunlarını da beraberinde getirmiştir (14).

İçkilerde kullanılan etil alkoldür (etanol). Bu alkolün saf hali renksizdir ve acı ve yakıcı bir tadı vardır. Etil alkol, arpa ve üzüm gibi tahıl ve meyvelerin doğal yapısında bulunan şekerlerin fermantasyonundan elde edilir.

Geçmişte alkolün "yaşam iksiri" olduğuna ve yaşamı uzattığına inanılırdı. Ancak zaman geçtikçe bu inanın doğru olmadığı kanıtlandı. Alkol merkezi sinir sistemini baskılayarak sakinleştirir ve bilinç durumunu da değiştirir. Çok fazla içildiğinde alkol öldürücü bir zehir olabilir. Alkol, bir gram yağın içerdiği kalorigen biraz daha az kalori içerdiğinden teknik olarak bir besin maddesidir (15).

Ağır alkol tüketimi ve karaciğer hastalıkları arasındaki ilişki 200 yıldan daha uzun süre önce fark edildi. Karaciğer, alkole bağlı hasara karşı başlıca duyarlı olan organdır, çünkü alkol metabolizmasının primer bölgesi karaciğerdir (16,17).

#### **2.3.1. Alkol Metabolizması:**

Karaciğer alkolün metabolik yıkımından sorumlu temel organdır ve total eliminasyonun %75'inden sorumludur. Böbrek, mide, ince bağırsak, akciğer, kalp, beyin, kan hücreleri ve iskelet kası da az miktarda fakat belirgin alkol oksidasyon kapasitesine sahiptirler (18).

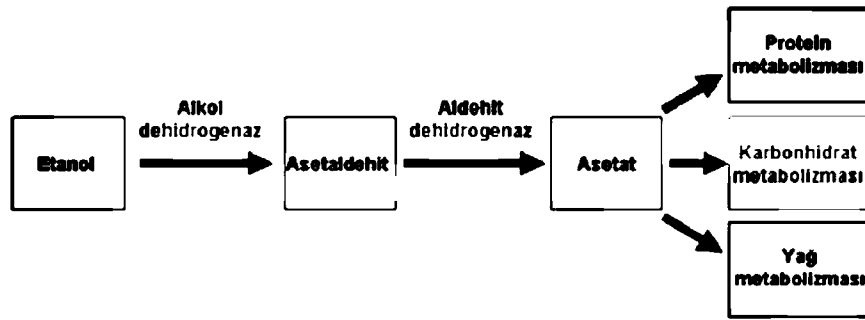
Karaciğerde alkol (etanol) metabolizmasından sorumlu olan başlıca 3 yolak vardır. Bunlar sırasıyla:

1. Hepatosit sitozolünde bulunan alkol dehidrogenaz yolağı,
2. Hepatosit endoplazmik retikulumunda bulunan mikrozomal enzimler,

3. Hepatosit peroksizomlarında bulunan katalaz yolaklarıdır.

### 2.3.1.1. Alkol Dehidrogenaz Yolağı:

Alkol dehidrogenaz (ADH); etanolü, hepatosit sitozolünde, asetaldehid'e dönüştürür. Karaciğere toksik etki gösteren asıl madde asetaldehit'dir. Düşük konsantrasyonlarda bile çok yüksek toksik etki gösterir. Asetaldehit, mitokondriyal Aldehit Dehidrogenaz (ALDH) enzimi tarafından asetat'a dönüştürülür. Her iki basamakta da NAD, NADH'e indirgenir. Asetat ise enerji veya yararlı molekülleri üreten metabolik döngülere girer (Şekil 1.1) (19, 2).



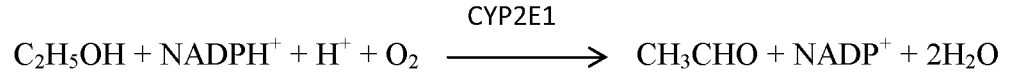
Şekil 1.1: Alkol metabolizmasında alkol dehidrogenaz yolağı

### 2.3.1.2. Mikrozomal Etanol Okside Edici Sistem (MEOS):

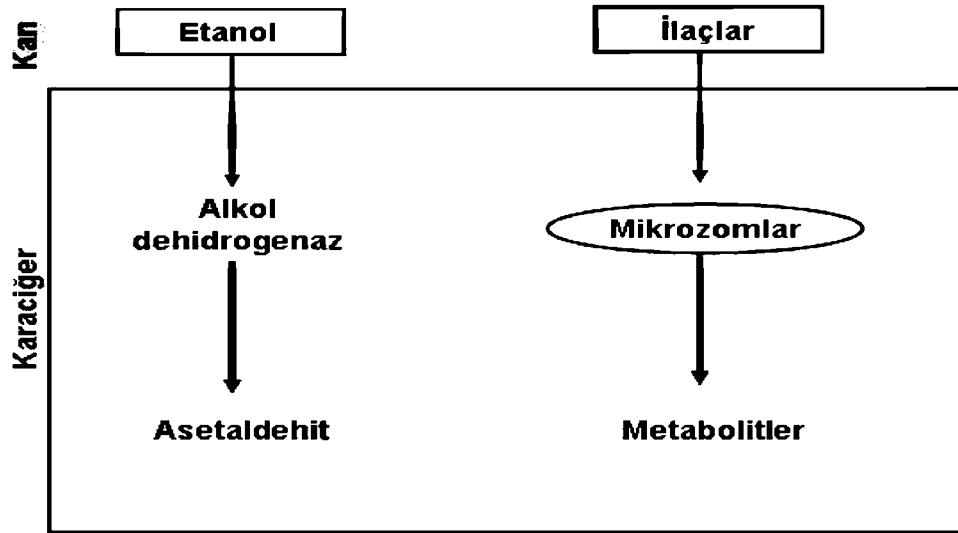
Mikrozomal enzimler, ADH yolağı kadar etkili olmasa da, etanolün metabolizmasında önemli rol oynarlar. MEOS olarak isimlendirilen bu sistem, ilaçları metabolize eden sitokrom P450 gibi enzimlerle birçok ortak özelliği paylaşır. Bu paylaşım, bir çok etanol-ilaç etkileşimlerini açıklar. MEOS'un etanole affinitesi, ADH enzimine göre çok azdır (12). Dolayısıyla az miktarlarda alınan etanolün metabolizmasında MEOS'un rolü yoktur (Şekil 1.2) (19).

Endoplazmik retikulumda lokalize bazı sitokromlar, zararlı bileşiklerin detoksifikasyonunda görev alırlar. MEOS, karaciğer endoplazmik retikulumunda bulunan sitokrom p450 2E1 (CYP2E1) aracılığıyla alkolü asetaldehite okside eder.

Normalde düşük düzeyde fonksiyon gösteren CYP2E1, alkol varlığında çok yüksek bir düzeye stimüle edilir. Daha sonra, asetaldehit, asetata okside edilirken, NADPH ise NADP<sup>+</sup>ye oksitlenir. Bu yol serbest demirle ilişkili olarak, oksidatif strese yol açan serbest radikaller üretir. Oksidatif stres yeterli büyüklükteyse, membran ve lipoproteinlerdeki lipidler peroksidasyona uğrar, sonrasında nekroz veya apoptoz gelişir (19, 2).



Reaksiyon sonucu bir reaktif oksijen radikali olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşur. Bu molekül glutatyon ile nötralize edilmediğinde lipid peroksidasyonuna yol açar. Lipid peroksidasyonu sonucu hücre membranının kalsiyuma geçirgenliği artar, hücre içinde kalsiyum birikimi olur ve bu olaylar sonucu yağlanmış karaciğerde inflamasyon ve fibroz başlar, sonuç siroza kadar gidebilir (3).



Şekil 1.2. Alkol metabolizmasında Mikrozomal Etanol Okside Edici Sistem

### 2.3.1.3. Katalaz Yolağı:

Katalaz yolağı etanol metabolizmasında önemli bir role sahip değildir. Etanol peroksisomlarda katalaz ile okside edilir. Hiç katalaz enzimine sahip olmayan kişilerin bile, etanol alımını takiben asemptomatik oldukları bilinmektedir.

### **2.3.2. Alkolik Karaciğer Hastalığı:**

Alkol kullanımının karaciğer hastalıklarına yol açtığı yüzyıllardır bilinmektedir. Bugün için alkol kullanımı ile yağlı karaciğer, alkolik hepatit ve siroz gibi karaciğer hastalıkları arasındaki ilişki iyice araştırılmıştır. Yağlı karaciğer; alkol (etanol) kullanımının bırakılması ile geriye dönebilen selim bir durumdur. Ancak hastada alkolik hepatit gelişmiş ise bu tedavi gerektiren daha ciddi bir sorundur, gerekli tedavi yapılamazsa siroza kadar ilerleyebilir. Siroz gelişmiş ise; bu son dönem karaciğer hastalığıdır, tedavi görmeyen hastalarda kısa sürede portal hipertansiyon ve komplikasyonları, karaciğer yetmezliği gelişebilir ve sonunda ölüme yol açar (19).

Uzun süre alkol kullanımı alkolik karaciğer hastalığında majör rol oynasa da, alkolik karaciğer hastalığı gelişme oranı ağır içicilerin yarısından daha fazla değildir. Bu bulgular karaciğer hastalıklarında diğer faktörlerin, heredite, çevresel veya her ikisi birden, etkili olduğunu düşündürmektedir.

Organizmada etanol metabolizması esnasında meydana gelen artmış lipid peroksidasyonu, ya karaciğerde oluşan peroksidatif sürece bağlı olarak indirek, ya da etanolün dolaşan lipidler ve hücre membranları üzerine direk etkisinden ileri gelebilir.

Aşırı NADH oluşumu, hiper metabolizmaya ve bu olayda doku hipoksisine neden olur. Hipoksinin en belirgin olduğu bölge Zone 3 yani perisentral bölgedir. Karaciğerin kan akımı periferden merkeze, yani portal alandan Zone 1'e sonra Zone 2'e sonra Zone 3'e ve sonra da santral vene doğrudur. Ortaya çıkan perisentral hipoksi hücre içi laktat miktarında artmaya yol açar ki, bu da fibrozisi tetikleyen bir olaydır (3).

### **2.3.3. Alkolik Karaciğer Hastalığı Tipleri:**

Alkolik karaciğer hastalığı üç kategoriye ayrılabilir:

### 2.3.3.1. Yağlı Karaciğer:

Ağır içicilerin hemen hemen tamamının karaciğerinde birkaç derece yağlanma oluşur. Bu ayrıca, tek bir içki oturumu sonrasında da geçici olarak görülebilir. Yağlı karaciğer geri dönüşümlüdür ve daha tehlikeli hasarlara yol açtığı düşünülmez.

Yağlı karaciğer hastalığının ilk bulgusu hepatositlerdeki yağ birikimidir. Normal karaciğerde lipidlerin miktarı karaciğer ağırlığının % 5'ini geçmez ve bunun içinde trigliseridler, fosfolipidler, kolesterol ve kolesterol esterleri bulunur. Yağlanmış karaciğerde bir yandan genel lipid miktarı artarken diğer yandan da trigliserid birikiminin ön plana çıktığı görülür. Normalde trigliseridler karaciğerdeki lipidlerin %15 kadarını oluştururken, yağlanmış karaciğerde bu oran %60'lara kadar yükselir.

Karaciğer yağlanması ya trigliserid sentezinin artması veya sentezlenen trigliserid molekülünün hepatosit dışına çıkışının yetersiz olması sonucunda meydana gelmektedir.

Ancak aynı metabolik bozuklukları taşıyor olmasına rağmen bazı hastalarda sadece yağlanma görülürken diğerlerinde ise steatohepatit gelişmesi yağlı karaciğer hastalığının tüm formlarının sadece bu metabolik bozukluklar zemininde açıklanmasını imkansız kılmaktadır. Bu gerçekten hareketle geliştirilen 'two hits' (iki darbe) hipotezi bugün için yağlı karaciğer hastalığı patogenezindeki en geçerli kuram durumundadır. Bu kurama göre birinci darbe sadece karaciğer yağlanmasına neden olmakta, hastalar ikinci darbe ile karşılaşmadıkça bu durum karaciğer yağlanması olarak devam etmektedir. İkinci darbe (second hit) ile karşılaşan hastalarda ise birinci darbe ile yağlanarak duyarlı hale gelmiş olan iltihabi infiltrasyon ve fibrozis gelişmekte neticede yağlı karaciğer hastalığının diğer bir klinik formu olan steatohepatit ortaya çıkmaktadır. Bu patogeneiz sürecinde ikinci vurudan sorumlu olan, serbest radikaller ve bunların artmasına yol açan koşullardır (20).

### **2.3.3.2. Alkolik Hepatit:**

Bu hastalık, karaciğer dokusunun bozulması ve yaygın inflamasyon ile karakterizedir. Ağır içicilerin %50'sinde ortaya çıkar. Ateş, sarılık ve karın ağrısı semptomları gözlenir. Fibroz denen süreç başlar ve scar doku sağlıklı dokunun yerini almaya başlar. Hepatositlerde yer yer şişme ve nekroz, nekroz odakları etrafında ve içinde de nötrofil birikimi mevcuttur. Hastaların çoğunun hepatositlerinde intrasitoplazmik hyalen materyal (Mallory Cisimcikleri) görülür. Bu cisimcikler, alkolik hepatitte karakteristiktir ancak tanınmaz değildir. Karaciğer hücre nekrozunu takiben nötrofillerin hakim olduğu bir infiltrasyon meydana gelir, lenfositler ve makrofajlar da katılırlar ancak bu katılım nötrofillere göre daha az orandadır. Alkol bağımlılığı devam ederse, yaygın nekroz, inflamasyon ve fibroz görülür (2, 16).

### **2.3.3.3. Alkolik Siroz:**

Ağır içicilerin % 15-30'ununda görülen ve karaciğer hastalığının en ileri boyutu alkolik sirozdur. Alkolik karaciğer hastalığının son evresidir.

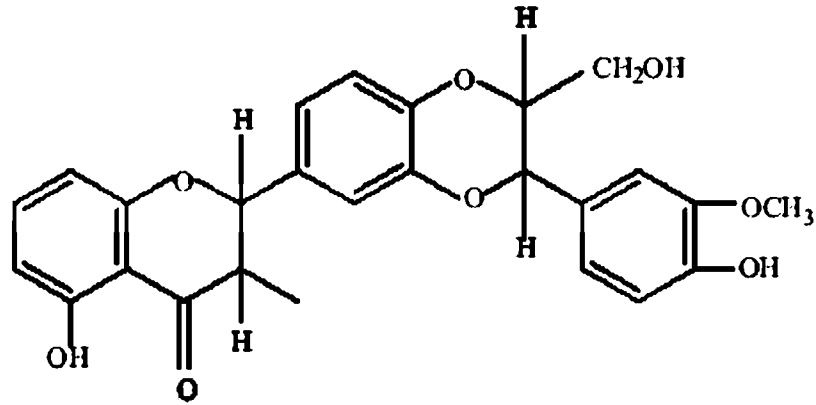
Hastalığın başlangıcında etiyolojik nedene bağlı olarak gelişen bir hepatoselüler hasar ve buna eşlik eden iltihabi infiltrasyon söz konusudur. Uzun süre devam eden iltihabi infiltrasyon karaciğerde aşırı bağ dokusu birikimi olarak ifade edebileceğimiz fibroze neden olmakta, gelişen fibrozis karaciğerin normal yapısı ile mikrovasküler ilişkilerini bozmakta ve devam eden bu süreç neticesinde karaciğer sirozu gelişmektedir. Bu yapısal değişiklikler presinüzoidal alan, sinüzoidler düzeyi ve postsinüzoidal alanda (santral ven) farklı morfolojik oluşumlarla temsil edilir (21).

Karaciğer küçülür ve normal karaciğere göre ağırlığı azalır. Skar oluşumu artar, karaciğer parankimi azalır, fibroz belirginleşir (2).

### **2.4. Silimarin:**

Silimarin devedikeni (*Silybum marianum*) bitkisinin tohum ve meyvesinin ekstresinden elde edilir ve üç ayrı bileşik olan silibinin (*silybin*), *silydianin* ve *silychristine*'den oluşur (22,23).





**Şekil 3:** Silimaritin kimyasal formülü

Etki Mekanizması:

Literatürde silimaritin etki mekanizması için dört farklı yol açıklanmıştır ancak gerçek mekanizma tam olarak bilinmemektedir.

1. Hepatotoksik ajanların hepatositlere girmesini engelleyen hücre membranı stabilizatörü ve permeabilite regülatörleri olarak.
2. Glutasyonun intraselüler konsantrasyonunun regülatörü olarak.
3. Karaciğer rejenerasyonunu stimüle ederek RNA polimerazın hücre çekirdeğindeki aktivitesini uyarıcı olarak.
4. Siroz oluşturan kolajen liflerin depozisyonundan sorumlu hepatositlerin miyofibroblastlara transformasyonunun inhibitörü olarak (25).

#### **2.4.1. Fonksiyonları:**

##### **2.4.1.1. Antioksidan Özelliği:**

Silimaritin, birçok deneysel hayvan modelinde ve insan hepatik hasarında lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (25). Hem serbest radikal süpürücü hem de oksidatif stres sonucunda azalan redükte glutasyon miktarını arttırarak antioksidan özellik gösterir. Ratlarla yapılan bir çalışma, silimaritin lipoksijenaz yolağında lökotrien sentezini önleyerek, enzim peroksidasyonunu inhibe ettiği gözlenmiştir (25 - 27).

#### **2.4.1.2. Karaciğer Üzerine Etkisi:**

Karaciğer vücudun detoksifikasyonundan sorumludur. Vücudumuza aldığımız zararlı kimyasallar, ilaçlar ve alkol karaciğer hücreleri tarafından filtrelenir. Silimarin, toksinleri kandan uzaklaştırmaya yardımcı olan kan proteinlerinin niteliğini arttırarak karaciğere yardımcı olur.

Silimarinin kimyasal komponentleri, doğru hepatoprotektif ya da karaciğer dostu olarak adlandırılır. Silimarinin, karaciğeri koruma ve fonksiyonlarını arttırma kapasitesi, karaciğer hasarına neden olan faktörleri inhibe edebilme yeteneğine bağlıdır. Bu faktörlerin en önemlileri lökotrienler ve serbest radikallerdir. Silimarin bileşiklerini bu kadar etkili ve önemli kılan şey, karaciğeri korurken aynı zamanda karaciğer protein sentezini sitimüle etmesidir. Silimarin varlığında, hasarlı karaciğer, dokuları daha hızlı yenileyebilir (28).

Oksijenin bir poliansature yağ asidine transferi ile oluşan lökotrienler karaciğer dokusuna zarar verir. Bu reaksiyonun gerçekleşebilmesi için lipoksijenaz enziminin varlığı gereklidir. Silimarin, bu enzimin etkisini inhibe ederek lökotrienlerin oluşumunu inhibe eder (29).

Silimarinin de kapsayan flavonoid-benzeri bileşikler karaciğer üzerinde iki spesifik etkisi vardır:

1. Silimarin hepatosit membranlarına bağlanarak, çevresel toksinlerin, yabancı kimyasalların, endojen zehirlerin ve serbest radikallerin olası hasarlarından korur.
2. Silimarin karaciğer hücrelerinin içine girer, karaciğerin sağlığı için hayati önem taşıyan enzimleri üretme yeteneğini teşvik eder. Bu etkisi karaciğer hücrelerinin hasar ve hastalıklarının iyileşmesini hızlandırır. Bu enzimlerin üretimini hızlandırarak, karaciğer hücre yenilenmesi de sitimüle edilmiş olur (29).

#### **2.4.1.3. Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkisi:**

Silimarin, arter duvarlarının zarar görmesine neden olan serbest radikalleri süpürücü olarak etki göstererek kalbi korur. Kalp krizi geçirmiş ve kan basıncı yüksekliğinden şikayetçi kişiler için yararlıdır.

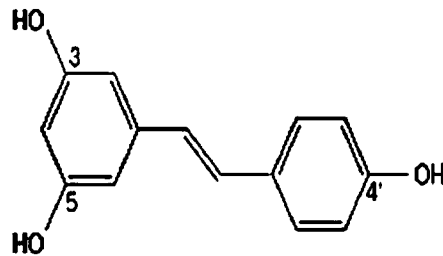
#### 2.4.1.4. Antiinflamatuvar ve Antikarsinojenik Etkisi:

Lökotrien ve prostaglandinlerin sentezinin inhibisyonu, Kupffer hücrelerinin inhibisyonu, nötrofil göçünün inhibisyonu, silimarinin literatürde bildirilmiş antiinflamatuvar etkilerinden bazılarıdır. Silimarinin topikal kullanımı ile farelerde UVB ışınları ile oluşturulmuş cilt kanserini önleyebildiği gösterilmiştir (22).

### 2.5. Resveratrol:

#### 2.5.1. Tarihçe:

Resveratrol (3,4',5-trihidroksi stilben), 1930' lu yılların başında tıbbi bir bitki olan *Veratrum grandifolium* reçinelerinde tanımlanmıştır (Şekil 1.4) (30). Çin ve Japon bilim adamları başta olmak üzere, birçok bilim adamı tarafından yıllarca araştırılmıştır. Japonya ve Çin'de halk arasında geleneksel olarak kullanılan *Polygonum cuspidatum* (kojo-kon ya da İdatori çayı) adı verilen, ve deri hastalıkları, karaciğer ve damar hastalıklarını tedavi edici, bitkinin en yüksek resveratrol miktarına sahip olduğu belirtilmektedir (30,31,32,33,34).



Şekil 1.4. Resveratrolün yapısı

Resveratrol, üzümün yaprak ve özellikle tanesinin kabuğunda yüksek miktarda bulunan ve fitoaleksinin özelliği gösteren bir stilben grubu bileşiktir (35). Cis ve trans izomer şekillerde bulunur. Cis ve trans şeklinde glukosid olarak trans ve cis-piceid şeklinde glukoz molekülüne bağlanarak da oluşur. Kapalı formülü  $C_{14}H_{12}O_3$  tür (36).

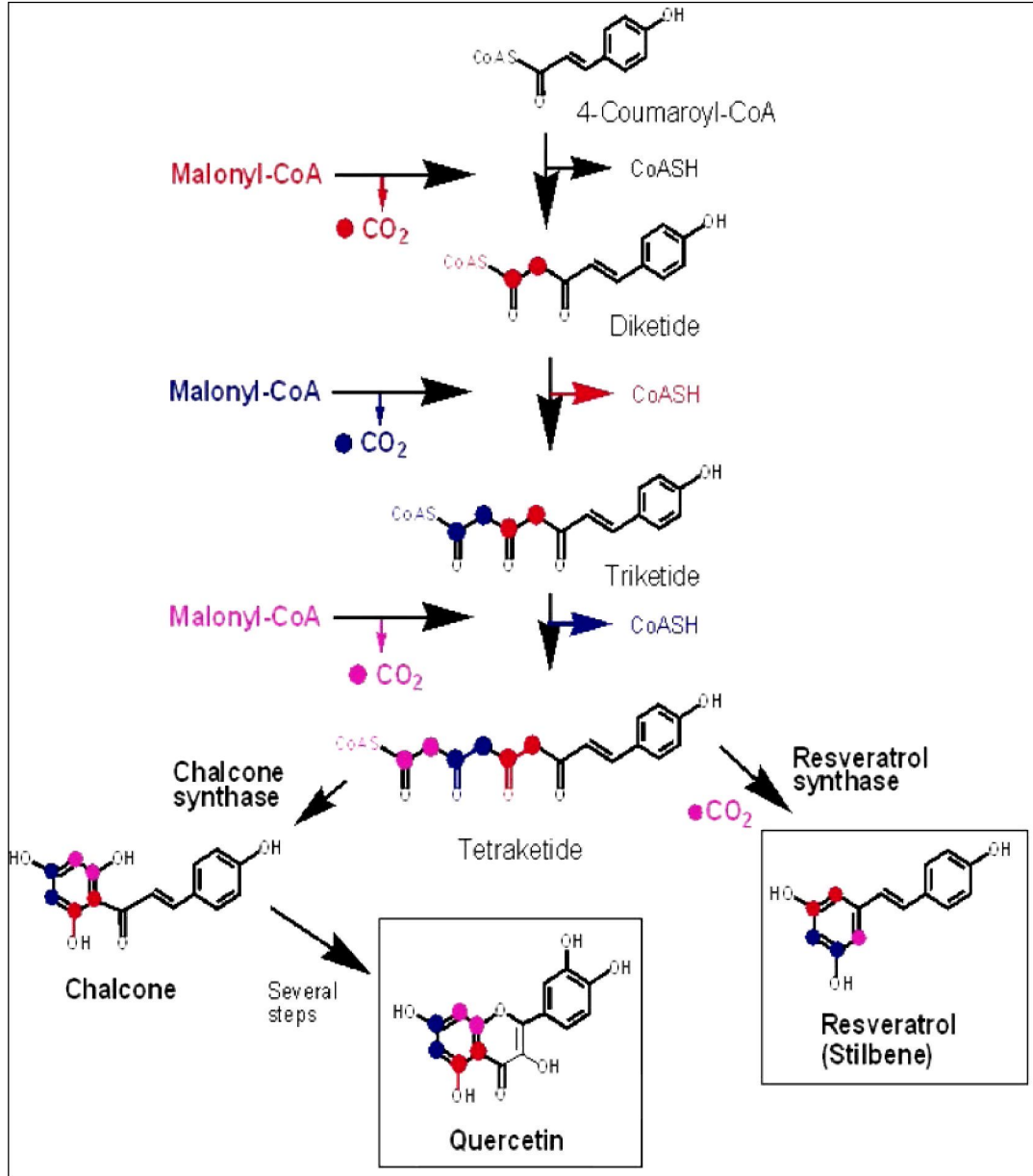
Resveratrolün 72 bitki türünde üretilebildiği belirlenmiştir. Asma, yaban mersini, dut, Antep fıstığı, başta olmak üzere, böğürtlen, kızılıcık, yer fıstığı gibi

birçok meyve ve bitkide tespit edilmiştir (37, 38). Asmaların resveratrol üretebilme kapasitesi diğer birkilere kıyasla daha yüksektir ve bu özelliği üzümün taze ve işlenmiş ürünlerinin yaygınlaştırılmasında etkili olmaktadır. Resveratrol, özellikle renkli kabuklu üzümlerde bol miktarda sentezlenmektedir. Taze üzümün her gramında 0,30 - 14,10 mg, kuzu üzümde ise gram'da 9,30 - 78,50 mg resveratrol bulunmaktadır (5,38)

Resveratrol ısıya dayanıklıdır. Bu nedenle, çoğu gıdada aktif formunu (trans formu) korumaktadır. % 60 nem ve oda sıcaklığında 2 yıl, % 70 nem ve 40<sup>0</sup>C'de ise 4 sene süreyle stabilitesini koruduğu belirtilmiştir (39). Işık ve oksijene maruz kaldığında trans izomerlerin cis izomere dönüştüğü belirlenmiştir (36).

### **2.5.2. Sentezi:**

Resveratrol asmanın, yaprak, çiçek dokuları ve tanelerinde, fitoaleksinin olarak sentezlenmektedir. Bu dokularda resveratrolün sentezlenebilmesi için bitkinin bir stres faktörü ile karşılaşmasının gerekli olduğu, uyarıcı etkisinin bulunmadığı durumlarda ise bu dokularda resveratrol üretiminin gerçekleşmediği veya çok az miktarda gerçekleştiği belirtilmiştir (40,41). Resveratrol tanelerde, tane kabuk hücrelerinde, yapraklarda ise alt/üst yaprak dokusundaki hücrelerde sentezlenir. Bunun yanı sıra, asmanın diğer odunsu kısımlarında da resveratrolün bulunduğu ve bu kısımları çürümelere karşı koruduğu belirtilmiştir (42,43,44).



Şekil 1.5. Resveratrolün Sentezi

### 2.5.3. Etkileri:

1992 yılında Siemann ve Creasy'nin şaraplarda resveratrolü tanımlamalarıyla birlikte, resveratrolün sağlık üzerine etkisi ile ilgili çalışmalar da hız kazanmıştır. Resveratrolün; antioksidan, antitümör ve antimutajen özellikleri nedeniyle insan sağlığı için doğal bir kimyasal koruyucu olduğu belirtilmiştir (45,46,47).

Resveratrolün sağlık üzerine olumlu etkileri şöyledir:

1. Serbest radikal oluşumunu engellemektedir (48).
2. Trombosit agregasyonunu engellemektedir (49,50)
3. Düşük yoğunluklu lipoproteinlerin oksidasyonunu önlemektedir (51,52).
4. Koroner kalp rahatsızlığı riskini düşürmektedir (53,54,55).
5. Sinir dokularını korur ve Alzheimer'a karşı iyi bir koruyucudur
6. Hücre membranı için koruyucudur (56).
7. Sinir hücrelerinin olgunlaşmasına yardımcı olmaktadır (56).
8. Kanserin başlangıç, gelişme ve ilerleme olarak bilinen 3 aşamasında da etki göstererek insanda görülebilecek ağız, deri, kolon, böbrek, karaciğer, prostat ve meme kanseri gibi tüm kanser çeşitlerinde azalma sağlanmaktadır (55).
9. Güçlü bir anti inflamatuardır (45).
10. Yaşlanmayı düzenleyen genleri aktive etmektedir.
11. Damarlardaki nitrik oksit sentezini arttırarak damarların genişlemesine yardımcı olup kan akımının rahatlamasını sağlamaktadır (56).

#### **2.5.4. Sağlık Üzerine Etkileri:**

##### **2.5.4.1. Antikanserojen Aktivite:**

Resveratrol, kanserin pek çok aşamasında durdurucu ve engelleyici özelliğe sahiptir. Hücreyi apoptozise götüren tümör baskılayıcı gen p53'ün olup olmamasına bağlı olmaksızın kanser hücrelerini yok etmektedir (57).

Serbest radikallerden zarar gören hücrelerin, sağlıklı hücrelere kıyasla kansere dönüşme olasılığı daha yüksektir. Kemoterapi ve radyasyon sonrası ölüp parçalanmış hücreler vücut içerisine yayılarak komşu hücrelerde inflamasyona neden olmaktadır. Resveratrol, bu hücreler parçalandıktan sonra kalan hücre kalıntılarının akyuvarlar tarafından temizlenmesini uyarmaktadır (5).

Resveratrol, Faz I ve Faz II, siklooksijenaz ve nitrik oksit sentazın modülasyonu, kanser hücrelerinde büyümeyi durdurma ve apoptozisi uyarma mekanizmaları ile antikanser etki göstermektedir (58, 59).

#### 2.5.4.2. Antioksidan Aktivite:

Resveratrol hem serbest radikalleri süpürerek hem de bu radikallerin sebep olduğu zararları engellemeye yardımcı olabilen güçlü bir antioksidandır. İn vivo antioksidan olarak fonksiyon görür, in vitro antioksidan aktivitesi zayıftır (5).

Resveratrolün,  $O_2^-$ ,  $OH^\cdot$  radikallerini süpürdüğü ve  $OH^\cdot$  radikalının neden olduğu lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği belirlenmiştir.  $OH^\cdot$  ve  $H_2O_2$ 'in neden olduğu DNA hasarını önlemektedir

Poliansature yağ asitlerinin (PUFA) oksidasyonuna bağlı olarak düşük yoğunluklu LDL'lerin özelliklerindeki değişikliklerin aterosklerozda belli başlı bir rol oynadığına inanılmaktadır. Resveratrolün lipid peroksidasyonunu inhibe edebilmesi başlıca bakır iyonlarının şelasyonu yoluyla gerçekleştiği gösterilmiştir. Resveratrolün her iki izomerinde serbest radikal süpürücü etkisinin aynı olmasına rağmen trans-izomerinin şelasyon kapasitesi cis-izomerinin iki katıdır. Bu sonuç hidroksil gruplarının pozisyonunun bakır şelasyon kapasitesinde önemli olduğunu göstermiştir. Bununla beraber, trans-resveratrol ferröz iyonlarını şelate edememektedir. Resveratrol, membran lipidlerinin oksidasyonunu da inhibe etmektedir. Rat karaciğer mikrozomlarında, non-enzimatik ve ya NADPH-bağımlı peroksidasyonda, %50 inhibisyon sağlamak için gereken resveratrol konsantrasyonunun aynı oranda inhibisyon sağlayan quercetin miktarından 3 kat daha az olduğu bildirilmiştir (60,61).

Resveratrol, hücre membranlarını koruyarak, canlı hücrelerde oksidatif stresin etkilerini azaltmaktadır.

#### 2.5.4.3. Antiinflamatuvar Aktivite:

Resveratrol, inflamasyondan sorumlu maddelerin oluşumunu inhibe ederek antiinflamatuvar aktivite göstermektedir (5).

Resveratrol'ün COX-2 transkripsiyonunu ve ornitin dekarboksilazı inhibe ederek, kanser gelişimini ve ilerlemesini azalttığı bildirilmiştir (34).

Resveratrol siklooksijenazları inhibe edebilmektedir.

İskemik bir kalpte resveratrolün kardiyoprotektif özelliği onun antiinflamatuvar aktivitesinden kaynaklanmaktadır (62). İnflamasyonun, arterlerin iç yüzeyinde lipid depolanmasına katkı sağlayıcı faktör olduğu belirtilmiştir. Bu lipid bileşikler, arterlerin tıkanmasına ve böylece kalp krizine veya bunun tetiklenmesine neden olabilir. Resveratrolün, inflamatuvar enzimlerin aktivitesini engelleyerek kalbi koruduğu bildirilmiştir (5).

#### **2.5.4.4. Östrojenik Aktivite:**

Resveratrol ile sentetik östrojen dietilstilbestrol (4,4'-dihidroksi-trans-dietilstilben) arasındaki yapısal benzerlik resveratrolün östrojenik aktivitesi olup olmadığı sorusunu akla getirmiştir. Östrojen pozitif ve negatif insan göğüs adenokarsinom hücreleri ile yapılan bir çalışmada, resveratrol, diğer biyolojik aktivitelerini göstermesi için gerekli konsantrasyonunda, östrojen ile kıyaslanmış ve resveratrolün, östrojen-bağımlı göğüs kanser hücrelerinin çoğalmasını uyardığı ve yerel regüle genlerin ekspresyonunu arttırdığı bulunmuştur (60).

#### **2.5.4.5. Hepatoprotektif Aktivite:**

Karaciğer fibrozunda kritik bir rol oynayan stellat hücrelerinin çoğalması oksidatif stres ile artar. Bu nedenle, bu hücrelerin aktivasyonunu inhibe edebilen bileşikler hepatik fibrogenizi önleyebilir. Yapılan bir çalışmada, resveratrolün, hücre protein döngüsü ekspresyonunu ve sinyal ileti yolağını bozarak stellat hücre aktivasyonunu inhibe ettiği bulunmuştur. Dahası araştırmacılar, resveratrolün, lipopolisakkarid-stimüle Kupffer hücreleri ile tümör nekroz faktörü  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ve nitrik oksitin üretimini inhibe edebildiğini göstermiştir (60).

#### **2.5.4.6. Antiplatelet Aktivite:**

Platelet agregasyonu, araşidonik asitten eikosanoidlerin sentezi ile ilişkilidir. Potent bir vazodilatatör olan prostasiklin PGI<sub>2</sub>, ve bir proagregant ve vazokonstriktör ajan olan tromboksan TxA<sub>2</sub>, siklooksijenaz (COX) yolağı ile üretilir. Ayrıca, hidroksiasitler ( HHT, HPETE ve HETE) ve lökotrienler (LT) lipoksijenaz yolağı ile üretilirler. LTB<sub>4</sub>, bir inflamasyon mediatörü ve proagregant ajandır. Yapılan bir çalışmada, resveratrolün, rat peritoneal polimorfonükleer lökositlerinde TxB<sub>4</sub> ve



lipoksijenaz ürünlerinin oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu bileşikler, platelet agregasyonu ve kemotaktik bileşiklerin oluşumu gibi inflamatuvar proseslere yol açarlar (60).

Resveratrol izomerlerinin antiplatelet aktivitesi kıyaslanınca araştırmacılar, benzer konsantrasyonlarda, trans-izomerin, cis-izomere göre kısmen daha az aktif olduğunu gözlemlemişlerdir (60).

#### **2.5.4.7. Vazorelaksan Aktivite:**

Üzüm ya da şarap ekstraktı, damar duvarında 3',5'-monofosfat (cGMP) miktarını artırır, hem relaksasyon hem de cGMP'de artış N<sup>G</sup>-monometil-L-arjinin ya da N<sup>G</sup>-nitro-L-arjinin (endotelyuma bağlı gevşetici faktörün sentezinin kompetitif inhibitörü) tarafından ters çevrilir. Üzümdeki ürünler tarafından indüklenen vazorelaksasyona NO-cGMP yolu aracılık eder. Vazorelaksasyonda NO'nin doğrudan rolü resveratrol ile muamele edilen pulmoner arter endotel hücre kültüründe nitrik oksit sentaz (NOS) etkinliğinde artış bulunduğunda gösterilmiştir. Resveratrolün NOS üretimini etkileyerek kardiyoprotektif etki gösterdiği de saptanmıştır (62).

#### **2.5.4.8. Lipid ve Lipoprotein Metabolizmasını Düzenleyici Aktivite:**

Resveratrol yaklaşık 20 yıl önce rat lipid metabolizması için yararlı olarak bulundu. Normal karaciğer parankimal hücrelerin fonksiyonlarının çoğunu bulunduran, insan hepatokarsinoma hücre-line HepG2 kullanılarak yapılan bir çalışmada, trans-resveratrol konsantrasyonundaki artışa yanıt olarak ApoB'nin intraselüler konsantrasyonunda anlamlı bir azalma kaydedilmiştir. Dahası, kolesterol esterleri ve trigliseridlerin sekresyon oranı düşmüş, bu da daha az VLDL ve buna bağlı olarak daha az LDL üretildiğini düşündürmüştür. Bu, LDL aterojenik olduğundan, potansiyel olarak yararlıdır (60).

#### **2.6. E Vitamini:**

E vitamini ilk olarak 1936 yılında izole edilmiştir. Deneysel olarak E vitamini verilen ratların nesillerinin daha sağlıklı olduğunun görülmesi üzerine, tokos: doğurmak, phero: taşımak kelimelerinden ve bileşiğin alkol olmasından yola

çıkılarak ‘tokoferol’ adı verilmiştir. Bileşiğin birbirine benzeyen 4 farklı yapıdaki bileşiklere  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ve  $\delta$  tokoferol adı verilmiştir (7).

Tokoferoller birçok bitki ve hayvan dokularında bulunurlar. En zengin kaynakları yeşil yapraklı bitkiler yağlı tohumlar ve yağları, sert kabuklu meyvelerdir.

Tokoferoller yapışkan kıvamlı ve açık sarı renge sahip maddelerdir. Yağda ve organik çözücülerde çözünürler, suda çözünmezler.

Oksitlenince biyolojik etkileri kaybolur, oksijensiz ortamda 200°C’ye kadar dayanıklıdır.

Serbest radikaller, sağlıklı hücelere saldırarak hücre membranlarını zayıflatır ve hücre hasarına neden olurlar. Poliansature yağ asitleri, serbest radikallerden etkilenmeye çok müsaittir. E vitamininin, zincir kırıcı bir antioksidan olarak, fosfolipidlerin yağ asitleri boyunca başlayan peroksidasyonunun yayılmasını engellediği düşünülmektedir.

Zincir kırıcı bir antioksidan işlevi gören E vitamini hücre membranlarının fosfolipid tabakasında ve plazmada bulunan lipoproteinlerde yer alır. Alfa tokoferolün hidrofobik yapısına bağlı bir hidroksil grubu vardır. Bu hidroksil grubunun hidrojen atomu çok kolay uzaklaştırılabilir. Bu nedenle lipid peroksidasyonu sırasında oluşan LOO $\cdot$  ve LO $\cdot$  radikalleri komşu bir yağ asidi ile birleşmek yerine tokoferolle birleşir. Bu olay zincir reaksiyonunu sonlandırır (63).

E vitamininin, primer olarak peroksil radikali ile tepkime vermesinin nedenleri şunlardır:

1. İlerleme safhası lipid peroksidasyonunun en yavaş basamağıdır ( 3.ncü reaksiyon), ve peroksil radikalleri diğer radikaller içinde en yüksek konsantrasyona sahip olanlarıdır.
2. Peroksil radikalleri, diğer moleküllere göre, E vitamini ile daha hızlı tepkime verirler.
3. E vitamini 1.nci ve 2.nci reaksiyonlar için zayıf bir inhibitördür.

Tokoferoller, alkoksil radikalleri, singlet oksijen, nitrojen dioksit, peroksinitrit, ozon ve süperoksit gibi diğer reaktif oksidanlarla da tepkimeye girer. Bu oksidanlarla olan tepkimeleri bir çok model sistemiyle çalışılmıştır. Singlet oksijen hariç,  $\alpha$ -tokoferol, bu diğer oksidanları süpürmede, göreceli olarak küçük kinetik üstünlüğe sahiptir.

Antioksidan teorisi, bir çok hayvanda, E vitamini eksikliği hastalıklarının antioksidanlar ile engellemesiyle, dahası, E vitamini eksik hayvanların dokusunda lipid peroksidasyonunun artması kanıtı ile, desteklenmiştir.

Antioksidan teoriye göre, tokoferol metabolitlerini belirlemek mümkün olabilir,  $\alpha$ -tokoferol, in vivo ortamda  $\alpha$ -tokoferol quinon'a dönüştürülebilir ve bazı hayvanlarda  $\alpha$ -tokoferol'ün oksidan ürünleri kaydedilmiştir (7).

### **2.6.1. E Vitamininin Metabolizması:**

E vitamini, diğer yağda eriyen öğeler gibi safra asitleri ve yağların yardımıyla, ince bağırsakta emilir. E vitamini plazmada  $\beta$ -lipoproteinlere bağlı olarak taşınır ve safra ile nispeten küçük miktarlarda atılır. Oral yolla alınan E vitamininin yaklaşık % 70'i karaciğer, yağ dokusu, kalp, adrenal korteks ve kaslara iletilir ve depo edilir (7).

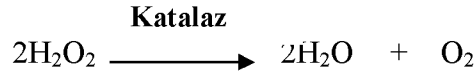
### **2.7. Antioksidan Savunma Sistemleri:**

Hücrelerde oksidatif hasarı önleyen ya da sınırlayan mekanizmalar bulunmaktadır. Memeli hücrelerinde oksidatif hasara karşı savunma üç şekilde olur; Birincisi ve en etkili savunma mekanizması, enzim sistemleriyle özellikle de tüm hücrelerde bulunan SOD enzimiyle olur. Cord ve Fridowich SOD enziminin aerobik hücreler için gerekli olduğunu göstermişlerdir (64). Diğer enzimler ise tüm hücrelerde bulunan katalaz, GSH-Px, G6PD, GSH-R gibi enzimlerdir (65).

SOD bir enzim grubu olup hücrelerin sitozol, mitokondri ve plazmasında bulunur. İnsanda bakır (Cu), çinko (Zn) ve mangan (Mn)-SOD bulunmaktadır. Kuvvetli bir radikal olan süper oksit anyonunu dismute ederek daha az zararlı olan  $H_2O_2$  ve moleküler  $O_2$ 'ye dönüştürmektedir. (66).



Katalaz ise dört hem grubu içeren bir hemoproteindir. Katalaz kan, kemik iliği, müköz membranlar, böbrek, karaciğer ve hemen hemen tüm hücrelerde bulunur. Görevinin, dismutazla oluşan hidrojen peroksidin yıkımı olduğu sanılmaktadır.



İkinci savunma mekanizması ise sitoplazmik yerleşimli glutatyon (GSH), GSH-Px, urat, vitamin C, A ve E gibi maddelerle olur. Bunlardan GSH-Px stoplazmada oluşan  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'yi suya çevirir. Vitamin A ve E'nin membran lipidlerinin oksidatif strese dayanıklılığını artırarak etki gösterdikleri düşünülmektedir (67).

Üçüncüsü ise hücre dışı seruloplazmin, transferrin, albumin, haptoglobulin, östrojen gibi maddelerle olur. Seruloplazmin demirin transferrine bağlanmasını kolaylaştırarak ve albuminin ise bakırı bağlayarak (çünkü ortamdaki serbest metallerin varlığı oksijen radikali oluşumunu artırır) antioksidan etki yaptığı bildirilmiştir. Östrojen ise yapısındaki fenolik grupları ile karaciğerde mikrozomal lipid peroksidasyonunu inhibe ederek etkisini göstermektedir (67).

### 2.7.1. Serbest Oksijen Radikalleri:

Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektronlarından dolayı çok reaktif olan atom veya moleküllerdir. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenden oluşan radikallerdir. Mitokondriler, ksantin oksidaz enzimi, prostaglandin biyosentezi ve inflamatuvar cevapta rol oynayan fagositler (nötrofil ve monosit), süperoksit radikali, hidroksil radikali ve hidrojen peroksidin ve diğer reaktif oksijen ürünlerinin kaynağı olarak bilinirler. Cu, demir (Fe), Mn ve molibden (Mo) gibi geçiş metalleri de reaksiyonları katalize ettiklerinden dolayı serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar (65).

Reaktif oksijen ürünleriyle reaksiyon veren maddelerin (SOD, katalaz gibi) veya inflamatuvar hücrelerde serbest radikal üretimini engelleyici ajanlar (ibuprofen, BW755C ve allopurinol gibi) doku hasarını azaltırlar (68).

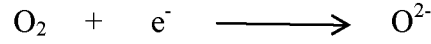
Reaktif metabolitlerin oluşma hızı, hücrenin oksidatif strese karşı savunma kapasitesini aşarsa toksik etki oluşmaya başlar. Hücrenin antioksidan mekanizmaları arasında SOD, katalaz, GSH-Px ve GSH-Rd vardır. Pentoz monofosfat yoluyla da NADPH sağlayarak redükte glutatyon oluşumuna ve lipid peroksidlerinin detoksifikasyonunda rol alan GSH-Px'a yardım eder. Ayrıca C ve E vitamini ve GSH-Px'ın kofaktörü olan selenyumun da hücredeki antioksidan mekanizmalarda rolü vardır (69).

Reaktif metabolitler, biyolojik hedeflerle (lipid, katekolamin, DNA, protein, karbonhidrat) direk reaksiyona girerler ve sonuçta lipid peroksidasyonu, mitokondrial solunum zincirinin inhibisyonu, Na<sup>+</sup> kanalları membran Na/K ATP az aktivitesinin inhibisyonu gibi I/R hasarı fizyo-patolojisinde rol oynayabilen olayları meydana getirebilirler. DNA hasarı oluşturan radikaller hücrede nükleer bir enzim olan poli ADP-riboz sentazı (PARS) aktive ederler. PARS enzimi nikotinamid adenin dinükleotidi (NAD) substrat olarak kullanılır. Sonuçta bu olay ATP tüketimine ve hücrelerin ölümüne yol açabilir. Antioksidan tedavi PARS aktivitesini inhibe ederek I/R hasarını önleyebilir.

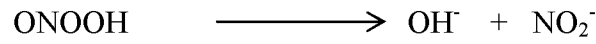
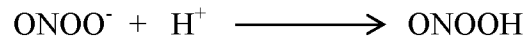
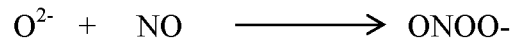
Oluşan serbest radikaller, hücre membranı ve hücre içi organelleri etkilerken ekstrasellüler kompartmana da geçerek uzak etkilerini oluşturur. Burada serbest radikalın çözünürlüğü ve diffüzyon hızı önem kazanmaktadır. Serbest radikaller incelendiğinde, hidroksil radikali çok güçlü olmasına rağmen, diffüzyon hızı yavaştır. Bu yüzden ancak oluştuğu yerde ya da yakınında etki gösterir. Buna karşın H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> daha az güçlü olmasına rağmen plazma membranını, mitokondrial ve peroksizomal membranları rahatlıkla geçerek uzak etki gösterebilir (71).

Reaktif oksijen ürünleri hücrenel metabolizmanın normal ürünleri olarak sürekli oluşurlar. Oksidatif fosforilasyon sırasında mitokondriyal sitokrom oksidaz enzimi ile moleküler oksijen 4 elektron (e<sup>-</sup>) alarak suya indirgenir. Bununla birlikte bu yoldan oksijenin yaklaşık %1-5'i sızarak enzimatik olmayan, basamaklı ve her basamakta tek e<sup>-</sup> kullanıldığı bir başka yolağa girerek toksik ara ürün oluştururlar. Bu reaksiyonların ilkinde süperoksit oluşur.

Süperoksit radikali, en çabuk ve en kolay oluşan radikaldır. Aktivitesi kısmen düşük olduğu halde diğer radikalleri oluşturduğu ve geçiş metal iyonlarını indirgediği için önemlidir. Oksijenin bir elektron alarak indirgenmesiyle oluşur.

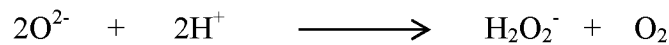


Reperfüzyonda fazla miktarda oluşan süperoksit radikali NO ile reaksiyona girerek reaktif bir oksijen türevi olan peroksinitriti (ONOO<sup>-</sup>) oluşturur. Aynı zamanda endotel hasarı gibi pek çok dejeneratif sürecin başlamasına neden olabilir. Fizyolojik pH'da peroksinitrit hızla hidroksil ve nitrojen dioksit radikaline çevrilir.

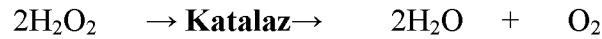


NO'un süperoksitle reaksiyonu peroksinitrit üzerinden hidroksil ve nitrojen dioksit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) radikallerini oluşturur. Peroksinitrit güçlü bir prooksidan madde olup SOD ile reaksiyona girerek sellüler proteinlerin tirozinlerini nitrozlar. Böylece hücresel fonksiyon bozukluklarına neden olur. Peroksinitrit proteinlerdeki veya serbest haldeki tirozini orto pozisyonundan nitrolayarak 3-nitrotirozini oluşturur. Peroksinitrit nötrofillerde etkin bir priming ajandır ve bu etkisine tirozin artıklarının nitrasyonu aracılık eder (71).

Hücrelerin, oldukça zararlı olan serbest radikallere karşı savunma mekanizmaları vardır. SOD enzimi bunlardan biridir ve süperoksiti, hidrojen peroksite indirger. Spontan olarak sulu ortamda süperoksit, hidrojen peroksit ve singlet oksijene ayrışır ve hücre hasarı oluşturur.



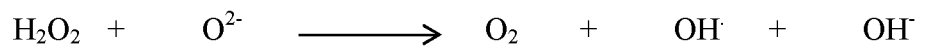
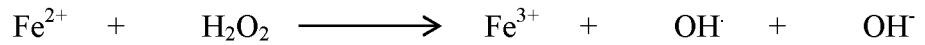
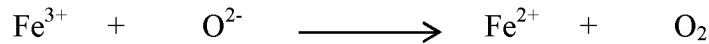
SOD tarafından oluşturulan hidrojen peroksit daha çok intrasellüler ortamda bulunan katalaz enzimi ile, su ve oksijene dönüştürülür. Ekstrasellüler ortamda ise katalazın görevini daha çok selenyum bağımlı bir enzim olan GSH-Px üstlenir. Okside olan GSH ise GSH-Rd ile glutatyona çevrilir.



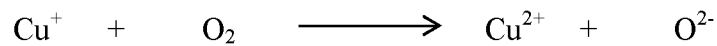
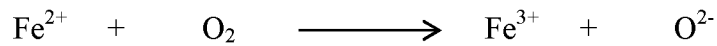
Hidroksil radikali bu grupta en güçlü serbest radikaldır. En reaktif okside edici ajandır ve in vivo koşullarda  $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  gibi yüksek bir reaksiyon hızıyla hemen hemen her moleküle saldırır. Oluşması için ortamda demir veya bakır gibi transizyonel metallerin varlığı gereklidir. Transizyonel bir metal tarafından katalizlenen bu reaksiyonlar, Fenton reaksiyonu olarak bilinir:



Bir transizyonel metalin varlığında süperoksit radikali hidrojen peroksit ile tepkimeye girerek hidroksil radikalini oluşturur. Bu reaksiyona Haber-Weiss reaksiyonu denir;



İndirgenmiş geçiş metallere otoksidasyonu da süperoksit meydana getirebilir.

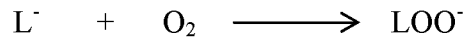


Haber-Weiss reaksiyonu fizyolojik ortamda yavaş geliştiğinden biyolojik sistemlerde Fe ve Cu aracılığıyla meydana gelen modifiye Fenton reaksiyonu aracılığıyla OH radikali oluştuğu kabul edilmektedir. Dolayısıyla süperoksit ve

hidrojen peroksidin in-vivo oluşturduğu hasarın çoğuna hidroksil radikali aracılık etmektedir (70,72).

Hidroksil radikali hücre içinde bulunan tüm moleküllerle reaksiyona girebilir. Diğer serbest radikaller gibi DNA'yı, lipidleri, karbonhidratları ve proteinleri etkileyebilir. Hidroksil radikali lipid peroksidasyonu olarak bilinen klasik serbest radikal zincir reaksiyonunu başlatabilir. Membran fosfolipidlerinin yakınında OH radikali oluştuğu zaman peroksil radikali, lipid hidroperoksitler gibi radikaller oluşur. Hidroperoksitlerin birikimi, membran fonksiyonunu bozabilir ve sitotoksik aldehyitler oluşturabilir (73).

Reaktif serbest radikaller ve metabolitler membranda bir H uzaklaştırmalarıyla lipid peroksidasyonunu başlatırlar. Oluşan lipid radikal (L-) O<sub>2</sub> ile reaksiyona girerek lipid peroksil radikalini (LOO-) oluşturur.



Reperfüzyonda adenzin ve hipoksantin seviyeleri hızla yükselir. Resirkülasyon ile ksantin oksidaz enzimi hipoksantini ksantine, sonra da üreye çevirir. Bu enzim hızının reperfüzyonda arttığı bilinmektedir. Ksantin oksidaz enzimi, hipoksantini ksantine dönüştürürken moleküler oksijen kullanır ve süperoksit ortaya çıkmasına neden olur. Artmış hücre içi Ca<sup>2+</sup> bir proteaz olan kalpanini aktive edebilir. Bu enzim de ksantin dehidrogenazdan bir peptit yapının ayrılması ile ksantin oksidaza dönüşmesini sağlayabilir (özellikle vasküler endotelde). Böylece serbest radikal yapımı artar.

Ayrıca, hücre içi artan Ca<sup>2+</sup> girişi ile beraber azalan çıkışı, sellüler Ca<sup>2+</sup> homeostazını bozar. İskemi sırasında, hücrede enerji tükendiğinden sitoplazma ve mitokondride aşırı miktarda Ca<sup>2+</sup> birikip toksik etki göstermesine neden olmaktadır. Fizyolojik koşullarda, hücre içi biriken fazla Ca<sup>2+</sup> dışarı atılarak ya da hücre içinde depolanarak tolere edilir. Ancak iskemi sırasında enerji eksikliği nedeniyle pompalar ve depolama mekanizmaları iflas eder ve artan Ca<sup>2+</sup> düzeyi fosfolipazları, proteazları aktive ederek radikal ve yağ asitleri oluşumunu artırır ve hücreyi ölüme sürükleyebilirler (74).

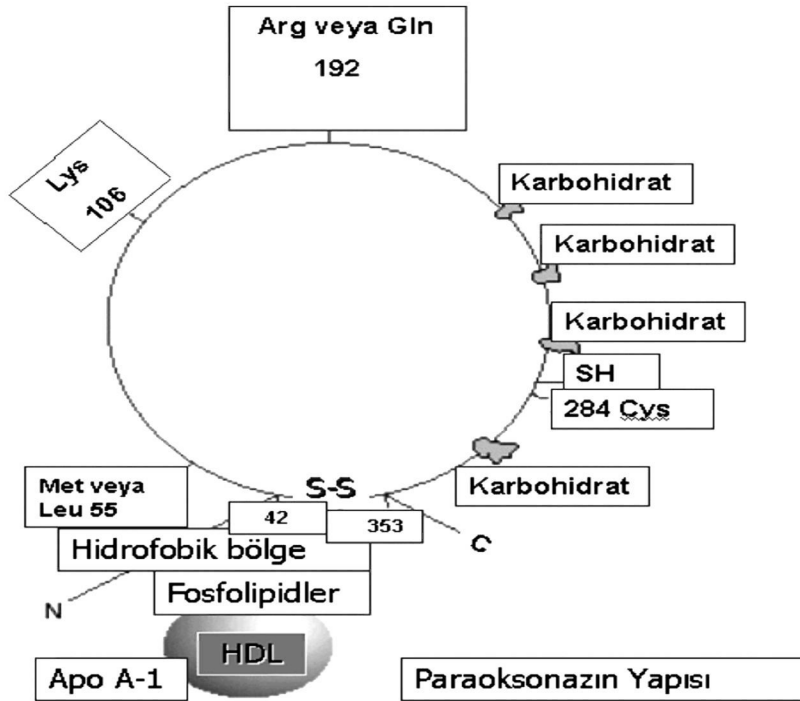


## **2.8. Paraoksonaz :**

### **2.8.1. Kimyasal Yapısı Ve Substratları:**

Paraoksonaz (PON), hem arilesteraz (E.C. 3.1.1.2) hem de paraoksonaz (arildialkil fosfataz; organofosfat hidrolaz; paraokson hidrolaz; (E.C.3.1.8.1) aktivitesine sahip bir ester hidrolazdır (75). Enzim, paration dışında diizopropil florofosfat (DFP) gibi organik fosforlu insektisitlerle, yine aynı kimyasal gruptan olan sarin, tabun gibi sinir gazlarının; çeşitli karbamatların; fenilasetat, 4-nitrofenil asetat, 2-naftil asetat gibi birçok aromatik karboksilik asit esterlerinin hidrolizini de katalize etmektedir. Bununla birlikte, PON'un doğal substratı kesin olarak belli değildir (76,77)

İnsan serum paraoksonaz enzimi HDL ile ilişkili, antioksidan fonksiyona sahip olduğu düşünülen bir enzimdir (78). PON1 enziminin HDL-K'un Apo-A1 ve APO-J (Clustrein) proteinleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (79). İnsan serum paraoksonaz enzimi; karaciğerde sentezlenen, arildialkilfosfataz olarak da adlandırılan Ca bağımlı, HDL ile ilişkili ve 354 amino asitten oluşan 43 - 45 kDa molekül ağırlıklı bir ester hidrolazdır. Kalsiyum, enzimin hem aktivitesi hem de stabilitesi için gerekmektedir ve katalitik mekanizmada da rol oynamaktadır. Aktif bölgeden dietilfosfatın uzaklaştırılması bu bölgenin uygun konformasyonel yapı kazanmasını sağlar (80).



Şekil 1.6. Paraoksonazın Yapısı (78)

Enzimin HDL ile etkileşimi için N-terminaldeki hidrofobik sinyal peptidine ihtiyaç vardır. Bu peptid aracılığı ile fosfolipidlere ve lipoproteinlere bağlanır. Paraoksonaz glikoprotein yapılı bir enzimdir (80). Ağırlığının % 15,8'ini karbonhidrat birimleri oluşturmaktadır ve bu birimler proteine dört farklı konumda bağlanmaktadır (81). Paraoksonazın lözün içeriği yüksek olmasına rağmen, sistein içeriği kringle yapısına sahip olacak kadar çok değildir. 42, 284 ve 353. konumlarda yer alan sistein artıkları enzimin yapısal ve fonksiyonel özelliklerine katkıda bulunduğu söylenmektedir. 42. ve 353. konumlarındaki sistein molekülleri, molekül içi disülfid bağının oluşumuna katılırken, sistein 284'ün, enzimin aktif merkezine yakın bölgede bulunduğu ve bu bölgenin substrata bağlanma için gerekli olduğu düşünülmektedir (80,82,83). Polipeptid zincirinin siklik yapısı, protein yapısında bulunan tek disülfid bağından kaynaklanmaktadır (83).

Paraoksonazı kodlayan gen, farelerde 6.ncı kromozom üzerinde, insanlarda 7.nci kromozomun uzun kolunda q 21-22 bölgesinde yerleşiktir (80). Memelilerde ayno kromozom üzerinde birbirine komşu PON1, PON2 ve PON3 genleri bulunmaktadır (84).

Paraoksonaz enzimi 55. ve 192. pozisyonlarındaki aminoasitlerin değişimi ile ortaya çıkan iki genetik polimorfizm gösterir:

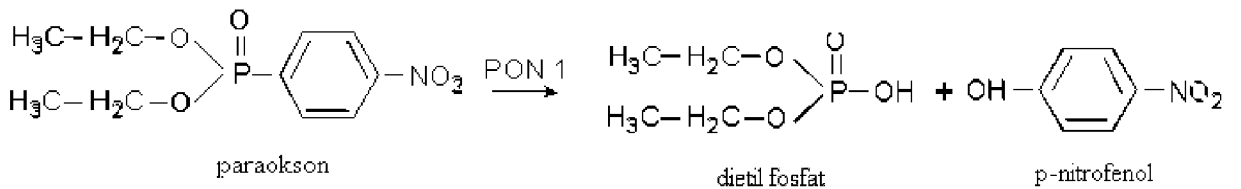
**Birinci polimorfizm (192. Polimorfizm);** 192. pozisyonundaki aminoasit glutamin ise Q aleli (Tip A) veya arginin ise R aleli (Tip B) izozimleri oluşmaktadır (83,86).

**İkinci polimorfizm (55. Polimorfizm);** 55. Pozisyonundaki metionin (M aleli) lösin (L aleli) ile değişince ikinci polimorfizm oluşmaktadır (83,86).

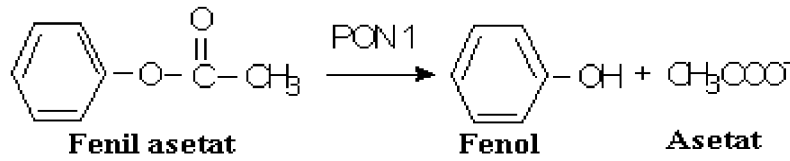
Paraoksonaz enzimi karaciğerde sentezlenir ve fiziksel olarak HDL'ye bağlıdır. HDL'nin ateroskleroza karşı koruyucu etkisine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (86). Enzim, karaciğer, böbrek ve ince bağırsak başta olmak üzere birçok dokuda ve serumda bulunmaktadır (80).

Enzim aktivitesi, yenidoğanlarda yetişkinlerin yaklaşık yarısı kadardır. Doğumdan bir yıl sonra erişkindeki düzeyine ulaşır ve hayat boyu devam eder (80).

**Paraoksonaz Reaksiyonu:** enzime adını veren paraokson (o,o-dietil-o-p-nitrofenil fosfat), paraoksonaz aktivite tayininde en çok kullanılan substratlardan biridir. Paraokson, organofosfat bileşiklerinden parationun aktif katabolik metabolitidir (87). Paraoksonazın, paraoksonu hidroliz etmesiyle açığa çıkan p-nitrofeol veya fenolün konsantrasyonu üzerinden, enzimin aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edilebilmektedir (81).



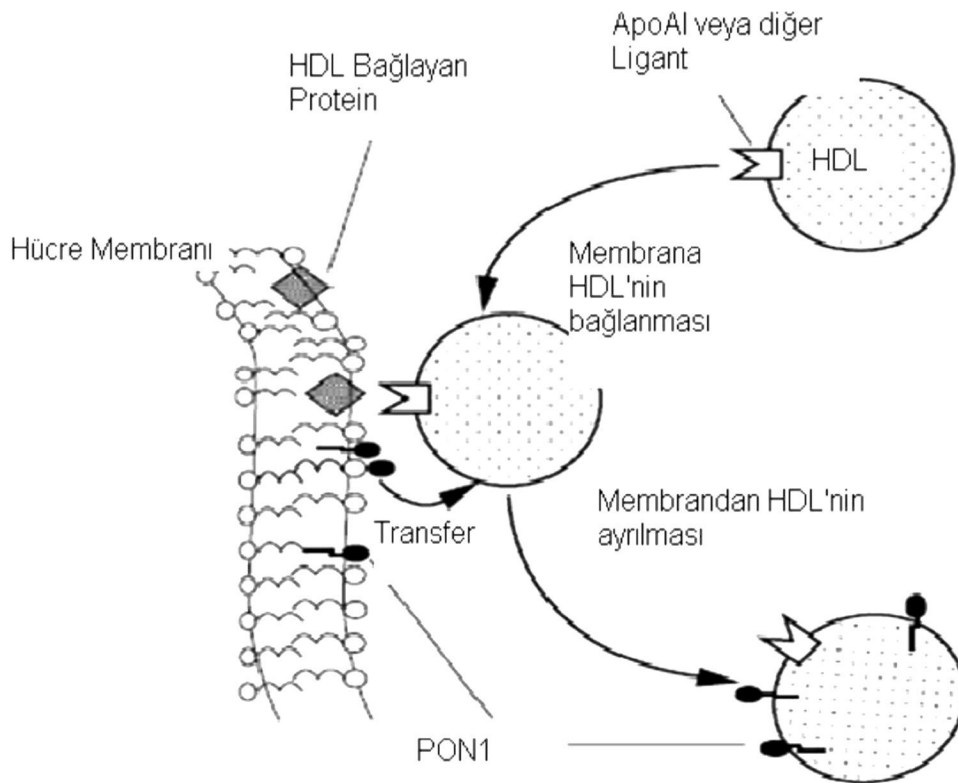
**Arilesteraz reaksiyonu :** Paraoksonaz enziminin aktivitesinin tayininde sıklıkla kullanılan substratlardan biri de, aromatik karboksilik asit esterlerinden fenil asetatdır (75).



### 2.8.2. Sentez Ve Salınımı:

PON1 karaciğer tarafından üretilir ve kana verilir. Kanda HDL ile birlikte bulunur. İnsanda serum PON1 konsantrasyon ve aktivitesi geniş bir aralığa sahiptir. Enzim aktivitesinin ve konsantrasyonunun PON1 geninin polimorfizmiyle birlikte beslenme, yaşam biçimi ve çeşitli hastalıklardan etkilendiği gösterilmiştir.

PON1 sekresyonunun mekanizması önemlidir. Çünkü çeşitli faktörler bu mekanizmayı değiştirerek serum düzeyinin belirlenmesini sağlar. Lipoproteinlerin yokluğunda az miktarda PON1 salınır. Hücrelerden salınan PON1'i fosfolipid miçeller ve HDL sekresyonu stimüle ederken, LDL ve ApoA1 etki göstermez. PON1, HDL ile fosfolipidlerden ayrılabilir. Membrana bağlı PON1 fenilasetata etki gösterir. HDL'nin belirmesiyle bu etki ortadan kaybolur. Bu da HDL'nin PON1'i hücre membranından ayırabildiğini gösterir. HDL ile indüklenmiş PON1 sekresyonu konsantrasyona bağımlıdır. Aynı zamanda reseptöre de bağımlıdır. HDL en uygun alıcı olmasına rağmen fosfolipid kompleks tek başına hücrelerden PON1 salınımını uyarma kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte sadece fosfolipid içeren lipid kompleks salınım için yeterli değildir. Bu da PON1 salgılanması için niye LDL'nin yetersiz olduğunu açıklamayı sağlayabilir. PON1'in hücre membranının dış yüzeyinde bulunduğu ve HDL yaklaşık lipoproteinler vasıtasıyla HDL'ye geçtiği belirtilmiştir. HDL için bir reseptör olarak daha önceden tanımlanan scavenger reseptör B1 (SR-B1)'in HDL ile PON1 ilişkisini sağladığı hipotezi ortaya atılmıştır. SR-B1 HDL'yi hücre membranına bağlanmasını ve hücre ile lipoproteinler arasında materyal değişimini sağlar. SR-B1, yüksek afinite ile HDL'ye bağlanır ama bağı gevşektir ve fosfolipid komplekse bağlanma kapasitesi vardır. Sonunda PON1'in karaciğerden bol miktarda salındığı belirtilmiştir (Şekil 1.7) (88).



**Şekil 1.7.** Hücre membranında bulunan PON1'in HDL'ye transferi (88)

### 2.8.3. Fonksiyonları:

Paraoksonaz enziminin iyi bilinen fonksiyonu, aromatik karboksilik asit esterleri ve paraokson, diazookson, sarin, soman gibi organofosfat türevlerini hidroliz yoluyla detoksifiye edebilmektedir (80,82). Memelilerde bulunan paraoksonaz enziminin bu substratlara karşı affinitesi düşüktür. Bu nedenle tarımla uğraşanlarda organofosfat zehirlenmesine sık rastlanır. Ancak düşük dozda organofosfatlara uzun süre maruz kalınması durumunda PON1'in daha etkili olduğu çalışmalarda gösterilmiştir (75). PON1'in substratlarını hidroliz edebilme gücü, kişiler arasında büyük bir çeşitlilik gösterir. Paraoksonun hidrolizinde R tipi, Q tipine göre daha etkili olmasına rağmen, organofosfatların çoğunu Q tipi daha iyi hidroliz eder (84). Enzim, paraoksondaki O-P ester bağının hidrolizinden sorumlu olan esterazdır. PON1 ayrıca laktonaz, siklik karbonat esterleri ve farmakolojik ajanları da hidroliz etmektedir (78).

PON1'in hem LDL'yi, hem de HDL'yi oksidasyondan koruduğu bildirilmiştir (75). HDL ile ilişkili enzimlerin [PON1, LCAT, Trombosit Aktive Edici Faktör Asetil Hidrolaz Platelet (PAF-AH)] oksidatif modifikasyonlara karşı lipoproteinleri koruduğuna inanılmaktadır (78,80). PON1'in HDL vasıtasıyla antioksidan etkiye katkıda bulunduğu ve HDL'nin inhibitör etkisinde, metal iyon şelasyonu ve/veya peroksidaz benzeri aktivite ile ilişkili olabileceği ileri sürülmektedir. HDL-PON1, uzun zincirli okside fosfolipidleri hidroliz edebilme yeteneğine sahiptir (89). HDL'nin LDL oksidasyonu üzerine koruyucu etkisinin öncelikle PON1'dan kaynaklandığı düşünülmektedir. PON1'in,  $Cu^{+2}$ 'nin indüklediği lipoprotein oksidasyonunu in vitro olarak inhibe ettiği ve nonkompetitif PON1 inhibitörlerinin serbest radikal oluşumunu ve  $Cu^{+2}$ 'nin indüklediği HDL oksidasyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca, PON1'in makrofajlardan kolesterol çıkısını arttırdığı da bildirilmiştir (90).

PAF-AH, MM-LDL'deki aktif lipidleri yıkmaktadır. PAF-AH ve PON1'in aynı ortamda buldukları zaman bu aktif lipidleri tek başlarına gösterdikleri etkinin toplamı bir etki ile yıktıkları çalışmalarla gösterilmiştir.  $Cu^{+2}$  iyonu ile uyarılan LDL oksidasyonunda PAF-AH; Apo-B100 modifikasyonunu ve konjuge dien oluşumunu inhibe etmesi rağmen TBARS oluşumu üzerine etkisi yoktur. Paraoksonaz ise hem TBARS üretimini hem de lipid peroksit oluşumu inhibe etmektedir. Paraoksonazın yokluğunda PAF-AH ve LCAT, LDL'yi oksidasyondan korumada çok etkili değildirler. HDL-K, lipid peroksitlerin serumdaki en önemli taşıyıcısıdır ve oksidatif stres altında oksidasyona maruz kalmaktadır. HDL-K yapısındaki kolesterol ester hidroperoksitler, LDL'de bulunanlara oranla daha hızlı ancak daha az reaktif hidroksitlere indirgenmektedir. HDL'nin oksidatif modifikasyonu; ters yönde kolesterol taşıma fonksiyonunda bozulmalara yol açar. Paraoksonaz, HDL'yi oksidasyondan koruyarak HDL-K'nin ters kolesterol taşıma fonksiyonunun devamını sağlar. Bu durum makrofajlarda kolesterol birikimini engelleyerek köpük hücre oluşumunu ve ateroskleroz gelişimi yavaşlatmaktadır (78).

HDL-K yapısında bulunan PON1 enzimi, Minimal Modifiye LDL (MM-LDL)'deki aktif lipidleri yıkar ve böylece arter duvarında yer alan hücrelerde inflamatuvar cevap oluşumuna karşı koruyucu etki gösterebilir. Paraoksonaz, okside

LDL'deki kolesteril linoleat hidroperoksitleri ve spesifik okside fosfolipidleri hidroliz eder (91,92).

Oksidatif strese, lipoproteinlerle birlikte, hücrenin yapısındaki lipidler de lipid peroksidasyonuna uğrar. Paraoksonaz lipid peroksitlerinin aterojenik etkilerini gidererek hücre membranını koruyucu etki gösterir (82).

LDL'in oksidasyonu sırasında oluşan okside kolesterol esterleri, lizofosfatidilkolinler paraoksonazdaki serbest sülfidril grubu ile (284. sistein) etkileşime girerek enzimin inaktive olmasına yol açarlar (78).

### **2.9. Miyeloperoksidaz:**

Miyeloperoksidaz (MPO), başlıca insan polimorfonükleer nötrofillerinde (PMN) yaklaşık olarak % 5 oranında bulunmaktadır. Ayrıca monositlerde ve doku makrofajlarında MPO varlığı belirlenmiştir.

Miyeloperoksidaz, 146 kD molekül ağırlığında, katyonik özellikte ve dimer yapıdadır. Monomerleri arasında tek bir disülfid köprüsü (sistein 153-319) bulunmaktadır (93,94).

MPO, laktoperoksidaz, eozinofil peroksidaz ve tiroid peroksidaz memeliler ailesine aittir. MPO için optimumu pH 5.5'tir ancak geniş bir pH aralığında aktif kalmaktadır.

Tamamlanmış MPO sistemi olarak adlandırılan sistem, enzim MPO, hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), ve okside olabilen kofaktörlerden oluşmaktadır. Temel halde MPO demiri peroksidazlar için esas substrat olan  $H_2O_2$  varlığında yükseltgenen, ferrik formunda bulundurmaktadır.  $H_2O_2$  ile yükseltgenmesi sonrasında MPO, bileşik I (Bil. I) olarak adlandırılan kısa ömürlü bir redoks ara ürününe dönüşmektedir. Bil. I' de hem demiri ferril ( $Fe^{+4}$ ) halinde bulunmaktadır ve diğer okside edici eşdeğer ise porfiril radikali formundadır. Bil. I, oksijen atomunun ikili bağ ile demire bağlandığı bir ferril  $\pi$ -katyon radikal türü olarak kabul edilir (93,95).

Bil. I, iki aşamada birer elektron transferi ile aromatik amino asitler, indol türevleri gibi sayısız organik ve inorganik substratları da oksitlemektedir. Bu

oksidasyon esnasında halojenlerle reaksiyona girmeyen ve amino asit merkezli radikalini kaybetmiş olan ferril hem demir molekülü, Bil. II oluşmaktadır. İkinci adım, Bil. II' nin temel hale indirgendiği adımdır ve tipik peroksidaz döngüsünün hız kısıtlayıcı basamağıdır. Bu adım nötrofillerde bol bulunan süperoksit anyon radikali ( $O_2^-$ ) ya da askorbik asit gibi fizyolojik indirgeyiciler ile hızlandırılabilir.

MPO'nun fizyolojik substratının klorür olduğu düşünülmektedir. MPO-bil. I için diğer önemli bir substrat da nitrite ( $NO_2^-$ ) yükseltgenen nitrik oksittir (NO). Ancak fizyolojik şartlarda tirozin ya da askorbat gibi yarışmalı indirgeyicilerin konsantrasyonları NO'ye kıyasla çok yüksek olduğundan, NO'in MPO-bil. I ve II tarafından direkt oksidasyonu mümkün görünmemektedir. Bunun yerine MPO'nun, daha sonra NO'yi okside ederek  $NO_2^-$  oluşumuna sebep olacak tirozil ya da askorbil radikalleri gibi küçük ara ürünler oluşturduğu düşünülmektedir (93,95).



### **3. GEREÇ VE YÖNTEM:**

#### **3.1. Deney Hayvanları:**

Bu deneysel çalışma İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi (İNÜ-DEHÜM)'den temin edilen ratlar üzerinde gerçekleştirildi. Wistar-albino cinsi, ağırlıkları 250-300 gram arasında değişen 40 adet erkek rat kullanıldı. Ratlar, her bir kafeste bir rat olacak şekilde yerleştirildi ve standart şartlarda (12 saat aydınlık, 12 saat karanlık, havalandırılmalı, sabit ısı odalarda) bakıldı.

#### **3.2. Çalışma grupları:**

**1. Grup: Kontrol grubu (K; n=8):** Dört haftalık deney süresince ratlara etanol içermeyen modifiye sıvı diyet (MSD: 100 mL inek sütü + 1,7 gram glukoz) verildi. MSD uygulaması çalışmanın 4.ncü günü başladı. İlk 3 gün tedavi gruplarına ön uygulama yapıldı. MSD, '(1995) Uzbay T ve Kayaalp SO'nun metoduna göre hazırlandı (96).

**2. Grup: Alkol grubu (AK; n=8):** Dört hafta boyunca % 7.2 etil alkol içeren modifiye sıvı diyet ( 92,8 mL inek sütü + 7,2 mL etil alkol + 1,1 gram glukoz) verildi (96).

**3. Grup: Silimarin grubu (SLY; n=8):** Alkol grubuna benzer şekilde beslendi, ek olarak 4 hafta boyunca 150 mg/kg/gün dozunda silimarin gavaj yoluyla verildi (97).

**4. Grup: Resveratrol grubu (RSV; n=8):** Alkol grubuna benzer şekilde beslendi, ek olarak 4 hafta boyunca 50 mg/kg/gün dozunda resveratrol gavaj yoluyla verildi (98).

**5. Grup: E Vitamini grubu (E VİT; n=8):** Alkol grubuna benzer şekilde beslendi, ek olarak 4 hafta boyunca oral yoldan 300 mg/kg/gün dozda E vitamini verildi (99).

MSD, günlük hazırlandı ve her sabah aynı saatte verildi. MSD verilen ratlara ayrıca pellet yem ve su verilmedi. MSD şişeleri günlük olarak yıkandı. Günlük tüketilen MSD miktarı ölçüldü.

### **3.3. Silimarin Çözeltisinin Hazırlanışı:**

**Silimarin Çözeltisi:** % 10'luk etil alkol içinde 3300 mg/dL.

Silimarin, etil alkol içinde yüksek çözünürlüğe sahip olduğu için önce etil alkol içinde çözüldükten sonra distile su ilavesiyle etil alkol konsantrasyonu % 10 (v/v)'a seyreltildi. Ratlara, günlük 150 mg/kg/gün dozunda silimarin verildi. Doz ayarlaması silimarin grubundaki ratların ortalama ağırlıkları dikkate alınarak yapıldı.

Silimarin grubundaki ratların ortalama ağırlıkları 222±14 gramdı. Bir rat için verilecek silimarin miktarı şu şekilde hesaplandı:

$$222 \text{ g} \times 1 \text{ kg}/1000 \text{ g} \times 150 \text{ mg}/\text{kg}/\text{gün} = 33.3 \text{ mg}/\text{gün}$$

Her bir rat için 33.3 mg silimarin içeren 1 mL' lik çözelti gavaj ile verildi. Çözeltiler haftalık hazırlandı.

### **3.4. Resveratrol Çözeltisinin Hazırlanışı:**

**Resveratrol Çözeltisi:** % 10'luk etil alkol içinde 1120 mg/dL.

Resveratrol, % 10' luk (v/v) etil alkol içinde çözülerek hazırlandı. Çözelti her defasında 5 günlük kullanım için hazırlandı. Ratlara, günlük 50 mg/kg/gün dozunda resveratrol verildi. Doz ayarlaması resveratrol grubundaki ratların ortalama ağırlıkları dikkate alınarak yapıldı.

Resveratrol grubundaki ratların ortalama ağırlıkları 224±12 gramdı. Bir rat için verilecek resveratrol miktarı şu şekilde hesaplandı:

$$224 \text{ g} \times 1 \text{ kg}/1000 \text{ g} \times 50 \text{ mg}/\text{kg}/\text{gün} = 11.2 \text{ mg}/\text{gün}$$

Her bir rat için 11.2 mg resveratrol içeren 1 mL' lik çözelti gavaj ile verildi.

### **E Vitamini Çözeltisinin Hazırlanışı:**

**E Vitamini Çözeltisi:** % 10'luk etil alkol içinde 6975 mg/dL.

E vitamini sıvı ayçiçek yağı içinde çözülerek hazırlandı. Doz ayarlaması E vitamini grubundaki ratların ortalama ağırlıkları dikkate alınarak yapıldı.

E vitamini grubundaki ratların ortalama ağırlıkları  $233 \pm 4$  gramdı. Bir rat için verilecek E vitamini miktarı şu şekilde hesaplandı:

$$233 \text{ gram} \times 1 \text{ kg}/1000 \text{ g} \times 300 \text{ mg}/\text{kg}/\text{gün} = 69.75 \text{ mg}/\text{gün}$$

Her bir rat için 69.75 mg E vitamini içeren 1 mL' lik çözelti gavaj ile verildi. Çözeltiler haftalık hazırlandı.

### **3.5. Biyokimyasal Analizler:**

#### **3.6.1. Miyeloperoksidaz Aktivitesi Tayini:**

Miyeloperoksidaz (MPO) enziminin aktivitesi, MPO aracılı  $\text{H}_2\text{O}_2$  ile yapılan oksidasyon için substrat olarak 4-aminoantipirin/fenol solüsyonu kullanılarak yapıldı (100).

#### **Reaktifler:**

- 1. İzotonik fosfat tamponu:** 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  solüsyonuna 50 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  pH 6.0 oluncaya kadar eklenir.  
**50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ :** 6,805 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tartılır ve son hacim 1 L olacak şekilde distile su içinde çözülür.  
**50 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ :** 2,177 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  tartılır ve son hacim 250 mL olacak şekilde distile su içinde çözülür.  
**Hazırlanışı:** 890 mL 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  üzerine 110 mL 50 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  çözeltisi eklenir. Karışımın pH'sı 6.0 oluncaya kadar üzerine az miktarda asidik veya bazik çözeltilerden ilave edilir.
- 2. 25 mM 4-aminoantipirin (4-AAP) (% 2'lik (w/v) fenol içinde):** Önce % 2'lik fenol çözeltisi hazırlanır. Bu amaçla, 2 gram fenol tartılır ve son hacim 100 mL olacak şekilde distile su içinde çözülür.

25 mM 4-AAP için; 0,57825 gram 4-AAP alınır % 2'lik fenolde çözülür.

3. **1,7 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**: 34,7 µL % 30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alınır ve fosfat tamponu ile 100 mL'ye seyreltilir.
4. **% 0,05'lik (w/v) hexadecyltrimetil amonium bromid (HDTMAB)**: 0,5 gram alınır bir miktar distile su içinde çözüldükten sonra 100 mL'ye tamamlanır.

#### Analizin Yapılışı:

MPO aktivitesi, 4-AAP'nin molar ekstinksiyon katsayısı (ε) kullanılarak kinetik ölçüm yöntemi ile ölçüldü.

|   | Blank  | Numune |
|---|--------|--------|
| Distile Su                                | 200 µL | -      |
| 4-AAP/Fenol Solüsyonu                     | 1,3 mL | 1,3 mL |
| Substrat (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) | 1,5 mL | 1,5 mL |
| Numune                                    | -      | 200 µL |

Tüpler karıştırılır 510 nm'de blank ile sıfır ayarı yapıldıktan hemen sonra 30 saniye aralıklarla 3 dakika boyunca numune tüpündeki absorbans artışı izlenir. Dakikadaki ortalama absorbans değişimi (ΔA) hesaplanır.

$$U/L = \frac{\Delta A \times V_t \times 10^6}{\epsilon \times T \times V_s \times l} \quad /$$

V<sub>t</sub> = Toplam hacim; V<sub>s</sub> = Numune hacim; l = ışık yolu=1cm; T = zaman (dk)

ε = % 2'lik fenol içinde hazırlanmış 4-AAP'in molar ekstinksiyon katsayısıdır (1.72×10<sup>4</sup> mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

Bulunan toplam aktivite doku ekstraktındaki protein konsantrasyonuna bölünerek U/g.protein cinsinden spesifik aktivite hesaplanır.

### 3.6.2. TBARS Tayini:

TBARS analizinde 'Buege & Aust, 1970' yöntemi kullanıldı (101).

#### Reaktifler:

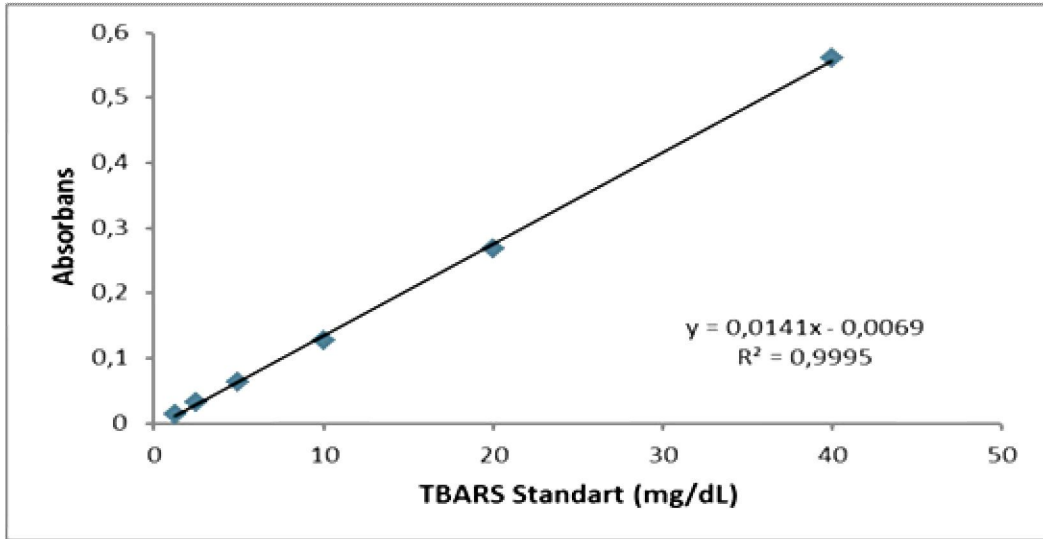
- % 0,37 TBA çözeltisi (0,25 mol/L HCl içinde):** önce 200 mL 0,25 M HCl çözeltisi hazırlanır. Bu maksatla, % 37'lik derişik HCl'den 4,16 mL alınır ve distile su ile 200 mL'ye seyreltilir. 18,5 mg TBA tartılır ve 50 mL 0,25 M HCl içinde çözülür.
- % 15 TCA (0,25 mol/L HCl içinde):** 22,5 gram TCA tartılır ve 150 mL 0,25 M HCl içinde çözülür.
- 20 mmol/L stok standart:** Standart çözeltisi hazırlamada 1.1.3.3. tetrametoksipropan kullanılır. 329 µL tetrametoksipropan alınır ve etanol ile 100 mL'ye seyreltilir. Bu çözeltinin konsantrasyonu 20 mmol/L'dir. Bu çözeltiden dilüsyon yolu ile 40 µmol/L, 20 µmol/L, 10 µmol/L, 5 µmol/L, 2,5 µmol/L, 1,25 µmol/L'lik standart çözeltiler hazırlanır.

#### Analizin yapılışı:

Çalışma vida kapaklı tüpler ile yapılır. Tüplere, numune, TCA ve TBA ilave edilir. Blank ve standartlarda aynı şekilde hazırlanır.

|   | Blank  | Numune | Standart |
|---|--------|--------|----------|
| Distile Su  | 250 µL | ---    | ---      |
| Standart  | ---    | ---    | 250 µL   |
| Numune  | ---    | 250 µL | ---      |
| TBA   | 0,5 mL | 0,5 mL | 0,5 mL   |
| TCA   | 1,5 mL | 1,5 mL | 1,5 mL   |
| Tüpler karıştırılır, 30 dk süreyle kaynar suda inkübe edilir. İnkübasyondan hemen sonra tüpler musluk suyu altında soğutulur. |        |        |          |
| n-Bütanol   | 3 mL   | 3 mL   | 3 mL     |

Tüpler vortekslenir.  $2000\times g$ 'de 10 dakika santrifüj edilir. Süpernatantlar 535 nm dalga boyunda n-bütanole karşı okunur. Standart konsantrasyonlarının absorpsiyonlarına bölünmesiyle elde edilen faktörlerin ortalaması ya da kalibrasyon grafiğinde lineer regresyon analizi ile bulunan formül ( $y=0,0141x-0,0069$ ) kullanılarak numunelerin TBARS miktarları hesaplanır.



Şekil 3.1. TBARS Kalibrasyon Grafiği

### 3.6.3. GSH Analizi:

Glutatyon analizinde Ellman metodu kullanıldı. Yöntem ortamda bulunan GSH'nin DTNB ile reaksiyonundan oluşan sarı-yeşilimsi rengin 410 nm dalga boyundaki absorpsiyonunun ölçümü esasına dayanır (102).

#### Reaktifler:

- % 10'lük TCA (w/v):** 10 gram TCA tartılır ve son hacim 100 mL olacak şekilde distile su içinde çözülür.
- % 1'lik trisodyum sitrat (w/v):** 100 mg trisodyum sitrat tartılır ve son hacim 100 mL olacak şekilde distile su içinde çözülür.
- 0,3 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  :** 4,25 gram  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  tartılır ve son hacim 100 mL olacak şekilde distile su içinde çözülür.

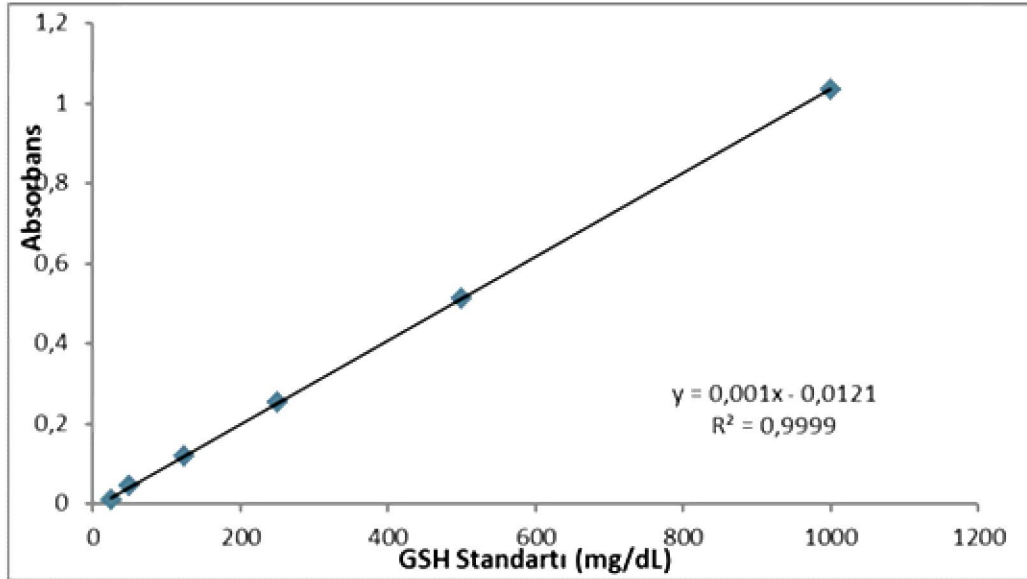
4. **5,5'-ditiyobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB) çözeltisi:** 4 mg DTNB 10 mL % 1'lik trisodyum sitrat içinde çözülür.

**Analizin Yapılışı:**

Plastik tüplere pipetlenmiş homojenatların üzerine TCA eklenir, iyice vortekslendikten sonra  $3000\times g$ ' de 10 dk santrifüj edilerek protein çökeltisi uzaklaştırılır. Süpernatantlar alınır hafif alkali ortam oluşturmak için üzerlerine  $Na_2HPO_4$  eklenir. Daha sonra tüplere DTNB çözeltisi pipetlenir. DTNB nonenzimatik bir reaksiyonlar GSH tarafından 2TNB'ye indirgenir ve hafif alkali ortamda renksiz okside DTNB sarı renkli redükte TNB'ye dönüştürülür.

|                               | <b>Kör</b>   | <b>Numune</b> | <b>Standartlar</b> |
|-------------------------------|--------------|---------------|--------------------|
| <b>D.su</b>                   | 250 $\mu$ L  | ---           | ---                |
| <b>Standartlar</b>            | ---          | ---           | 250 $\mu$ L        |
| <b>Numune</b>                 | ---          | 250 $\mu$ L   | ---                |
| <b>DTNB</b>                   | 250 $\mu$ L  | 250 $\mu$ L   | 250 $\mu$ L        |
| <b><math>Na_2HPO_4</math></b> | 2000 $\mu$ L | 2000 $\mu$ L  | 2000 $\mu$ L       |

Tüpler karıştırılır ve 5 dakika inkübe edilir. İnkübasyondan sonra oluşan sarı rengin absorbansı 410 nm dalga boyunda köre karşı okunur. Standartların konsantrasyonlarının absorbanslarına bölünmesi ile elde edilen faktör ya da kalibrasyon grafiğinde lineer regresyon analizi ile bulunan formül ( $y=0,001x-0,0121$ ) kullanılarak numunelerin GSH miktarları hesaplanır.



Şekil 3.2. GSH Kalibrasyon Grafiği

#### 3.6.4. Paraoksonaz Analizi:

PON1 aktivitesi, substrat olarak kullanılan paraoksonun (O,O-diethyl-O-p-nitrophenylphosphate) enzimatik olarak hidrolizi sonucu oluşan p-nitrofenolün verdiği renkli ürünün absorbansının 412 nm dalga boyunda ölçümü ile belirlenmesi esasına dayanır (103).

#### Reaktifler:

- 37 mM Glisin-NaOH tamponu:** 7,5 gram glisin tartılır yaklaşık 400 mL distile suda çözülür. 1 N NaOH ilavesi ile glisin çözeltisinin pH'sı 10.5 oluncaya kadar NaOH çözeltisi eklenir. pH ayarı yapıldıktan sonra toplam hacim distile su ile 500 mL'ye tamamlanır.
- 1 mM CaCl<sub>2</sub>:** 11,1 mg CaCl<sub>2</sub> tartılır 100 mL 37 mM Glisin-NaOH tamponunda çözülür.
- Substrat Solüsyonu:** Çalışma anında hazırlanır. 1 mM CaCl<sub>2</sub> içeren 100 mL 37 mM Glisin-NaOH tamponu içerisine 2 mM paraokson (40 µL) ilave edilerek hazırlanır.

#### Analizin Yapılışı:

Paraokson, analizin yapılacağı an tampona katılır ve bekletmeden çalışılır.



|                           | <b>Blank</b> | <b>Numune</b> |
|---------------------------|--------------|---------------|
| <b>Distile Su</b>         | 50 µL        | -             |
| <b>Substrat Solüsyonu</b> | 2 mL         | 2 mL          |
| <b>Numune</b>             | -            | 50 µL         |

412 nm dalga boyunda blank ile sıfır ayarı yapıldıktan hemen sonra 30 saniye aralıklarla 3 dakika boyunca numune tüpündeki absorbans artışı izlenir. Dakikadaki ortalama absorbans değişimi ( $\Delta A$ ) hesaplanır.

$$U/L = \frac{\Delta A \times V_t \times 10^6}{\epsilon \times T \times V_s \times l} \quad /$$

$V_t$  = Toplam hacim;  $V_s$  = Numune hacim;  $l$  = ışık yolu=1cm;  $T$  = zaman (dk)

$\epsilon$  = p-nitrofenol'ün molar ekstinksiyon katsayısıdır ( $1.7 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

Bulunan toplam aktivite doku ekstraktındaki protein konsantrasyonuna bölünerek U/g.protein cinsinden spesifik aktivite hesaplanır.

### 3.6.5. Protein Tayini:

Protein tayininde Lowry Metodu kullanıldı (104). Bu metod alkali çözeltide bakır-protein kompleksi oluşturarak fosfomolibdat-fosfotungstat (Folin-Ciocalteu) reaktifinin indirgenmesi ile oluşan koyu mavi rengin 595 nm dalga boyundaki absorbansının ölçümü esasına dayanır. Rengin koyuluğu protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

#### Reaktifler:

- Lowry A:** 0,1 M NaOH içinde %2'lik  $\text{Na}_2\text{CO}_3$
- Lowry B:** %1'lik  $\text{CuSO}_4$ , distile su ile hazırlanır.
- Lowry C:** % 2'lik sodyum potasyum tartarat ( $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )

- 4. Folin Reaktifi:** Fenol Reagent-2N (Folin-Ciocalteau Reagent) adı altında kullanıma hazır ticari preperat olarak bulunur. Kullanılmadan önce distile su ile 1:1 dilüe edilir.

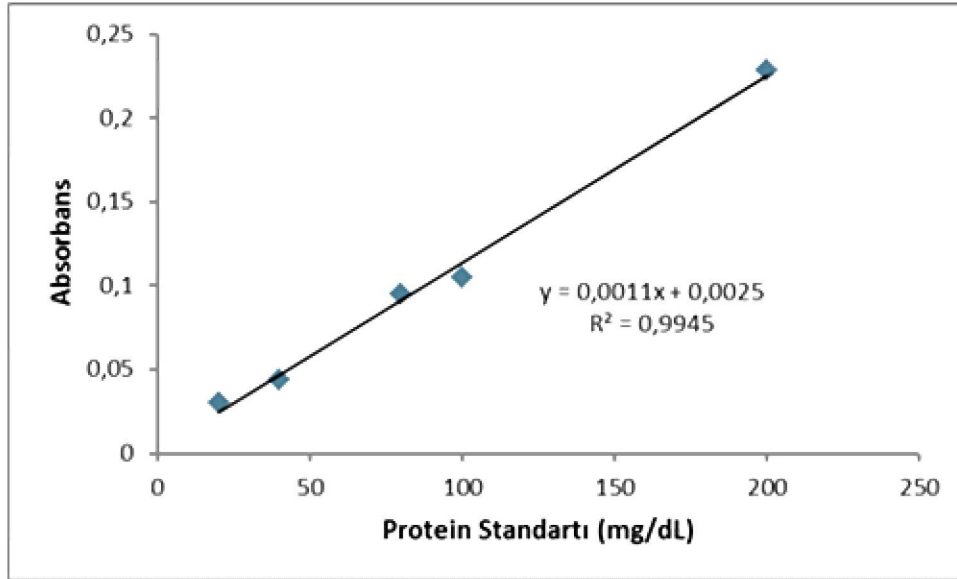
300 mL Lowry solüsyonu için; 294 mL Lowry A + 3 mL Lowry B + 3 mL Lowry C karıştırılır.

Standart çözeltisi olarak kullanılmak üzere, laboratuvarımızda bulunan 6,4 g/L konsantrasyonundaki protein kalibratörü 1/200, 1/100, 1/80, 1/40 ve 1/20 oranında seyreltildi ve faktör tayini yapılarak protein miktarı hesaplanmasında kullanıldı.

**Analizin Yapılışı:**

|   | <b>Blank</b> | <b>Numune</b> | <b>Standart</b> |
|---|--------------|---------------|-----------------|
| <b>Distile Su</b>   | 500 µL       | 490 µL        | 490 µL          |
| <b>Numune</b>   | -            | 10 µL         | 10 µL           |
| <b>Lowry Solüsyonu</b>  | 2500 µL      | 2500 µL       | 2500 µL         |
| Karıştırılır ve karanlıkta oda sıcaklığında 15 dk inkübe edilir |              |               |                 |
| <b>Folin Reaktifi</b>   | 250 µL       | 250 µL        | 250 µL          |

Tüpler karıştırılır ve pipetlemenin ilk yapıldığı tüpten başlanarak 595 nm dalga boyunda köre karşı okunur. Standartların konsantrasyonlarının absorbanlarına bölünmesi ile elde edilen faktör ya da kalibrasyon grafiğinde bulunan formül ( $y=0,0011x+0,0025$ ) kullanılarak numunelerin protein miktarları hesaplanır.



**Şekil 3.3.** Lowry Yöntemi ile protein analizi kalibrasyon grafiği

### 3.6.6. ALP, AST, ALT, TP Tayini:

ALP, ALT, AST ve TP analizler laboratuvarımızda bulunan mevcut Olympus AU-600 klinik otoanalizöründe (Olympus Cooperation, America Inc.) aynı marka kitler kullanılarak analiz edildi. Analizlerin tekrarlanabilirlik değerleri (%cv) % 5'ten daha küçüktü.

ALP analizinde, dietanol amin tamponunun ve paranitrofenilfosfat substratının kullanıldığı, kinetik kolorimetrik GSSC (German Society for Clinical Chemistry) yöntemi kullanıldı.

AST ve ALT analizlerinde, tampon olarak tris tampon ve koenzim olarak piridoksal fosfatın kullanıldığı, IFCC (International Federation for Clinical Chemistry)'nin önerdiği kinetik enzimatik UV metodlar kullanıldı.

TP analizinde, Biüret ölçüm yöntemi kullanıldı.

### 3.6.7. Serum HDL-K Düzeyleri Tayini:

Serum lipid düzeyleri Abbott marka klinik otoanalizöründe çalışıldı. Bu amaçla otoanalizörle aynı marka orijinal Abbott analiz kitleri ( Abbott Diagnostics, Abbott Park, Illinois, USA) kullanıldı.

### 3.6.8. Dokuların Histopatolojik İncelenmesi:

Histopatolojik inceleme için karaciğer dokusu örnekleri % 10'luk formaldehit ile tespit edildi. Tespit işlemi sonrasında karaciğer doku örnekleri rutin histolojik doku takip işlemi basamaklarından geçirildikten sonra parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan mikrotom yardımıyla 6 µm kalınlığında kesitler hazırlandı. Lamlar üzerine alınan kesitler hematoxilen – eozin (H-E) ile boyandıktan sonra Leica DFC 280 ışık mikroskobu ve Leica Q Win Görüntü Analiz Sistemi (Leica Microsystems Imaging Solutions, Cambridge, UK) ile incelenerek fotoğraflar çekildi.

Karaciğer kesitlerindeki histopatolojik değişiklikler (inflamatuvar hücre infiltrasyonu, hepatositlerdeki vakuolizasyon ve hepatik nekroz) 0 ile 3 arasında (0; yok, 1; hafif, 2; orta dercede, 3; şiddetli-yaygın) maksimum toplam skor 9 olacak şekilde skorlandı (105).

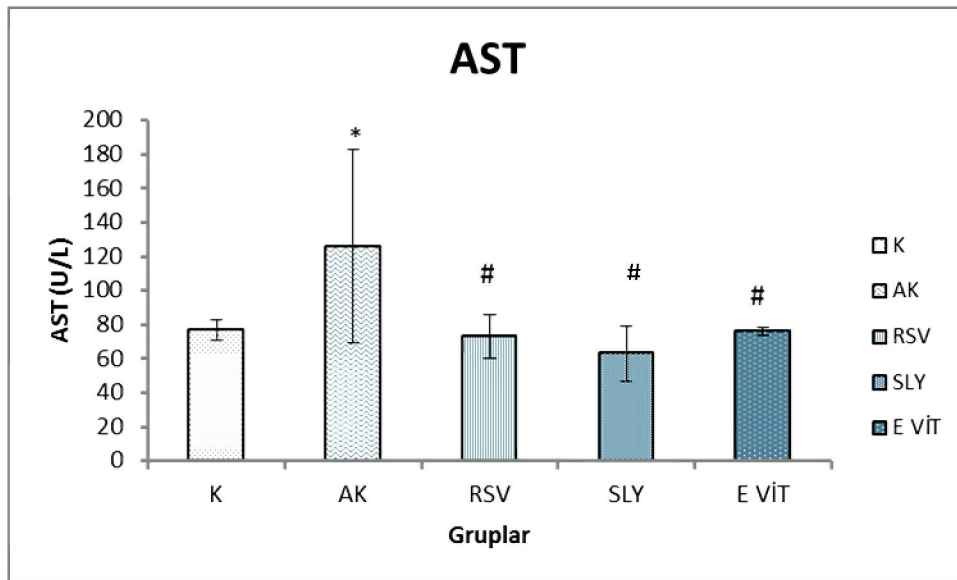
### 3.7. İstatistiksel Analizler:

Verilerin istatistiksel analizi SPSS paket programı (16.0) ile yapıldı. Nicel değişkenlere ilişkin veriler ortalama±standart hata şeklinde sunuldu. Gruplardaki nicel değişkenlere ilişkin veriler Shapiro Wilk normallik testi ile test edildi. Normal dağılım göstermediği saptandı ( $p<0.05$ ). bu nedenle ikiden fazla grupların karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis varyans analizi sonucu anlamlı bulunanların ikili karşılaştırılmasında Bon Ferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi kullanıldı. Değişkenler arasındaki ilişkiyi saptamada Sperman korelasyon analizi kullanıldı.  $p<0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR:

### 4. 1. Serum AST Düzeyleri:

Kontrol grubuna kıyasla, serum AST düzeyleri alkol grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir. Tedavi gruplarının hepsinde serum AST düzeyleri, alkolik kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azalmıştır ( $p=0,09$ ) (Şekil 4.1).



# : Alkolik kontrol grubuna göre anlamlı ( $p<0.05$ )

\*: kontrol grubuna göre anlamlı ( $p<0.05$ )

**Şekil 4.1.** Serum AST düzeyleri.

### 4. 2. Serum ALT Düzeyleri:

Kontrol grubuna kıyasla, serum ALT düzeyleri alkolik kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir. Alkolik kontrole kıyasla, resveratrol grubunda anlamlı bir azalma saptanmıştır. Silimarin ve E vitamini gruplarında azalma bulunamamıştır (Şekil 4.2).



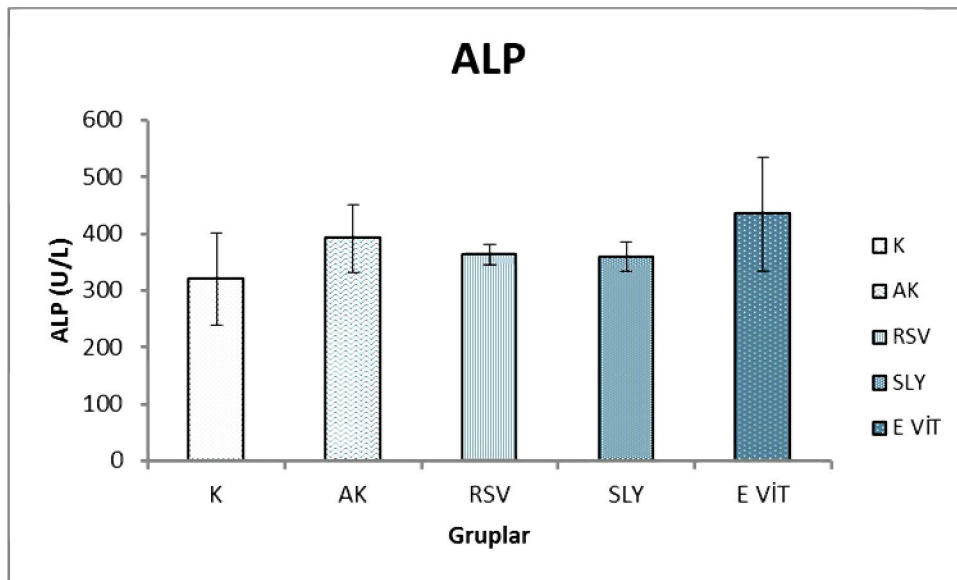
\*: kontrol grubuna göre anlamlı ( $p < 0.05$ )

#: kontrol grubuna göre anlamlı ( $p < 0.05$ )

Şekil 4.2. Serum ALT düzeyleri.

#### 4. 3. Serum ALP Düzeyleri:

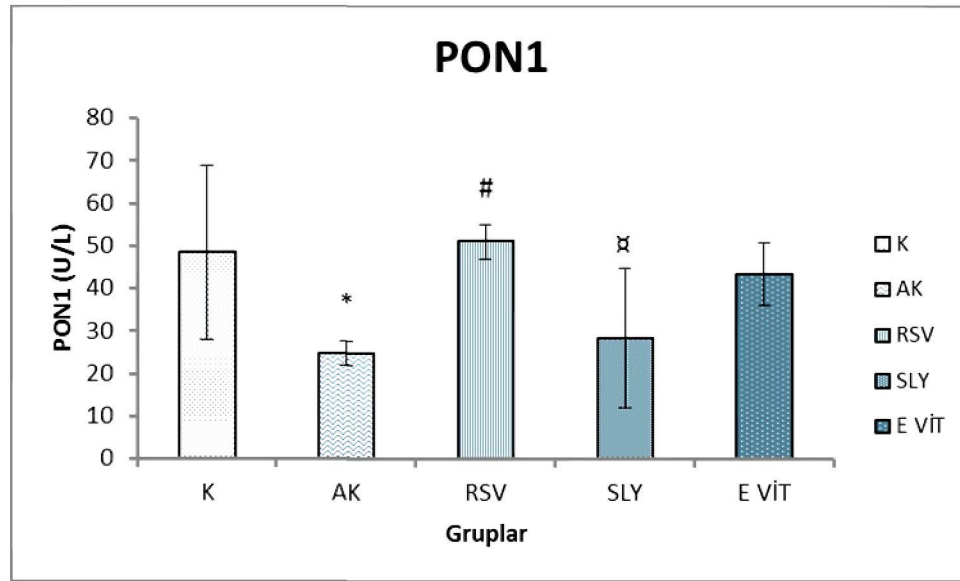
Gruplar arasında, serum ALP düzeyleri bakımından, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p=427$ ) (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Serum ALP düzeyleri.

#### 4. 4. Serum PON1 Düzeyleri:

Kontrol grubuna kıyasla, alkolik kontrol grubunun serum PON1 düzeyleri anlamlı olarak azalmıştır. Alkolik kontrole kıyasla, tedavi gruplarından resveratrol grubunda serum PON1 düzeyleri anlamlı olarak artmıştır. Resveratrol grubunun PON1 düzeyleri, silimarin grubuna kıyasla, anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Şekil 4.4).



\*: Kontrol grubuna göre anlamlı ( $p < 0.05$ )

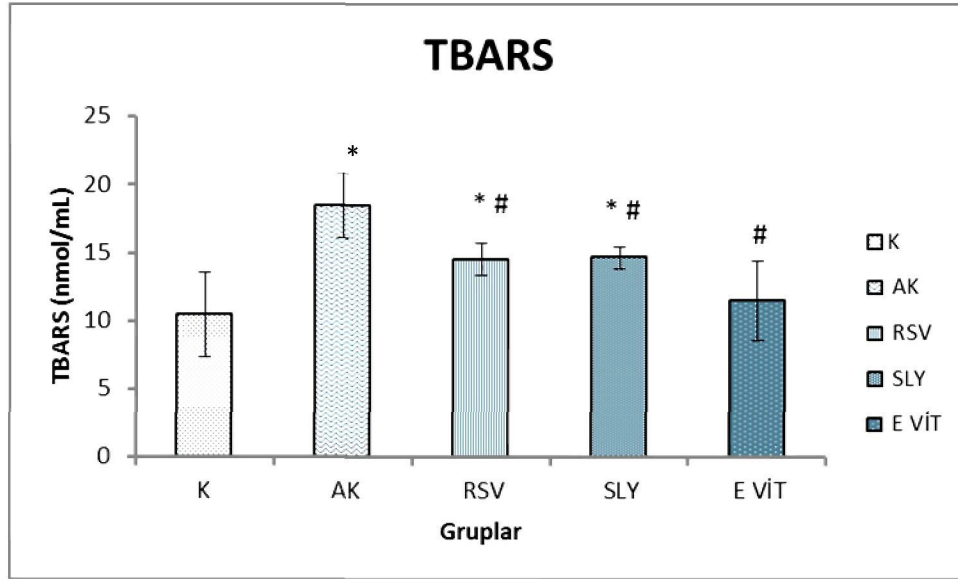
#: Alkolik kontrol grubuna göre anlamlı ( $p < 0.05$ )

x= Resveratrol grubuna göre anlamlı ( $p < 0.05$ )

**Şekil 4.4.** Serum PON1 düzeyleri.

#### 4. 5. Serum TBARS Düzeyleri:

Kontrol grubuna kıyasla, alkolik kontrol grubunun serum TBARS düzeyleri anlamlı olarak artmıştır. Alkolik kontrol grubundaki artışa kıyasla silimarin ve E vitamini gruplarının TBARS düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı azalma göstermiştir (Şekil 4.5).



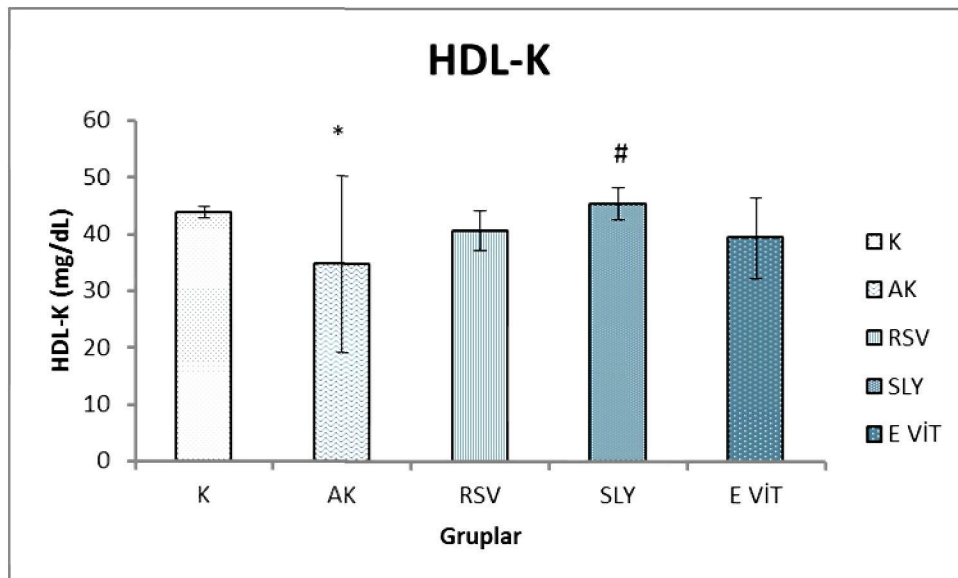
\*: Kontrol grubuna göre anlamlı ( $p < 0.01$ )

#: Alkolik kontrol grubuna göre anlamlı ( $p < 0.01$ )

**Şekil 4.5.** Serum TBARS düzeyleri.

#### 4.6. Serum HDL-K Düzeyleri:

Kontrol grubuna kıyasla alkolik kontrol grubunun serum HDL-K düzeyleri anlamlı olarak azalmıştır. Tedavi gruplarından silimarin grubunda alkolik kontrole kıyasla serum HDL-K düzeyleri anlamlı olarak artmıştır (Şekil 4.6).



\*: Kontrol grubuna göre anlamlı ( $p < 0.05$ )

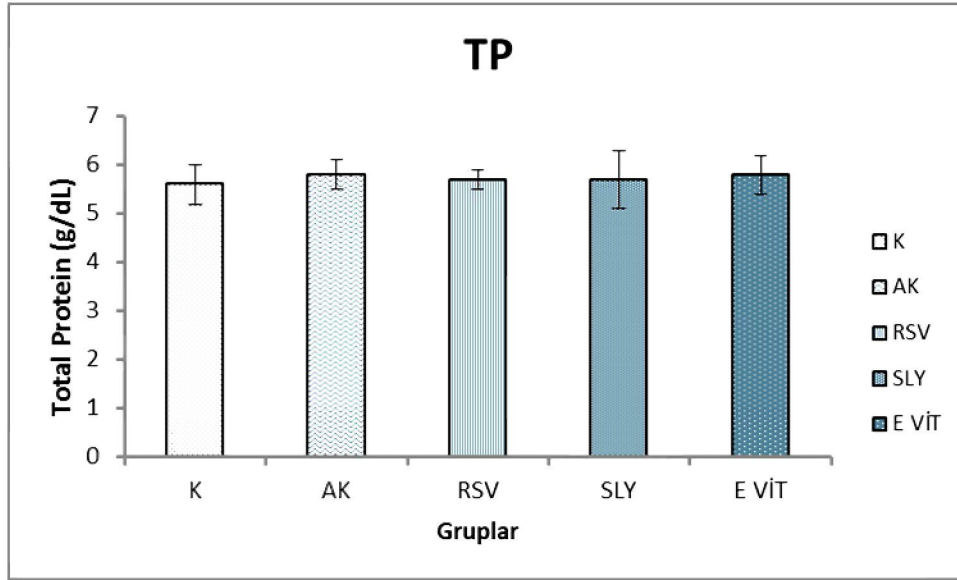
#: Alkolik kontrol grubuna göre anlamlı ( $p < 0.05$ )

**Şekil 4.6.** Serum HDL-K düzeyleri



#### 4. 7. Serum TP Düzeyleri:

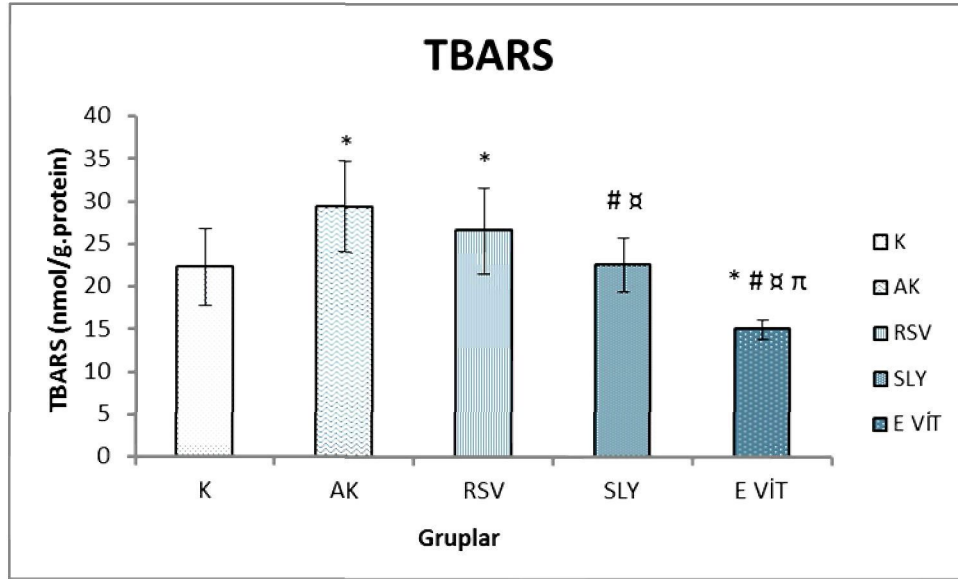
Serum TP düzeyleri bakımından gruplar arası anlamlı fark bulunamamıştır ( $p=0,286$ ) (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Serum TP düzeyleri.

#### 4. 8. Karaciğer TBARS Düzeyleri:

Kontrol grubuna kıyasla, alkolik kontrol grubunun karaciğer TBARS düzeyleri anlamlı olarak artmıştır. Alkolik kontrol grubundaki artışa kıyasla silimarin ve E vitamini gruplarında istatistiksel olarak anlamlı azalma saptanmıştır. Resveratrol grubundaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.8).



\*: Kontrol grubuna göre anlamlı ( $p < 0.05$ )

#: Alkolik kontrol grubuna göre anlamlı ( $p < 0.05$ )

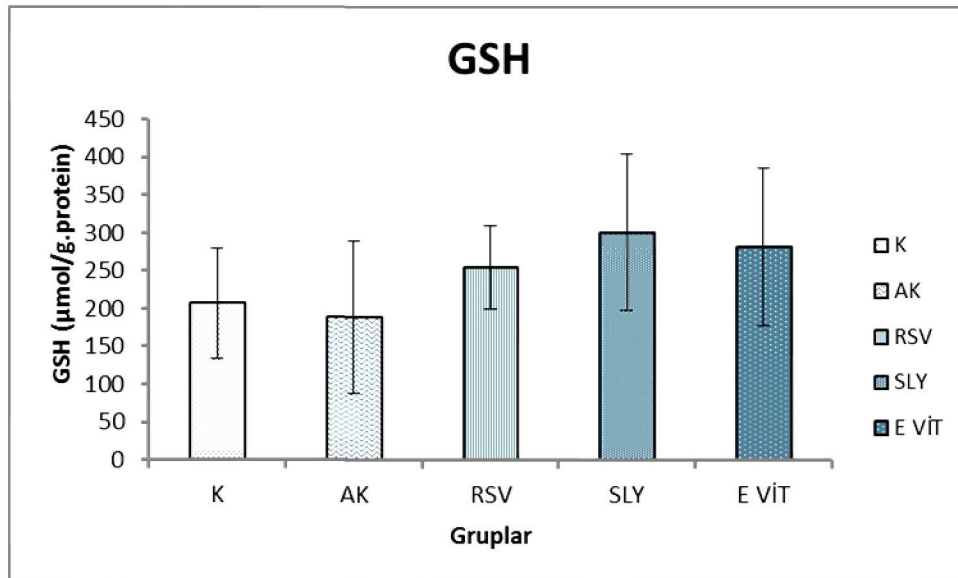
α= Resveratrol grubuna göre anlamlı ( $p < 0.01$ )

π= Silimarin grubuna göre anlamlı ( $p \leq 0.001$ )

**Şekil 4.8.** Karaciğer TBARS düzeyleri.

#### 4. 9. Karaciğer GSH Düzeyleri:

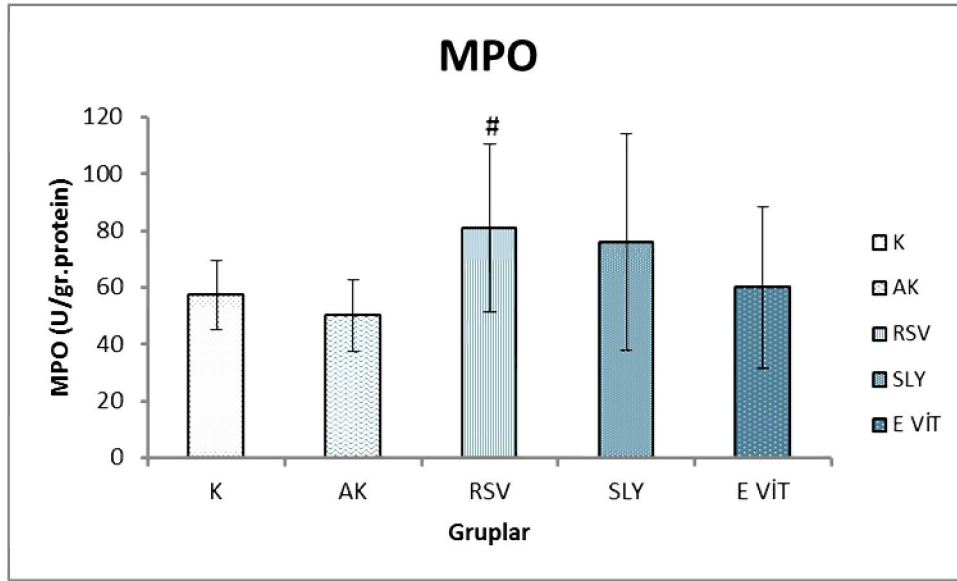
Karaciğer GSH düzeyleri bakımından gruplar arası anlamlı fark bulunamamıştır ( $p=0,643$ ) (Şekil 4.9).



**Şekil 4.9.** Karaciğer GSH düzeyleri.

#### 4. 10. Karaciğer MPO Düzeyleri:

Kontrol grubuna kıyasla alkolik grubun MPO düzeylerindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Alkolik kontrol grubundaki azalmaya kıyasla tedavi gruplarından sadece resveratrol grubunda anlamlı artış saptanmıştır (Şekil 4.10).

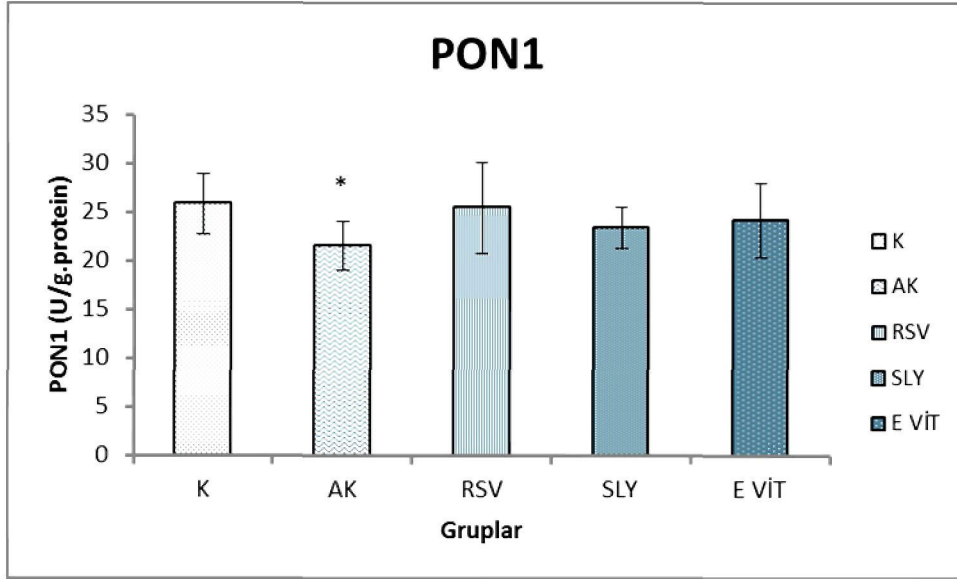


#: Alkolik kontrol grubuna göre anlamlı ( $p < 0.05$ )

Şekil 4.10. Karaciğer MPO düzeyleri.

#### 4. 11. Karaciğer PON1 Düzeyleri:

Kontrol grubuna kıyasla, alkolik kontrol grubunun PON1 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma saptanmıştır. Alkolik kontrole göre tedavi gruplarında gözlenen artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.11).

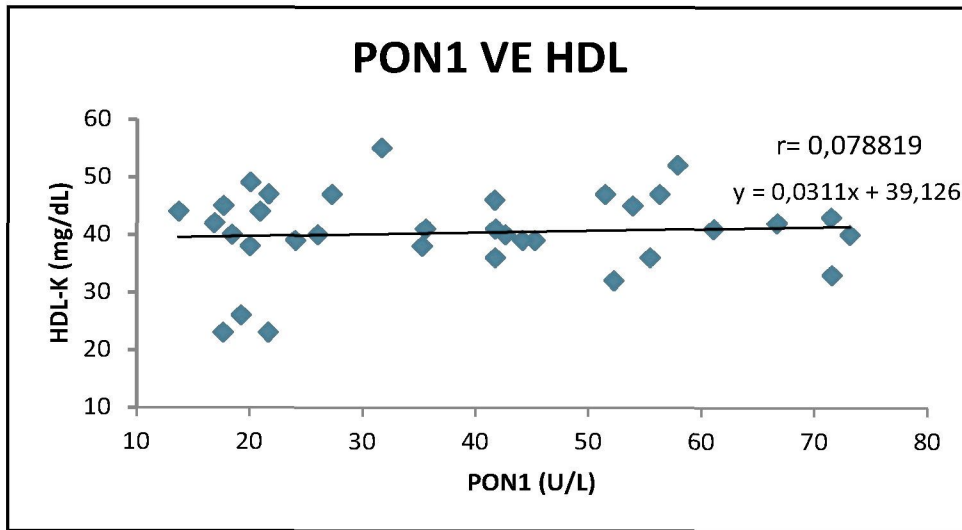


\*: Kontrol grubuna göre anlamlı ( $p < 0.05$ )

Şekil 4.11. Karaciğer PON1 düzeyleri.

#### 4. 12. Serum PON1 ve HDL-K Arasındaki Korelasyon

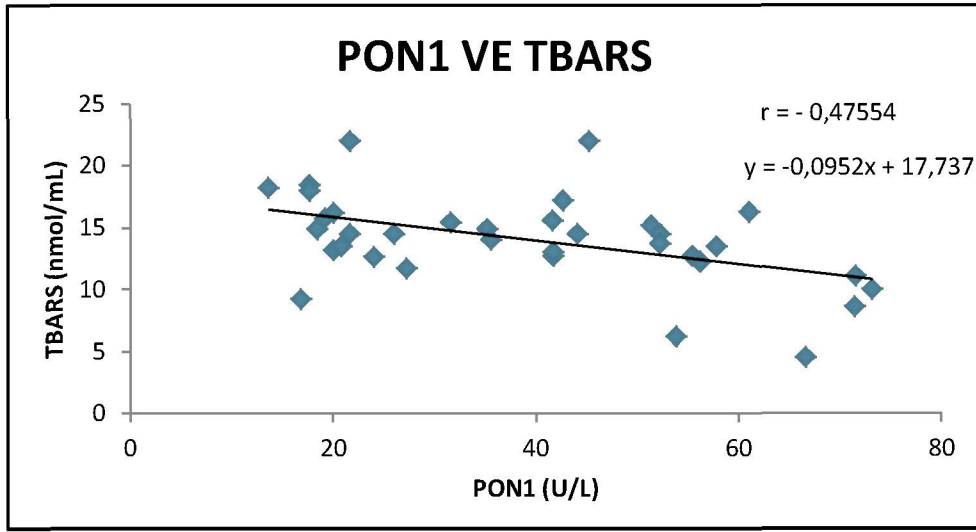
Serum PON1 ve HDL-K düzeyleri arasında korelasyon bulunamamıştır ( $r=0,078819$ ) (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Serum PON1 ve HDL-K dağılım grafiği

#### 4. 13. Serum PON1 ve TBARS Arasındaki Korelasyon

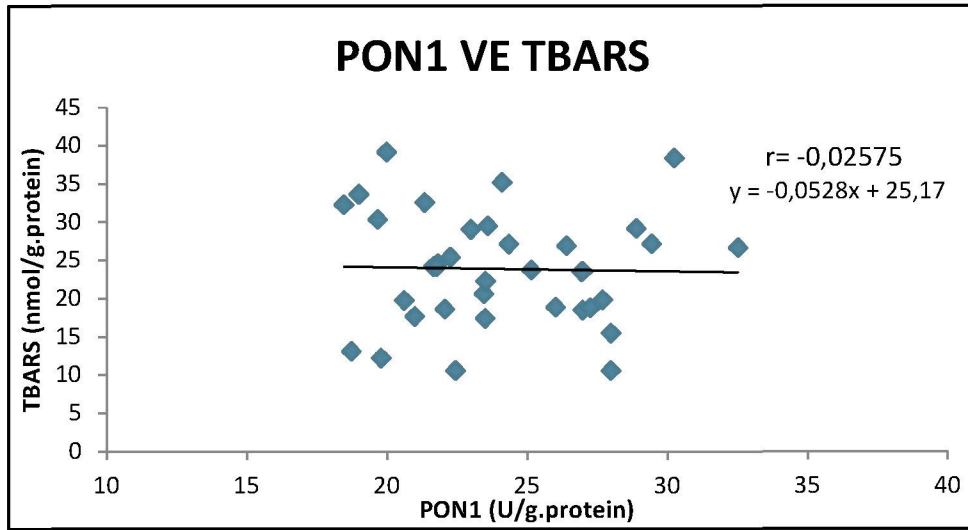
Serum PON1 ve TBARS düzeyleri arasında anlamlı negatif korelasyon ( $r=-0,47554$ ,  $p < 0.05$ ) bulunmuştur (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Serum PON1 ve TBARS dağılım grafiği

#### 4. 14. Karaciğer PON1 ve TBARS Arasındaki Korelasyon

Karaciğer PON1 ve TBARS düzeyleri arasında korelasyon bulunamamıştır ( $r=-0,02575$ ) (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Karaciğer PON1 ve TBARS dağılım grafiği

**Tablo 4.1.** Serum parametreleri gruplara göre tanımlayıcı istatistiksel ölçütleri

|                            | <b>K</b>             | <b>AK</b>                         | <b>RSV</b>                         | <b>SLY</b>                         | <b>E VİT</b>                       |
|----------------------------|----------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| <b>AST<br/>(U/L)</b>       | 77 ± 6<br>(n=7)      | 126 ± 57<br>(n=8)                 | 73 ± 13 <sup>b</sup><br>(n=7)      | 63 ± 16<br>(n=6)                   | 76 ± 2<br>(n=8)                    |
| <b>ALT<br/>(U/L)</b>       | 35,7 ± 9,9<br>(n=7)  | 138 ± 133 <sup>a</sup><br>(n=8)   | 38 ± 11<br>(n=7)                   | 45 ± 10<br>(n=6)                   | 46 ± 1 <sup>a,c</sup><br>(n=8)     |
| <b>ALP<br/>(U/L)</b>       | 320 ± 81<br>(n=7)    | 392 ± 59<br>(n=8)                 | 363 ± 18<br>(n=7)                  | 360 ± 26<br>(n=6)                  | 435 ± 100<br>(n=8)                 |
| <b>PON1<br/>(U/L)</b>      | 48,5 ± 20,5<br>(n=7) | 24,8 ± 2,8<br>(n=8)               | 51,1 ± 4<br>(n=7)                  | 28,4 ± 16,4<br>(n=6)               | 43,5 ± 7,6<br>(n=7)                |
| <b>TBARS<br/>(nmol/mL)</b> | 10,4 ± 3,1<br>(n=7)  | 18,5 ± 2,4 <sup>a</sup><br>(n=8)  | 14,5 ± 1,2 <sup>a,b</sup><br>(n=7) | 14,6 ± 0,8 <sup>a,b</sup><br>(n=6) | 11,5 ± 2,9 <sup>a,b</sup><br>(n=7) |
| <b>HDL<br/>(mg/mL)</b>     | 43,9 ± 0<br>(n=7)    | 34,8 ± 15,6 <sup>a</sup><br>(n=8) | 40,7 ± 3,5<br>(n=7)                | 45,4 ± 2,8 <sup>b</sup><br>(n=6)   | 39,4 ± 7,1<br>(n=8)                |

a: kontrol grubuna göre anlamlı (p<0.05)

b: Alkolik kontrol grubuna göre anlamlı (p<0.05)

c: Resveratrol grubuna göre anlamlı (p<0.05)

**Tablo 4.2.** Karaciğer parametreleri gruplara göre tanımlayıcı istatistiksel ölçütleri

|                               | <b>K</b>                         | <b>AK</b>                        | <b>RSV</b>                        | <b>SLY</b>                       | <b>E VİT</b>                       |
|-------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| <b>TBARS<br/>(nmol/g.prt)</b> | 24,3 ± 4,5<br>(n=7)              | 30,4 ± 1,4 <sup>a</sup><br>(n=8) | 26,6 ± 10,9 <sup>a</sup><br>(n=7) | 26,2 ± 3,4 <sup>b</sup><br>(n=6) | 15,0 ± 3,1 <sup>a,b</sup><br>(n=8) |
| <b>GSH</b>                    | 224 ± 73<br>(n=7)                | 194 ± 92<br>(n=8)                | 329 ± 164<br>(n=7)                | 342 ± 86 <sup>a,b</sup><br>(n=6) | 302 ± 117<br>(n=8)                 |
| <b>MPO</b>                    | 57,5 ± 12,1<br>(n=7)             | 50 ± 12,6<br>(n=8)               | 81 ± 29,7 <sup>b</sup><br>(n=7)   | 76 ± 38<br>(n=6)                 | 60 ± 28,5<br>(n=8)                 |
| <b>PON1</b>                   | 25,9 ± 3,1 <sup>a</sup><br>(n=7) | 21,6 ± 2,5<br>(n=8)              | 25,5 ± 4,7<br>(n=7)               | 23,5 ± 2,1<br>(n=6)              | 24,2 ± 3,8<br>(n=8)                |

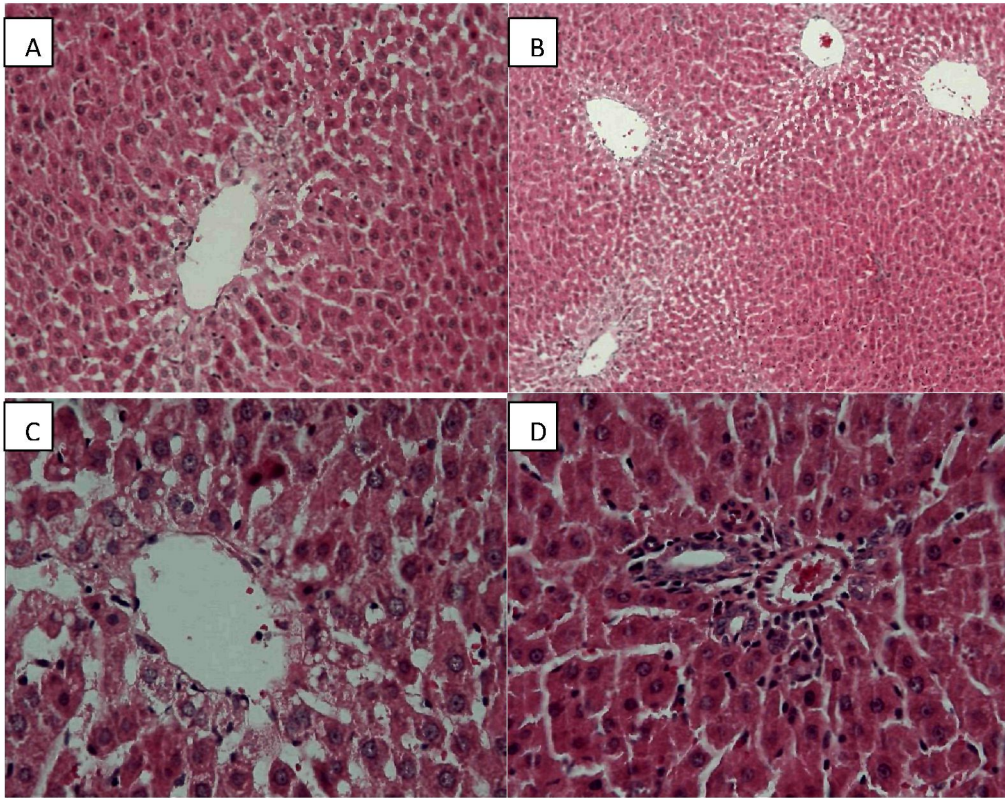
a: kontrol grubuna göre anlamlı (p<0.05)

b: Alkolik kontrol grubuna göre anlamlı (p<0.05)



#### 4.15. Karaciğer Histopatolojik Bulgular:

**4.15.1. Kontrol grubu:** İncelenen karaciğer kesitlerinde karaciğer lobüllerinin merkezinde yer alan santral ven çevresindeki hepatositlerde vakuolizasyon izlendi (Şekil 4.15.1A). Bu vakuolizasyon izlenen hepatosit kordonlarının yer yer lobüller arasında köprüleşmeler oluşturduğu görüldü (Şekil 4.15.1B). Vakuolizasyon görülen karaciğer lobüllerinin bazılarının santral venlerinde endotel hasarı ve perivasküler alandaki hepatositlerde dejenerasyon saptandı (Şekil 4.15.1C). Vakuolizasyon görülen alanlar dışındaki hepatositler ve sinuzoidler ile karaciğer parankimi ve portal alanlar normal histolojik yapıda değerlendirildi (Şekil 4.15.1A, B, D).



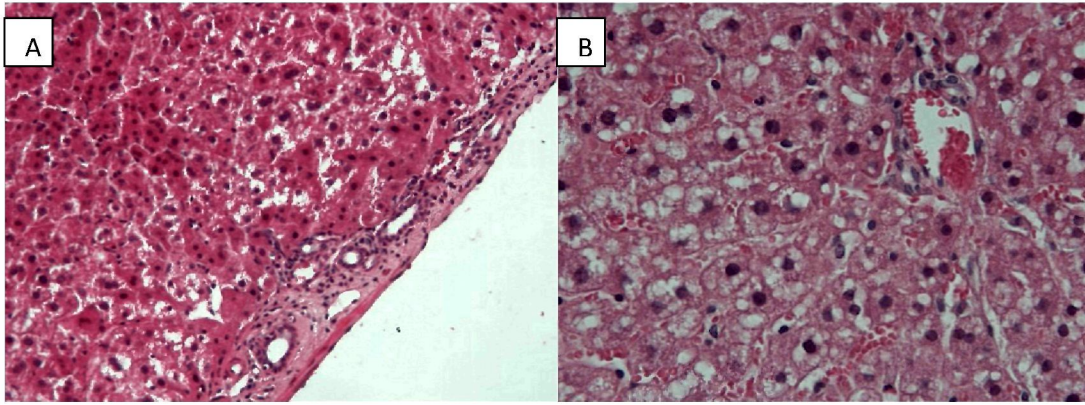
**Şekil 4.15.1A.** Kontrol grubu histopatolojik inceleme, H-E, x20

**B.** Kontrol grubu histopatolojik inceleme, H-E, x10

**C.** Kontrol grubu histopatolojik inceleme, H-E, x40

**D.** Kontrol grubu histopatolojik inceleme, H-E, x40

**4.15.2. Alkolik Kontrol Grubu:** Bu gruba ait karaciğer kesitlerinde yer subkapsüler bağ dokusu artışı ve safra kanalı hiperplazisi saptandı. Karaciğer parankiminin bazı alanlarında hepatositlerde piknotik nukleus ve koyu eozinofilik sitoplazma yapısı ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu dikkati çekti (Şekil 4.15.2A). Bu gruptaki üç sıçana ait karaciğer kesitlerinde hepatositlerde intrasitoplazmik mikro ve makroveziküler vakuolizasyon saptandı (Şekil 4.15.2B). Ayrıca bu grupta iki sıçana ait karaciğer kesitlerinde yer yer küçük nekroz alanları saptandı.

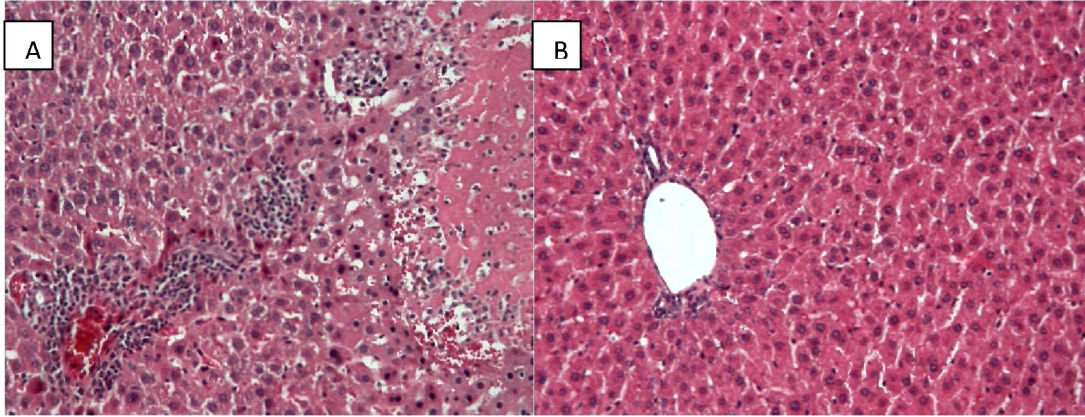


**Şekil 4.15.2A.** Alkol kontrol grubu histopatolojik inceleme, H-E, x20

**B.** Alkol kontrol grubu histopatolojik inceleme, H-E, x40

**4.15.3. Resveratrol Grubu:** İncelenen karaciğer kesitlerin bazılarında santral ven çevresindeki hepatositlerde vakuolizasyon (Şekil 4.15.3A), yer yer parankimal nekroz alanları ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu izlenmekle birlikte normal histolojik yapıda değerlendirilen karaciğer kesitleri de mevcuttu (Şekil 4.15.3B).

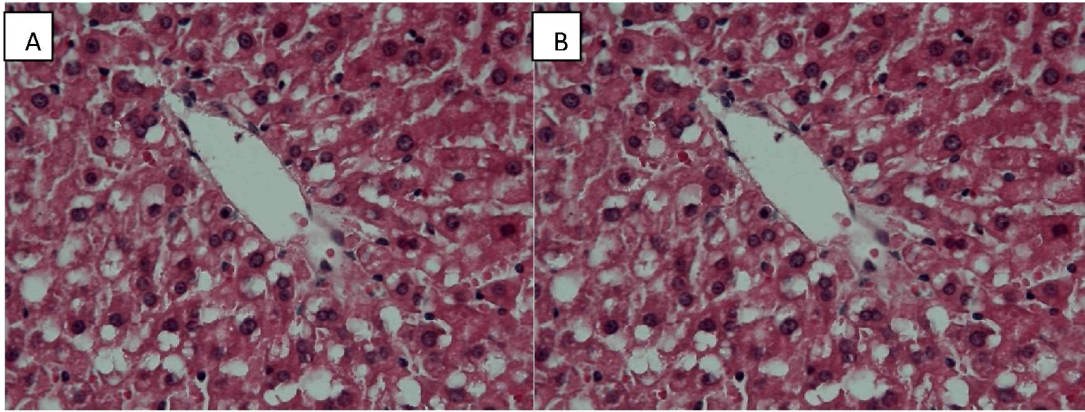




**Şekil 4.15.3A.** Resveratrol grubu histopatolojik inceleme, H-E, x20

**B.** Resveratrol grubu histopatolojik inceleme, H-E, x20

**4.15.4. Silimarin Grubu:** İncelenen karaciğer kesitlerinde yer yer hepatositlerde vakuolizasyon (Şekil 4.15.4A) ve minimal inflamatuvar hücre infiltrasyonu saptandı. Vakuolizasyon gösteren hepatositler dışındaki karaciğer parankim alanları normal histolojik yapıda değerlendirildi (Şekil 4.15.4B).

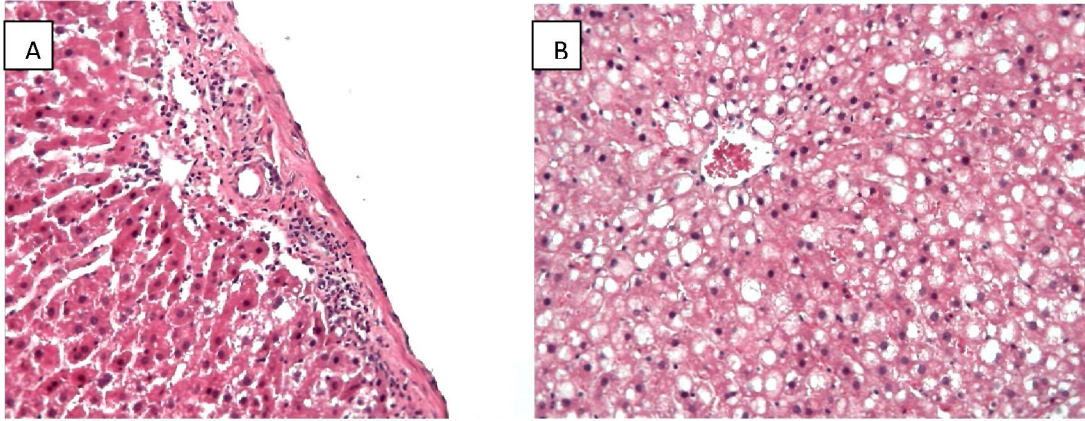


**Şekil 4.15.4A.** Silimarin grubu histopatolojik inceleme, H-E, x20

**B.** Silimarin grubu histopatolojik inceleme, H-E, x40

**4.15.5. E Vitamini Grubu:** Bu gruba ait karaciğer kesitlerinde yer yer Glisson kapsülünde fibrozise bağlı kalınlaşma ve subkapsüller bölgedeki bazı hepatositlerde heterokromatik-piknotik nukleus yapısı saptandı (Şekil 4.15.5A). Karaciğer parankiminde, özellikle lobüllerin merkezi bölgelerinde ve yer yer geniş

parankimal alanlardaki hepatositlerde vakuolizasyon mevcuttu. Ayrıca karaciğer parankimi içinde yer yer nekroz alanları ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu (Şekil 4.15.5B) saptandı.

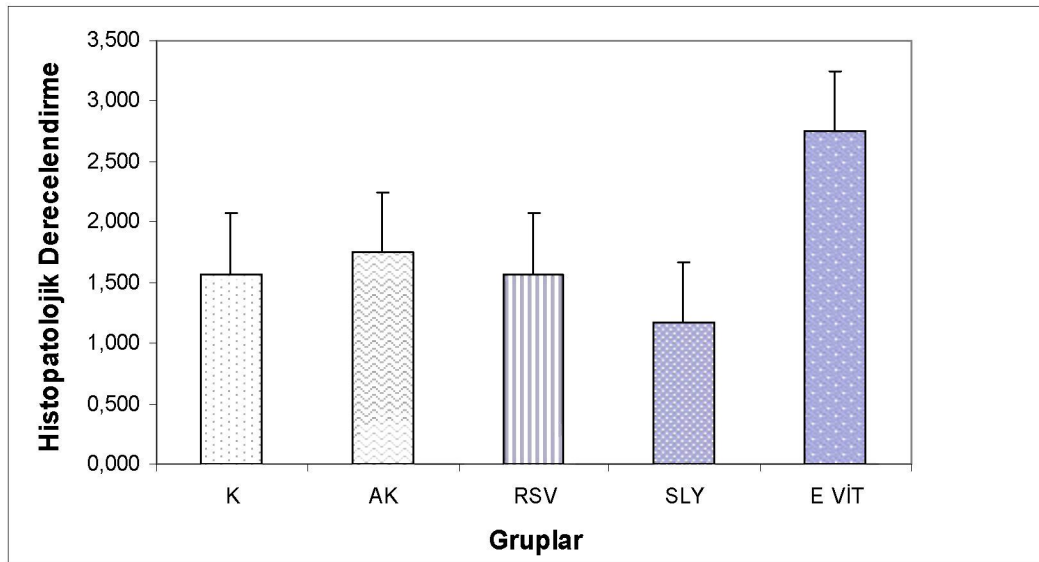


Şekil 4.15.5A. E vitamini grubu histopatolojik inceleme, H-E, x20

B. E vitamini grubu histopatolojik inceleme, H-E, x20

#### 4.16. Karaciğerin Histopatolojik Değerlendirilmesi:

Karaciğer dokularının histopatolojik değerlendirilmesinde gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 4.16. Karaciğer histopatolojik verilerin gruplara göre değişimi

**Tablo 4.3.** Karaciğer histopatolojik skorlama

| <b>K</b>     | <b>İnflamatuvar Hücre İnfiltrasyonu</b> | <b>Vakuolizasyon</b> | <b>Nekroz</b> | <b>Toplam skor</b> |
|--------------|---|----------------------|---------------|--------------------|
| 1            | 1                                       | 1                    | -             | 2                  |
| 2            |   |                      |               |                    |
| 3            | -                                       | 1                    | -             | 1                  |
| 4            | -                                       | 1                    | -             | 1                  |
| 5            | -                                       | 1                    | -             | 1                  |
| 6            | 1                                       | 2                    | -             | 3                  |
| 7            | -                                       | 2                    | -             | 2                  |
| 8            | -                                       | 1                    | -             | 1                  |
| <b>AK</b>    |   |                      |               |                    |
| 1            | 1                                       | -                    | -             | 1                  |
| 2            | 1                                       | -                    | 1             | 2                  |
| 3            | 1                                       | -                    | -             | 1                  |
| 4            | 1                                       | -                    | 1             | 2                  |
| 5            | 1                                       | -                    | -             | 1                  |
| 6            | -                                       | 2                    | -             | 2                  |
| 7            | -                                       | 2                    | -             | 2                  |
| 8            | 1                                       | 2                    | -             | 3                  |
| <b>RSV</b>   |   |                      |               |                    |
| 1            | -                                       | 1                    | -             | 1                  |
| 2            | 2                                       | 1                    | 2             | 5                  |
| 3            | -                                       | 2                    | -             | 2                  |
| 4            | -                                       | -                    | -             | 0                  |
| 5            | -                                       | -                    | -             | 0                  |
| 6            | 1                                       | 1                    | 1             | 3                  |
| 7            |   |                      |               |                    |
| 8            | -                                       | -                    | -             | 0                  |
| <b>SLY</b>   |   |                      |               |                    |
| 1            | -                                       | 1                    | -             | 1                  |
| 2            | -                                       | -                    | -             | 0                  |
| 3            | -                                       | 1                    | -             | 1                  |
| 4            |   |                      |               |                    |
| 5            |   |                      |               |                    |
| 6            | 1                                       | 2                    | -             | 3                  |
| 7            |   |                      |               |                    |
| 8            | -                                       | 2                    | -             | 2                  |
| <b>E VİT</b> |   |                      |               |                    |
| 1            | -                                       | 2                    | -             | 2                  |
| 2            | 1                                       | 2                    | 1             | 4                  |
| 3            | -                                       | -                    | -             | 0                  |
| 4            | 2                                       | 1                    | -             | 3                  |
| 5            | 3                                       | 2                    | 2             | 7                  |
| 6            | -                                       | 1                    | -             | 1                  |
| 7            | 2                                       | 1                    | 1             | 4                  |
| 8            | 1                                       | -                    | -             | 1                  |

## 5. TARTIŞMA:

Karaciğer hastalıkları birçok nedene bağlı olarak görülebilir. Bunlar; genetik, toksik, viral, konjenital gibi nedenler olabilir. Alkol kullanımına bağlı olarak görülen karaciğer hasarı, tüm dünyada, özellikle gelişmiş toplumlarda çok yaygın ve önemli bir problemdir. Alkole bağlı karaciğer hasarını anlayabilmek ve önleyebilmek için birçok çalışma yapılmıştır ve yapılmaya devam edilmektedir (106).

Alkol, karaciğer sirozunun, batı toplumlarında birinci, ülkemizde ise ikinci önemli nedenidir (107).

Karaciğerin, alkolün metabolize olduğu en önemli organ olması nedeniyle çalışmalar karaciğer üzerinde yoğunlaşmıştır. Yapılan çalışmalarda, alkolün karaciğer üzerinde hasar oluşturma mekanizmalarında çeşitli faktörlerin etki ettiği bildirilmiştir. Alkolik karaciğer hastalığı, yağlı dejenerasyon, inflamasyon ve nekrozun görüldüğü, alkol kullanımı bırakılmaz veya tedavi edilmezse siroza kadar gidebilen ölümcül bir hastalıktır (108).

Alkolik karaciğer hasarının patogeneğinde, oksifatif stresin rol oynadığı bir çok çalışma ile gösterilmiştir. Bu bağlamda, serbest radikallerin, alkole bağlı karaciğer hasarındaki rolü yıllardan beri araştırılmaktadır (106). Hücrel metabolizmada üretilen reaktif oksijen türleri (ROS) düşük seviyelerde çoğu hücrelerin fonksiyonu için önemli olmasına rağmen yüksek miktarlarda bu fonksiyonlarda ters etki yapmaktadırlar (108). Alkolün metabolizması sırasında ortaya çıkan asetaldehit, serbest radikal aktivitesinde artmaya, lipid peroksidasyonuna, glutatyon aktivasyonunda ve antioksidan fonksiyonunda bozulmaya neden olmaktadır. Asetaldehit oluşumu esnasında ortaya çıkan NADH, elektronları mitokondriyal solunum sistemine vererek oksijenin süperoksit oluşturmak üzere indirgenmesine neden olur. Asetaldehit, ileri oksidasyona uğrayıp serbest radikal üretimini artırarak, antioksidanların hem fonksiyonunu bozarak hem de antioksidanları tüketerek etki eder (2).

Silimarin, deve dikenini bitkisinden elde edilen bir flavonoiddir. Silimarinin toksinlere, çoğu kimsayala ve farmakolojik ilaçlara bağı olarak gelişen karaciğer hasarına karşı koruyucu etki gösterdiği bir çok in vivo ve in vitro çalışma ile bildirilmiştir. Serbest radikallere karşı antioksidan etki göstermesi ve sitokin üretimine etki ederek immün düzenleyici olması muhtemel iki mekanizma olarak bildirilmiş olmasına rağmen, etki mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. (109).

Yüksek derecede reaktif olan bazı maddeler serbest radikal üreterek veya radikal gibi davranarak karaciğere zarar verebilir ve canlı dokuyu yok edebilirler. Alkol bu maddelerden biridir. Yapılan çalışmalarda, alkol kullananlarda, güçlü bir antioksidan olan silimarin verilmesinin alkolün oluşturduğu hasara karşı koruyucu etki gösterdiği belirtilmiştir (110).

Silimarinin antioksidan aktivitesinin E vitamininden on kata kadar daha etkili olduğunu göstermiştir (111). Glutasyon karaciğerin detoksifikasyonunda hayati önem taşır. Silimarinin, alkol kullanımı ya da diğer toksinlere maruziyet sonucu ortaya çıkan glutasyon tükenmesini önleyerek etki ettiği ve ayrıca karaciğerin glutasyon seviyesini %35 arttırdığı gösterilmiştir (111). Bizim çalışmamızda da silimarin glutasyon seviyesini alkolik kontrol grubuna kıyasla %43 arttırmıştır.

Silimarinin oksidatif hasarla korelasyon gösterdiği, yağ asidi oksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit (MDA) düzeyini düşürdüğü, katalaz ve glutasyon peroksidaz gibi endojen antioksidan enzim aktivitelerini artırdığı bildirilmiştir. (112).

Hidrojen peroksidin zararsız hale getirilmesinde glutasyon, glutasyon peroksidaz (GPx) enzim aktivitesi aracılığı ile okside glutatyona (GSSG) dönüştürülür. Glutasyon, okside glutatyona katalizlenirken NADPH tüketilir. Katalaz bir hemoproteindir ve aktif formda olabilmesi için NADPH üretimine ihtiyaç vardır. Bu yüzden NADPH bu enzimlerin iş görmesinde önemli role sahiptir. NADPH seviyesi glukoz-6- fosfat dehidrogenaz (GP6D) aktivitesine bağlıdır. GR/GPx hücre sitoplazmasında aktif iken, katalaz başlıca peroksizomlarda aktiftir. GSH ve katalazın üretimi için gerekli olan NADPH pentoz fosfat yolunda üretilir. Silimarin, hücrenin glukoz alınımını artırma özelliğine sahiptir. Sonuçta pentoz fosfat yolu ve oksidatif fosforilasyon için enerji kaynağını artırıcı olarak iş görebilir. Bu sebeble

NADPH/NADP ın hücredeki seviyesini ve katalaz seviyesini artırır. NADPH seviyesinin dolayısıyla glutatyon redüktaz (GR) aktivitesinin artması ile glutatyon peroksidaz (GPx) için substrat olan redükte glutatyon seviyesi artar. Kısacası, silimarin katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerinin miktarının artmasına yol açar (113).

Kronik alkolik karaciğer hasarı olan hastalarla yapılan bir çalışmada, ‘silimarin, serbest radikal reaksiyonlarının zararlı etkilerini iyileştirerek hücrelerin antioksidan savunmalarını arttırabilmektedir’ sonucuna varılmıştır (114).

Günlük belirli miktarda silimarin kullanımının, çevresel kirliliklere, diyetel toksinlere ve ağır metallere karşı karaciğeri koruyabildiği bildirilmiştir. Canlı dokularda birikme gösteren kadminyumu gerçek anlamda etkisizleştirdiği gösterilmiştir (115). Başka bir çalışmada ise toksik serbest demiri bağladığı bildirilmiştir (116). Hücrel savunmayı desteklemek için tamamlayıcı tedaviler listesine eklenmesi gerektiği belirtilmiştir.

Resveratrolün doğal antioksidan rolü üç farklı mekanizma ile açıklanmaktadır. Bunlardan biri, koenzim Q ile yarışmak ve ROS oluşum yerinde oksidatif zincir kompleksini azaltmaktır. Diğeri, mitokondride oluşan süperoksit radikalini yakalamak, sonucusu ise fenton reaksiyonu ürünleri tarafından indüklenen lipid peroksidasyonunun inhibisyonudur. Resveratrolün hem süperoksit hem de hidroksil radikalini yakalama yeteneğinin olduğu çalışmalarda gösterilmiş olsa da, bu özelliği diğeri güçlü antioksidanlardan daha zayıftır (62).

Resveratrol, biyolojik sistemlerde bulunan antioksidanların hücre içi konsantrasyonlarının sürdürülmesini de sağlamaktadır (117). Yapılan bir çalışmada, resveratrolün hidrojen peroksit ile aktive olan insan lenfositlerinde glutatyon miktarını arttırdığı gösterilmiştir (62).

Yapılan çalışmalarda, resveratrolün hepatoprotektif etkileri gösterilmiş ve bu etkilerin antioksidan özelliklerine bağlı olduğu belirtilmiştir. Ayrıca resveratrol, kalpte alkole bağlı lipid peroksidasyonunda azalmaya neden olmaktadır. Bu da kırmızı şarap tüketiminin kardiyovasküler hastalıklar üzerine yararlı etkilerini açıklamaktadır. Bununla beraber, resveratrolün etki şekli hala tartışmalıdır (118).



İn vivo yapılan bir çalışmada, resveratrolün, alkol hasarına karşı nöroprotektif etki ortaya koyduğu gösterilmiştir (118). Resveratrolün, LDL'lerin damar endotelinde birikmesini dolayısıyla ateroskleroz gelişimini önlediği bildirilmiştir (34).

Zengin resveratrol içeriğinden dolayı şarap ve yeşil çay gibi doğal ürünlerin uzun süre kullanılmasının bir çok yararlı biyolojik etkiler gösterdiği saptanmıştır. Bu polifenoller içinde, en dikkat çekicisi ve etkisi fazla kanıtlanmış olanı resveratroidir. Resveratrolün farmakokinetiği hakkında yapılan çalışmalar, biyolojik etki çalışmalarına nazaran oldukça azdır. İn vitro çalışmalardaki kanıtlanmış yüksek biyolojik etkinliği resveratrolün popülaritesini arttırmıştır (119).

Serum PON1, başlıca karaciğerde sentezlenen HDL bağlı bir enzimdir. PON1'in doğal substratları bilinmemesine rağmen, son zamanlarda yapılan çalışmalar PON1'in lipid peroksidleri hidroliz ederek LDL oksidasyonunu engellediğini göstermiştir. HDL'nin biyolojik rolü, kendine bağlı olan PON1'in varlığına bağlıdır. Yapılan çalışmalar, PON1'in aktif bölgesinde 283. Sisteinde serbest tiol (SH) grupları olduğunu göstermiştir (120 - 122). Lipid peroksidlerin hidrolizi için PON1'in aktif bölgesi 284. sistein aminoasitte serbest bir sülfhidril grubu gerektirir. Lipid peroksidler bu bölgeyle kovalent olarak bağlanarak enzimin inhibisyonuna neden olur. Dolayısıyla artan oksidatif stresin net sonucu azalan PON1 aktivitesidir (123). Bununla beraber son zamanlardaki çalışmalar, HDL'nin fonksiyonunda sorumlu olan, PON1'deki 283. sistein aminoasitinin serbest SH gruplarından başka bileşiklerin de sorumlu olduğunu belirtmiştir (124).

Karaciğer, PON1 sentezinde anahtar rol oynar ve kronik karaciğer hastalıklarında PON1 serum düzeyleri azalır. Son çalışmalar PON1 aktivitesi ile proteinin sülfhidril (SH) grupları arasındaki ilişkiye dikkat çekmektedir. Hepatositler, major plazma proteini olan albümini sentezler. Protein üzerindeki SH grupları in vivo major antioksidanlar olarak kabul edilir. Vücuttaki SH grupları düzeyleri antioksidan statüyü belirtir ve düşük protein SH düzeyleri, yükselmiş ileri oksidasyon protein ürünleri (AOPP) düzeyleri ile koreledir (125,126).

Marsillah ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, kronik alkol kullanan hastalarda PON1 aktivitesinin azaldığını ve PON1 aktivitesinin anlamlı olarak karaciğer hasarının derecesi ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Yine aynı çalışmada, normal karaciğeri olan alkolik hastalarda, standart biyokimyasal analizlere göre hepatik fonksiyonda dikkate değer bir inhibisyon derecesi gözlenmiştir. Bu hastalarda serum PON1 aktivitesi oksidatif stresin bir göstergesi olan plazma MDA konsantrasyonu ile ters olarak ilişkili bulunmuştur (123). Benzer şekilde, bizim çalışmamızda da serum PON1 ve TBARS konsantrasyonu arasında negatif yönde anlamlı korelasyon bulunmuştur.

Karaciğer hastalığı olan hastalar HDL sentezini düzenleyen çeşitli enzimlerin sentezinde bozulma gösterirler. Kolesterol ester sentezindeki bozulmanın bir sonucu olarak HDL'nin yapısında ve şeklinde değişiklik gözlenir (127).

Karaciğer hastalığı, çoğunlukla ikincil olarak hepatit C, olan kişiler üzerinde yapılan bir çalışmada, serum PON1 konsantrasyonlarındaki artışın, fibrinogenezin serolojik göstergesi olarak karaciğer biyopsilerinde artmış serum PON1 ifadesi ile direk korele olduğu gözlenmiştir (128).

Prakash ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, alkolik karaciğer hasarı olan alkoliklerde PON1 seviyeleri anlamlı olarak azalmıştır. PON1 aktivitesi, karaciğerin azalan PON1 sentez edebilme kapasitesi ve hepatosit membranındaki hasarı gösteren yüksek karaciğer enzimleri ile negatif olarak korele bulunmuştur (125).

Biz çalışmamızda, kronik alkol kullanımının karaciğer hasarı oluşturduğu ratlarda, güçlü antioksidanlar olan silimarin, resveratrol ve E vitamininin hepatoprotektif özelliklerini kıyasladık.

Çalışmamızda karaciğer hasarında azalması beklenen serum PON1 aktivitesi, kontrol grubuna kıyasla alkolik grupta istatistiksel olarak anlamlı düşük çıkmıştır. Hem resveratrol hem de silimarin tedavisi ile istatistiksel olarak anlamlı bir iyileşme saptanmıştır.

Transaminazlar, hepatotoksitenin önemli bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Hepatositlerde bulunan bu hücre içi enzimlerin, karaciğer hasarında



hücre dışına sızmalarıyla kan seviyeleri yükselir. Aspartat aminotransferaz (AST) hepatositlerin sitozolünde ve mitokondrilerinde bulunur, ayrıca iskelet kası, kalp, böbrek, beyin ve pankreasta da bulunur. Alanin aminotransferaz (ALT) daha çok karaciğerde, hepatosit hücrelerinin sitozolünde bulunur. Bu enzimlerin kandaki aktivitesi, karaciğer hasarının şiddetini gösterir ancak AST kalp ve iskelet kası harabiyetinde de yükseldiği için ALT karaciğere daha özgüdür.

Çalışmamızda serum AST düzeylerinin, kontrol grubuna kıyasla alkol grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür. Tedavi gruplarının hepsinde AST düzeyleri alkol grubuna göre anlamlı olarak düşmüştür.

Alkol grubu ALT düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştır. Resveratrol tedavisi ile istatistiksel olarak anlamlı bir iyileşme saptanmıştır.

Alkol uygulaması serum ALP düzeyinde anlamlı bir artışa neden olmamıştır. ALP düzeyleri bakımından gruplar arası anlamlılık bulunmamıştır.

Serum TBARS düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır. Alkol verilen ratların serum TBARS düzeyleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek çıkmıştır. Antioksidan tedavisi ile TBARS düzeyleri, alkol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı azalma göstermiştir.

Serum AST, ALT, ALP düzeyleri ve PON1 aktivitesinde, alkol grubuna kıyasla, en fazla iyileşme resveratrol grubunda, TBARS düzeylerinde ise E vitamini grubunda gözlenmiştir.

Karaciğer TBARS düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır. Alkol uygulaması, hücrel hasarın göstergelerinden biri olan karaciğer TBARS düzeylerini kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak arttırmıştır. Bütün tedavi gruplarında TBARS düzeyleri alkol grubuna kıyasla anlamlı olarak düşmüştür.

GSH, peroksitlerin, serbest radikallerin ve ROS'lerin neden olduğu hücrel hasara karşı koruma sağlayan bir antioksidandır. Yapısındaki tiol grupları indirgeyici ajanlardır. Glutasyon bir elektron donörü gibi davranarak, sitoplazmik proteinlerde oluşan disülfid bağlarını indirger, bu süreçte glutasyon okside formu olan okside glutatyona (GSSG) dönüşür (129).

Oksidatif strese düşmesi beklenen karaciğer GSH aktivitesinin bizim çalışmamızdaki düşüşü istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Bu sonucun, karaciğerde GSH'ın bol bulunması, bu nedenle alkol uygulamasının GSH'ı tüketmeye yetmemesinden kaynaklandığını düşünmekteyiz. GSH düzeyi bakımından antioksidan tedavileri anlamlı bir artış gösterememiştir.

MPO, nötrofillerin solunumsal patlama süresince  $Cl^-$  anyonu ve  $H_2O_2$ 'den HOCl (hipoklorik asit) oluşturur. Ayrıca  $H_2O_2$ 'yi okside edici ajan olarak kullanarak tirozini tirozil radikaline oksitleyerek, nötrofillerin HOCl ve tirozil radikalini kullanarak bakteri ve diğer patojenleri yok etmesine yardımcı olur.

MPO aktivitesinin karaciğer hasarında düşmesi beklenir. Bizim çalışmamızda alkol grubunun MPO aktivitesindeki düşme istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bunun nedeninin verilen alkol miktarının karaciğerdeki enzim aktivitelerini inhibe etmeye yeterli olmadığını ve alkol uygulamasının daha uzun süre yapılması gerektiğini düşünmekteyiz. Tedavi gruplarından resveratrol grubunun MPO aktivite düzeyleri alkol grubuna kıyasla anlamlı bir artış göstermiştir. Silimarin ve E vitamini gruplarında anlamlı bir artış bulunmamıştır.

Karaciğer doku kesitlerinin histopatolojik incelenmesi sonucunda kontrol grubunda vakuolizasyon gözlenmiştir. Bunun ratların besinlerinin yağ bakımından zengin olmasına bağlamaktayız. Alkolik grupta istatistiksel olarak anlamlı bir patoloji gözlenmemiştir. Resveratrol ve silimarin tedavisi ile patolojik hasarda iyileşme gözlenirse de bu iyileşme yine istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. E vitamini grubunda hasarın yüksek oluşunu, E vitamininin yağda çözüldükten sonra ratlara verilmesine bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

PON1 aktivitesinin karaciğer hasarına bağlı olarak azaldığı çalışmalarda gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda da literatüre uyumlu olarak alkol grubunda karaciğer PON1 aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşme saptanmıştır. Tedavi gruplarında en etkili artış resveratrol grubunda gözlenirse de bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER:

Kronik alkol tüketimine bağı karaciğer hasarının oksidatif stres ile bağlantılı olmasından yola çıkarak, güçlü antioksidanlar olan silimarin, resveratrol ve E vitamininin, alkol kullanımına bağı karaciğer doku hasarı üzerine etkilerini araştırdık.

Genel olarak antioksidan tedavisi verilen gruplarda iyileşme gözlenmiş olsa da, bu iyileşmelerin bir kısmı istatistiksel olarak anlam göstermemiştir.

Araştırmamızda kullanılan her üç antioksidan madde de hem serum AST ve TBARS hem de karaciğer TBARS düzeylerinde alkolik kontrol grubuna göre iyileşme sağlamıştır. İlave olarak resveratrolün karaciğer MPO düzeyleri üzerinde de iyileştirici etkiye sahip olduğu görülmüştür.

Her ne kadar üç antioksidanın da benzer etkilere sahip oldukları görölse de bu etkilerin derecelerinin ve doku örnekleri üzerindeki farklılıklarının etki türlerinin farklı olmasından kaynaklandığına inanmaktayız.

Sonuç olarak, alkolik karaciğer hasarına karşı koruyucu etkilerini kıyaslamaya çalıştığımız antioksidanlardan resveratrol, doku örneklerinde MPO ve PON1 bakımından daha güçlü iyileşme sağlarken, serum örneklerinde PON1 ve ALT bakımından diğerlerine göre daha güçlü iyileşme sağlamıştır. Silimarin, serum örneklerinde AST bakımından diğer antioksidanlara göre daha güçlü iyileşme sağlamıştır. E vitamini ise hem karaciğer hem de serum örneklerinde TBARS bakımından diğer antioksidanlara kıyasla daha güçlü iyileşme sağlamıştır.

Kronik alkol kullanımına bağı karaciğer hasarını önlemenin en iyi yolu alkolü bırakmak olsa da olası hasarları en aza indirgeyebilmek için bir çok alternatif tedavi yöntemine başvurulmaktadır. Bu yöntemlerden biri antioksidan destektir. Çalışmamızda kullandığımız resveratrol, silimarin ve E vitamininin, bol buldukları besinlerin tüketimi ya da ticari olarak mevcut sentetik formlarının kullanımı ile alkol kullanımına bağı karaciğer hasarını önlemeye yardımcı olabileceğini düşünmekteyiz.

**KAYNAKLAR:**

1. Artun, BC. (2008). Karnozin Uygulamasının Sıçanlarda Alkole Bağlı Karaciğer Hasarı Üzerine Etkisinin İncelenmesi. Yüksek lisans tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul.
2. Fırat, S. (2005). Alkole Bağlı Karaciğer Hasarının Önlenmesinde Sarımsak, Vitamin E ve Melatonin Etkilerinin Kıyaslanması. Uzmanlık tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya.
3. Aşıcıoğlu, YT. (2005). Sıçanlardaki Kronik Alkolik Karaciğer Hasarına Likopenin Etkisi. Uzmanlık tezi, Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul.
4. Uyar, ME. (2008). Deneysel Diyet Modeli İle Non Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı Oluşturulan Ratlarda Silymarinin Protpektif Etkilerinin Araştırılması. Uzmanlık tezi, Fatih Üniveristesi, İstanbul.
5. Keskin, N., Noyan, T., Kunter, B. (2009). Resveratrol ile Üzümden Gelen Sağlık. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 29(5), 1273-1279.
6. Gökpınar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E. ve ark. (2006). Algal Antioksidanlar. *EU Su Ürünleri Der*, 23, 85-89.
7. Pekiner, BD. (2003) Vitamin E as an antioxidant. *J. Fac. Pharm, Ankara*, 32, 243-267.
8. Burtis, A., Ashwood, ER. (2005). *Klinik Kimyada Temel İlkeler* (D.Aslan, Çev.). Ankara, Palme Yayınevi, 748-749.
9. Arthur, C., Guyton, MD. *Tıbbi Fizyoloji* ( Gökhan, N., Çavuşoğlu, H. Çev.) 1.nci Baskı, İstanbul, Merk Yayıncılık, 1204-1206.
10. Adam, B., Göker, Z., Ardıçoğlu, Y. *Temel & Klinik Biyokimya*. Ankara, Atlas Kitapçılık, 292-293.
11. Kaplan, LA., Pesce, JA., kazmiercza, SC. (2003). *Clinical Chemistry, Theory, Analysis, Correlations*. 493-497.
12. Mehra, RK., Bremner, I. (1985). Studies on the metabolism of rat liver copper-metallothionein. *Biochem. J* 227, 903-908.

13. <http://www.doctorslounge.com/primary/forums/backup/topic-32.html>  
(15.06.2011).
14. Sayal, A., Aydın, A. Ve diğerleri. (2005). *Gülhane Tıp Dergisi*, 47 (1), 14-17.
15. Özsu, YB. (2011). Alkol Nedir? Erişim: Temmuz 2011.  
<http://www.saglikyardim.com/hastaliklar/alkol-bagimliliği/170-alkol-nedir-.html>
16. Maher, JJ. (1997). Exploring Alcohol's Effects on Liver Function. *Alcohol Healt & Research World*, 21, 5-12.
17. Adachi, U., Moore, LE., Bradford, BU. ve diğerleri. (1995). Antibiotics to prevent liver injury in rats following long term exposure to ethanol. *Gastroenterology*, 108, 218-224.
18. Coşkunol, H., Altıntoprak, E. (1999). Alkol Kullanımının Genetik Yönleri. *Klinik Psikiyatri*, 2, 222-229.
19. İlter, T., Tekin, F. (2005). Alkol Metabolizması. *Güncel Gastroenteroloji*, 9, 58-62.
20. Sonsuz, A. (2004). Yağlı Karaciğer Hastalığı. *Gastroenterolojide Klinik Yaklaşım, Sempozyum Dizisi No: 38*, 171-180.
21. Sonsuz, A. (2002). Karaciğer Sirozunun Etyolojisi ve Patogenezi. *Hepato-Bilier Sistem ve Pankreas Hastalıkları Sempozyum Dizisi No: 28*, 87-91.
22. Fraschini, F., Demartini, G., Eposti, D. (2002). Pharmacology of silymarin. *Clin. Drug Invest*, 79, 313-316.
23. Morazzoni, P., Bombardelli, E. (1995). Silybum marianum (carduus marianus). *Fitoterapia*, 16, 3-42.
24. Bosisio, E., Benelli, C., Pirola, O. (1992). Effect of the flavanolignans of Silybum marianum L. on lipid peroxidation in rat liver microsomes and freshly isolated hepatocytes. *Pharmacol, Res*, 25, 147-54.
25. Sotoa, C., Recobaa, R., Barrona, H. Alvareza, C., Favarib, L. (2003). Silymarin increases antioxidant enzymes in alloxan-induced diabetes in rat pancreas. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 136, 205-212.

26. Wellington, K., Harvis, B. (2001). Silymarin: a review of its clinical properties in the management of hepatic disorders. *Biodrugs*, 15, 465–489.
27. Valenzuela, A., Garrido, A., (1994). Biochemical bases of the pharmacological action of the flavonoid silymarin and of its structural isomer silibinin. *Biol. Res.* 27, 105–112.
28. Murray, M., Pizzorno, J. (1991). *Encyclopedia of Natural Medicine*. (Rocklin, California: Prima Publishing, 82.
29. Grove, P. (1995). *Milk Thistle: A Remarkable Flavonoid Antioxidant And Liver Protectant*. Woodland Publishing Inc.
30. Alkan, R. (2006). Doğal Bitki Antibiyotiği: Resveratrol. *Gıda*, 32 (5), 259-262.
31. Langcake, P., Pryce, RJ. (1977). A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia*, 33, 151-152.
32. Creasy, LL., Creasy, MT. (1998). Grape chemistry and the significance of resveratrol: An over view. *Pharm Biol*, 36(1), 8-13.
33. Goldberg, DM., Ng, E., Yan, J., Karumanchiri, A., Soleas, GJ., Diamandis, EP. (1996). Regional differences in resveratrol isomer concentrations of wines from various cultivars. *Jof Wine Research*, 7(1), 13-24.
34. Karabulut, AB. (2008). Resveratrol ve Etkileri. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 28, 166-169.
35. Bavaresco, L., Vezzulli, S. (2006). Stilben phytoalexin physiology in grape vine (*Vitis* spp.) as affected by viticultural factors. *Drug Development from New Molecules*, 389-410.
36. Chen, RS., Wu, PL., Robin, YY. (2002). Peanut roots as a source of resveratrol. *J.Agric.Food.Chem*, 50, 1665-1667.
37. Dong, Z. (2003). Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol. *Mutat Res*, 523-524, 145-50.
38. Sovak, M. (2001) Grape Extract, Resveratrol, and Its Analogs: A Review. *J Med Food*, 4, 93-105.

39. Prokop, J., Abrman, P., Seligson, AL., Sovak, M. (2006). Resveratrol and its glycon piceid are stable polyphenols. *Journal of Medicinal Food*, 9 (1), 11-14.
40. Hoos, G., Blair, R. (1988). Metabolism of stilbene phytoalexins in grapevines: oxidation of resveratrol in single-cell cultures. *Vitis*, 27, 1-12.
41. Fregoni, C., Bavaresco, L., Contu, E. Ve diğerleri. (2000). Advances in understanding stilbene (resveratrol, e-viniferin) grapevine relationships. *V. International nSymposium on Grapevine Physiology, ISHS Acta Horticulture*, 526, 467-477.
42. Ector, BJ., Magee, JB., Hegwood, CP., Coign, MJ. (1996). Resveratrol concentration in muscadine berries, juice pomace, purees, seeds, and wines. *Amer J Enol. Vitic*, 47, 57-62.
43. Bavaresco, L., Cantu, E., Fregoni, M. and Trevisanz, M. (1997). Constitutive stilben contents of grapevine cluster stems as potential source of resveratrol in wine. *Vitis*, 36, 115-118.
44. Bavaresco, L., Fregoni, C. Trevisan, M. and Forunati, P. (2000). Effects of cluster stems on resveratrol content in wine. *Italian journal of Food Science*, 12(1), 103-108.
45. Jang, M, and Pezzuto, JM. (1997). Assessment of cyclooxygenase inhibitors using in vitro assay systems. *Meth. Cell Sci.* 19, 25-31.
46. Sardi, E., Korbuly, J., Kiralyne Veghely, ZS., Minsovics, E. (2000). Effect of different stresses on the resveratrol level in various parts of *Vitis* genotypes. *VII. International Symposium on Grapevine Genetics and Breeding ISHS Acta Horticulturae* 528, 597-603.
47. Moriarty, JM., Harmon, R., Leslie, AW., ve diğerleri. (2001). Resveratrol content of two Californian table grape cultivars. *Vitis* 40(1), 43-44.
48. Kanner, J., Frankel, E., Granit, R., German, B. and Kinsella, JE. (1994). Natural antioxidants in grapes and wines. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 64-69.
49. Kimura, Y., Okuda, H., Arichi, H. (1985). Effects of stilbens on arachidonate metabolism in leukocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 834, 275-278.
50. Melzoch, K., Hanzlikova, I., Filip, V., Buckiova, D., Smidrkal, J. (2001). Resveratrol in parts of vine and wine originating from Bohemian and

- Moravian vineyard regions. *Agriculture Conspectus Scientificus*, 66(1), 53-57.
51. Ector, BJ., Magee, JB., Hegwood, CP., Coign, MJ. (1996). Resveratrol concentration in muscadine berries, juice pomace, purees, seeds, and wines. *Amer. J. Enol. Vitic*, 47, 57-62.
  52. Belguendouz, L., Fremont, L., Gozzelino, MT. (1998). Interaction of transresveratrol with Plasma Lipoproteins. *Biochemical Pharmacology*, 55, 811-816.
  53. Kopp, P. (1998). Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. a possible explanation for the conundrum of the French Paradox? *European Journal of Endocrinology*, 138, 619-620.
  54. Cui, J., Juhasz, A., Maulik, N., Das, DK. (2002). Cardioprotection with grapes. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 40, 762-769.
  55. Falchetti, R., Fuggetta, MP., Lanzilli, G., Tricarico, M., Ravagnan, G. (2001). Effects of Resveratrol on Human Immune Cell Function. *Life Science*, 70, 81-96.
  56. Bradamante, S., Barenghi, L., Villa, A. (2004). Cardiovascular Protective Effects of Resveratrol. *Cardiovascular Drug Reviews*, 22, 169-188.
  57. Narayanan, BA., Narayanan, NK., Stoner, GD., Bullock, BP. (2002). Interactive gene expression pattern in prostate cancer cells exposed to phenolic antioxidants. *Life Sci*, 70(15), 1821-39.
  58. Soleas, GJ., Grass, L., Josephy, PD., ve diğeri. (2002). A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. *Clin Biochem*, 35 (2), 119-124.
  59. Gerogiannaki-Christopoulou, M., Athanasopoulos, P., Kyriakidis, N., Gerogiannaki, AI., Spanos, M. (2006). Trans-Resveratrol in wines from the major Greek red and white grape varieties. *Food Control*, 17 (9), 700-706.
  60. Fremont, L. (1999). Biological Effects of Resveratrol. *Life Sciences*, 66, 663-673.
  61. Belguendouz, L., Fremont L., Linard, A. (1997). *Biochem. Pharmacol.* 53, 1347- 1355.



62. Gescher1, AJ., Steward, WP. (2003). Relationship between Mechanisms, Bioavailability, and Preclinical Chemopreventive Efficacy of Resveratrol: A Conundrum. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 12, 953–957.
63. Yalçın, S. (2006). Kronik Alkol Kullanımında Protein Karbonil Düzeylerinin Belirlenmesi ve Diğer Biyogöstergelerle Birlikte Değerlendirilmesi. Yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.
64. McCord, JM., Fridowich I. (1969). Süperoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte. *J Biol Chem*, 224, 6049-6055.
65. Aydoğan, H. (2003). Melatonin'in sıçan dorsal random paternli cilt flebi yaşayabilirliği üzerine etkisi. Uzmanlık tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya.
66. Sun, Y., Oberley, LW., Elwell, JH. ve diğerleri. (1989). Antioxidant enzyme activities in normal and transformed Mouse liver cells. *Int J Cancer* 44, 1028-1033.
67. Seren, A., Kardeş, G. (1996). Antioksidan savunma sistemleri. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 27, 41-51.
68. Lucchesi, BR. (1990). Modulation of leukocyte-mediated myocardial reperfusion injury. *Ann Rev Physiol*, 52, 561-576.
69. Corr, PB., Sobel, BE. (1980). The role of biochemical factors in ventricular dysrhythmia accompanying ischemia. *Adv Cardiol*, 27,346-360.
70. Kılıç, E. (1999). Pinealektomi yapılmış sıçanda melatoninin beyin fokal iskemi-reperfüzyon hasarına etkileri. Uzmanlık tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya.
71. Davis, KL., Martin, E., Murad, F. (2001). Novel effects of nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 41, 203-36.
72. Demiryürek, T. (1999). İnflamasyonda Serbest Radikallerin Rolü. *Türk Farmakoloji Derneği, Eğitim Sempozyumları Programı Konuşma Özetleri*. Ankara Üniv. Tıp Fak. Ankara, 16-18.
73. Halliwell, B., Gutteridge JMC. (1989). Free radicals in biology and medicine. 2nd edition. Oxford, Clarendon Pres.

74. Harman, AW., Maxwell, MJ. (1995). An evaluation of the role of calcium in cell injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 35, 129-144.
75. Baskol, G., Köse, K. (2004). Paraoksonaz: Biyokimyasal özellikleri, fonksiyonları ve klinik önemi. *Erciyes Tıp Dergisi*, 26, 75-80.
76. Primo-Parma, SL, Sorenson, RC, Teiber, J, La Du BN. (1996). The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of multigene family. *Genomics*, 33, 498-509.
77. Mackness, MI., Mackness, B., Durrington, PN., Connelly, PW., Hegele, RA. (1996). Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr Opin Lipidol*. 7, 69-76.
78. Ekmekçi, ÖB., Donma, O., Ekmekçi, H. (2004). Paraoksonaz. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 35, 78-82.
79. McElveen, J., Mackness, MI., Colley, CM., Peard, T., Warner, S., Walker CH. (1986). Distribution of paraoxon hydrolytic activity in the serum of patients after myocardial infarction. *Clin Chem*, 32, 671-3.
80. Mackness, B., Durrington, PN., Mackness, MI. (1998). Human serum Paraoxonase. *Gen Pharm*, 3, 329-36.
81. Gan, N., Smolen, A., Eckerson, W., La Du, BN. (1991). Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities. *Drug Metab Dispos*, 19, 100-106.
82. Aviram, M., Hardak, E., Vay, J., Mahmood, S., Milo, S., ve diğerleri. (2000). Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions. *Circulation*, 101, 2510-17.
83. La Du, BN., Aviram, M., Billecke, S., Navab, M. (1999). On the physical role(s) of the paraoxonases. *Chem -Biol Inter*, 119-120, 379-88.
84. Hegele, RA. (1999). Paraoxonase genes and disease. *Ann Med*, 31, 217-224.
85. Kasprzak, M., Iskra, M., Majewski, W., Wielkoszyński, T. (2009). Arylesterase and paraoxonase activity of paraoxonase (PON1) affected by ischemia in the plasma of patients with arterial occlusion of the lower limbs. *Clinical Biochemistry*, 42, 50-56.

86. Ng, C., Shih, D., Hama, S., ve diğerleri. (2005). The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radical Biol Med*, 38, 153–63.
87. Eckerson, HW., Romson, J., Wyte, C., La Du, BN. (1983). The Human serum paraoxonase polymorphism: Identification of phenotypes by their response to salts. *Am J Hum Genet*, 35, 214-227.
88. Öztürk, H. (2008). Diabetes Mellitus’da Paraoksonaz Aktivitesi ve Aopp Düzeyleri. Uzmanlık tezi, Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul.
89. Watson, AD., Berliner, JA., Hama, SY., ve diğerleri. (1995). Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidised low density lipoprotein. *J Clin Invest*, 96, 2882-2891.
90. La Du, BN. (1996). Structural and functional diversity of paraoxonases, *Nat Med*, 2, 1186-1187.
91. Aviram, M., Hardak, E., Vay, J., ve diğerleri. (2000). Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions. *Circulation*, 101, 2510-17.
92. Nelson, DL., Cox, MM. (2000). *Lehninger principles of Biochemistry 3rd edn*. Lipid Biosynthesis. ch 21. Worth Publishers, New York, 770-817.
93. Lau, D., Baldus, S. (2006). Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacology & Therapeutics*, 111, 16-26.
94. Furtmüller, GP., Zederbauer, M., Jantschko, W., Helm, J., Bogner, M., Jakopitsch, C., Obinger, C. (2006). Active site structure and catalytic mechanisms of humanperoxidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 445, 199-213.
95. Arnhold, J. (2004). Properties, Functions, and Secretion of Human Myeloperoxidase. *Biochemistry (Moscow)*, 69, 4-9.
96. Uzbay, İT., Kayaalp, SO. (1995). A modified liquid diet of chronic ethanol administration: Validation by ethanol withdrawal syndrome in rats. *Pharmacological Research*, 31, 37-42.
97. Zeng, T., Guo, FF., Zhang, CL. ve diğerleri. (2008). The anti-fatty liver effects of garlic oil on acute ethanol-exposed mice. *Chemico-Biological Interactions*, 176, 234–242

98. Marier, JF., Vachon, P., Gritsas, Ari. ve diğeri. (2002). Metabolism and disposition of resveratrol in rats: extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 302, 369-373.
99. Özpamukçu, İ. (2005). Farelerde Metotreksat'ın İnce Bağırsak Mukozası Üzerine Yaptığı Harabiyete E Vitamininin Etkisi. Yüksek lisans tezi, Gaziantep Üniversitesi, Gaziantep.
100. Ulutaş, H. (2008). Akut Akciğer Travmalarında Melatonin ve Dekametazon'un Ratlar Üzerindeki Etkileri. Uzmanlık tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya.
101. Buege, JA., Aust, SD. (1970). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, 52, 302-310.
102. Ellman, G. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, 82, 52-155.
103. Güvenen, G. (2008). Atorvastatin Kullanan Dislipidemi Hastalarında Tedavi Öncesi ve 3 Ay Sonrası Serum PON1 ve Okside LDL Düzeyleri. Uzmanlık tezi, Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul.
104. Yagi, K. (1984). Assay for blood plasma or serum. *Methods in Enzymology*, 105, 328-337.
105. Eşrefoğlu M., Gül M., Ateş B., ve ark. (2006). Antioxidative effect of melatonin, ascorbic acid and N-acetylcystein on caerulein-induced pancreatitis and associated liver injury in rats. *World J Gastroenterol*, 14, 259-264.
106. Artun, BC: (2008). Karnozin Uygulamasının sıçanlarda Alkole Bağlı Karaciğer Hasarı Üzerine Etkisinin İncelenmesi. Yüksek lisans tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul.
107. Erçin, CN. (1999). Kronik Viral Hepatitlerde ve Alkolik Karaciğer Hastalığında Antioksidan Enzim ve Esansiyel Element Düzeyleri. Uzmanlık tezi, Gülhane askeri Tıp Akademisi, İstanbul.
108. Aksoy, A. (2007). Alkolik sıçan Karaciğeri Üzerine Karvakolün Etkisi. Yüksek lisans tezi, Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir.

109. Türkay, C. (2008). Deneysel Diyet Modeli ile Non Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı Oluşturulan Ratlarda Silymarinin Protaktif Etkilerinin Araştırılması. Uzmanlık tezi, Fatih Üniversitesi, İstanbul.
110. Sonnebichler, J., ve diğerleri. (1986). Stimulatory effect of silibinin on the DNA synthesis in partially hepatectomized rat livers: Non-response in hepatoma and other malignant cell lines. *Biochem Pharm*, 35, 538-541.
111. Antweiler, H.(1980). Effects of silymarin on intoxication with ethionine and ethanol. *In Braatz and Schneider*, 80-82.
112. Bayramoğlu, G. (2007). Sıçanlarda Siklofosamid ile Oluşturulmuş Oksidatif Strese Karşı Silimarinin Olası Koruyucu Etkileri. Doktora tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir.
113. Ramakrishnan, G., Raghavendran, HRB., Vinodhkumar, R., Devaki, T., (2006). Suppression of N-nitrodiethylamine induced hepatocarcinogenesis by silymarin in rats. *Chemico-Biological Interactions*, 161, 104-114.
114. Muzec, G. (1991). The Effects of the Bioflavonoid Silymarin on the In Vitro Activity and Expression of Superoxide Dismutase (SOD). *Acta Physiol*, 78-85.
115. Braatz, R. (1976). The effect of silymarin on intoxication with ethionine and ethanol. *Braatz and Schneider*, 31-36.
116. Pietrangelo, A., Borella, F., Casalgrandi, G., ve diğerleri. (1995). Antioxidant activity of silybin in vivo during long-term iron overload in rats. *Gastroenterology*, 109, 1941-1949.
117. Asensi, M., Medina, I., Ortega, A., Carretero, J., ve diğerleri. (2002). Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability. *Free Radic. Biol. Med.*, 33, 387-398.
118. Kasdallah-Grissa, A., Mornagui, B., Aouani, E. ve diğerleri. (2006). Protective effect of resveratrol on ethanol-induced lipid peroxidation in rats. *Alcohol & Alcoholism*, 41, 236-239.
119. Katırcıoğlu, FE. (2007). Uzun Süre Resveratrol ile Beslenmiş Sıçanların Karaciğer, Akciğer, Böbrek ve Kalp Dokularında Resveratrol Miktarının Belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara.

120. Durrington, PN., Mackness, B., Mackness, MI. (2001). Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21, 474–80.
121. Banka, CL. (1996). High density lipoprotein and lipoprotein oxidation. *Curr Opin Lipidol*, 7, 139–42.
122. Aviram, M., Billecke, S., Sorenson, R., et al. (1998). Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18, 1617–24.
123. Marsillach, J., Ferre, N., Vila, MC., ve diğerleri. (2007). Serum paraoxonase-1 in chronic alcoholics: Relationship with liver disease. *Clinical Biochemistry*, 40, 645–650.
124. Cao, H., Girard-Globa, A., Berthezene, F., Moulin, P. (1999). Paraoxonase protection of LDL against peroxidation is independent of its esterase activity towards paraoxone and is unaffected by the Q/R genetic polymorphism. *J Lipid Res*, 40, 133–9.
125. Kilic, SS., Aydın, S., Kilic, N., Erman, F., Aydın, S., Celik, I. (2005). Serum arylesterase and paraoxonase activity in patients with chronic hepatitis. *World J Gastroenterol*, 11(46), 7351–4.
126. Himmelfarb, J., McMonagle, E., McMenamin, E. (2000). Plasma protein thiol oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure. *Kidney Int*, 58, 2571–8.
127. Sabesin, SM., Hawkins, HL., Kuiken, L., Ragland, JB. (1997). Abnormal plasma lipoproteins and lecithin-cholesterol acyltransferase deficiency in alcoholic liver disease. *Gastroenterology*, 72, 418–510.
128. Ferre, N., Marsillach, J., Camps, J., et al. (2006). Paraoxonase-1 is associated with oxidative stress, fibrosis and FAS expression in chronic liver diseases. *J Hepatol*, 45, 51–9.
129. Pastore, A., Piemonte, F., Locatelli, M., ve diğerleri. (2003). Determination of blood total, reduced, and oxidized glutathione in pediatric subjects. *Clinical Chemistry*, 47 (8), 1467–9.









**İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI**

Toplantı Tarihi : 08.06.2009  
Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya  
Araştırma Protokol No.su :2009/08

Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerinden Doç.Dr. İsmail TEMEL'in yürütücüsü olduğu "**Alkolik ratlarda, silimarin, resveratrol ve E vitamininin hepatoprotektif özelliklerinin kıyaslanması**" isimli 2009/08 Protokol no'lu çalışmanın dosyası incelendi.

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi bir etik sakınca bulunmadığına oy birliği ile karar verildi.

|   |   |  |
|---|---|--|
| Prof.Dr.Yusuf TÜRKÖZ<br>Başkan<br> | Doç.Dr.Nigar VARDI<br>Başkan Yard.<br> | Doç.Dr. Yunus KARAKOÇ<br>Raportör<br> |
| Doç.Dr. Ahmet KIZILAY<br>Üye<br>   | Doç.Dr.Cüneyt KAYAALP<br>Üye<br>katılmadı   | Yrd.Doç.Dr.M.Arif ALADAĞ<br>Üye<br>   |
| M.Zafer BOZDAĞ<br>Üye<br>          | Bekir ÜNAL<br>Sivil Üye<br>katılmadı  | Zafer KIRÇUVAL<br>Sivil Toplum Örgütü Üyesi<br>katılmadı   |

**ÖZGEÇMİŞ:**

1979 yılında Malatya'da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Malatya'da tamamladım. 1996 yılında Malatya Anadolu Lisesi'nden mezun oldum. 1997 yılında Dokuz Eylül Üniversitesi Buca Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği Bölümü'nü kazandım 2001 yılında mezun oldum. 2003 yılında İnönü Üniversitesi Eğitim Fakültesi Kimya Bölümüne Araştırma Görevlisi olarak atandım. 2003-2005 yılları arasında İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimimi tamamladım. 2005 yılından itibaren aynı anabilim dalında doktoramı yapmaya devam etmekteyim.