

T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RATLARDA TİYOASETAMİDLE  
İNDÜKLENEN KARACİĞER HASARINA  
KARŞI NİGELLA SATİVA (ÇÖREK OTU)  
YAĞININ ETKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KEVSER TANBEK  
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİMDALI**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Elif ÖZEROL**

**MALATYA-2011**

**T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RATLARDA TİYOASETAMİDLE  
İNDÜKLENEN KARACİĞER HASARINA  
KARŞI NİGELLA SATİVA (ÇÖREK OTU)  
YAĞININ ETKİSİ**

**KEVSER TANBEK**

**Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Elif ÖZEROL**

**Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi  
tarafından 2010/64 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**MALATYA-2011**

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

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

Jüri Başkanı

Prof. Dr. İsmail TEMEL

İmza

Danışman

Prof. Dr. Efil ÖZEROL

Üye

Yrd. Doç. Dr. Ahmet ÇİĞLİ

ONAY :

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu...../...../2011 tarih ve 2011/.....sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ali OTLU  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜRLER

Yüksek lisans tez çalışmamın her aşamasında yardım ve tecrübelerini benden esirgmeden yol gösteren danışmanım Prof. Dr. Elif ÖZEROL'a ve manevi desteklerinden dolayı değerli AİLEM'e sonsuz teşekkür ederim.

Çalışmamızın cerrahi aşamasındaki desteklerinden dolayı Doç. Dr. Mustafa IRAZ'a, laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan doktora öğrencisi Sedat BİLGİÇ'e, histopatolojik incelemelerde yardımcı olan Uzm.Dr. Nurhan Şahin'e ve istatistik analizler için Yrd.Doç.Dr. Cemil Çolak'a teşekkürler ederim.

Bu çalışmaya maddi destek sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkürler.



## ÖZET

Tiyoasetamid (TAA) deneysel araştırmalarda sıkça kullanılan bir hepatotoksindir. Birçok araştırmacı tek dozunun sentrolobüler karaciğer hasarına neden olabildiğini ve kronik uygulanmasının sirozla sonuçlandığını rapor etmiştir. TAA'ın hepatotoksisite mekanizması tam olarak bilinmemesine rağmen TAA serbest radikal reaksiyonlarını arttırarak hasar oluşturduğu ve prooksidan /antioksidan dengesinin akut TAA uygulamasından etkilendiği ileri sürülmüştür.

Nigella sativa (NS)'nin antioksidan ve antiinflamatuvar etkisinin olduğu değişik çalışmalarında gösterilmiştir. NS yağı aromatik yağlar, eser elementler vitaminler ve enzimler gibi yüz üzerinde bileşen içeriği nedeniyle çok faydalıdır.

Bu çalışmanın amacı ratlarda tiyoasetamidle indüklenmiş karaciğer hasarına karşı çörek otu yağının muhtemel koruyucu etkisini araştırmaktır.

Çalışmada 12 haftalık ve 200-250 g ağırlığındaki 41 Wistar Albino erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar 5 gruba ayrıldı; grup 1(n:7) kontrol; grup 2(n:9), TAA (300 mg/kg/gün (i.p.); grup 3(n:9), 1ml/kg/gün NSY+ TAA; grup 4(n:8), 10ml/kg/gün NSY+ TAA; group 5(n:8), N-Asetil sistein(NAC) (50 ml/kg/gün) + TAA. Tüm ratlar 6. günün sonunda kan ve karaciğer dokuları alındıktan sonra sakrifiye edildi.

Sıçanlarda alınan karaciğer dokusunun bir kısmı histopatolojik incelemeler için %10 luk formaldehitte saklandı. Katalaz (CAT), süperoksitdismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), miyeloperoksidaz (MPO) aktiviteleri malondialdehid (MDA) ,hidroksiprolin ve protein karbonil seviyeleri karaciğer dokusunda analiz edildi. AST, ALT, GGT, ALP aktiviteleri kolestrol ve total bilirubin miktarları plazmada analiz edildi

Hasara maruz kalan sıçanların karaciğer dokusunda lipid peroksidasyonu göstergesi olan MDA içeriği ile antioksidan savunma sistemlerinden olan CAT ve GSH-Px enzim aktivitelerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir fark gözlenmezken NSY'nin SOD, PC ve MPO düzeyleri üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu açık bir şekilde görülmektedir.

Histopatolojik bulgular NSY' nin TAA ile indüklenen karaciğer sirozunun oluşumunu inhibe ettiğini göstermiştir.

TAA toksisitesine karşı NSY uygulanmasıyla, serbest radikallerin temizlenmesi, antioksidan aktivitenin artışı ve protein karbonil gruplarının

oluşumunun kısmen engellenmesi sağlanarak NSY'nin karaciğer hücre hasarının engellenmesinde katkısı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca karaciğer dokularında TAA uygulanan gruba verilen NSY, NAC tedavisi ile oksidan /antioksidan dengeyi tamamen aynı olmasa da hemen hemen paralel bir şekilde olumlu yönde değiştirmiş ve protein karbonil gruplarının oluşumunu engellemiştir. Böylece NSY'nin sıçanlarda NAC tedavisinde olduğu gibi antioksidan bir etkiye sahip olduğu, TAA'in oluşturduğu hasarı kısmende olsa geriletmediği ve koruyucu etkide bulunduğu söylenebilir.

**Anahtar kelimeler;** Karaciğer, N-Asetilsistein (NAC ) , Nigella Sativa Yağı (NSY), Tiyoasetamid (TAA),

**ABSTRACT**  
**EFFECT OF NIGELLA SATIVA OIL DAMAGE ON THIOASETAMIDE-  
INDUCED RATS HEPATOSIT**

Thioacetamide (TAA) is a hepatotoxin frequently used for experimental purposes. Several investigators have reported that a single dose of this hepatotoxic agent could produce centrilobular hepatic necrosis and that chronic administration led to cirrhosis. Although the mechanism of TAA hepatotoxicity is not clear, some investigators have suggested that TAA hepatotoxicity may be due to free radical – induced reactions and prooxidant-antioxidant balance in TAA-induced liver cirrhosis was concerned.

*Nigella sativa* (NS) has been shown to have antioxidant and antiinflammatory activities in different conditions. The oil of NS (NSO) is so beneficial due to its content of over a hundred components such as aromatic oils, trace elements, vitamins, and enzymes.

The aim of this study was focused on investigating the possible protective effect of NSO against TAA-induced liver injury in rats.

Fourty one male Wistar-albino rats ,(12 weeks old) weighing around 200–250 g, were divided into five equal groups as follows:group1(n:7) kontrol; group 2(n:9), TAA (300 mg/kg/day i.p.); group 3(n:9), 1ml/kg/day NSO+ TAA; group 4(n:8), 10ml/kg/day NSO+ TAA; group 5(n:8), N-Asetil sistein (NAC) (50 ml/kg/day i.p.) + TAA . On treatment day 6,all rats were humanely killed then blood and liver tissues were removed.

A sample of removed liver tissue was kept in 10% formalin for histopathological analysis. Catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), myeloperoxidase (MPO) activities and malondialdehyde (MDA),hidroksi proline, protein carbonyl (PC) levels were determined in liver tissue. Gamma glutamyl transferase (GGT), alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and activities and total bilirubin, cholesterol were determined in plasma.

Histopathological findings also suggested that NSO has an inhibitive effect on TAA-induced hepatic cirrhosis.

On liver tissue of rats, which exposed to damage, while an indicator of lipid peroxidation MDA content and antioxidant defense systems, the CAT and GSH-Px

enzyme not a significant difference compared with control group, NSO had a significant impact on the SOD activities, PC and MPO levels.

The prevention of NSO has been shown to contribute to liver cell damage with implementation of NSO against the TAA toxicity, removal of free radicals, increase antioxidant activity and partly prevented by ensuring the formation of protein carbonyl groups. In addition, the liver tissues of the group received TAA NSO, NAC treatment of oxidant / antioxidant balance, but not exactly the same positive direction, have changed almost in parallel, and inhibited the formation of protein carbonyl groups. Thus, can be said that NSO has an antioxidant effect as in the treatment of NAC in rats, at least in part reversed and protective effect of TAA the injury.

**Key words;** Liver, N-acetylcysteine (NAC) , Nigella Sativa Oil (NSO), Thioacetamide (TAA)

**İÇİNDEKİLER**

|  | SAYFA |
|--|-------|
| ONAY SAYFASI   | iii   |
| TEŞEKKÜRLER  | iv    |
| ÖZET   | v     |
| ABSTRACT   | vii   |
| İÇİNDEKİLER  | ix    |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ                                 | xiii  |
| ŞEKİLLER DİZİNİ  | xvi   |
| TABLolar DİZİNİ  | xvii  |
| 1.GİRİŞ  | 1     |
| 2.GENEL BİLGİLER   | 2     |
| 2.1. Karaciğerin Yapı ve Fonksiyonları                         | 2     |
| 2.1.1. Karaciğerin Anatomisi                                   | 2     |
| 2.1.2. Fonksiyonel Anatomi                                     | 3     |
| 2.1.3. Sıçan Karaciğerinin Anatomisi                           | 4     |
| 2.1.4. Karaciğerin Histolojisi                                 | 5     |
| 2.1.5. Hepatositler  | 7     |
| 2.1.6. Karaciğerin Fizyolojisi                                 | 9     |
| 2.2.Tiyoasetamid   | 12    |
| 2.2.1. TAA ‘nın fiziksel ve kimyasal özellikleri               | 14    |
| 2.2.2. TAA ‘nın Metabolizma Yol Haritası                       | 15    |
| 2.3. N-Asetilsistein   | 17    |
| 2.3.1. Farmakodinamik özellikler                               | 17    |
| 2.3.2. Farmakokinetik özellikler                               | 18    |
| 2.3.3. Endikasyonları  | 18    |
| 2.4. Nigella Sativa  | 19    |
| 2.4.1. Nigella Sativa Tohum Yağının Yağ Asidi Analiz Sonuçları | 22    |
| 2.5. Serbest Radikaller  | 23    |
| 2.5.1. Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri                 | 24    |
| 2.5.2. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri               | 25    |

|   |    |
|---|----|
| 2.5.3. Serbest Radikallerin Nükleik Asitlere Etkileri | 26 |
| 2.5.4. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri | 26 |
| 2.6. Antioksidanlar                                   | 26 |
| 2.6.1. Süperoksit Dismütaz (SOD)                      | 28 |
| 2.6.2. Katalaz  | 28 |
| 2.6.3. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)                  | 28 |
| 2.6.4. Glutatyon Redüktaz                             | 29 |
| 2.6.5. Glutatyon S-Transferazlar (GST)                | 29 |
| 2.6.6. Mitokondriyal sitokrom oksidaz                 | 30 |
| 2.6.7. Vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol)               | 30 |
| 2.6.8. Vitamin C (askorbik asit)                      | 31 |
| 2.6.9. Karotenoidler                                  | 32 |
| 2.6.10. Glutatyon (GSH)                               | 32 |
| 2.6.11. Melatonin                                     | 33 |
| 2.6.12. Ürat  | 33 |
| 2.6.13. Bilirubin                                     | 33 |
| 2.6.14. Albümin                                       | 33 |
| 2.6.15. Seruloplazmin                                 | 33 |
| 2.6.16. Transferrin ve Laktoferrin                    | 33 |
| 2.6.17. Ferritin                                      | 34 |
| 2.6.18. Sistein                                       | 34 |
| 2.6.19. Ebselen                                       | 34 |
| 2.6.20. Sitokinler.                                   | 34 |
| 2.6.21. Demir şelatörleri                             | 34 |
| 2.6.22. Desferroksamin                                | 34 |
| 2.6.23. Oksipürinol                                   | 34 |
| 2.6.24. Mannitol                                      | 34 |
| 2.6.25. Probukol                                      | 34 |
| 2.7. Oksidatif Stres                                  | 34 |
| 2.7.1. Oksidatif Stres Parametreleri                  | 35 |
| 2.7.1.1. Nitrik Oksit (NO)                            | 35 |
| 2.7.1.2. Malondialdehid (MDA)                         | 36 |
| 2.7.1.3. Protein karbonil (PCO)                       | 37 |

|  |    |
|--|----|
| 2.7.2. Antioksidan aktivitenin ölçülmesi                                   | 39 |
| 2.8. Biyokimyasal Parametreler   | 40 |
| 2.8.1. Aspartat Aminotransferaz (AST, SGOT)                                | 40 |
| 2.8.2. Alanin Aminotransferaz (ALT, SGPT)                                  | 40 |
| 2.8.3. Alkalen Fosfataz (ALP)  | 41 |
| 2.8.4. Gama-Glutamil Transferaz (GGT)                                      | 41 |
| 2.8.5. Bilirubin   | 42 |
| 2.8.6. Kolesterol  | 42 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER  | 44 |
| 3.1. Deney Hayvanlarının Temini  | 44 |
| 3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması                                       | 44 |
| 3.3. NAC, TAA VE NSY Uygulaması  | 44 |
| 3.4. Kan ve Karaciğer Dokularının Elde Edilmesi ve Analizlere Hazırlanması | 45 |
| 3.5. Kan ve karaciğer dokularının analizlere hazırlanması.                 | 45 |
| 3.6. Karaciğer dokusunda yapılan analizler                                 | 46 |
| 3.6.1. Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivite tayini                     | 46 |
| 3.6.2. Katalaz (CAT) enzim aktivite tayini                                 | 47 |
| 3.6.3. Glutatyon-peroksidaz (GSH-Px ) enzim aktivite tayini                | 48 |
| 3.6.4. Miyeloperoksidaz (MPO) enzim aktivite tayini                        | 49 |
| 3.6.5. Tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri (TBARS) miktarının tayini     | 50 |
| 3.6.6. Protein karbonil (PC) tayini  | 51 |
| 3.6.7. Doku homojenat, süpernatant ve ekstraktlarında protein tayini       | 51 |
| 3.6.8. Hidroksiprolin tayini   | 52 |
| 3.7. Serumda Kolesterol, Total Bilirubin, AST, ALT, ALP, GGT Tayini        | 53 |
| 3.8. Patolojik Değerlendirme   | 54 |
| 3.9. İstatistiksel analizler   | 54 |
| 3.10. Kullanılan Aletler   | 54 |
| 4. BULGULAR  | 55 |
| 4.1. Sıçanların Karaciğer Dokularında CAT Aktivitesi                       | 59 |
| 4.2. Sıçanların Karaciğer Dokularında GSH-Px Aktivitesi                    | 59 |
| 4.3. Sıçanların Karaciğer Dokularında SOD Aktivitesi                       | 59 |
| 4.4. Sıçanların Karaciğer Dokularında TBARS Seviyesi                       | 59 |
| 4.5. Sıçanların Karaciğer Dokularında Protein Karbonil Seviyesi            | 60 |

|  |    |
|--|----|
| 4.6. Plazmada T.BİL. ve KOL., Seviyesi                   | 60 |
| 4.7. Plazmada ALT, AST, ALP, GGT Seviyesi                | 61 |
| 4.8. Sıçanların Karaciğer Dokularında MPO Aktivitesi     | 61 |
| 4.9. Sıçanların Karaciğer Dokularında OH-Prolin Seviyesi | 62 |
| 4.10. Karaciğer Dokusunda Histopatolojik Bulgular        | 62 |
| 5. TARTIŞMA  | 66 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER                                     | 74 |
| 7.KAYNAKLAR  | 77 |
| EK-1 :Nigella sativa yağının analiz sonucu               | 91 |
| EK-2 :Deney Hayvanları Etik Kurul Kararı                 | 92 |
| 8.ÖZGEÇMİŞ   | 93 |



### SİMGELER VE KISALTMALAR

|                      |  |
|----------------------|--|
| TAA                  | : Tiyoasetamid                           |
| NS                   | : Nigella Sativa                         |
| NSY                  | : Nigella Sativa Yağı                    |
| NSO                  | : Nigella Sativa Oil                     |
| PAS                  | : Periyodik asit-Schiff                  |
| CYP                  | : Sitokrom                               |
| CCl <sub>4</sub>     | : Karbon Tetraklorür                     |
| CCl <sub>3</sub> ·   | : Triklorometil radikali                 |
| CCl <sub>3</sub> OO· | : Triklorometilperoksil                  |
| ÇDDL                 | : Çok Düşük Dansiteli Lipoorotein (VLDL) |
| DDL                  | : Düşük Dansiteli Lipoprotein (LDL)      |
| YDL                  | : Yüksek Dansiteli Lipoprotein (HDL)     |
| RBP                  | : Retinol Bağlayıcı Protein              |
| GH                   | : Büyüme Hormonu                         |
| GHRF                 | : Büyüme Hormonu Salgılatıcı Hormon      |
| TASO                 | : Tiyoasetamid sülfoksit                 |
| TASO <sub>2</sub>    | : Tiyoasetamid S,S-dioksit               |
| LOO·                 | : Lipid peroksit radikalleri             |
| NAC                  | : N-Asetilsistein                        |
| SH                   | : Sülfidril                              |
| ATP                  | : Adenozin trifosfat                     |
| NADP                 | : Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat  |
| DNA                  | : Deoksiribonükleik asit                 |
| TNF                  | : Tümör Nekroz Faktörü                   |
| IL-6                 | : Interlökin 6                           |
| AIDS                 | : Acquired Immuno Deficiency Syndrome    |
| 2O <sub>2</sub> ·    | : Süperoksit anyonu                      |

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| O <sub>3</sub>                | : Ozon                                   |
| O <sub>2</sub>                | : Singlet oksijen                        |
| HO·                           | : Hidroksil radikali                     |
| HO <sub>2</sub> ·             | : Hidroperoksil                          |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | : Hidrojen peroksit                      |
| HOCl                          | : Hipoklorik asit                        |
| NO·                           | : Nitrik oksit                           |
| RO·                           | : Alkoksil                               |
| ROO·                          | : Peroksil radikali                      |
| RCOs                          | : Karbonil bileşikleri                   |
| SOR                           | : Serbest oksijen radikalleri            |
| ROS                           | : Reaktif oksijen türleri                |
| MDA                           | : Malondialdehid                         |
| PC                            | : Protein karbonil                       |
| SOD                           | : Süperoksit dismütaz                    |
| CAT                           | : Katalaz                                |
| XO                            | : Ksantin oksidaz                        |
| GSH-Px                        | : Glutatyon Peroksidaz                   |
| GSH                           | : Glutatyon                              |
| GSSG                          | : Okside glutatyon                       |
| EDRF                          | : Endotel Derived Relaxing Factor        |
| i.p.                          | : İntraperitonel                         |
| SF                            | : Serum fizyolojik                       |
| HCl                           | : Hidroklorik asit                       |
| GC                            | : Gaz kromatografisi                     |
| MS                            | : Kütle spektrometrisi                   |
| EDTA                          | : Etilen diamin tetra asetik asit        |
| ELİSA                         | : Enzyme-linked immunosorbent assay      |
| HPLC                          | : High-performance liquid chromatography |
| FCF                           | : Folin-Ciocalteu-Fenol                  |
| TBARS                         | : Tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri  |
| TCA                           | : Triklorasetik asit                     |
| TBA                           | : Tiobarbitürik asit                     |

|      |   |
|------|---|
| NBT  | : Nitroblue tetrazolium                                     |
| OH-P | : Hidroksi prolin   |
| OD   | : Optik dansite   |
| PBS  | : Phosphate buffer saline                                   |
| DAB  | : 3,3 Diaminobenzidin                                       |
| H&E  | : Hematoksilin & Eozin                                      |
| EC   | : Enzyme Commission -Enzim Komisyonu                        |
| AST  | : Aspartat amino Transferaz                                 |
| ALT  | : Alanin amino Transferaz                                   |
| ALP  | : Alkalen Fosfataz  |
| GGT  | : Gama-Glutamil Transferaz                                  |
| PUFA | : Polyunsaturated Fatty Acids (Çoklu Doymamış Yağ Asitleri) |

**ŞEKİLLER**

|  | SAYFA |
|--|-------|
| Şekil 2.1 : Karaciğerin anterior and posterior görünümü  | 2     |
| Şekil 2.2 : Karaciğer loblarının şematik görünümü  | 3     |
| Şekil 2.3 : Rat Karaciğeri   | 5     |
| Şekil 2.4 : Normal karaciğerin şematik diyagramı   | 6     |
| Formül 2.1 : N-Asetilsisteinin Açık Formülü  | 17    |
| Formül 2.2 : $\alpha$ -Tokoferolün Açık Formülü  | 30    |
| Formül 2.3 : Askorbik Asit Açık Formülü  | 32    |
| Formül 2.4 : Kolesterol'ün Açık Formülü  | 43    |
| Resim 4.1 : Kontrol grubunda perivenüler kollajen belirginliği   | 63    |
| Resim 4.2 : TAA grubunda sentrosentral köprüleşme ve kısmi nodül oluşumu                               | 63    |
| Resim 4.3 : 1ml/kg/gün NSY+TAA grubunda kısmi nodül oluşumu  | 64    |
| Resim 4.4 : 10ml/kg/gün NSY+TAA grubunda perisentral kollajen kalınlaşması<br>ve kısmi nodül oluşumu   | 64    |
| Resim 4.5 : N-Asetil sistein +TAA grubunda perisentral kollajen kalınlaşması<br>ve kısmi nodül oluşumu | 65    |

## TABLOLAR

|   | Sayfa |
|---|-------|
| Tablo 2. 1: TAA'nın fiziksel ve kimyasal özellikleri  | 14    |
| Tablo 2.2 : Timokinin'in fiziksel ve kimyasal özellikleri Karaciğer dokusunda   | 21    |
| Tablo 2.3 : Çörek Otu Yağı'nın gaz kromatografisi ile yağ asidi içeriği   | 22    |
| Tablo 4.1 : Kontrol ve deney gruplarında normal dağılım gösteren KOL. CAT ve OH-prolin parametrelerin İstatistik verileri | 55    |
| Tablo 4.2 : Kontrol ve deney gruplarında normal dağılım gösteren ALT, AST , ALP parametrelerin İstatistik verileri        |       |
| Tablo 4.3 : Normal dağılım göstermeyen TB, TBARS, PC, değişkenlerin İstatistik verileri                                   | 57    |
| Tablo 4.4 : Normal dağılım göstermeyen GGT, GSH-Px, MPO,SOD değişkenlerin İstatistik verileri                             | 58    |
| Tablo 4.5 : Kontrol ve deney gruplarının patolojik skor tablosu   | 62    |
| Grafik 1 : Doku SOD (U/mg prot) aktiviteleri  | 59    |
| Grafik 2 : Doku PC (nmol/mg prot) miktarı   | 60    |
| Grafik 3 : Doku MPO (mU/g prot) aktiviteleri  | 62    |

## 1.GİRİŞ

Türkçesi çörek otu olan *Nigella sativa* (NS) Ortadoğu ülkeleri arasında birçok derdin dermanı olduğu için “Habbat Al Barakah” ya da “Kutsanmış Tohum” olarak bilinir. Çörek otu bir yıllık otsu bir bitkidir, tohumlarından çoğalır. Tohumları haşhaş bitkisinde olduğu gibi kozalak (kapsül) içerisinde olgunlaşır. Tohumları 2–3 mm boyunda üç yüzeyle mat olmayan siyah renklidir.

NS tohumu % 36-38'i sabit yağ, proteinler, alkaloidler, saponinler ve % 0,4–2,5 esansiyel yağ içerir. NS tohum yağı, hoş kokulu yağlar, eser elementler, vitaminler ve enzimler gibi içerdiği yüzden fazla bileşen sayesinde çok yararlıdır. Omega 6 ve omega 3'ü içeren esansiyel yağ asitlerinin % 58'ini içerir. NS tohum yağının farklı bileşenlerini araştırmak için çeşitli farmakolojik testler gerçekleştirilmesine rağmen NS tohum yağının aktivitesi hakkında çok az bilgi vardır.

*Nigella sativa* tohum yağının faydalı etkileri antioksidant, antidiabetik, antihistaminik, antiepileptogenik, antiinfektif, antitümör ve antiperoksidatif özellikleriyle ilgilidir. Bütün bu özellikleriyle NS tohum yağı gelecekte serbest radikal hasarıyla ilgili karaciğer hastalıklarında etkili ilaçların üretilmesinde potansiyel bir hedef olarak görülmektedir.

Bir tio-sülfür birleşimi olan tiyoasetamid (TAA) deneysel olarak indüklenen karaciğer hasarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Akut TAA uygulaması hepatitle sonuçlanırken, kronik TAA uygulamasının karaciğer sirozuna neden olduğu gösterilmiştir. Oksidatif stresin TAA ile indüklenen hepatit ve sirozun patogenezinde önemli bir rol oynadığı rapor edilmiştir. TAA ile indüklenen hasara karşı karaciğeri korumada antioksidanların yararlı etkileri yapılan çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir.

*Nigella sativa* tohum yağının TAA ile indüklenen karaciğer hasarındaki rolü çalışılmamıştır. Bu nedenle bizim yapmak istediğimiz tez çalışmasının amacı sıçanlarda, TAA ile indüklenen karaciğer hasarında antioksidan özelliği olan *Nigella sativa* tohum yağının muhtemel koruyucu etkisini araştırmaktır.

## 2.GENEL BİLGİLER

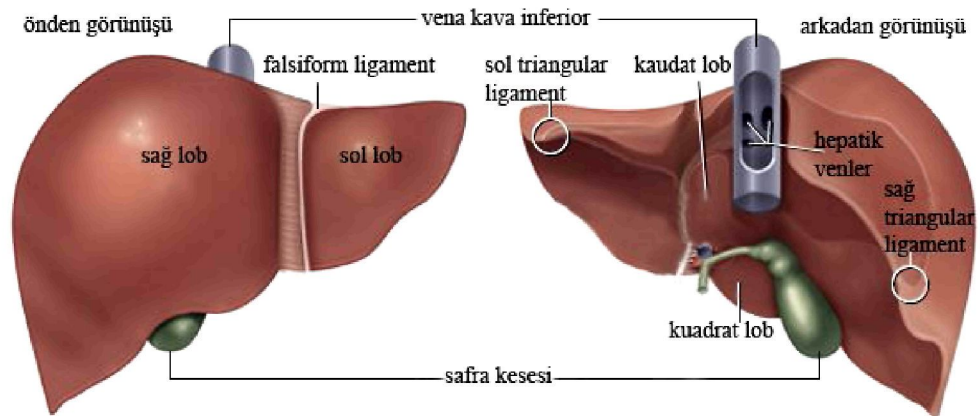
### 2.1. Karaciğerin Yapı ve Fonksiyonları

#### 2.1.1. Karaciğerin Anatomisi

Karaciğer, gebeliğin üçüncü haftasında duodenumdan içi boş bir endodermal tomurcuk olarak oluşmaya başlar. Bu yapı karaciğer ve safra oluşturmak üzere ikiye ayrılır. Hepatik bölümü, çift potansiyelli öncül hücreler içerir. Bunlar hepatositler ya da erken primitif safra kanal yapılarına katılan kanal hücrelerine dönüşür. Bu değişime, hücre içerisinde sitokeratin tipin değişimide eşlik eder.(1-2)

Karaciğer vücudun en büyük organıdır. Ağırlığı 1200-1500 g arasında olup yetişkinlerde toplam vücut ağırlığının 1/50'si kadardır. Yenidoğanlarda karaciğer nispeten daha büyüktür. Doğum ağırlığının 1/80'nini oluşturur. Bu durum sol lobun büyük olmasından kaynaklanır.

Karaciğer, sağ üst kadranda kostalar tarafından korunur. İki anatomik lobu bulunur. Sağ lob, sol lobdan altı kat daha büyüktür. Sağ lobun küçük segmentlerinden kaudat lob posterior yüzde, kuadrat lob ise inferior yüzde bulunur. Sağ lob ve sol loblar önden falsiform ligament denen peritona sarılarak, arkadan ligamentum venosum fissürüyle, aşağıdan ise ligamentum teres fissürüyle ayrılmıştır.(3-2)



Şekil 2. 1:Karaciğerin anterior and posterior görünümü (4)

Sağ lobun üst sınırı, 5. kosta seviyesinde ve sağ midklaviküler hattın 2 cm medialinde (sağ meme ucunun 1 cm altında) bulunur. Sol lobun üst sınırı, 6. kostanın üst seviyesine tekabül edip sol midklaviküler hatta (sol meme başının 2 cm altında) bulunur. Burada karaciğer, diyafram aracılığıyla kalbin tepesinden ayrılır.

Alt sınır, 9. sağ kostal kartilajdan 8. sol kostal kartilaja yukarı doğru eğik olarak geçer. Ayrıca alt sınır, orta hatla sifoid ve göbek merkezi arasında yarı yolda kesişir. Sol lob sternumun soluna doğru sadece 5 cm uzanır. (2)

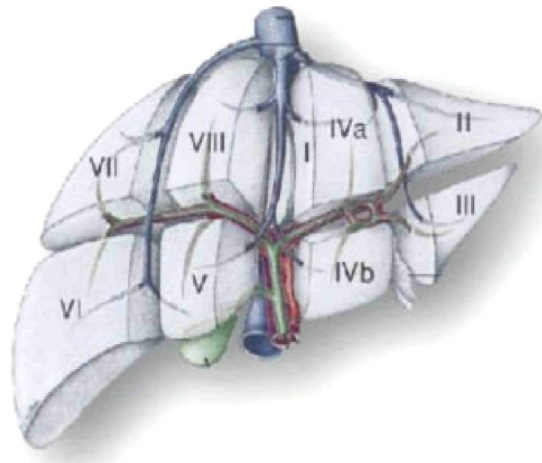
Karaciğer, kanı iki kaynaktan temin eder. Portal ven, venöz kanı bağırsaklardan ve dalaktan getirir. Hepatik arter ise koliaik aksisten arteriyal kanı karaciğere taşır. Bu damarlar, sağ lobun inferior yüzünde bulunan porta hepatis fissüründen geçerek karaciğere girer. Porta içerisinde portal ven ve hepatic arter dallara ayrılıp sağ ve sol loba gider. Sağ ve sol hepatic safra kanalları birleşerek ana hepatic kanalı oluştururlar.(3-2)

Karaciğerde venöz drenaj, karaciğerin arkasından çıkan sağ ve sol hepatic venle olur. Bu venler aynı anda inferior vena kavaya girerler. Inferior vena kava, orta hattan 2 cm kadar kaudat lobun sağına derin bir oluk yapar.

Karaciğer, üç yer hariç tamamen periton ile kaplıdır. Inferior vena kava çukurunun sağında yer alan çıplak alan vasıtasıyla diyafram ile direk temas eder. Peritonsuz diğer alanlar ise inferior vena kava ve safra kesesi çukurlarıdır.

Karaciğer, peritonal ligamentlerle ve karın duvarının kas tonu tarafından iletilen intra-abdominal basınçla pozisyonunu korur.(2)

### 2.1.2. Fonksiyonel Anatomi



Şekil 2. 2: Karaciğer loblarının şematik görünümü



Dış görünüşe göre karaciğer, falsiform ligamentin araladığı hat boyunca ayrılmış olan sağ ve sol loblara sahiptir. Bu ayrılma, kan kaynağı veya safra drenajı ile ilişkili değildir. Fonksiyonel anatomi, damarlara ve safra kanallarına vinil enjekte edilerek vasküler ve safra çıkışı çalışmalarıyla tanımlanmaktadır. Ayrıca bu sınıflandırma görüntüleme teknikleri ile de ilişkilidir.

Ana portal ven, sağ ve sol dallara ayrılır. Daha sonra bunlardan her biri ayrıca iki subüniteyi oluşturur. Bunlara sektör denir. Sağda anterior ve posterior sektörler, solda ise medial ve lateral sektörler olmak üzere toplam dört sektör oluşturur.

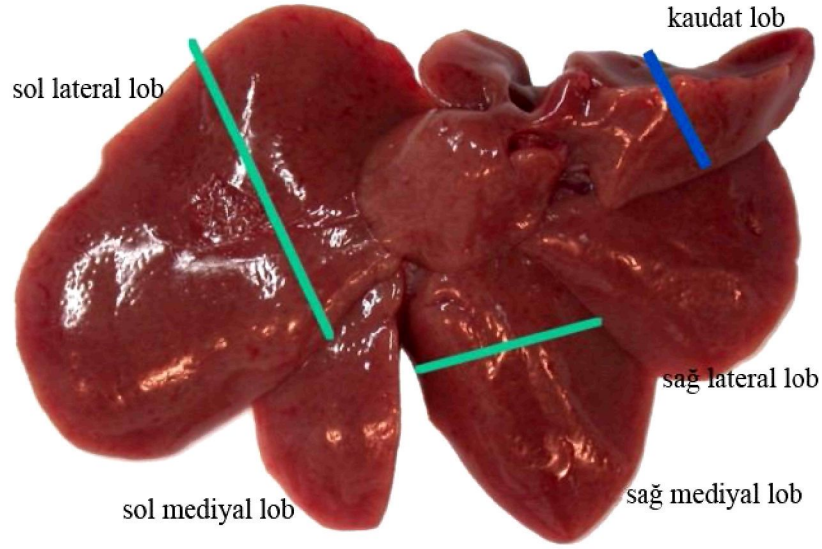
Bu dört sektör ayrıca segment denilen alt bölümler oluştururlar. Sağ anterior sektör V. ve VIII. segmenti, sağ posterior sektör VI. ve VII. segmenti, sol medial sektör IV. segmenti, sol lateral sektör II. ve III. segmenti içerir. Segmentlerin makroskopik damarları arasında vasküler anastomoz bulunmaz. Fakat iletişim sinüzoidal seviyede olur. Segment I, kaudat lob olarak da bilinir. Bu segment, kanlanmayı direk majör portal dallardan yapmaz ya da üç majör hepatik venin herhangi birinden drenaj yapmaz.

Bu fonksiyonel anatomik sınıflandırma, radyolojik verinin yorumlanmasında ve karaciğer rezeksiyonunun cerrahi planlanmasında önemlidir.(5-2)

### **2.1.3. Sıçan Karaciğerinin Anatomisi**

Sıçan karaciğeri mediyen lob ve sağ lateral lob, sol lateral lob ve kaudal lob olmak üzere dört lobtan oluşmuştur. Mediyen lob, longitudinal fisürle, sağ merkez ve sol merkez olarak 2'ye bölünür. Sağ merkez lob, sağ lateral lob tarafından sarılmıştır. Sol lateral lob, büyük bir lobtur ve hemen sol merkez lobun arkasında uzanır. Kaudal lob, transvers fisürle yarılaşıp, küçük omentum ve mide kıvrımı arasında uzanan iki küçük lobtan meydana gelir (Şekil 2,2.)

Anatomik olarak mediyen lob, iki merkez kısmıyla ve sol lateral lob ile birlikte bir bütün formda, bir dereceye kadar cerrahi çıkarıma uygundur.(6)



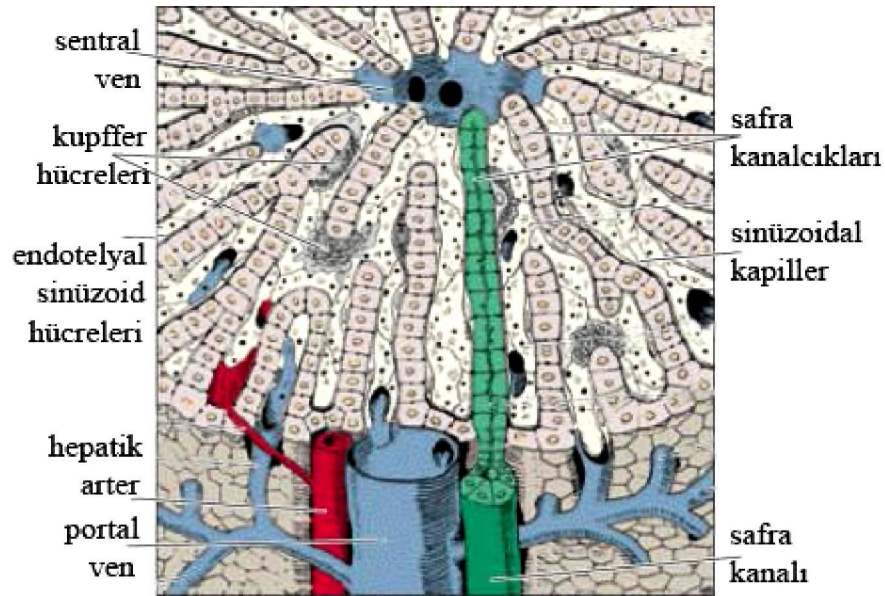
**Şekil 2. 3:**Rat Karaciğeri (7)

#### 2.1.4. Karaciğerin Histolojisi

Karaciğer büyük hacimli ve oldukça damarlı bir organdır. Ayrıca kollajen lifler, yaygın fibroblastlar, miyeloblastlar, küçük kan damarları ve lenfatiklerden oluşmuş ince bir kapsül tarafından çevrilmiştir. Kapsül, kan damarlarının karaciğere giriş yaptığı ve safra kanallarının ayrıldığı yer olan porta hepatis çevresinde en kalın yapıdadır. Parankimada kapsül, portal sistemleri çevreleyen bağ doku ile birleşir.

Portal sisteme giren damarlar ve santral venler hepatik sinüzoitlere uzanır. Bu alanlarda kan ve karaciğerin tek hücreli tabakaları arasında alış-veriş meydana gelir. Histolojik kesitlerde, portal sistemler (hepatik arter dalları, portal ven, bir ya da iki safra kanalı, lenfatikler, sinirler, birkaç lenfosit ve yumuşak bağ dokuda fibroblastlar), santral lobüler ven (terminal hepatik ven) ve lobüler parankima tanımlanmıştır. Karaciğerin görünen yapısal üniteleri çok yüzlü prizma şeklinde loçuklardır. Bunların merkezinde sentrolobüler ven bulunur.(8-9)

Normal karaciğerde en az 15 değişik hücre tipi bulunabilir.(10-9) Hepatositler, tek hücreli bir tabaka ya da lamina şeklinde düzenlenmiştir. Bu hepatik lamina, dallanarak karmaşık bir duvar sistemi oluşturmak üzere birbiriyle anastomoz yapar.(9-11-12) Portal sistemi çevreleyen hepatositler, sistemin bağ dokusu ile hepatik parankima arasında sınırlayıcı tabakadan bir arayüzey oluşturur.



Şekil 2. 4:Normal karaciğerin şematik diyagramı (13)

Sinüzoidal membran (total hücre yüzey alanının %70'i), yüzey alanını altı kat artıran mikrovil ile kaplıdır. Disse aralığı boyunca kan ve hepatositler arasında madde değişimi yalnızca sinüzoidal plazma membranının görevidir.

Tüm hücresel mekanizma birçok fonksiyonu; onarımı, transportu, sentezi, biyotransformasyonu ve yıkımı (protein, lipid, karbonhidrat, hormon, ksenobiyotik ve safra) gerçekleştirir.

Yaşlandıkça hepatosit sayısı azalır ve hipertrofi görülür. Diğer taraftan poliploidi, lizozom ve düz endoplazmik retikulum sayısı artar.

Sinüzoidler özel kapillerlerdir. Bunlar; geçirgen endotelyal bariyerine, sinüzoidlerin girişinde koruma sağlayan yerleşik makrofajlara (kupffer hücreleri), bazıları büyük granüler lenfositler olmak üzere karaciğere birleşik lenfositlere ve vitamin A depolayan stellat hücrelerine sahiptirler. Sinüzoidler, gerçek taban membranlarına sahip olmaması vasıtasıyla disse aralığı boyunca hepatositlerle giren kan arasındaki alış-veriş ve immünolojik savunma mekanizmalarını kolaylaştırır.(9–14–15)

Zon 1'de sinüzoidler kıvrımlı, dar ve anastomotik olup zon 3'e göre daha paralel ve genişleme eğilimindedir.(9–16–17) Kan akışı tekyönlü olarak sinüzoidlerde zon 1'den zon 3'e doğru olur. Sinüzoidlerde mikrosirkülasyon

değişiklik gösterir. Sinüzoidal hücreler, lobüler parankimanın %6'sını (%2,5 endotelial, %2 kupffer ve %1,4 stellat hücreleri) ve karaciğerin plazma membranının %26,5' ini temsil eder. (9–18–19)

Endotelial hücreler, sinüzoidlerin bariyerini oluştururlar. Ana karakterleri; geniş bir alanı kapsayan çok ince bir oluşum (karaciğerin tüm plazma membranının %15'i) ve grup halinde kümelenip daha küçük moleküllerin geçişine izin veren ortalama 100 nm çaplı gözeneklere sahiptirler. Aynı zamanda endositik kapasiteyi artıran çok sayıda pinositik veziküller bulundurlar. (9–16–20)

Kupffer hücreleri, sinüzoidal lümen içerisinde yer alır ve endotelial duvarın geniş bir alanı kaplar. (21) Zon 1'de zon 3'ten daha fazla bulunurlar. Ayrıca çok sayıda lizozom içerirler. Kupffer hücreleri, KP1 (anti-CD68) gibi monoklonal antikor ile tanımlanabilir. Bu hücreler, lateks partikülleri gibi çoğu maddeyi, denatüre albüminleri, bakteri ve immün kompleksleri fagositoza uğratar. (9)

Hepatik stellat hücreleri aynı zamanda perisinüzoidal ya da Ito hücreleri olarak da bilinirler. (22) Bunlar sıklıkla interhepatositik girintide yer alarak lipid ve vitamin A içerirler. Endotelial hücreleri çevreleyen uzun ve ince bir sitoplazmik yapıdadır. (23) Hepatik stellat hücrelerini çevreleyen taban membran bulunmaz. Bu hücreler vitamin A depolar, mikrovasküler tonüsün düzenlenmesine ve ekstrasellüler matriksin sentezine katılırlar.

Disse aralığı, stellat hücre tabakası ve hepatositlerin sinüzoidal membranı arasında uzanır. Ayrıca hepatic parankimanın %2-4'ünü oluşturur. (9–24)

### **2.1.5. Hepatositler**

Hepatositler, herbirinin boyutu 20–30 µm ebatında büyük, poligonal hücrelerdir. Karaciğer hücre topluluğunun yaklaşık %80'ini oluştururlar. Hepatosit çekirdeği, büyük ve sferik olup, hücre merkezinde bulunur. Hepatositler, karaciğer lobüllerinde anastomozlaşan hücre tabakaları oluştururlar. Erişkin karaciğerinde pekçok hücre çift çekirdekli ve hücrelerin çoğu tetraploittir (4n miktarında DNA içerirler). Heterokromatin, nükleoplazmada dağınık demetler şeklinde ve nüklear zarf altında ayrı bir bant şeklinde bulunur. Her bir çekirdekte iki veya daha fazla iyi gelişmiş çekirdekçik bulunur. Hepatositler, nispeten uzun yaşayan hücrelerdir. Hayat süreleri yaklaşık 5 aydır. İlâveten, karaciğer hücreleri, karaciğer dokusu hepatotoksik oluşumlar, hastalıklar veya cerrahi ile kaybedildiği zaman önemli rejenerasyon

yeteneği gösterirler. Hepatosit sitoplazması genellikle asidofiliktir. Rutin ve özel boyama işlemleri ile spesifik sitoplazmik yapıları tanımlanabilir. Bazofilik bölgeler, ribozomal ER ve serbest ribozomlar içerirler. Vital boyama veya enzim histokimyası ile 800–1000 mitokondriyon gösterilebilir. Spesifik boyamalardan sonra, her hücrede çok sayıda küçük golgi kompleksi görülebilir. Çok miktarda peroksizom immünohistokimya ile gösterilir. Periyodik Asit-Schiff (PAS) işlemi ile boyanan glikojen depozitleri görülür. Bununla beraber, iyi korunmuş hematoksilen & eozin ile boyanmış preparatlarda, glikojen düzensiz aralıklar şeklinde görülebilir. Genellikle sitoplazmaya köpüklü bir görünüm verir. Uygun fiksasyon ve Sudan boyamadan sonra, değişik boyutlarda lipid damlaları görülür. Lipid damlalarının sayısı, etanol gibi belirli hepatotoksinlerin verilmesinden sonra artar. Lipofuksin, lizozomlardaki bir pigmenttir. Rutin H&E boyamalarda değişik miktarlarda görülür. Sınırları belirli, kahverengi granüller PAS metodu ile de görülebilir. Hepatositlerde çok sayıda peroksizom bulunur. Herbir hepatositte en az 200–300 peroksizom bulunur. Bunlar nispeten büyüktür ve çapları 0,2–1,0 µm'dir. Peroksizomlar, oksijen kullanımının ana alanlarıdır. Bu yolda mitokondriyonlara benzer bir fonksiyon geliştirirler. Toksik hidrojen peroksidi oluşturan büyük miktarlarda oksidaz içerirler. Peroksizomlarda, aynı zamanda katalaz enzimi bulunur. Katalaz, hidrojen peroksidi oksijen ve suya indirger. Bu tip reaksiyonlar, karaciğerde oluşan pekçok detoksifikasyon yolu ile ilgilidir (Alkollerin detoksifikasyonunda olduğu gibi). Normalde, sindirimle alınan etanolün yarısı, karaciğer peroksizomlarında bulunan enzimler tarafından asetaldehite çevrilir. İnsanlarda peroksizomlarda katalaz, D-amino asit oksidaz ve alkol dehidrojenaz bulunur. İlaveten, peroksizomlar, yağ asitlerinin β-oksidasyonu, glikoneojenez ve pürin metabolizması ile ilgili organellerdir. Hepatositlerde düz endoplazmik retikulum yaygın olabilir, fakat bu metabolik aktivite ile değişir. Düz endoplazmik retikulum, toksinlerin, ilaçların, kolesterolün ve lipoproteinlerin lipid bölümlerinin sentezinden sorumlu enzimlerin indirgenmesi ve konjugasyonu ile ilgili enzimler içerir. Hepatositlerin ilaçlar, toksinler veya metabolik uyarıcılarla karşılaşması durumunda, düz endoplazmik retikulum hücredeki yaygın organel olabilir. Belirli ilaçlar ve hormonlar, düz endoplazmik retikulumu uyarmalarına ilaveten yeni düz endoplazmik retikulum membranlarının ve ilgili enzimlerin sentezini de teşvik ederler. Düz endoplazmik retikulum, alkol, çeşitli ilaçlar

(fenobarbital, anabolik steroidler ve progesteron gibi) ve kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötiklerin uygulanmasını takiben hipertrofiye uğrar. Etanol tarafından uyarım, düz endoplazmik retikulumun ilaçları, belirli karsinojenleri ve bazı pestisitleri detoksifiye etme yeteneğini artırır. Diğer yandan, düz ER tarafından oluşan metabolizma, hepatosit hasarı yapan CCl<sub>4</sub> ve 3,4-benzpiren gibi toksik bileşiklerin etkileriyle gerçekten artabilir. Hepatositlerdeki büyük Golgi aparatı 50 kadar golgi ünitesi içerebilir. Kalın kesitlerin ağır-metal preparasyonları (golgi boyamaları), yaygın golgi ağını gösterir. 50 kadar çok miktarda golgi ünitesinin herbiri sıkıca paketlenmiş 3–5 sisterna içerir. Ayrıca hepatositlerde büyük ve küçük veziküller bulunur. Bu üniteler, ağır-metal preparatlarında golgi aparatının dalları olarak görülür. Golgi aparatının safra kanalikülüne yakın elementlerinin ekzokrin safra sekresyonu ile ilgili olduğuna inanılır. Hücrenin sinüzoidal yüzeyine yakın golgi sisternaları ve veziküller, 25–80 nm çapında elektro-dens granüller içerirler, bunların çok düşük dansiteli lipoproteinler (ÇDDL) ve diğer lipoprotein prekürsörleri olduğuna inanılır. Bu maddeler, hepatositlerin endokrin fonksiyonunun bir bölümü olarak dolaşıma salınırlar. Düz endoplazmik retikulumun genişlemiş bölümlerinde benzer yoğun globüller görülür. Bazen de ribozomal endoplazmik retikulumun sisternalarının genişlemiş son kısımlarında ki burası sentezlendikleri yerdir, görülebilir. Lizozomlar safra kanaliküllerine yakın bölgede yoğundur, histolojik kesitlerde görülen peribiliyer yoğun cisimlere karşılık gelirler. (25)

### 2.1.6. Karaciğerin Fizyolojisi

Karaciğer tarafından pek çok plazma proteinleri üretilir ve salgılanır. Karaciğer, besin maddeleri ve vitaminlerin kan dolaşımından alınmasından, depolanmasından ve dağıtılmasından sorumludur. Aynı zamanda, kan glukoz düzeylerini korur ve dolaşan çok düşük dansiteli lipoprotein (ÇDDL) düzeylerini düzenler. İlâveten, karaciğer çok sayıda toksik maddeleri indirger veya bağlar, fakat böyle maddeler tarafından da harap olabilir. Karaciğer, aynı zamanda bir ekzokrin organdır. Safra tuzları, fosfolipidler ve kolesterol içeren safra salgısını sentezler. Son olarak, karaciğer önemli endokrin benzeri fonksiyonlar gerçekleştirir.

Karaciğer, dolaşan plazma proteinlerinin çoğunu üretir. Bunların başlıcaları:

Albumin, plazma kolloid ozmotik basıncını koruyarak doku sıvı dengesinin ve plazma yoğunluğunun düzenlenmesini sağlar.

Lipoproteinler, karaciğerde çok fazla ÇDDL sentezlenir, bunlar trigliseritlerin karaciğerden diğer organlara taşınmasına iştirak eder. Karaciğer, aynı zamanda az miktarlarda diğer plazma proteinlerini de sentezler. Bunlar, düşük dansiteli lipoprotein (DDL) ve yüksek dansiteli lipoprotein (YDL)'lerdir. DDL, kolesterol esterlerini karaciğerden diğer dokulara taşır. YDL, kolesterolü çevre dokulardan alır ve karaciğere taşır.

Glikoproteinler, demir taşınımı ile ilgili proteinler, haptoglobin, transferrin ve hemopeksin gibi.

Protrombin ve fibrinojen, kan pıhtılaşmasının önemli bileşikleridir.

Non-immün  $\alpha$ - ve  $\beta$ - globulinler, plazma ozmotik basıncının korunmasına yardımcı olur ve değişik maddelerin taşıyıcı proteini olarak rol oynar.

Karaciğer, çeşitli vitaminleri, demiri depolar ve dönüşümünü sağlar. Çeşitli vitaminler, kan dolaşımından alınarak karaciğer tarafından depolanır ve/veya biyokimyasal olarak modifiye edilir:

A Vitamini (retinol), görmede önemli bir proteindir. Gözde rodopsin sentezi için gereken retinalin prekürsörüdür. Karaciğer, vitamin A'nın alınması, depolanması ve dolaşan düzeylerinin korunmasında önemli rol oynar. Kandaki vitamin A düzeyleri düştüğü zaman karaciğer, İto hücrelerinde bulunan depo alanlarından vitamin A'yı harekete geçirir. Daha sonra, A vitamini retinol bağlayıcı proteine (RBP) bağlı bir şekilde dolaşıma salınır. Karaciğer, aynı zamanda RBP sentezler. RBP sentezi, plazma A vitamini düzeyleri ile düzenlenir. Gece körlüğü ve multiple deri hastalıkları, A vitamini eksikliği ile ilgilidir.

D vitamini (kolekalsiferol), kalsiyum ve fosfat mekanizmasında önemli bir vitamin olan D vitamini diyetteki D<sub>3</sub> vitamininden oluşturulur, ayrıca ultraviyole ışınlarına maruz kalan deride, 7-dehidrokolesterolün çevirimiyle de üretilir. A vitamininden farklı olarak, D vitamini karaciğerde depolanmaz, fakat iskelet kaslarına ve yağ dokusuna dağılır. Karaciğer, D vitamini metabolizmasında önemli bir rol oynar. D<sub>3</sub> vitaminini 25-hidroksikolekalsiferole dönüştürür. Bu, dolaşan D vitamininin yaygın şeklidir. Böbrekte, daha ileri çevirim aşaması gerçekleşir ve 1,25-dihidroksikolekalsiferole dönüşür. Bu, D<sub>3</sub> vitamininden 10 kat daha fazla aktiftir. D<sub>3</sub> vitamini, iskelet sistemi, immün sistem, dişlerin gelişimi ve büyümesi için temel bir vitamindir.

K vitamini, protrombin ve çeşitli diğer pıhtılaşma faktörlerinin karaciğerde sentezi için önemlidir. Vücuda diyetsel olarak alınır ve ince barsaktaki bakteriyel flora tarafından sentezlenir. K vitamini, şilomikronlarla karaciğere taşınır. Burada hızlı bir şekilde absorbe edilip, daha sonra ÇDDL ile salgılanır. K vitamini eksikliği, hipoprotrombinemi ve kanama bozuklukları ile ilişkilidir.

İlaveten, karaciğerin depolama, metabolizma, demir dengesini düzenleme gibi fonksiyonları vardır. Demir taşınımı ve metabolizması ile ilgili hemen hemen bütün proteinleri sentezler (transferrin, haptoglobin ve hemopeksin gibi). Transferrin, bir plazma demir taşıyıcı proteindir. Haptoglobin, plazmadaki serbest hemoglobini bağlar; bu kompleks, karaciğer tarafından depo demiri olarak ortadan kaldırılır. Hemopeksin, kandaki serbest hem'in taşınımı ile ilgilidir. Demir, hepatosit sitoplazmasında ferritin şeklinde depolanır veya hemosiderin granüllerine dönüştürülebilir. Yeni çalışmalarda, hepatositlerin uzun dönem demir depolanması için ana merkezler olduğu gösterilmiştir.

Hepatositler, ilaçların, toksinlerin ve vücuda yabancı diğer proteinlerin (ksenobiyotikler) indirgenmesi ile ilgilidir. Pekçok ilaçlar ve toksinler hidrofilik değildir. Bundan dolayı, böbrekler tarafından dolaşımdan etkin bir şekilde elimine edilemeyebilirler. Karaciğer, bu maddeleri daha çözülebilir şekillere dönüştürür. Bu yol, hepatositler tarafından iki fazda gerçekleştirilir:

Faz I, oksidasyon olarak isimlendirilir. Yabancı bileşiklere hidroksilasyon (OH grubu eklenmesi) ve karboksilasyonu (COOH grubu eklenmesi) içerir. Bu faz, hepatosit düz endoplazmik retikulum ve mitokondriyonunda gerçekleşir. Proteinleri sitokrom p-450 olarak isimlendirilen, bir seri biyokimyasal reaksiyonu içerir.

Faz II, konjugasyon olarak isimlendirilir. Glukuronik asitin, glisin ve taurinle konjugasyonu gerçekleşir. Bu yol, faz I ürünlerini daha suda eriyebilir hale getirerek böbrekler tarafından ortadan kaldırılmasına yardımcı olur.

Karaciğer pekçok diğer önemli metabolik yollarla ilgilidir. Karaciğer, karbonhidrat metabolizması için önemlidir. Çünkü hücre prosesleri için yeterli besin desteğini sağlar. Glukoz metabolizmasında, karaciğer gastrointestinal yoldan emilen glukozu fosforile ederek glukoz-6-fosfata dönüştürür. Enerji isteğine bağlı olarak, glukoz-6-fosfat ya karaciğerde glikojen şeklinde depolanır veya glikolitik yolda kullanılır. Açlık sırasında, glikojen glikojenoliz ile yıkılır ve glukoz kan dolaşımına



verilir. Karaciğer, lipid metabolizmasında da rol oynar. Plazmadan köken alan yağasitleri,  $\beta$ -oksidasyon ile hepatositlerde işleme girer ve enerji elde edilir. Karaciğerde, aynı zamanda diğer organlar için yakıt olarak kullanılan keton cisimleri üretilir.

Karaciğer, kolesterol metabolizmasında da önemli fonksiyon görür. Kolesterol; safra tuzlarının oluşumunda, D<sub>3</sub> vitamininin, steroid hormonların, ÇDDL sentezinde ve organellerin biyosentezinde rol oynar. Karaciğer, protein ve nükleik asit indirgenmesi ile oluşan amonyum iyonlarından üre sentezinin yapıldığı ana bir organdır. İlaveten, karaciğer non-esansiyel aminoasitlerin sentezlendiği ve esansiyel amino asitlere çevrildiği bir organdır.

Safra üretimi karaciğerin ekzokrin bir fonksiyonudur. Safra, konjuge ve indirgenmiş atık ürünler içerir. Safra salgısı ince bağırsağa ulaştırılır. Safra, karaciğer parankiminden safra kanalı ile taşınır, safra kanalları birleşerek hepatik kanalı oluşturur. Daha sonra, sistik kanal safrayı safra kesesine taşır, safra burada yoğunlaşır. Safra, daha sonra sistik kanal aracılığı ile genel safra kanalına verilir. Bu kanal, safrayı karaciğer ve safra kesesinden duodenuma taşır.

Karaciğerde pekçok hormonun yapı ve fonksiyonu düzenlenir. D vitamini, karaciğerde 25-hidroksikolekalsiferole dönüştürülür. Tiroksin, tiroit bezi tarafından tetraiyodotironin olarak sentezlenir. Karaciğerde deiyodinyasyon ile biyolojik olarak aktif formu olan triiyodotironine dönüştürülür. Büyüme hormonu (GH), hipofiz bezi tarafından sentezlenen bir hormondur. GH'un işlevleri, karaciğer tarafından üretilen büyüme hormonu salgılatıcı hormon (GHRF) tarafından düzenlenir ve gastrointestinal kanalın enteroendokrin hücreleri tarafından sentezlenen somatostatin tarafından inhibe edilir. İnsülin ve glukagon, pankreatik hormonlardır. Bu hormonlar, pek çok organda indirgenirler fakat karaciğer ve böbrek en önemli indirgenme bölgesidir.(25–26–27–28)

## 2.2. Tiyoasetamid

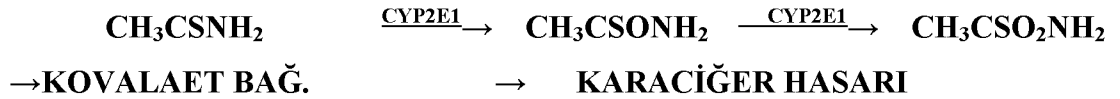
Bir tiyo-sülfür bileşimi olan tiyoasetamid (TAA) toksik bir kimyasaldır. Açık formülü CH<sub>3</sub>CSNH<sub>2</sub> şeklindedir.

Tiyoamid grupları doğal olarak nadir bulunur ve *Methylosimus trichosporium* OB3b methanobactin bakır şelatör bileşiklerinde bulunduğu kanıtlanmıştır.(29)

TAA fungusitlerde, organik çözücülerde, kağıtuğun vulkanizasyon işleminin hızlandırılmasında, deri, tekstil, kâğıt sanayide ve motor yağının stabilizasyonunda kullanılmaktadır. 2,6-Diklorbenzonamid (klordiamid) herbisid olarak kullanılmaktadır. Tiyoamid ürünlerinden olan 2-ethyl-4-pyridinecarbothioamide (ethionamide) çoklu ilaç tedavisine dirençli *Mycobacterium tuberculosis* ve *M. Leprae* ilaç tedavisinde ikinci bir alternatif olarak kullanılmaktadır. (30–31) TAA'in hepatotoksik bir kimyasal olduğu ilk kez Fitzhugh ve Nelson tarafından 1948 yılında bildirildi. TAA 'in tek dozunun hayvanlarda sentrolobüler nekroza neden olabildiğinin ve buna yanıt olarak hücresel yenilenmenin oluştuğu rapor edilmiştir.(32–33) TAA 'in düzenli olarak kullanımı karaciğer sirozuna ve karaciğer kanserine neden olmaktadır.(34–35–36)

Yüksek dozda karbontetraklorür, tiyoasetamid, dimetilnitrozamin ve *amanita falloides* verilerek ratlarda ağır karaciğer zedelenmesi meydana getirildiğinde, lizozom enzimlerinin karaciğer dokusu ve serumdaki aktivitelerinin gelişen karaciğer nekrozu ile orantılı şekilde yükseldiği saptanmıştır. Bazı deneylerde enzim artışı bir bekleme dönemi olmaksızın ve hücre nekrozunun morfolojik belirtileri ortaya çıkmadan önce meydana gelmiştir(37–38–39–40–41–42–43)

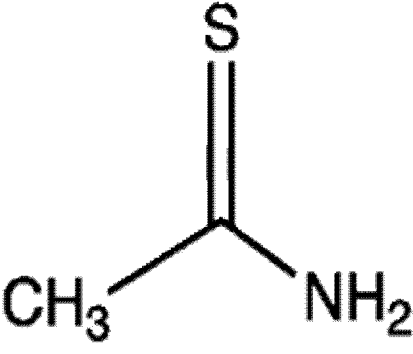
TAA toksisite oluşturma mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Ancak vucuda alınan TAA CYP2E1 aracılığıyla TAA sülfokside (TASO) ve oluşan TAA sülfoksid TAA-S,S-dioksidi (TASO<sub>2</sub>) dönüşür. Oluşan TASO<sub>2</sub> in hepatosit membranlarında lipid peroksidasyonunu başlatır ve membran proteinlerine kovalent bağlanarak nekroz oluşumunu sağlar.(44)



TAA ile indüklenen karaciğer patolojisinde oksidatif stresin önemli bir rol oynadığı belirtilmesine rağmen TAA hepatotoksitesinde oksidatif stres mekanizması hala açık değildir.(45–46–47–48–49–50) Antioksidanların TAA uygulamasında oluşan hasarlara karşı koruyucu etkileri rapor edilmiştir.(45–46–51–53–52–54)

### 2.2.1. TAA 'nın fiziksel ve kimyasal özellikleri

**Tablo 2. 1.** TAA'nın fiziksel ve kimyasal özellikleri

|   |
|---|
|  |
| TAA 'NIN AÇIK FÖRMÜLÜ   |
| Moleküler formülü: CH <sub>3</sub> CSNH <sub>2</sub>                              |
| CAS No: 62-55-5   |
| Görünüm: Renksiz kristaller   |
| Molekül ağırlığı: 75,13   |
| Koku: Hafif bir koku  |
| Buhar Yoğunluğu (1atm) : 2,6  |
| Çözünürlük: suda-etanolde çözünebilir   |
| Suda çözünürlük:16,3g/100 ml(25 C)  |
| Erime Noktası: 110-115 ° C  |
| LD50/LC50:Oral, sıçan:301mg/kg  |

### 2.2.2. TAA 'nın Metabolizma Yol Haritası

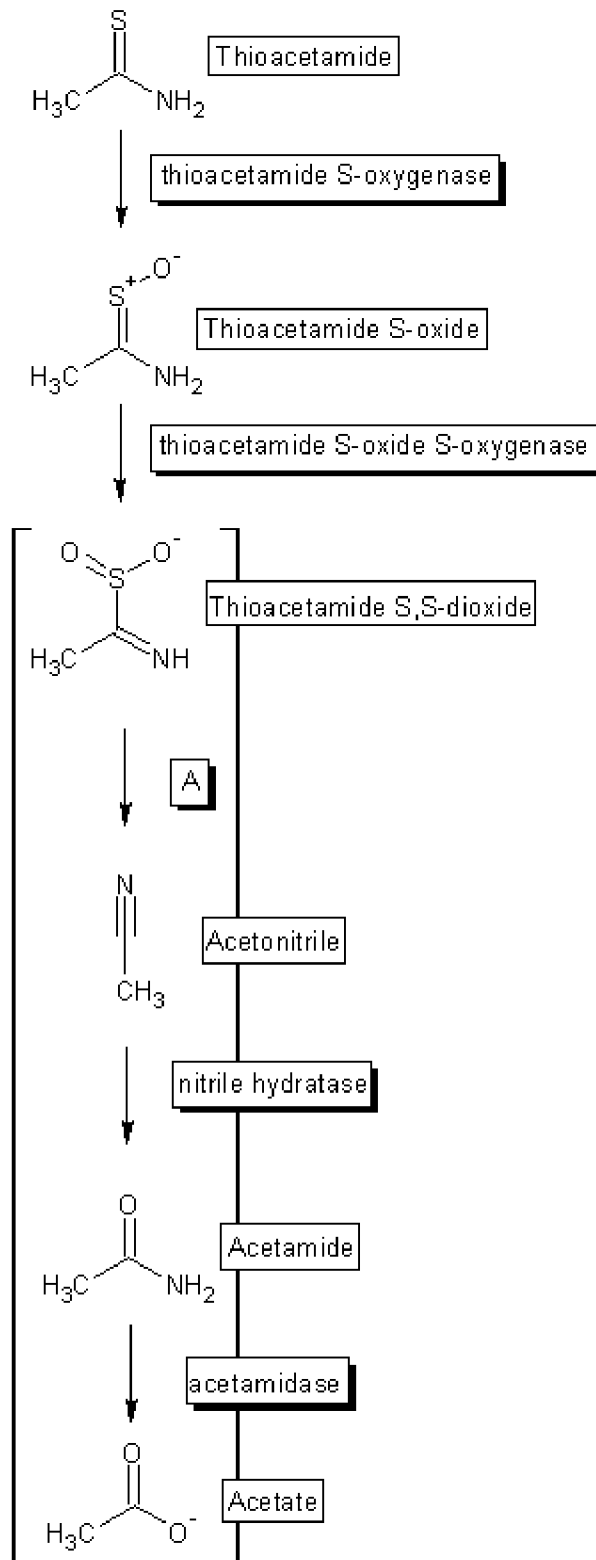
TAA'nın *Mycobacterium* spp ve memeliler üzerindeki toksik etkisi tioamid sülfür atomunun flavoprotein monooksijenaz ya da sitokrom P450 tarafından sıralı oksijenizasyonundaki ürünlerin metabolik aktivasyonuna bağlıdır.(56–57–58)

Tiyoamid S-oksit toksik olmamasına rağmen henüz izoleadilememiş olan tiyoamid S,S-dioksit ve daha ileri oksidasyon ürünleri toksik etkiye sahiptir.(59–60)

TAA'nın bu aktivitesi tiyoamid kükürt eliminasyonu ve nitril veya amid türevlerine dönüşümüyle sonuçlanır (56-58-59).*Ralstonia pickettii* azot ve karbon kaynağı olarak sadece tiyoasetamid kullanarak büyüyebilir fakat degravasyon yolu hala tamamen bilinmemektedir. (61)

Tiyoasetamid S-oksidin oksijenaz aracılı mekanizma ile bir ara metabolik olduğu tespit edildimiştir. Tiyoasetamid yıkımı sırasında, 3,5-dimetil-1,2,4-thiadiazol ortamda birikir ve daha fazla metabolize olmaz. Bu bileşik tiyoasetamid ve tiyoasetamid S-oksit ile bileşik oluşturmaz. Bu nedenle, muhtemelen tiyoasetamid S, S-dioksit gibi daha okside türler, tiyoasetamid ile reaksiyona girerek dönüşümsüz metabolitleri oluşturduğu ileri sürülmüştür. Tiyoasetamid metabolizması sırasında ortamda kükürt dioksit / sülfid gibi kükürt elimine edildi. Tiyoasetamid S,S-dioksiden bu basamakta bilinmeyen bir mekanizma ile meydana gelen kükürt salınımı, ek iki elektron oksidasyonu gerektirir. Tiyoasetamid degravasyonu süresince salınan nitrojen amonyum iyonu miktarıyla tesbit edilir. Bu model mekanizma *R. Pickettii*'nin karbon ve azot kaynağı olarak kullandığı tiyoasetamid sülfürün asetonitrile ve asetamide dönüşümünden uyarlanmıştır. Fakat her ikisinde TAA degravasyonu boyunca tesbit edilemiyebilir çünkü bu substratların hidrolizi sülfür yayılımından daha hızlıdır.(61)

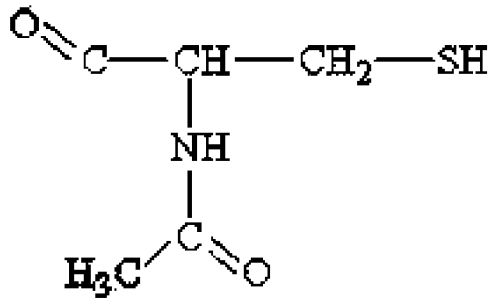
## TAA'nın metabolik yol haritası(62)-



### 2.3. N-Asetilsistein

#### 2.3.1. Farmakodinamik özellikler

Asetilsistein doğal bir aminoasit olan L-Sistein'in N-Asetillenmiş türevi olup mukolitik olarak kullanılan ajandır. Yapısında bulunan sülfidril grubu ile glikoprotein içerisindeki disülfid bağlarını koparma özelliğinden dolayı mukoid ve mukopürülan sekresyonlar üzerine mukolitik etki göstermektedir. Solunum yollarında biriken balgam yoğunluğunu ve yapışkanlığını azaltır. Bu özelliği sayesinde balgamı su gibi akıcı kıvama getirir. Balgamın çözülmesine de yardımcı olur. Bronşiyal sekresyonların atılımına ve solunumu kolaylaştırarak akciğer fonksiyonlarının düzenlenmesine yardımcı olur. Mukolitik etkisinden başka asetaminofen zehirlenmesinde de tedavi edici bir ajan olarak kullanılır. Asetilsistein, asetaminofenin doz aşımına bağlı olarak oluşan hepatotoksisite üzerine etkisini karaciğer glutatyon seviyesini koruyarak veya arttırarak gösterir. Glutatyon hepatotoksik olduğu bilinen asetaminofenin ara metabolitini inaktif etmek için gerekmektedir. Doz aşımı sonucu primer metabolik yolu (glukoronid ve sülfat konjugasyon) satüre olduğu için bu ara metabolit düzeyinde artış görülmektedir. Asetilsistein etkisini bu ara metaboliti ana madde haline dönüştürerek veya metabolitin konjugasyonu için sülfhidril vererek gösteriyor olabilir. Deneysel çalışmalar; asetilsistein ve sülfhidril içeren diğer maddelerin kullanımının bu ara metabolitin inaktivasyonu üzerine direkt etkisini göstermektedir.(63)



**Formül 2. 1:N-ASETİLSİSTEİN 'İN AÇIK FORMÜLÜ**

### 2.3.2. Farmakokinetik özellikler

Asetilsistein, oral olarak uygulandıktan sonra hızlı bir şekilde absorbe edilir. İlk olarak akciğer, böbrek ve karaciğere geçer. Mide ve barsak sıvılarında stabildir. Akciğer ve plazmada asetilsistein hem serbest hem de disülfid köprüleri yardımıyla proteinlere geri dönüşümlü olarak bağlanmış halde bulunur. İlacın alınımından 4 saat sonra dağılım oranı 0.33–0.47 l/kg arasında değişir ve proteinlere %50 oranında bağlanır. Aç veya tok karnına uygulanmasında bir farklılık yoktur. Uygulamadan 30–60 dakika sonra plazma konsantrasyonu tepe noktasına ulaşır. Genellikle vücutta birikmemekle beraber akciğer dokusunda yüksek konsantrasyonda bulunabilir. Karaciğerde metabolize olur. Böbrek, karaciğer ve akciğer yolu ile vücuttan atılmaktadır. %70 atılımı böbrek dışı olup böbrek klirensi 0.190–0.211 l/h/kg olarak belirtilmiştir.

### 2.3.3. Endikasyonları

Alt solunum yollarında; soğuk algınlığı ve üşütme sonucu oluşan balgamların atılmasında, ekspektorasyonun kolaylaştırılması gereken durumlarda, bronkopulmoner hastalıklarda ve bronşiyal sekresyon bozukluklarının tedavisinde endikedir.(63) Bunun yanı sıra; N-asetilsistein sülfür tabanlı bir amino asit olup, bağışıklık sistemi için çok önemli bir antioksidan olan glutatyonun oluşumunda yer alır. Ayrıca sistein; tırnaklarda, deride ve saçlarda bulunan ana protein beta-keratinde yer alır. Kollajen üretiminde de bulunur, cildin elastikiyetini sağlar. N-asetilsistein; kanser, ağır metal zehirlenmesi, sigara kaynaklı öksürük, bronşit, kalp hastalığı, kistik fibrozis, asetaminofen zehirlenmesi ve septik şokun önlenmesi ve tedavisinde etkili olabilir.

N-asetilsistein T<sub>4</sub> lenfositlerinin üretimini uyardığından N-asetilsistein takviyesi AIDS tedavisinde de denenmektedir. Asetilsisteinin bağışıklık sistemini kuvvetlendirici etkisi, gribe karşı koruma sağlayabilir. Asetilsistein takviyesi grip virüslerine karşı en dayanıksız grup olan yaşlılar ve kronik rahatsızlıkları olanlar için faydalı olabilir. Bazı çalışmalar asetilsisteinin akciğerleri sigaranın kanserojen etkilerinden, karaciğeri alkolün toksik etkilerinden koruyabileceğini ve kanser ilaçlarının yan etkilerini azaltabileceğini gösteriyor. Asetilsistein; arsenik ve civa zehirlenmelerine karşı da kullanılmaktadır.

Asetilsisteinin, günlük tavsiye edilen kullanım dozu yoktur. Vücut tarafından üretilmektedir. Et, yumurta gibi yüksek protein içeren hayvansal gıdalar, buğday, brokoli, sarmsak, soğan ve kırmızıbiber asetilsistein bakımından zengindir.(63)

#### 2.4.Nigella Sativa

*Nigella sativa* (çörek otu), düğün çiçeğigiller (Ranunculaceae) familyasından bir yıllık otsu bir bitkidir. Tohumlarından çoğalır. Kumlu gevşek toprakları sever, çiçeklenme dönemine kadar su ister daha sonra sulanmaz. Tohumları haşhaş bitkisinde olduğu gibi kozalak (kapsül) içerisinde olgunlaşır. Tohumları 2–3 mm boyunda 3 yüzeyli mat olmayan siyah renklidir.

Yunan filozof, Dioskorides; baş ağrılarını, burun tıkanıklıklarını, diş ağrısını ve bağırsak parazitlerini tedavi etmek için çörek otu kullanmıştır. Modern tıbbın babası kabul edilen Hipokrat, çörek otunu karaciğer ve sindirim rahatsızlıklarının devası olarak tanımlamıştır. Tıp tarihinin en ünlü kitaplarından biri olan Tıbbın Kanunu (Canon of Medicine- El-Kanun fi't-Tıb)'nun yazarı olan İbn-i Sina, çörek otunun metabolizmayı uyardığını, uyuşuklu ve halsizliği engellediğini savunmuştur.

*Nigella sativa*, Ortadoğu ülkeleri arasında birçok derdin dermanı olduğu için "Habbat Al Barakah" ya da "Kutsanmış Tohum" olarak bilinir. Binlerce yıldır Ortadoğu, Asya ve Afrika'da kullanıldığı gibi günümüzde tüm dünyada kullanılmaktadır.

Çörek otu tohumlarında % 6,4 su, % 4 kül, % 32 yağ, % 20,2 ham protein, % 6,6 ham lif ve % 37,4 karbonhidrat bulunur. Sabit yağın % 1,2 miristik, % 8,4 palmatik, % 2,9 stearik, % 17,9 oleik, % 60,8 linoleik, az miktarda araşidik ve % 1,7 eikosadienoik asitlerden oluştuğu bildirilmiştir. Çörek otu tohumunda ayrıca az miktarda B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> ve B<sub>6</sub> vitamini; proteinlerin yapı taşı olan aminoasitler; iz elementler olarak bilinen ve organizmada pek çok önemli metabolik faaliyette rol alan, besin ve su ile dışarıdan alınması gereken demir, kalsiyum, magnezyum, çinko ve selenyum gibi mineraller de vardır. Çörek otu tohumlarındaki müessir madde (kristal hâlinde) nigellon, ancak 1959'da izole edilebilmiştir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar çörek otu yağının tümör tedavisinde, kemoterapide görülen negatif yan etkileri göstermeyip büyük başarılar sağladığını kanıtlamıştır. Çalışmalarda ayrıca *Nigella sativa*'nın kemik iliği büyüme oranını % 250 gibi bir rakama çıkardığı ve tümörün büyümesini %50 oranında azalttığı tespit



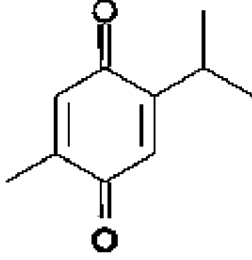
edilmiştir. Bu durum, bağışıklık sistemini uyararak hücreleri virüslerin yok edici özelliğinden koruyan interferon üretimini arttırmaktadır. Araştırmacılar, *Nigella sativa*'nın anti bakteriyel ve anti mikotik etkilerini onaylamış ve diyabet tedavisinde esas olan şeker seviyesini düşürmekte de faydalı olduğunu tespit etmişlerdir.(64)

Son zamanlarda AIDS konusunda yapılan bağımsız çalışmalar, çörek otunun doğal katil hücre aktivitesini arttırırken aynı anda yardımcı ve bastırıcı T hücreleri arasındaki oranı da geliştirip savunma sistemi üzerinde meydana getirdiği şaşırtıcı etkilerini ortaya çıkarmıştır.

Çörek Otu Yağı (Black Cumin Oil veya kalonji oil) içinde barındırdığı; hoş kokulu yağlar, elementler, enzimler ve vitaminler gibi içerdiği yüzden fazla öğeden dolayı oldukça faydalıdır. İçinde omega 3 ve omega 6 ihtiva eden % 58 oranında temel yağ asidi vardır. Bunlar, bağışıklık sistemini alerji ve enfeksiyonlara karşı güçlendirip dengeleyerek kronik hastalıklara karşı koruma sağlayan Prostaglandin E1 oluşumu için gereklidir. Bu oluşum sağlıklı hücreleri virüslerden koruyup tümör oluşumunu engeller.(65) Bruits ve Bucar'ın yaptıkları bir çalışmada NS esansiyel yağının antioksidan aktivitesini araştırmışlar ve radikal süpürücü özelliklerini göstermişlerdir. Aynı zamanda etkili bir hidroksil radikal süpürücü ajanlar olduklarını da belirtmişlerdir.(66)

Preliminer çalışmalar sabit yağ ile esansiyel yağın temel bileşeni olan Timokinin (TQ)'in lipozomlardaki nonenzimatik lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini göstermiştir. Timokinin *Nigella sativa* bitkisinde bulunan fotokimyasal bir bileşiktir. Yapılan hayvan çalışmalarında kalp, karaciğer ve böbrek hasarına karşı koruyucu etkisi ve antioksidan etkisi kanıtlanmıştır. Aynı zamanda çok iyi anti kanser etkisine sahiptir.(67–68–69)

**Tablo 2.2:** Timokinin'in fiziksel ve kimyasal özellikleri

|   |
|---|
|  <p>TİMOKİN 'İN AÇIK FORMÜLÜ</p> |
| Moleküler formülü: C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>   |
| CAS No: 490-91-5  |
| IUPAC: 2-Isopropyl-5-methylbenzo-1,4-quinone  |
| Molekül ağırlığı: 164.2 g /M  |

#### 2.4.1.Nigella Sativa Tohum Yağının Yağ Asidi Analiz Sonuçları

Çalışmamızda kullandığımız çörek otu yağı İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkez Laboratuvarında gaz kromatografisi yöntemiyle yapıldı.

**Tablo 2. 3:** Çörek Otu Yağı'nın gaz kromatografisi ile yağ asidi içeriği

|                          |         |
|--------------------------|---------|
| Renk: Sarı               |         |
| Koku: Natürel            |         |
| Yağ Asidi                | yüzde % |
| Miristik Asit (14:0)     | 0.1     |
| Palmitik Asit (16:0)     | 7.1     |
| Palmitoleik Asit (16:1)  | Eser    |
| Margarik Asit (17:0)     | Eser    |
| Stearik Asit (18:0)      | 3.2     |
| Oleik Asit (18:1)        | 27.2    |
| Linoleik Asit (18:2)     | 59.2    |
| Linolenik Asit (18:3)    | 0.5     |
| Araşidonik Asit (20:0)   | Eser    |
| 11-Eikosenik Asit (20:1) | 0.2     |
| Behenik Asit (22:0)      | 0.6     |
| Lignoserik Asit (24:0)   | Eser    |
| Doymuş Yağ Asit          | 11.6    |

|                   |      |
|-------------------|------|
| Doymamış Yağ Asit | 87.6 |
| Doymamış / Doymuş | 7.6  |

Yağ asidi analizine göre linoleik asit (C18:2n-6) ve oleik asit (C18:1n-9) çörek otu yağının majör yağ asitleridir. Ek -1

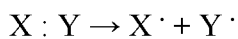
### 2.5. Serbest Radikaller

Doğada bulunan moleküllerin çoğu son yörüngelerinde çift elektron taşımaya rağmen bazı moleküller bir ya da birkaç eksik elektron taşımakta olup böyle moleküllere serbest radikal denilmektedir. Serbest radikaller oldukça kararsız yapıdadır. Dolayısıyla elektron alışverişine ve reaksiyona girmeye oldukça meyillidirler. Girdikleri bu reaksiyonlar sonucunda ise karşısındaki moleküllerin yapısını bozarlar. Başlıca serbest radikaller; serbest oksijen radikalleri (reaktif oksijen partikülleri-ROS ), süper oksit radikali (SOR), hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve singlet oksijendir. Bunlar dışında karboksi, peroksil, alkoksil ve sülfür radikalleri de vardır.(70-71)

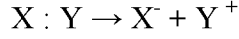
Organizmada fagositer sistemin elemanları olan nötrofil, monosit, makrofaj ve eozinofillerin yaptıkları fagositoz sonucunda, bir takım kemoterapötiklerin ve antibiyotiklerin kullanımı, iyonize ve non-iyonize radyasyona maruz kalma, sıcak ve soğuğa maruziyet, travma, sigara kullanımı, fizyolojik yaşlanma, hava kirliliği, solventler, anestezi uygulamaları ve aromatik hidrokarbon içeren yiyeceklerin tüketilmesi sonucu serbest radikaller oluşur. Ayrıca hücre içinde gerçekleşen küçük moleküllerin (katekolamin, flavinler) oksidasyonunda ksantin oksidaz gibi çözünebilir enzim ve proteinlerle, peroksizomlarla, mitokondrial elektron transportu, endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemi ile de serbest radikaller oluşur(72)

Bir serbest radikal 3 yolla ortaya çıkabilir. (73)

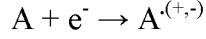
1. Kovalent bağ taşıyan normal bir molekülün homolitik yıkımı sonucu oluşurlar (Bölünme sonrası her bir parçada ortak elektronlardan biri kalır).



2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı ya da bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi ile oluşurlar. Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron, atomlardan birisinde kalır.



3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile oluşurlar.



Serbest radikaller, pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötral olabilirler. Biyolojik sistemlerde en fazla elektron transferi ile oluşurlar.(74–75)

Serbest radikaller; hücrelerin lipid, protein, DNA, karbohidrat gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler ve yapılarının bozulmasına neden olurlar. Biyolojik sistemlerdeki reaktif oksijen türleri, süperoksit anyonu ( $2O_2^-$ ), hidroksil radikali ( $HO\cdot$ ), nitrik oksit ( $NO\cdot$ ), peroksil radikali ( $ROO\cdot$ ) ve radikal olmayan hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) gibi serbest radikaller oksidatif stresin en önemli nedenlerini oluştururlar. (76)

### 2.5.1. Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri

Lipidler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinir. Lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Hücre membranlarında lipid serbest radikalleri ( $L\cdot$ ) ve lipid peroksit radikallerinin ( $LOO\cdot$ ) oluşması, reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir.

Serbest radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonuna "nonenzimatik lipid peroksidasyonu" denir. Hücre membranlarında lipid peroksidasyonuna uğrayan başlıca yağ asitleri poliansatüre yağ asitleridir. Lipid peroksidasyonu genellikle yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomlarının çıkarılması ve bunun sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipid radikali niteliği kazanmasıyla başlar.

Lipid radikali ( $L\cdot$ ) dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Lipid radikallerinin ( $L\cdot$ ) moleküler oksijenle ( $O_2$ ) etkileşmesi sonucu lipid peroksit radikalleri ( $LOO\cdot$ ) oluşur. Lipid peroksit radikalleri ( $LOO\cdot$ ), membran yapısındaki

diğer poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipidperoksitlerine (LOOH) dönüştürler ve böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid peroksitlerinin (LOOH) yıkılımı geçiş metalleri iyon katalizini gerektirir. Plazma membranı ve subsellüler organel lipid peroksidasyonu serbest radikal kaynaklarının hepsiyle uyarılabilir ve geçiş metallerinin varlığında artar. Lokal olarak hidrojen peroksitten ( $H_2O_2$ ) fenton reaksiyonu sonucu hidroksil radikali ( $OH\cdot$ ) oluşması zincir reaksiyonunu başlatabilir.

Lipid peroksitleri (LOOH) yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar.

Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda malondialdehit (MDA) meydana gelir. Malondialdehit (MDA) kanda ve idrarda ortaya çıkar, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü olmamakla beraber lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Bu nedenle biyolojik materyalde malondialdehit (MDA) ölçülmesi lipid peroksit seviyelerinin indikatörü olarak kullanılır.

Nonenzimatik lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve ürettiği reaktif aldehitlerle indirekt olarak diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece doku hasarına ve birçok hastalığa neden olur.

### **2.5.2. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri**

Proteinler serbest radikallere karşı poliansatüre yağ asitlerinden daha az hassastırlar. Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme derecesi amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Bu etki sonucunda özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller oluşur.

Serbest radikallerin etkileri sonunda, yapılarında fazla sayıda disülfid bağı bulunan immünoglobülin G (IgG) ve albümin gibi proteinlerin tersiyer yapıları bozulur, normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Prolin ve lizin reaktif oksijen türleri (ROS) üreten reaksiyonlara maruz kaldıklarında nonenzimatik hidroksilasyona

uğrayabilirler. Hemoglobin gibi hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin süperoksit radikali ( $O_2\cdot$ ) veya hidrojen peroksitle ( $H_2O_2$ ) reaksiyonu methemoglobin oluşumuna neden olur.

### 2.5.3. Serbest Radikallerin Nükleik Asitler Etkileri

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Hidroksil radikali ( $OH\cdot$ ) deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. Süperoksit ( $O_2\cdot$ ) maruz kalan DNA molekülleri hayvanlara enjekte edildiklerinde daha fazla antijenik özellik gösterirler ki bu oldukça önemli bir etkidir, çünkü otoimmün bir hastalık olan sistemik lupus eritematozusta (SLE) ve romatoid artrit (RA) dolaşımında anti-DNA antikorlar bulunur.

### 2.5.4. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri

Serbest radikallerin karbonhidratlara etkisiyle çeşitli ürünler meydana gelir ve bunlar, çeşitli patolojik süreçlerde önemli rol oynarlar.

Diyabet ve diyabet komplikasyonlarının gelişimi, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, psöriyazis, romatoid artrit, Behçet hastalığı, çeşitli deri ve göz hastalıkları, kanser gibi birçok hastalıkta ve yaşlılıkta serbest radikal üretiminin arttığı, antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz olduğu gösterilmiştir. Ancak bu hallerde serbest radikal artışının sebep mi yoksa sonuç mu olduğu tam olarak bilinmemektedir.

## 2.6. Antioksidanlar

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşın vücutta pek çok savunma sistemi geliştirilmiştir. Geliştirilen bu sistemlere antioksidan savunma sistemleri, bu sistemde kullanılan moleküllere ise antioksidanlar denilmektedir.

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler:

1) Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni moleküle çevirme **toplayıcı etkidir**. Antioksidan enzimler, trakeobronşiyal mukus ve küçük moleküller bu tip etki gösterirler.

2) Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme **bastırıcı etkidir**. Vitaminler, flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.

3) Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki **zincir kırıcı etkidir**. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.

4) Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması **onarıcı etkidir**.(77)

Antioksidanlar, endojen kaynaklı veya eksojen kaynaklı olabilirler.

#### **Endojen antioksidanlar**

Endojen antioksidanlar, enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar.

**Enzim olan endojen antioksidanlar** şunlardır: 1) Süperoksit dismutaz (SOD). 2) Glutatyon peroksidaz (GSH-Px). 3) Glutatyon S-Transferazlar (GST). 4) Katalaz (CAT). 5) Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi. 6) Hidroperoksidaz.

**Enzim olmayan endojen antioksidanlar** şunlardır: 1) Melatonin. 2) Seruloplazmin. 3) Transferrin. 4) Miyogloblin. 5) Hemogloblin. 6) Ferritin. 7) Bilirubin. 8) Glutatyon. 9) Sistein. 10) Metiyonin. 11) Ürat. 12) Laktoferrin. 13) Albümin.

#### **Eksojen antioksidanlar**

Eksojen antioksidanlar, vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanları olmak üzere sınıflandırılabilirler.

**Vitamin eksojen antioksidanlar** şunlardır: 1)  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E). 2)  $\beta$ -karoten. 3) Askorbik asit (vitamin C). 4) Folik asit (folat).

**İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar** şunlardır: 1) Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten). 2) NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestetikler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflatuvar ilaçlar, diphenyline idonium). 3) Rekombinant süperoksit dismutaz. 4) Trolox-C (vitamin E analogu). 5) Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GSH-Px aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein). 6) Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin). 7) Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin). 8) Nötrofil adezyon inhibitörleri. 9) Sitokinler (TNF ve IL-1). 10) Barbitüratlar. 11) Demir şelatörleri.

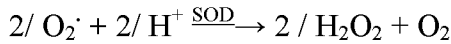


**Gıdalardaki eksojen antioksidanlar** şunlardır: 1) Butylated hydroxytoluene (BHT). 2) Butylated hydroxyanisole (BHA). 3) Sodium benzoate. 4) Ethoxyquin. 5) Propylgalate. 6) Fe-süperoksit dismutaz.

### 2.6.1.Süperoksit Dismutaz (SOD)

Mc Cord ve Fridovich tarafından 1968'de keşfedilmiştir. 3 tür SOD vardır. Birincisi mitokondride lokalize Mn-SOD, ikincisi sitozolde lokalize Cu-Zn SOD ve üçüncüsü de Cu içeren ve plazmadaki süperoksit radikallerini metabolize eden vasküler endotele bağlı Cu-SOD'dur.(78–79)

SOD enzimi, süperoksit radikalini dismutasyona uğratarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlar. Organizmada substrat olarak serbest radikal kullanan tek enzim SOD'dur.(80)



### 2.6.2. Katalaz

Sumer ve Dounce tarafından 1937'de kristalize halde saflaştırıldı. Her biri bir prostetik grup olan ve yapısında Fe<sup>+3</sup> bulduran 4 hem grubundan oluşmuş bir hemoproteindir. (78–79)

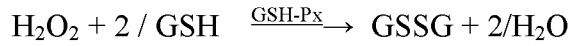
Katalaz esas olarak mitokondri ve peroksizomlarda bulunmaktadır. Ayrıca sitoplazma ve endoplazmik retikulumda da aktivitesi vardır. CAT organizmayı H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin zararlı etkilerinde koruyan en önemli enzimlerden biridir.H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin konsantrasyonunun aşırı arttığı ortamda aktivite gösterir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 'nin düşük konsantrasyonunda (glutasyon peroksidaz gibi) diğer enzimler devreye girer(81).En yüksek CAT aktivitesi karaciğer ve böbrekte saptanırken en az aktivite ise desdek dokusunda gözlenir. İki tane H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> molekülünü iki H<sub>2</sub>O ve bir O<sub>2</sub>'ye dönüştürerek antioksidan etkisini gösterir.(82)



### 2.6.3.Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) sitozolde bulunup 4 selenyum atomu içerir ve tetramerik yapıdadır.(83)Redükte glutasyonu yükseltirken H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i de suya

çevirir. Böylece membran lipidlerini ve hemoglobini oksidan strese karşı korur.(84–79)



Fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidaz (PLGSH-Px), membrana bağlı en önemli antioksidan olan vitamin E yetersiz olduğunda membranı peroksidasyona karşı korur. GSH-Px'ın fagositik hücrelerde de önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini önler.

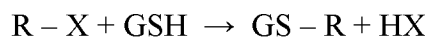
GSH-Px, eritrositlerde oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır. Eritrosit GSH-Px aktivitesi yaşlılarda ve Down sendromlu hastalarda yüksek, prematürelere ise düşük bulunmuştur.

#### **2.6.4. Glutasyon Redüktaz**

Glutasyon redüktaz, GSH-Px vasıtasıyla hidroperoksitlerin indirgenmesi sonucu oluşan okside glutasyonun (GSSG) tekrar indirgenmiş glutatyona (GSH) dönüşümünü katalize eder.(83) İki subünitten oluşmuş bir dimerdir. Her bir subünit 3 tane yapısal alan içerir. Bunlar NADPH bağlayan alan, FAD bağlayan alan ve ara yüz alandır. Okside glutasyonun, bir subünitin FAD alanı ve diğer subünitin arayüz alanından oluşan bir bağlanma bölgesi vardır.(78–79)

#### **2.6.5. Glutasyon S-Transferazlar (GST)**

GST, dimerik yapıda olup sitozolde bulunur. Çok sayıda izoenzimi vardır. Yabancı maddelerin biyotransformasyonunda önemli rolü olan GST, çeşitli endojen bileşiklerin GSH ile konjugasyonunu kataliz eder.(80)



GST; katalitik ve katalitik olmayan çok sayıda fonksiyona sahiptir. Hem detoksifikasyon yapar hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolü vardır. Aynı zamanda GST, karaciğerde sitokrom P450 enzim sistemi tarafından reaktif ara ürünlere dönüştürülen yabancı maddelerin daha az reaktif konjugatlara dönüşümünü katalizler.(83)

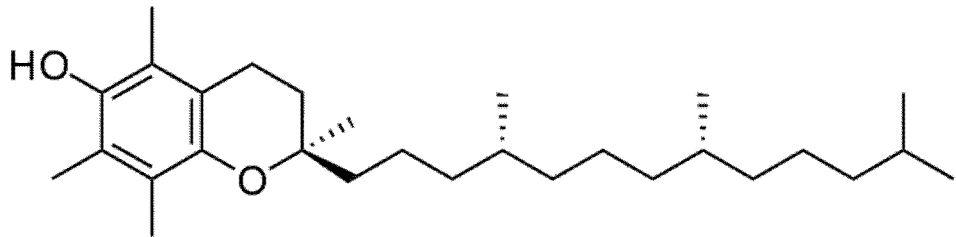
### 2.6.6. Mitokondriyal sitokrom oksidaz

Mitokondriyal sitokrom oksidaz solunum zincirinin son enzimidir ve süperoksidi ( $O_2\cdot^-$ ) detoksifiye eder. Bu reaksiyon fizyolojik şartlarda sürekli cereyan eden normal bir reaksiyondur, bu yolla yakıt maddelerinin oksidasyonu tamamlanır ve bol miktarda enerji üretimi (ATP) sağlanır. Ancak çoğu zaman süperoksit ( $O_2\cdot^-$ ) üretimi mitokondriyal sitokrom oksidaz enziminin kapasitesini aşar ve bu durumda diğer antioksidan enzimler devreye girerek süperoksidin ( $O_2\cdot^-$ ) zararlı etkilerine engel olurlar.

### 2.6.7. Vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol)

İlk olarak Evans tarafından 1938 yılında bulunmuştur. Yağda çözünen vitamin olduğu için hem sellüler hem de subsellüler membranlarda ve lipoproteinlerde bulunur. Membranlarda oksijen radikallerinin ana temizleyicisidir. E vitamini içinde alfa, beta, gama ve delta tokoferoller bulunur. Bunların içinden özellikle  $\alpha$ -tokoferol önemli bir antioksidandır. En aktif formu ve antioksidan aktivitesi en yüksek olan  $\alpha$ -tokoferol'dür. Yapısında bulunan fenol halkasındaki hidroksil grubu, molekülün antioksidan özelliğini sağlayan aktif kısmını oluşturur.(79)

Bitkisel yağ ve tohumlar, E vitamininden zengin kaynaklardır.(80) Vitamin E, çok güçlü bir antioksidan olup hücre membran fosfolipidlerinde bulunan poliansatüre yağ asitlerini serbest radikal etkisinden koruyan ilk savunma hattını oluşturur. Vitamin E, süperoksit radikalini ve hidroksil radikalini, singlet oksijeni, lipid peroksit radikallerini ve diğer radikalleri indirger. Vitamin E, zincir kırıcı antioksidan olarak bilinir. Lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonu, vitamin E vasıtasıyla sonlandırılabilir. Vitamin E okside olduktan sonra ve parçalanmadan önce askorbik asit ve glutatyon tarafından yeniden indirgenebilmektedir.(83)



**Formül 2. 2: $\alpha$ -TOKOFEROL' ÜN AÇIK FORMÜLÜ**

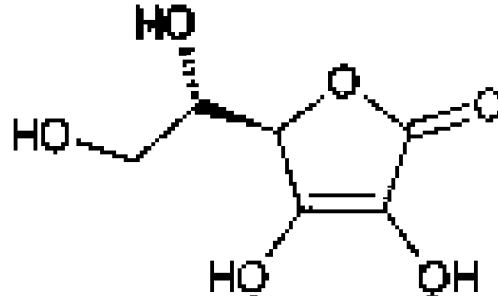
### 2.6.8. Vitamin C (askorbik asit)

C vitamini olarak bilinen askorbik asit kapalı formülü  $C_6H_8O_6$  olan bir ketolaktondur. Suda eriyebilen, insanlarda sentez edilmediği için besinlerle alınması gereken güçlü bir antioksidan moleküldür. Yeşil renkli taze sebze meyve ve turunçgillerde bol miktarda bulunur. İnce bağırsaklardan kolayca emilir. Plazma konsantrasyonu 0,1 mM 'dir. C vitamini omurilik, akciğer ve göz gibi pek çok hayvansal dokunun sulu bölümlerinde oldukça yüksek yoğunlukta (milimolar ve üstü) bulunur. (80–85)

Askorbik asit oksijen tutma özelliğine sahip olması nedeniyle antioksidan olarak kullanılır. Yağların ve yağlı besinlerin uzun süre saklanabilmesi, beyaz renkteki sebze ve meyvelerin kararmasının önlenmesi için kullanılır. Ayrıca çabuk soğutularak dondurulmuş meyveler erime sırasında doğal renk ve kokularını yitirir. Bunlara dondurmadan önce saf askorbik asit katmakla bu sakıncalar önenebilmektedir. Oksijen hoş gitmeyen değişiklikleri yapmadan önce askorbik asit tarafından tutulur.

Süperoksit ve hidroksil radikalleriyle reaksiyona girip onları temizleyen bir antioksidan olmasının yanı sıra tokoferoksil radikalinin tekrar tokoferole dönüşmesini sağlar.(79)

Askorbik asit antioksidan etkisinin yanında oksidan etki de gösterir. Demir ve bakır tuzlarının askorbattan  $H_2O_2$  ve hidroksil radikallerinin oluşumunu desteklediği iyi bilinir ki bu muhtemelen onun bazı koşullarda sitotoksik olabilmesi veya prooksidan olarak davranmasıyla ilgilidir. Askorbik asit proteine bağlı ferri demiri uzaklaştırarak ya da doğrudan ferri demiri indirgeyerek Fenton reaksiyonunda hidrojen peroksit ile etkileşmeye ve sonunda hidroksil radikali ( $OH\bullet$ ) oluşturmaya uygun ferro demire dönüştürür. Bu özelliğinden dolayı vitamin C, serbest radikal reaksiyonlarının önemli bir katalisti veya bir prooksidan olarak değerlendirilir. Ancak bu tip etkisinin sadece düşük konsantrasyonlarda (0,2mM'dan az) görüldüğü, yüksek konsantrasyonlarda güçlü bir antioksidan olarak etki ettiği kaydedilmiştir. (86)



**Formül 2. 3:ASKORBİK ASİT'İN AÇIK FORMÜLÜ**

### 2.6.9. Karotenoidler

Karotenoid bitkilerde ve bazı diğer fotosentetik mikroorganizmalarda (yosunlar, bazı mantarlar ve bazı bakterilerde) bulunan pigmenttir. Altı yüzün üzerinde bilinen karotenoid vardır. Karotenoidlerin pek çok fizyolojik işlevi vardır. Yapıları gereği serbest radikalleri etkili bir şekilde bertaraf ederler ve bağışıklık sistemini güçlendirirler. Epidemiyolojik çalışmalarda diyetinde ve kan plazmasında yüksek oranda beta-karoten bulunan kişilerde akciğer kanser riskinin anlamlı derecede azaldığı bulunmuştur. Öte yandan sigara kullananların yüksek dozda beta-karoten kullanmasının kanser riskini artırdığı bulunmuştur. Bir olasılıkla aşırı miktarda beta-karotenin yıkım ürünleri plazmadaki A vitaminini azaltıp, sigara dumanının neden olduğu akciğer hücrelerindeki çoğalmayı kötüleştirmektedir. (87)

Vitamin A'nın ön maddesi olan  $\beta$ -karoten singlet oksijeni bastırabildiği, süperoksit radikalini temizlediği ve peroksit radikalleriyle direkt olarak etkileşip antioksidan işlev gördüğü saptanmıştır.(83)

### 2.6.10.Glutatyon (GSH)

Glutatyon (GSH) karaciğerde genetik bilgiye ihtiyaç olmadan glisin, sistein ve glutamat amino asitlerinden sentezlenebilen bir tripeptittir. Glutatyon (GSH) çok önemli bir antioksidandır, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde rol alır. Ayrıca proteinlerdeki sülfhidril (-SH) gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur, böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. Glutatyon (GSH)

yabancı bileşiklerin detoksifikasyonu ve amino asitlerin membranlardan transportunu da sağlar. Glutasyon (GSH) eritrositleri, lökositleri ve göz lensini oksidatif strese karşı korumada hayati öneme sahiptir.

#### **2.6.11.Melatonin**

Melatonin en zararlı serbest radikal olan hidroksil serbest radikalini ( $\text{OH}\cdot$ ) ortadan kaldıran çok güçlü bir antioksidandır, günümüze kadar bilinen antioksidanların en güçlüsü olarak kabul edilmektedir. Melatonin serbest hidroksil radikali ( $\text{OH}\cdot$ ) ile reaksiyona girdikten sonra bir indolil katyon radikaline dönüşür ki bunun da ortamdaki süperoksit radikalini ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) tutarak antioksidan aktivite gösterdiği kaydedilmiştir. Melatoninin antioksidan olarak diğer bir özelliği lipofilik olmasıdır, hücrenin bütün organallerine ve hücre çekirdeğine ulaşabilir ve böylece çok geniş bir dağılımda antioksidan aktivite gösterir. Serbest oksijen radikalleri oluşturmak suretiyle kansere sebep olan safrolün DNA üzerine hasar oluşturucu etkisinin, melatonin tarafından çok etkili şekilde inhibe edildiği gösterilmiştir. Melatonin kanserin ilerleme ve gelişme safhalarını geciktirir. Yaşlanma ile birlikte melatonin üretimi de azalır ki bunun da yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı hastalıkların patogeneğinde önemli rolü olabileceği kaydedilmiştir.

#### **2.6.12.Ürat**

Normal plazma konsantrasyonunda ürat, hidroksil, süperoksit, peroksit radikalleri ve singlet oksijeni temizler. Fakat lipid radikalleri üzerine etkisi yoktur. Ayrıca vitamin C oksidasyonunu engelleyici etkisi vardır.

#### **2.6.13.Bilirubin**

Bilirubin süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısıdır.

#### **2.6.14.Albümin**

Albümin LOOH ve HOCl toplayıcısıdır.

#### **2.6.15.Seruloplazmin**

Seruloplazmin olasılıkla SOD'a benzer mekanizmayla etki gösterir. Ferro demiri ( $\text{Fe}^{+2}$ ) ferri demire ( $\text{Fe}^{+3}$ ) yükseltgeyerek Fenton reaksiyonunu ve böylece hidroksil radikali oluşumunu inhibe eder.

#### **2.6.16.Transferrin ve Laktoferrin**

Transferrin ve laktoferrin dolaşımdaki serbest demiri bağlarlar.

### **2.6.17.Ferritin**

Ferritin dokudaki demiri bağlar.

### **2.6.18.Sistein**

Sistein süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısıdır.

### **2.6.19.Ebselen**

Ebselen selenyumlu bir bileşiktir. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesini güçlendirir ve lipoksijenaz yolunu inhibe eder.

### **2.6.20.Sitokinler**

Sitokinler başta katalaz olmak üzere antioksidan enzimleri aktive ederler. Ancak proteolitik enzimleri aktive ettiklerinden dolayı zararlı da olabilirler.

### **2.6.21.Demir şelatörleri**

Demir şelatörleri hücre içine girerek serbest demiri bağlamak suretiyle onu etkisizleştirirler, böylece Fenton reaksiyonunu ve sonuçta hidroksil radikali oluşumunu inhibe ederler. Bu özelliklerinden dolayı reperfüzyonda kullanılmalarının faydalı olduğu kaydedilmiştir.

### **2.6.22.Desferroksamin**

Desferroksamin serbest  $Fe^{+3}$ 'ü bağlar.

### **2.6.23.Oksipürinol**

Oksipüranol allopürinolün metabolitidir, doğrudan hidroksil radikali ve hipokloriti azaltıcı yönde etki eder.

### **2.6.24.Mannitol**

Mannitol hidroksil radikalini toplayıcı etki gösterir.

### **2.6.25.Probukol**

Probukol kan kolesterolünü düşürmede kullanılır. Lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonunu kırıcı etkisi vardır.

## **2.7. Oksidatif Stres**

Fizyolojik koşullarda serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma sistemi bir denge halindedir. Bu dengenin serbest radikal tarafına kaymasıyla hücre organelleri ve membrandaki lipid ve protein yapısı bozulur, hücre içi enzimler inaktifleşir, DNA hasarı oluşur, mitokondrillerdeki aerobik solunum bozulur, litik enzimler aktive olur, hücreden  $K^+$  kaybı artar, damar geçirgenliği bozulur, ekstraselüler kollajen doku komponentleri yıkılır, trombosit agregasyonu ve dokulara

fagositlerin göçü artar. Organizmadaki tüm bu fonksiyonel ve yapısal değişikliklere oksidatif stres denir. Oksidatif stresin kanser ve ateroskleroz başta olmak üzere pek çok hastalığa yol açmasının yanında pek çok hastalık ve fizyolojik durum da oksidatif strese yol açabilir. Hipertansiyon, diabetes mellitus ve osteoporoz gibi patolojilerde oksidatif stresin arttığı rapor edilmiştir. Ayrıca son zamanlarda hamilelik gibi fizyolojik durumlarda da oksidatif stresin arttığı bildirilmiştir. Hamileliğin özellikle meme, uterus ve over kanserlerine karşı koruyucu özelliğinin bilinmesinin yanında bir takım hormonal değişiklikler ile oksidatif strese yol açabileceği de düşünülmektedir(74–88–89)

## **2.7.1 Oksidatif Stres Parametreleri**

### **2.7.1.1. Nitrik Oksit (NO)**

1980 yılında Furchgott ve Zawadski asetil kolin uyarısıyla endotel hücrelerinde yapılan damar düz kasını gevşetici bir madde bildirdiler. Bu maddeye endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF: Endotel Derived Relaxing Factor) adı verildi. 1987 yılında Palmer ve arkadaşları EDRF'nin bilinen biyolojik etkilerinde nitrik oksit (NO) adlı bir gazın sorumlu olduğunu buldular.(90–91)

Nitrik oksit, nitrik oksit sentaz (NOS) olarak bilinen sitozolik bir enzimin aktivitesi ile oluşur.(92–76) NO renksiz bir gaz olup oksijen yokluğunda oldukça stabildir. Fakat hava ile temas durumunda hızla oksijenle reaksiyona girerek nitrojen dioksit ( $\text{NO}_2$ ) dönüşür. Nitrojen dioksit doku hasarı yapabilecek toksik bir gazdır.(91–93)

NO bazı durumlarda bir antioksidan gibi davranır ve lipid peroksidasyonuna karşı koruma sağlar. Bununla birlikte süperoksit düzeylerinin arttığı durumlarda süperoksitle reaksiyona girer ve bir prooksidan olan peroksinitrit oluşturur.(79–92)

NO, sinyal iletimi ile görevli birkaç gazdan biridir. Aynı zamanda çok reaktif bir bileşik olup membranlardan hızlıca diffüzyona uğramaktadır. Birkaç saniyelik yarı ömrü vardır. Damarın iç endotel tabakası, NO sinyaliyle kendisini kuşatan damar düz kasını gevşetir. Böylece vazodilatasyon ve kan akımı artar.

NO; damar düz kasının kasılmasını, büyümesini, kan pulcuğu kümelenmesini ve endotele akyuvar yapışmasını inhibe ederek damar homeostazisinde önemli bir yer edinmektedir. Ayrıca insanda immün yanıtın bir bileşeni olarak makrofaj ve nötrofillerde de üretilmektedir. (94)



### 2.7.1.2. Malondialdehid (MDA)

Lipid peroksidasyonu, membranda bulunan (fosfolipid, glikolipid, gliserid ve sterol yapısında yer alan) poliansatüre yağ asitlerinin, serbest oksijen radikalleri tarafından peroksitler, alkoller, aldehidler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur. Lipid hidroperoksitlerinin yıkımı ile oluşan ve biyolojik olarak aktif olan aldehidler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler ya da başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar.(95–96) Serbest oksijen radikallerin başlattığı lipid peroksidasyon zincir reaksiyonu sonucunda lipid hidroperoksitleri (LOOH) ve konjuge dienler oluşur. Lipid hidroperoksitleri (LOOH) ve konjuge dienler de daha sonra alkan aldehitler, alken aldehitler, hidroksialken aldehitler, malondialdehit (MDA) ve uçucu hidrokarbonlar oluşturmak üzere parçalanırlar.

Serbest radikal üretimi artışının belirlenmesi için lipid hidroperoksitlerinin (LOOH) ölçümü, konjuge dienlerin ölçümü, MDA dışındaki aldehitlerin ölçümü, uçucu hidrokarbonların ölçümü, lipid peroksidasyonu fluoresan ürünlerinin ölçümü ve malondialdehit (MDA) ölçümü yapılabilir. Her bir tekniğin kendine göre zorlukları vardır ve hiçbir metodun lipid peroksidasyonunu tam bir doğrulukta ölçtüğü söylenemez. Ayrıca, oluşan ürünlerin miktarı çeşitli faktörlerden etkilenebildiğinden bir tek ürün yerine birden fazla ürünü ölçmek idealdir.

**Lipid hidroperoksitlerinin (LOOH) ölçümü** çeşitli tekniklerle plazmada yapılır. Bu tekniklerden biri, hassas olmakla birlikte pahalı bir teknik olan gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) tekniğidir.

Plazma lipid hidroperoksitlerinin (LOOH) ölçümü ticari olarak mevcut kitlerle de yapılabilir. Ancak bu ölçümlerin sonuçları diğer metotların sonuçlarıyla iyi bir korelasyon göstermemektedir.

**Konjuge dienlerin ölçümü** biyolojik materyallerde hem proteinleri gibi bazı maddelerin varlığından dolayı zordur. Ayrıca normalde insan plazmasında mevcut olan düşük düzeylerdeki konjuge dienler de ölçümü zorlaştırırlar.

**MDA dışındaki aldehitlerin ölçümü** genellikle zaman alıcı, pahalı ve rutin olarak kullanılmaya uygun olmayan metotları gerektirir.

**Uçucu hidrokarbonların ölçümü** flame iyonizasyon dedektörlü gaz kromatografisi yöntemiyle, dışarı verilen solunum havasında yapılır. Yöntem

oldukça hassastır ve olgulardan tekrar tekrar numune alınabilme avantajı vardır, fakat zaman alıcı ve pahalıdır. Ayrıca sigara dumanı ve egzoz gazı gibi eksojen kaynaklardan hidrokarbon kontaminasyonu riski vardır.

**Lipid peroksidasyonu fluoresan ürünlerinin ölçümü** peroksidasyonun geç aşamasını yansıtır ve her laboratuvarında uygulanması zordur.

**Malondialdehit (MDA) ölçümü** lipid peroksidasyonunun derecesinin belirlenmesi için en sık başvurulan testtir. MDA ölçümü en yaygın olarak tiyobarbitürik asit (TBA) yöntemiyle yapılır. Bazı deneysel sistemlerde TBA yönteminin esas olarak MDA'nın kendisini ölçtüğü gösterilmiştir. Ancak çoğu sistemde bu test MDA için spesifik olmadığından tiyobarbitürik asit ile reaksiyon veren maddelerin (TBARS) ölçümü şeklinde ifade edilir. Saf lipidlerle yapılan çalışmalar ve hayvanlar üzerinde yapılan denemeler, TBARS ölçümü ile lipid peroksidasyonunu ölçen diğer metotlar arasında iyi bir korelasyon olduğunu göstermiştir.

TBARS ölçümü çok basit ve hızlı olmakla birlikte biyolojik materyallere uygulanmasında çeşitli problemler vardır. Numunede mevcut ya da reaksiyon sırasında açığa çıkan pigmentler kolorimetrik ölçümü interfere edebilirler. Ayrıca MDA dışındaki aldehitler de tiyobarbitürik asitle (TBA) renkli kompleks oluşturmak üzere reaksiyona girebilirler.

Serbest MDA'nın direkt tayini en güvenilir şekilde yüksek performans likit kromatografisi (HPLC) yöntemiyle yapılır. HPLC çok hassas ve hızlı bir metottur ve az numune gerektirir. Fakat teknik çok dikkatli numune hazırlığı gerektirir.(79-97)

### **2.7.1.3. Protein karbonil (PCO)**

Proteinlerin; reaktif oksijen türleri veya oksidatif stresin sekonder ürünleri ile reaksiyonu, karbonil gruplarına sahip peptit fragmanları veya protein türevlerinin oluşumuna neden olabilir. Karbonil gruplarının oluşumu birkaç mekanizma ile gerçekleşebilmektedir.

1. Proteinlerin; reaktif oksijen türleri tarafından okside edilmesi aracılığıyla peptit bağlarının yıkılması sonucu karbonil grupları ortaya çıkabilir.

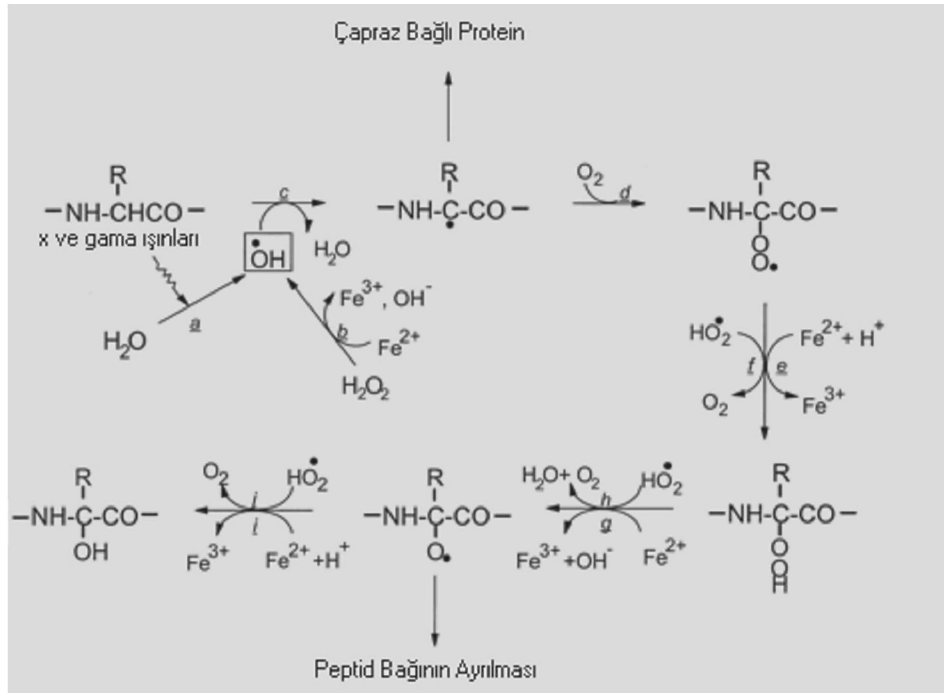
2. Metal kataliz aracılı oksidasyon sistemleri ile bazı proteinlerin amino asit rezidülerinin yan zincirlerinin oksidasyonu sonucu da karbonil grupları ortaya çıkabilmektedir.(98-99)

3. Reaktif karbonil grubu içeren proteinler aynı zamanda, indirgeyici şekerler veya onların oksidasyon ürünleri ile proteinlerin lizin rezidülerinin primer amino gruplarının sekonder reaksiyonları sonucu oluşabilir.(99–100)

Protein oksidasyonu reaksiyonları ilk defa Swallow (101), Garrison(102) ile Shuessler ve Schilling (103) adlı araştırmacıların çalışmalarıyla aydınlatılmaya başlanmıştır. Bu araştırmacılar protein oksidasyonuna yol açan ana mekanizmanın polipeptid omurgasındaki çeşitli amino asitlerin  $\alpha$ -karbon atomlarından OH. (hidroksil) radikalinin etkisiyle hidrojen atomunun çıkarılması sonucunda başladığını saptamışlardır

Protein oksidasyonu XX. yüzyılın ortalarından beri araştırılmış olmakla birlikte bu reaksiyonların ürünlerinin in vivo oksidatif hasarın spesifik, genel markırları olarak kullanılması ancak son yıllarda gerçekleşmiştir. Bunun nedeni oluşan ürünlerin yapısının bilinmemesi ve bu ürünleri biyolojik materyalde saptayacak duyarlı metodların mevcut olmamasıdır. Protein oksidasyonunun protein karbonil (PCO) gibi markırlarının in vivo protein oksidasyonunun derecesini gösterecek bir araç olarak kullanılması ise nispeten daha uzun bir geçmişe dayanmaktadır.(98–105)

Proteinlerin reaktif türevleri tarafından oksidatif modifikasyonu bir dizi bozukluğun ve hastalığın etyolojisi veya ilerlemesinde rol oynar. Proteinlerin oksidasyonu aromatik amino asit bakiyelerinin nitratlaşmasına, tiyol gruplarının oksidasyonuna, ileri oksidasyon protein ürünlerinin oluşmasına ve bazı amino asit bakiyelerinin karbonil türevlerine dönüşümüne yol açar. (104–105)



### 2.7.2. Antioksidan aktivitenin ölçülmesi

Oksidatif stres çalışmalarında, organizmada antioksidan savunma sistemlerinin yetersizliğini araştırmak için çeşitli biyolojik materyalde çeşitli antioksidanların aktiviteleri veya konsantrasyonları sıklıkla ölçülmektedir. Enzim olan ve enzim olmayan birçok antioksidan çeşitli yöntemlerle ölçülmektedir.

**Redükte glutatyon (GSH) ölçümü** eritrositlerde, kolorimetrik yöntemle yapılır. Bunun için EDTA'lı veya heparinli tam kan alınır. Tam kan, 4 C° 'de 1 gün stabildir.

**Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesi ölçümü** eritrositlerde, UV yöntemle yapılır. Bunun için EDTA'lı tam kan alınır. Tam kan, 4 C° 'de 20 gün stabildir.

**Glutatyon redüktaz aktivitesi ölçümü** eritrositlerde, kolorimetrik yöntemle yapılır. Bunun için EDTA'lı veya heparinli tam kan alınır. Tam kan, 4 C° 'de 20 gün stabildir.

**Glutatyon S-tansferaz aktivitesi ölçümü** için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır

**Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ölçümü** eritrositlerde, kolorimetrik yöntemle yapılır. Bunun için EDTA'lı veya heparinli tam kan alınır.

**Katalaz aktivitesi ölçümü** eritrositlerde, titrimetrik yöntemle yapılır. Bunun için EDTA'lı veya heparinli tam kan alınır.

**$\beta$ - karoten ölçümü** serumda, HPLC ile yapılır. Işıktan korunmalıdır ve serum hemolizli olmamalıdır.  $-70\text{ C}^\circ$  'de yıllarca stabildir.

**Vitamin C (askorbik asit) ölçümü** oksalatlı, EDTA'lı veya heparinli plazmada, serumda, lökositlerde kolorimetrik yöntemle ve HPLC ile yapılabilir. Plazma ve serum hemolizli olmamalı, lökositler eritrositlerle kontamine olmamalıdır.

**Vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol) ölçümü** serum veya heparinli plazmada, HPLC ile yapılır. Numune açlık fazında alınmalı ve ışıktan korunmalıdır.

**Melatonin ölçümü plazmada** ELİSA yöntemiyle yapılmaktadır.

## **2.8. Biyokimyasal Parametreler**

### **2.8.1. Aspartat Aminotransferaz (AST, SGOT)**

Aspartat aminotransferaz (EC numarası: 2.6.1.1.) amino asit katabolizması sırasında amino gruplarını glutamattan oksaloasetata transfer eder. AST'nin çok yaygın bir doku dağılımı vardır. Bütün vücut dokularında bulunmakla beraber kalpte, karaciğerde ve kas dokusunda en yüksek konsantrasyonda bulunur. Böbrek, pankreas ve eritrositlerde ise daha düşük konsantrasyonda bulunur.(106)

Herhangi bir nedene bağlı karaciğer hücre zedelenmesi veya hasarı, kolestatik ve obstrüktif sarılık, kronik hepatitler, kalp veya iskelet kası nekrozu veya travması, kalp veya iskelet kası inflamatuvar hastalıkları, miyokart enfaktüsü, ağır egzersiz, kalp yetmezliği, ciddi yanıklar, hipotiroidizm, intestinal obstrüksiyon, malign hipertermi ve talasemi majörde serum AST düzeyi artar. Azotemi, kronik renal diyaliz, pridoksal fosfat eksikliği durumlarında ise AST düzeyi azalır.(106)

### **2.8.2. Alanin Aminotransferaz (ALT, SGPT)**

Alanin aminotransferaz , (EC numarası: 2.6.1.2.) alanin amino grubunun  $\alpha$ -ketoglutarata transferini katalizleyerek pirüvat ve glutamat oluşumunu sağlar. ALT hücre sitoplazmasında bulunan bir enzim olup yarılanma ömrü yaklaşık 48 saattir. En çok karaciğer ve böbrek hücrelerinde bulunur. Kalp ve iskelet kasında daha az miktarda bulunur. Pankreas, akciğer ve dalakta ise oldukça düşük miktarlarda bulunmaktadır. Enzimin eritrositteki aktivitesi, serumun yaklaşık altı katıdır. Bu nedenle hemolizli nünunelerde ALT aktivitesi hemolize bağlı olarak yüksek çıkabilir.

Akut hepatit atağından sonra ALT seviyesinin yüksek kalması kronik hepatit gelişimi için yüksek risk faktörü olarak kabul edilmektedir.

Hepatit, sağ kalp yetmezliği, şiddetli şok, şiddetli travma, akut anoksi, siroz, tıkanma sarılığı, karaciğer tümörleri, musküler distrofi, preeklemsi, kas travması, yağlı karaciğer ve kronik alkol kullanımı durumları ALT seviyesinin yükselmesine neden olur.(107)

### **2.8.3. Alkalen Fosfataz (ALP)**

Alkalen fosfataz (EC numarası:3.1.3.1) bir hidrolaz enzimidir. Nükleotidler, proteinler ve alkaloidler dahil olmak üzere çeşitli moleküllerden fosfat gruplarının koparılmasını sağlar. Fosfat gruplarının koparılması sürecine defosfarilasyon denir. Adından da anlaşılacağı üzere, alkalen fosfataz en etkili alkali ortamlarda işlev görür.

Alkalen fosfataz (ALP) bütün vücut dokularında bulunan, özellikle hücre membranında yer alan bir enzimdir. En çok; bağırsak epiteli, böbrek tübül hücreleri, kemik osteoblastları, karaciğer safra kanalı hücreleri ve plesantada bulunmaktadır.

Sağlıklı kişilerin serumunda bulunan ALP aktivitesinin %95'inden fazlası karaciğer ve kemik kaynaklıdır. Normal yetişkinde kanda ölçülen ALP'nin yarısı karaciğer yarısı da kemik kökenlidir.(106)

Çocuk ve gençlerde hızlı kemik büyümesi nedeniyle normal yetişkine göre ALP değerleri 2–4 kat daha fazla olabilmektedir. Yine doğuma yakın gebelerde de plasenta tarafından sentezlendiğinden ALP değerleri yüksektir. Safra yollarındaki tıkanma sonucu ALP değerleri yükselir. Ayrıca kemik hastalıklarında da (özellikle Paget hastalığı) ALP değerleri yükselir. Pek çok ilaç da ALP düzeylerini yükseltebilir. Bu nedenle ALP yüksekliği çoğu zaman bir hastalık belirtisi olmayabilir.(106)

### **2.8.4. Gama-Glutamil Transferaz (GGT)**

Gama-Glutamil Transferaz (GGT), (EC numarası: 2.3.2.2) bir membran enzimidir. Karaciğerde (duktal ve kanalikuli hücrelerinde), böbrekte (proksimal renal tübüler epitelde), beyinde, prostatda ve pankreasta (duktal ve asiner hücrelerde) bulunur. Hücrelerde başlıca antioksidan molekül olan glutatyonun hücre dışı metabolizmasından sorumlu bir enzimdir. Yarılanma ömrü 7–10 gündür.(108)

Karaciğer ALP'sini yükselten kolestaz, hepatit, karaciğerde yer kaplayan lezyonlar ve karaciğer sirozu aynı zamanda GGT değerlerini de yükseltir. GGT, en yüksek düzeyine kolestazda çıkar.

GGT özellikle siroz, metastatik kanser ve hepatik infiltrasyonu göstermede duyarlıdır. Kronik alkolizmde serum GGT düzeyi yükselir ve bu artış alkol alınması ile paralellik gösterir.(109)

### **2.8.5. Bilirubin**

Bilirubin, insan safrasının esas pigmentini oluşturur ve altın sarısı rengini verir. Büyük oranda parçalanmış eritrositlerin hemoglobinlerinden kaynaklanır (%75). Bu yıkım retiküloendotelyal sistemde olmaktadır. Bilirubinin; glukuronik asit ve sülfürik asitle oluşturduğu esterlere konjuge (direkt) bilirubin adı verilir. Kandaki bilirubinin bir kısmı proteinle kompleks oluşturur. Buna da serbest bilirubin adı verilir. Posthepatik bilirubin, direkt bilirubin olup laboratuvar analizlerinde verilen kimyasal maddelerle direkt olarak reaksiyona girer. Prehepatik bilirubin ise indirekt bilirubin olup laboratuvar analizinde reaksiyon oluşturmak için metil alkol ilavesi gerekmektedir.

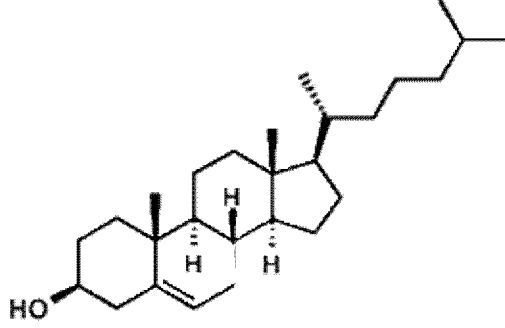
İndirekt (unkonjuge) bilirubin suda çözünmez. Kanda albumine bağlı olarak dolaşır. İndirekt bilirubin toksiktir. Kandaki seviyesi arttığında beyindeki bazal gangliyonlarda birikerek özellikle çocuklarda kernikterusa neden olabilir. Direkt (konjuge) bilirubin karaciğerde konjuge olmuş bilirubindir. Suda çözünür. Böylece safraya atılabilir. İndirekt bilirubinden daha az toksiktir. Kandaki seviyesi yükseldiğinde böbrekten süzülerek idrarla atılabilir.(110)

### **2.8.6. Kolesterol**

Kolesterol, yaşam için gerekli olan mum kıvamında yağmsı bir maddedir. Kolesterol; beyin, sinirler, kalp, bağırsaklar, kaslar, karaciğer başta olmak üzere tüm vücutta yaygın olarak bulunur.

Vücut kolesterolü kullanarak hormon (kortizon, steroid hormonu), D vitamini ve yağları sindiren safra asitlerini üretir. Bu işlemler için kanda çok az miktarda kolesterol bulunması yeterlidir. Kanda fazla miktarda kolesterolün bulunması; kan damarlarında birikmesine, kan damarlarının sertleşmesine ve daralmasına (arteriyoskleroz) yol açar.

Kolesterol, kanda normal koşullarda özünmez. Kolesterolün, kanda çözünmesi ve taşınması için karaciğerde bir protein ile birleştirilir. Kolesterol ile protein birleşimine lipoprotein adı verilir. Değişik tipte lipoproteinler vardır. Bunlar; LDL, HDL, VLDL, IDL ve şilomikronlardır.(111)



**Formül 2. 4:KOLESTEROL'ÜN AÇIK FORMÜLÜ**



### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1. Deney Hayvanlarının Temini

Çalışmamızda kullanılan Wistar albino türü erkek sıçanlar, İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Çalışmanın tüm aşamalarında İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu esaslarına uygun çalışıldı. Çalışmada kullanılan 12 haftalık 200–250 gram ağırlığındaki erkek sıçanlar deney gününe kadar standart barınma kafeslerinde tutuldu. İçme suları günlük değiştirildi ve gün aşırı kafes temizliği yapıldı. Ratlar oda sıcaklığı 24–27 C° arasında, havalandırma şartları sağlanmış, aydınlatılması 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olacak şekilde ayarlanan odalarda barındırıldılar. Sıçanlar çalışma boyunca *ad libitum* standart pellet yemle beslendi. Bir kafeste en çok 4 sıçan olacak şekilde rastgele gruplara bölündü. Ratlar 5 gruba ayrıldı. İstatistiki açıdan anlamlı sonuçların elde edilebilecek en az sayıda rat kullanılarak her gruba 7 rat alındı; TAA gruplarında kayıp olabileceği olasılığı düşünüldüğünden 1–2 adet fazla rat ayrıldı. 1. grup kontrol grubu; 7 adet rat, 2. grup TAA grubu; 9 adet rat, 3. grup 1ml/kg/gün NSY +TAA; 9 adet, 4. grup 10ml/kg/gün NSY+TAA; 8 adet, 5. grup N-Asetil sistein(NAC) +TAA; 8 adet olacak şekilde toplam 41 adet rat kullanıldı.

#### 3.2 Deney Gruplarının Oluşturulması

##### 1. Kontrol Grubu (n=7):

Bu gruptaki sıçanlara herhangi bir işlem yapılmadı diğer ratlarla aynı süre, aynı laboratuvar koşullarına tabii tutularak 6. günde karaciğer dokuları ve kan alınarak kurban edildi.

##### 2. TAA Grubu (n=9):

Bu gruptaki sıçanlara çalışmanın 1. 2. ve 3. günlerinde hiçbir müdahale yapılmazken 4. 5. ve 6. günlerinde günde 300 mg/kg/gün TAA intraperitoneal (i.p.) olarak enjekte edildi ve çalışmadaki TAA enjekte edilen 2, 3, 4 ve 5. gruptaki tüm ratlarda hipoglisemi oluşumunu engellemek için TAA enjeksiyonundan yarım saat sonra 10ml/kg % 5 lik dekstroz çözeltisi i.p. olarak enjekte edildi. 6. günde karaciğer dokuları ve kan alınarak kurban edildi. Çalışma 7 adet ratla sonlandırıldı.

##### 3. 1ml/kg/gün NSY +TAA Grubu (n=9):

Bu gruptaki sıçanlara 1. 2. ve 3. günde 1ml/kg/gün NSY gavajla oral olarak verildi 4. 5. ve 6. günlerde 1ml/kg/gün NSY' den sonra 300 mg/kg/gün TAA i.p.

olarak enjekte edildi. 6. günde karaciğer dokuları ve kan alınarak sakrifiye edildi. Çalışma 6 adet ratla sonlandırıldı.

#### **4. 10ml/kg/gün NSY + TAA Grubu (n=8):**

Bu gruptaki sıçanlara 1. 2.ve 3. günde 10ml/kg/gün NSY gavajla oral olarak verildi 4. 5. ve 6. günlerde 10ml/kg/gün NSY' den sonra 300 mg/kg/gün TAA i.p. olarak enjekte edildi. 6. günde karaciğer dokuları ve kan alınarak sakrifiye edildi. Çalışma 8 adet ratla sonlandırıldı.

#### **5. N-Asetil sistein + TAA Grubu (n=8):**

Bu gruptaki sıçanlara 1. 2.ve 3. günde 50 ml/kg/gün NAC i.p. enjekte edildi. 4. 5. ve 6. günlerde 50 ml/kg/gün NAC dan sonra 300 mg/kg/gün TAA i.p. olarak enjekte edildi . 6. günde karaciğer dokuları ve kan alınarak sakrifiye edildi. Çalışma 8 adet ratla sonlandırıldı.

#### **3.3. NAC, TAA VE NSY Uygulaması**

NAC ve etanol içerisinde çözülmüş TAA uygulaması 100 ünitelik (1 mililitrelik) insülin enjektörü ile intra peritoneal yapıldı.

NSY uygulamasında ratlar baş ve boyunlarından tutularak gavajla oral olarak verildi.

#### **3.4. Kan ve Karaciğer Dokularının Elde Edilmesi ve Analizlere Hazırlanması**

Çalışmanın 6. gününde 5 mg/kg xylazine ile 50 mg/kg ketamin kokteyli i.p. uygulanarak genel anestezi altında sıçanların karın derisi bistüri yardımıyla açıldı. Duodenum üst uçtan asılarak abdominal vena kava inferior görünür hale getirildi. 5 ml'lik enjektörlerle sıçanların kanları alındı. Alınan kan örnekleri 3000×g'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen serum tüplere aktarıldı. Sonrasında sıçanlardan alınan karaciğer dokusunun bir parçası patolojik incelemeler için %10 formaldehid içerisinde fikse edilerek saklandı. Diğer parçası ise ikiye ayrılarak hemen alüminyum folyoya sarılıp grup numaraları belirtilerek plastik kaplara konuldu. Sonra tüm numuneler -70 C° dereceye ayarlı derin dondurucuda biyokimyasal testlerin yapılacağı güne kadar saklandı.

#### **3.5. Kan ve karaciğer dokularının analizlere hazırlanması**

Deneyden bir gün önce derin dondurucudan çıkarılan karaciğer dokularının bir kısmı MPO ve hidroksprolin analizi için tekrar derin dondurucuya kaldırıldı ve

bir kısmı da bir gece süreyle buzdolabında (+4 C°) bekletilerek buzlarının çözülmesi sağlandı. Ertesi gün karaciğer dokuları soğuk SF ile yıkandı. Kurutma kâğıdı ile kurulan dokular sonra tartılarak her bir örneğin yaş doku ağırlığı kayıt edildi. Homojenizasyon öncesi bistüri yardımıyla yaklaşık 0,3–0,5 gram ağırlığında küçük parçalara ayrılan doku örnekleri, içi buz dolu taşıma kaplarına yerleştirilmiş cam tüplere aktarılarak soğukluğu muhafaza edildi. Daha önce ikiye ayrılmış olan dokuların bir bölümünün üzerine soğuk 2 ml Tris-HCl tamponu (pH:7.4 , 0.2 mM) eklenerek homojenizatörde 16000 devir/dakika hızda 2 dakika süreyle homojenize edildi. Homojenat üzerine 1 ml daha tampon ilave edildi ve 1 dakika süreyle tekrar homojenize edilerek süre 3 dakikaya tamamlandı. Homojenat vortekslenildikten sonra ependorf tüplere aktarıldı ve bu homojenatlarda TBARS, PC ve protein tayinleri yapıldı. Homojenatların bir bölümü, 1 saat süreyle 2200 g'de +4 C° soğutmali santrifüjde santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Ayrılan süpernatantlar SOD, CAT, GSH-Px ve protein tayinlerinde kullanıldı.

### **3.6. Karaciğer dokusunda yapılan analizler**

#### **3.6.1. Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivite tayini**

**Kullanılan Reaktifler:** Substrat solüsyonu [0,3 mmol/L ksantin, 0,6 mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA, 150 µmol/L NBT (Nitro blue tetrazolium), 400 mmol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1 g/L sığır serum albümini (BSA)], ksantin oksidaz (XO:167 U/L), 2M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,8 mmol/L CuCl<sub>2</sub>.

**Deneyin prensibi:** Süperoksit dismutaz aktivitesi Sun ve arkadaşları tarafından tanımlanan (113), Durak ve arkadaşları tarafından modifiye edilen (114) NBT indirgeme yöntemiyle çalışıldı. Bu metotta, ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksit radikalleri NBT'yi indirgeyerek renkli formazon oluşturur. Bu kompleks 560 nm'de maksimum absorbans verir. Enzimin olmadığı ortamda meydana gelen indirgenme mavi-mor renk oluşturmaktadır. Ortamda SOD olduğunda ise NBT indirgenmesi tam olmayıp enzim miktar ve aktivitesine bağlı olarak açık renk oluşmakta, buradan aktivite hesabı yapılabilmektedir.

Bir SOD ünitesi; NBT redüksiyonunu %50 oranında inhibe eden enzim aktivitesidir.

**Deneyin yapılışı:** Daha önce elde edilen homojenat süpernatantının bir kısmı 1/1 (v/v) oranında kloroform/etanol (3/5, v/v) karışımı içinde vortekslenip 1 saat

süreyle 2200 g' de soğutmalı santrifüjde santrifüj edildi. Üstte oluşan etanol fazından SOD enzim aktivite tayini yapıldı.

|                            | Kör      | Numune   |
|----------------------------|----------|----------|
| Substrat solüsyonu         | 2.85 ml  | 2.85 ml  |
| Kloroform-Etanol Ekstraktı | -        | 0.100 ml |
| Bidistile su               | 0.100 ml | -        |
| XO (167 U/l)               | 0.050 ml | 0.050 ml |

25 C° de 20 dakika inkübasyon süresi başlatıldı.

|                   |      |      |
|-------------------|------|------|
| CuCl <sub>2</sub> | 1 ml | 1 ml |
|-------------------|------|------|

Distile suya karşı körden başlanarak numuneler 560 nm' de okundu.

#### SOD aktivitesinin hesaplanması:

$$\% \text{ İnhibisyon} = (A_K - A_N) / A_K \times 100$$

A<sub>K</sub>: Kör absorbansı

A<sub>N</sub>: Numune absorbansı

%50'lik inhibisyona 1 U denildiği için

$$\text{Aktivite (U/ml)} = [(\% \text{ inhibisyon} / 50) \times (1/0.1)] \text{ ml}$$

Spesifik aktivite (U/ mg protein) = [U/ml/mg/ml protein]. Sonuçlar, U/mg protein olarak ifade edildi.

#### 3.6.2. Katalaz (CAT) enzim aktivite tayini

**Kullanılan reaktifler:** Fosfat tamponu (pH 7.0, 50 mM) ve fosfat tamponu kullanarak absorbansı 0.500 'e ayarlanmış olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi.

**Deneyin prensibi:** Katalaz aktivitesi Aebi'nin metoduna göre çalışıldı.(115) 240 nm' de maksimum absorbans veren H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> deney ortamına ilave edilen katalaz aktivitesiyle su ve oksijene parçalanır. Bu durum uv spektrumunda absorbans azalmasına neden olup absorbanstaki azalma CAT enziminin aktivitesi ile doğru orantılıdır.

Bir CAT ünitesi: Birim zamanda bir mikromol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i suya çeviren enzim miktarıdır.

**Deneyin yapılışı:** Kör olarak fosfat tamponunun kullanıldığı uv spektrofotometrede 240 nm dalga boyunda sıfır ayarı yapıldıktan sonra H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi 0.500 absorbans verecek şekilde aynı tampon ile dilüe edildi ve substrat

olarak kullanıldı. Substrat içine numune ilavesiyle her 15 saniyede bir defa olmak üzere 5 dakika süre ile absorbans azalması kaydedildi. Hesaplama 1 dakikalık lineer absorbans azalması değerleri esas alındı.

|   | Kör  | Numune  |
|---|------|---------|
| Fosfat Tamponu (50 mM, pH=7)                                      | 3 ml | -       |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> çözeltisi (A <sub>240</sub> =0.500) | -    | 2.99 ml |
| Süpernatant   | -    | 0.01 ml |

#### **CAT aktivitesinin hesaplanması:**

$$k = [2.3 \times \log (OD_1/OD_2)] / \Delta t \text{ (sn)}$$

$$k/g \text{ protein} = k / [(g/ml \text{ protein}) \times 1000]$$

Sonuçlar, k/g protein olarak hesaplandı. Burada k, reaksiyon hız sabitidir.

#### **3.6.3. Glutatyon-peroksidaz (GSH-Px ) enzim aktivite tayini**

**Kullanılan reaktifler:** 150 mM redükte GSH, 8 mM NADPH, 1 M NaN<sub>3</sub>, enzim [1,5 ml 3,2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 50 µl GSH-redüktaz], 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fosfat tamponu (50 mM, pH:7,5).

**Deneyin prensibi:** GSH-Px aktivitesi Paglia ve arkadaşlarının metoduna göre çalışıldı.(116) GSH-Px hidrojen peroksit varlığında redükte glutatyonun (GSH) okside glutatyon (GSSG)'a yükseltgenmesini katalizler. Hidrojen peroksidin bulunduğu ortamda GSH-Px 'in oluşturduğu GSSG, glutatyon redüktaz ve NADPH yardımı ile GSH'a indirgenir. GSH-Px aktivitesi NADPH'ın NADP<sup>+</sup>'ya yükseltgenmesi sırasındaki absorbans azalmasının 340 nm'de okunmasıyla hesaplanır.

Enzim ünitesi; birim zamanda okside olan mikromol NADPH miktarıdır.

**Deneyin yapılışı:** Dalga boyu 340 nm'ye ayarlanan spektrofotometrede numunelerin absorbans değerleri 5 dakika boyunca kaydedildi. Lineer aktivite azalışının 1 dakikalık süresi esas alınarak hesap yapıldı.

|                                      |          |
|--------------------------------------|----------|
| Fosfat tamponu 5 mM EDTA'lı          | 2.65 ml  |
| Redükte GSH (150 mM)                 | 0.10 ml  |
| NADPH (8 mM)                         | 0.10 ml  |
| Enzim (23,3 Ü/L)                     | 0.01 ml  |
| NaN <sub>3</sub> (1 M)               | 0.01 ml  |
| Süpernatant                          | 0.02 ml  |
| 30 dakika oda ısısında inkübasyon    |          |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (2 mM) | 0.100 ml |

#### **GSH-Px aktivitesinin hesaplanması:**

$$\text{IU/L} = [(\Delta A/t) / 6.22 \times 10^{-6}] \times (1/0.02)$$

$$\text{Spesifik aktivite IU/L mg protein} = (\text{IU/L}) / (1000 \times W)$$

W: gram protein miktarı

#### **3.6.4. Miyeloperoksidaz (MPO) enzim aktivite tayini**

**Kullanılan reaktifler:** %0,5 'lik hexadecyltrimethyl ammonium bromid (HDTMAB), % 2 lik phenol içinde hazırlanan 25 mM 4-aminoantipyrine (4-AAP) çözeltisi, 1,7 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanıldı.

**Deneyin prensibi:** Miyeloperoksidaz (MPO; EC 1.11.1.7) enziminin aktivitesi MPO aracılı H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile yapılan oksidasyon için substrat olarak 4-aminoantipyrine /phenol solusyonu kullanılarak yapıldı.(117)

**Deneyin yapılışı:**Daha önceden ayrılmış olan doku örnekleri MPO enzim aktivitesi tayininde kullanılacak olan süpernatantın elde edilmesi için % 0,5 lik hexadecyltrimethyl ammonium bromid, doku ağırlığının beş katı olacak şekilde, ilave edilerek 16000 devir/dakika hızla 2 dakika homojenize edildi. Homojenize edilen dokular 3500 g 40 dakika +4 C° santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant deneyde kullanıldı.

|  | Numune |
|--|--------|
| 4-AAP-% 2 lik phenol (25 mM)           | 1.3 ml |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1,7 mM) | 1.5 ml |
| Ekstrakt süpernatantı                  | 0.2 ml |

510 nm de 20. 40. 60. ve 80. sn de absorbans artışı kaydedildi. Lineer aktivite artışının gözlemlendiği absorbans değerleri hesaba katıldı.

**MPO aktivitesinin hesaplanması:**

$$U/L=[\Delta OD/ \Delta t (\text{dakika})] \times (3/0.2)] \times F$$

Bir enzim ünitesi; 25 C° 1 dakikada 1µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 'yi harcayan enzim olarak kabul edilir formüldeki F, ön çalışmalarla elde edilen bir reaksiyon sabitidir. Sonuçlar U/g protein olarak ifade edildi.

**3.6.5.Tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri (TBARS) miktarının tayini**

**Kullanılan reaktifler:** % 0,675 tiobarbitürik asit (TBA) çözeltisi, %10 triklorasetikasit (TCA) çözeltisi ve 20 mM/L 1,1,3,3- tetrametoksipropan (standart).

**Prensibi:** Esterbauer ve Cheeseman'nin metodu ile çalışıldı.(118) En çok kullanılan lipid peroksidasyon tayin yöntemidir. Asidik ortamdaki tiobarbitürik asit ile 90–95 C° de reaksiyona giren malondialdehit (MDA) ve diğer TBARS, pembe renkli kromojen meydana getirir. Onbeş dakika kaynatıldıktan sonra hızla soğutulan numunelerin absorbansları 532 nm de spektrofotometrik olarak okundu.

**Deneyin Yapılışı:**

|              | Numune | Kör    |
|--------------|--------|--------|
| Homojenat    | 0.5 ml | -      |
| TCA %10      | 2.5 ml | 2.5 ml |
| Deiyonize su | -      | 0.5 ml |

90 C° 15 dakika bekletildikten sonra 3000 g 'de 10 dakika santrifüj

|               |      |      |
|---------------|------|------|
| Süpernatant   | 2 ml | 2 ml |
| TBA (% 0,675) | 1 ml | 1 ml |

90 C° 15 dakika bekletilir, soğutulur ve köre karşı 532 nm 'de okunur.

**Hesaplama:** 20 mM/L stok standart çözeltisinden değişik konsantrasyonlarda hazırlanan standartlar, numunelerle aynı şartlarda çalışıldı ve elde edilen sonuçlar ile standart grafiği çizildi. Bu grafikten elde edilen eğim sabiti numunelere uygulanarak TBARS miktarı yaş gram doku başına nanomol olarak hesaplandı.

### 3.6.6. Protein karbonil (PC) tayini

**Kullanılan reaktifler:** %10–20 TCA (trikloroasetik asit), 2 N HCl, 10 mM DNPH (2,4-dinitrophenylhydrazine), etanol/etil asetat (1:1, v/v) çözeltisi, 6 M guanidin hidroklorid

**Deneyin yapılışı:** Levine ve arkadaşlarının metodu ile çalışıldı.(119)Dilüe edilmiş proteinler, soğuk trikloroasetik asit (TCA, %20) ile çökteldikten sonra 3-5 dakika santrifüj edildi. 2 N HCl'de 10 mM DNPH'ın (2,4-dinitrophenylhydrazine) solisyonu her bir nümunenin protein pelletine eklenerek 1–2 mg/ml protein konsantrasyonu elde edildi. Numuneler oda ısısında 1 saat karanlıkta bekletilip her 10 dakikada bir vortekslendi. Daha sonra %10–20 TCA ile çökteltilip 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılıp ve protein pelletleri %10-20 TCA ile bir kez daha yıkandı. Kalan DNPH'ı uzaklaştırmak için 1 ml etanol/etil asetat (1:1, v/v) ile 3 kez yıkayıp, numuneler 6 M guanidin hidroklorid içinde 37 C° 'de 15 dakika çalkalayıcıda yeniden askıya alındı. Karbonil içeriği 366 nm absorbanda tespit edildi.

### 3.6.7. Doku homojenat, süpernatant ve ekstraktlarında protein tayini

**Kullanılan reaktifler:** A reaktifi: 20 mmol CuSO<sub>4</sub>, 34 mmol Na<sub>3</sub>Sitrat, B reaktifi: 0.19 mmol Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,1 mol NaOH ve Folin-Ciocalteu-Fenol (FCF) reaktifleri kullanıldı.

**Deneyin prensibi:** Protein miktarı Lowry metoduna göre tayin edildi.(120) Bu yöntemde, alkali çözeltide bakır-protein kompleksi oluşarak fosfomolibdat-fosfotungstat reaktifini (Folin-Ciocalteu-Fenol reaktifi) redükler ve koyu mavi bir renk oluşur. Burada rengin koyuluğu ortamdaki protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Folin reaktifinin ilavesinde şunlara dikkat edilmesi gerekmektedir: Bu reaktif sadece asit ortamda dayanıklıdır. Fakat ifade edilen bu redükleme ise pH 10'da oluşmaktadır. Bu yüzden folin reaktifi süratle alkali bakır-protein çözeltisine ilave edilmeli ve vortekslenmelidir. Bu uygulama ile fosfomolibdat-fosfotungstat (folin) reaktifi parçalanmadan önce redüklenme olayı gerçekleşir.

**Deneyin yapılışı:** Standart grafiği çizmek için konsantrasyonu bilinen sıgır serum albümininden hazırlanmış çözeltiler kullanıldı. “OD – mg/ml protein konsantrasyonu” grafiği çizilerek protein değerleri bu grafikten okundu. Standart ve numuneler köre karşı 700 nm'de okundu.



|                     | Numune | Kör    |
|---------------------|--------|--------|
| Numune              | 10 µl  | -      |
| Deiyonize su        | 490 µl | 500 µl |
| C Reaktif (5/1:B/A) | 2.5 ml | 2.5 ml |

Karıştırılır, 5–10 dakika beklenir.

|                          |         |         |
|--------------------------|---------|---------|
| D Reaktif (1/1:FCF/d.s.) | 0.25 ml | 0.25 ml |
|--------------------------|---------|---------|

30 dakika oda ısısında bekletilir ve 700 nm’de köre karşı OD okunur.

### Hesaplanması:

$$\text{Protein (mg/ml)} = (K_{st}/A_{st}) \times A_N$$

$K_{st}$ : Standardın konsantrasyonu

$A_{st}$ : Standardın absorpsiyonu

$A_N$ : Numunenin absorpsiyonu

### 3.6.8.Hidroksiprolin tayini (OH-P)

**Kullanılan reaktifler:** Deney işlemleri esnasında; OH-P standardı, koramin T, P-dimetil amino benzaldehit, perklorik asit, isopropanol , Na-asetat.3 H<sub>2</sub>O, Na-sitrat.5.5 H<sub>2</sub>O, 12 N HCl, 1 mM HCl kimyasalları kullanıldı. (Merck&Co., Inc ., Whitehouse Station , NJ, USA).

Hidroksiprolin standardı; 1.231 mg OH-P 5 ml =0.001 M HCl’de çözülerek günlük stok standart çöeltisi hazırlandı. Daha sonra bu stok standart çöeltisi 1/2, 1/4, 1/6, 1/8, oranlarında dilüe edilerek daha düşük konsantrasyonlarda standart çöelteler hazırlandı. Sonra OH-P deney işlemleri bu örneklerde uygulanarak 558 nm’de standart körüne karşı okundu. Çıkan absorbans değerleri ile standart grafiği oluşturuldu. Bu grafikten eğim bulunarak hesap işlemlerinde kullanıldı.

Kloramin T çöeltisi; 70 mg kloramin T 1 ml bidistile suda çözülerek üzerine 4 ml asetat /sitrat tamponu ilave edilerek günlük hazırlandı.

Erlich reaktif; 4 gr P-dimetil amino benzaldehit 6 ml (% 60’ lık) perkloro asitte çözülerek üzerine 26 ml isopropanol ilave edilerek günlük hazırlandı.

Asetat/sitrat tamponu; 57 g Na-asetat 3 H<sub>2</sub>O ve 44.47 gr Na-Sitrat.5.5 H<sub>2</sub>O 400 ml bidistile suda çözüldü. Üzerine 385 ml isopropanol ilave edilerek HCl ile pH 6’ya ayarlandıktan sonra hacmi 1000 ml tamamlandı. Daha sonra deney işlemleri aşağıdaki tabloya göre yapıldı.

**Deneyin yapılışı:** – 70 C° 'de dondurularak, OH-P düzeyi tesbiti için deney gününe kadar saklanan, dondurulmuş dokular çözülerek izotonik NaCl ile yıkandı ve kurutma kağıdına serilerek kendi halinde kurumaya bırakılarak tartıldı. Ağızı açık cam tüplere konularak 100 C° 'ye ayarlanmış etüvde 72 saat kurutuldu. Kontaminasyon engellenerek kurutulan dokular küçük bir havan içinde toz haline getirildi. Toz haline gelmiş kuru dokuların herbirinin kuru ağırlıkları hassas terazide ölçülerek kaydedildi. Toz halindeki dokular 15 ml' lik vidalı kapaklı cam tüpler içerisine konularak üzerine 2ml 12 N HCl ilave edildi. Daha sonra etüvde 130 C° 'de 3 saat kaynatılarak hidrolize edildi. Buharlaşma nedeniyle miktarı 1 ml' nin altına düşenler ölçülerek 12 N HCl ile tekrar 1 ml tamamlandıktan sonra 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Üstteki süpernatant kısmından 0.5 ml alınıp üzerine 0.5 ml isopropanol eklenerek 2500 g' de 10 dakika daha santrifüj edildi. Sonra üst fazdan 0.3 ml alınarak çalışıldı. Hidroksiprolin tesbiti Woessner' in tarif ettiği yöntemle kısmen modifiye edilerek yapıldı.(121)

|                 | Kör    | Numune |
|-----------------|--------|--------|
| Bidistile su    | 0.3 ml | -      |
| Numune          | -      | 0.3 ml |
| İsopropanol     | 0.2 ml | 0.2 ml |
| Kloramin-T      | 0.1 ml | 0.1 ml |
| Erlich reaktifi | 2.6 ml | 2.6 ml |

Numune ve kör tüplerinin üzerine reaktifler yukarıdaki sıraya göre eklendikten sonra vorteksle karıştırıldı ve 60 C° 'de su banyosunda 25 dakika inkübe edildikten sonra 558 nm' de köre karşı okundu. Sonuçlar mg/g kuru doku olarak verildi.

### 3.7.Serumda Kolesterol, Total Biluribin, AST, ALT, ALP, GGT Tayini

Plazma kolesterol, total bilirubin, AST, ALT, ALP, GGT analizleri İnönü Üniv. Turgut Özal Tıp Merkezi Merkez laboratuvarında Abbott Aeroset Otoanalizör sistemlerinde aynı markanın kitleriyle yapıldı.

### 3.8. Patolojik Değerlendirme

Karaciğer dokuları %10 luk formalin içerisinde patoloji laboratuvarına gönderildi. % 10 luk formaldehit içerisinde laboratuvara gelen örnekler standart doku takip işleminden sonra parafine gömüldüler. Dokulardan 4 mikron kalınlığında kesitler alınıp camlar H&E ve Mason Trikrom boyası ile boyanıp ışık mikroskopik inceleme tek patolog tarafından kör olarak yapıldı. Dokular şu kriterlere göre skorlandı:

0: Normal karaciğer

1: perivenüler kollajen kalınlaşması ve ince kollajen septa

2: portal alanlar veya sentral venler arasında inkomplet köprüleşme ile ince septa

3: ince septa ve yaygın köprüleşme

4: kalın septa ile portal alanların komplet köprüleşmesi ve nodüler görünüm

### 3.9. İstatistiksel analizler

Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk testi ile yapıldı. Normal dağılıma sahip değişkenlerin gruplar arası karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi ve çoklu karşılaştırmalarında ise varyansların homojen olduğu durumlarda Tukey testi, olmadığı durumlarda Tamhane'nin T2 testi ile yapıldı. Normal dağılıma sahip olmayan değişkenlerin gruplar arası karşılaştırılmasında Kruskal Wallis H testi ve çoklu karşılaştırmalarında ise Conover testi uygulandı.  $p < 0.05$  ve  $p < 0.01$  değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### 3.10. Kullanılan Aletler

Tez çalışmamızdaki laboratuvar deneyleri esnasında SIGMA ve MERCK ticari firmalara ait kimyasallar ve belirtilen aletler kullanıldı: T25 Basic Ultra Turrax marka homojenizatör (Almanya), Visemix VM10 marka vorteks (Kore), Memmert SV1422 marka Ben Mary (Almanya), Shimadzu AEG-320 marka hassas terazi (Japon), Rotina 46R marka soğutmalı maksimum 5000 g kapasiteli santrifüj (Almanya), Shimadzu UV-120IV marka Spektrofotometre (Japon) ve Kendro HFU 586 Basic marka derin dondurucu (Almanya).

#### 4. BULGULAR

**Tablo 4.1:** Kontrol ve deney gruplarında normal dağılım gösteren KOL. CAT ve OH-prolin degerleri. Sonuçlar Ortalama  $\pm$  Ortalama standart sapma olarak verilmiştir. A.D.(Anlamlı değil)

| GRUP          | KOLESTROL(mg/dL) | OHprolin        | CAT(k/g prot)   |
|---------------|------------------|-----------------|-----------------|
| 1-Grup(n=7):  | 42,29 $\pm$ 5,28 | 3,83 $\pm$ 0,98 | 0,48 $\pm$ 0,36 |
| 2.Grup(n=7):  | 4,80 $\pm$ 2,33  | 2,79 $\pm$ 0,44 | 0,47 $\pm$ 0,26 |
| 3.Grup(n=6):  | 6,50 $\pm$ 1,00  | 3,14 $\pm$ 0,79 | 0,45 $\pm$ 0,11 |
| 4.Grup(n=8):  | 13,00 $\pm$ 4,30 | 2,85 $\pm$ 0,47 | 0,55 $\pm$ 0,15 |
| 5.Grup (n=8): | 16,43 $\pm$ 6,86 | 3,00 $\pm$ 0,58 | 0,65 $\pm$ 0,28 |
| P değerleri   | P=0,001          | P=0,04          | P=0,56          |
| 1-2           | <0,001           | 0,050           |                 |
| 1-3           | <0,001           | A.D.            |                 |
| 1-4           | <0,001           | A.D.            |                 |
| 1-5           | <0,001           | A.D.            |                 |
| 2-3           | A.D.             | A.D.            |                 |
| 2-4           | 0,007            | A.D.            |                 |
| 2-5           | 0,016            | A.D.            |                 |
| 3-4           | A.D.             | A.D.            |                 |
| 3-5           | 0,044            | A.D.            |                 |
| 4-5           | A.D.             | A.D.            |                 |

**Tablo 4.2:** Kontrol ve deney gruplarında normal dağılım gösteren ALT, AST ALP değerleri. Sonuçlar Ortalama  $\pm$  Ortalama standart sapma olarak verilmiştir. A.D.(Anlamlı değil)

| GRUP           | AST (U/L)              | ALT (U/L)             | ALP (U/L)          |
|----------------|------------------------|-----------------------|--------------------|
| 1-Grup(n=7):   | 77,86 $\pm$ 17,27      | 46,29 $\pm$ 7,74      | 223,14 $\pm$ 43,26 |
| 2.Grup (n=7):  | 10836,14 $\pm$ 7269,22 | 5339,29 $\pm$ 1886,62 | 342,29 $\pm$ 46,48 |
| 3. Grup (n=6): | 8138,17 $\pm$ 5322,17  | 4984,67 $\pm$ 2295,74 | 552,50 $\pm$ 97,85 |
| 4. Grup (n=8): | 5730,00 $\pm$ 4340,52  | 3586,63 $\pm$ 2138,95 | 506,00 $\pm$ 92,02 |
| 5.Grup (n=8):  | 5576,13 $\pm$ 1990,34  | 4569,38 $\pm$ 770,45  | 304,00 $\pm$ 29,73 |
| P değerleri    | P=0,002                | <0,001                | P<0,001            |
| 1-2            | A.D.                   | 0,003                 | 0,017              |
| 1-3            | A.D.                   | 0,032                 | <0,001             |
| 1-4            | A.D.                   | 0,022                 | <0,001             |
| 1-5            | 0,001                  | <0,001                | A.D.               |
| 2-3            | A.D.                   | A.D.                  | <0,001             |
| 2-4            | A.D.                   | A.D.                  | <0,001             |
| 2-5            | A.D.                   | A.D.                  | A.D.               |
| 3-4            | A.D.                   | A.D.                  | A.D.               |
| 3-5            | A.D.                   | A.D.                  | <0,001             |
| 4-5            | A.D.                   | A.D.                  | <0,001             |

**Tablo 4.3:** Normal dağılım göstermeyen TB, TBARS, PC değişkenlerin gruplar arası karşılaştırılması  $p<0.05$  ve  $p<0.01$  değerleri istatistiksel olarak önemli kabul edildi. Sonuçlar median (min- max) olarak verildi.

| GRUP          | TB (mg/dL)   | TBARS (nmol/g doku) | PC(nmol/mgprot) |
|---------------|--------------|---------------------|-----------------|
| 1.Grup (n=7): | 0,1(0,1-0,1) | 5,41(2,12-11,7)     | 0,10(0,10-0,16) |
| 2.Grup (n=7): | 1,3(0,3-3)   | 7,33(5,54-18,5)     | 0,60(0,14-1,51) |
| 3.Grup (n=6): | 1,5(0,5-7,9) | 6,35(3,27-12,28)    | 1,16(0,15-1,15) |
| 4.Grup (n=8): | 2,0(0,1-3,4) | 9,69(5,78-26,1)     | 0,17(0,09-1,33) |
| 5.Grup (n=8): | 2,5(0,6-3,6) | 13,48(6,4-20,34)    | 0,14(0,12-0,15) |
| p değerleri   | 0,002        | 0,0312              | 0,003           |
| 1-2           | 0,001*       | A.D.                | <0,05           |
| 1-3           | 0,001*       | A.D.                | <0,05           |
| 1-4           | 0,002*       | <0,05               | A.D.            |
| 1-5           | 0,001*       | <0,05               | A.D.            |
| 2-3           | A.D.         | A.D.                | A.D.            |
| 2-4           | A.D.         | A.D.                | A.D.            |
| 2-5           | A.D.         | A.D.                | <0,05           |
| 3-4           | A.D.         | A.D.                | <0,05           |
| 3-5           | A.D.         | <0,05               | <0,05           |
| 4-5           | A.D.         | A.D.                | A.D.            |

**Tablo 4.4:** Normal dağılım göstermeyen GGT, GSH-Px, MPO ,SOD değişkenlerin gruplar arası karşılaştırılması.  $p < 0.05$  ve  $p < 0.01$  değerleri istatistiksel olarak önemli kabul edildi. Sonuçlar median (min- max) olarak verildi.

| GRUP         | GGT(U/L)  | GSH-Px<br>(U/g/prot) | MPO (U/g/prot)  | SOD (U/mg/prot) |
|--------------|-----------|----------------------|-----------------|-----------------|
| 1.Grup(n=7): | 1(1-3)    | 1,01(0,99-1,18)      | 119,7(18,4-143) | 0,31(0,24-0,39) |
| 2.Grup(n=7): | 2(1-5)    | 1,02(0,75-2,40)      | 190(145-239)    | 0,21(0,12-0,32) |
| 3.Grup(n=6): | 6(4-10)   | 1,09(0,68-1,2)       | 156(97-236)     | 0,26(0,16-0,33) |
| 4.Grup(n=8): | 3,5(1-20) | 0,96(0,60-1,15)      | 167(91-255)     | 0,20(0,10-0,24) |
| 5.Grup(n=8): | 2(1-3)    | 0,76(0,23-1,26)      | 93(65-148)      | 0,20(0,17-0,41) |
| P değerleri  | 0,0036    | 0,37                 | 0,001           | 0,015           |
| 1-2          | A.D.      |                      | <0,05           | <0,05           |
| 1-3          | <0,05     |                      | <0,05           | A.D.            |
| 1-4          | <0,05     |                      | <0,05           | <0,05           |
| 1-5          | A.D.      |                      | A.D.            | <0,05           |
| 2-3          | <0,05     |                      | A.D.            | A.D.            |
| 2-4          | A.D.      |                      | A.D.            | A.D.            |
| 2-5          | A.D.      |                      | <0,05           | A.D.            |
| 3-4          | <0,05     |                      | A.D.            | A.D.            |
| 3-5          | <0,05     |                      | A.D.            | A.D.            |
| 4-5          | A.D.      |                      | A.D.            | A.D.            |

#### 4.1. Sıçanların Karaciğer Dokularında CAT Aktivitesi

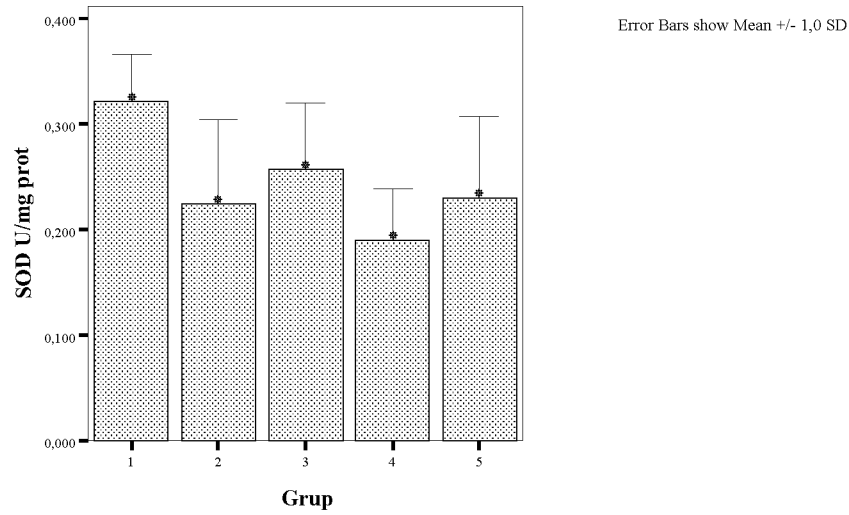
CAT analizlerinde 5 grup ortalaması farklı olmadığı için ( $p=0,56$ ) tek yönlü varyans analizi anlamlı bulunmamıştır.

#### 4.2. Sıçanların Karaciğer Dokularında GSH-Px Aktivitesi

GSH-Px analizlerinde 5 grubun ortancaları karşılaştırılmasında ( $p=0,37$ ) gruplar arası fark bulunmamıştır.

#### 4.3. Sıçanların Karaciğer Dokularında SOD Aktivitesi

SOD analizlerinde 5 grubun ortancaları karşılaştırılmasında kontrol grubu ile sadece TAA, 10ml/kg/gün NSY +TAA grubu, N-Asetil+TAA sistein grubu arasında anlamlı bir farklılık ( $p<0,05$ ) hesaplanmıştır.



**Grafik 1:** Doku SOD (U/mg prot) aktiviteleri. 1;kontrol grubu,2;TAA, 3; 1ml/kg/gün NSY+TAA grubu,4; 10ml/kg/gün NSY+TAA grubu, 5;N-Asetil sistein+TAA grubu

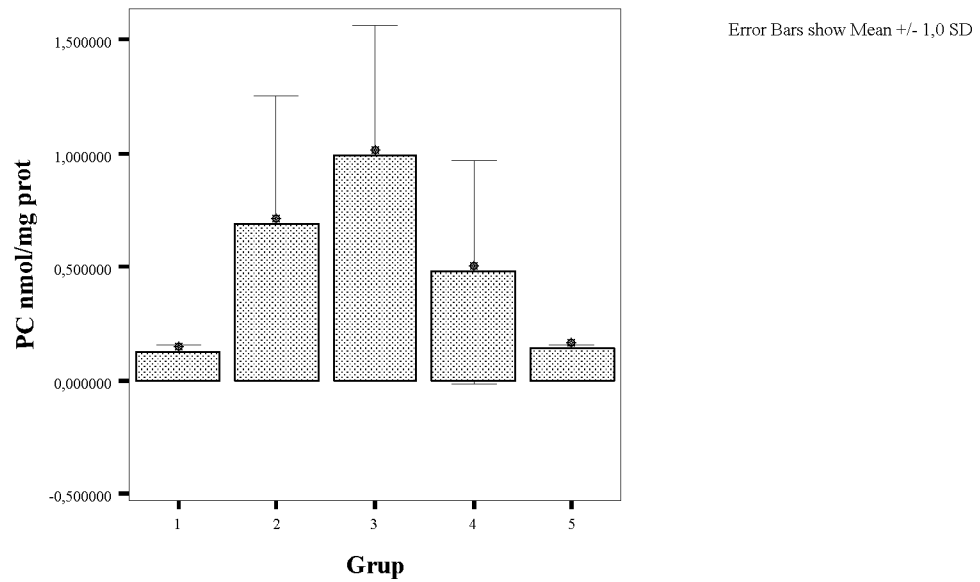
#### 4.4. Sıçanların Karaciğer Dokularında TBARS Seviyesi

TBARS analizinde 5 grubun ortancaları karşılaştırılmasında kontrol ile 10ml/kg/gün NSY+TAA grubu, kontrol ile N-Asetil sistein+TAA grupları ve 1ml/kg/gün NSY+TAA grubu ile N-Asetil sistein+TAA grubu arasında fark olduğu gözlenmiştir ( $p<0,05$ ).



#### 4.5. Sıçanların Karaciğer Dokularında Protein Karbonil Seviyesi

PC analizinde 5 grubun ortancaları karşılaştırıldı. Kontrol grubu ile sadece TAA grubu, kontrol grubu ile 1ml/kg/gün NSY+TAA grubu, TAA grubu ile N-Asetil sistein+TAA grubu. 1ml/kg/gün NSY+TAA grubu ile 10ml/kg/gün NSY+TAA grubu ve 1ml/kg/gün NSY +TAA grubu ile N-Asetil sistein+TAA grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,05$ ) bulunmuştur.



**Grafik 2:** Doku PC (nmol/mg prot) miktarı 1;kontrol grubu,2;TAA, 3; 1ml/kg/gün NSY + TAA grubu,4; 10ml/kg/gün NSY + TAA grubu, 5; N-Asetil sistein +TAA grubu

#### 4.6. Plazmada T.BİL. ve KOL., Seviyesi

T.Bil analizinde gruplar arası fark anlamlıdır ( $p=0,002$ ). Kontrol ile TAA grubu arası fark ( $p=0.001$ ), TAA ve 1ml/kg/gün NSY+TAA grubu ile arasındaki fark ( $p=0.001$ ) TAA ve 10ml/kg/gün NSY+TAA grubu ile arasındaki fark ( $p=0.002$ ), TAA ve N-Asetil sistein+TAA grubu ile arasındaki fark ( $p=0,001$ ) istatistiksel olarak anlamlıdır.

Kolesterol analizinde kontrol grubu ile diğer gruplar arası fark istatistik olarak anlamlı bulundu. TAA grubu ile 1ml/kg/gün NSY +TAA grubu arasındaki fark ve TAA grubu ile 10ml/kg/gün NSY+TAA gruplar arası fark anlamsız iken

TAA Grubu ile 10ml/kg/gün NSY +TAA grubu arasındaki fark ( $p=0,007$ ) ve TAA grubu ile TAA veN-Asetil sistein grubu arasındaki fark ist olarak anlamlı ( $p= 0,016$ ) bulundu. 1ml/kg/gün NSY+TAA grubu ile N-Asetil sistein+TAA grubu arası fark anlamlı ( $p=0,044$ ) iken 10ml/kg/gün NSY+TAA grubu ile N-Asetil sistein+TAA grubu arası anlamsız hesaplandı.

#### **4.7. Plazmada ALT, AST, ALP, GGT Seviyesi**

AST analizinde gruplar arası fark olup kontrol ile N-asetil sistein grupları arasındaki fark anlamlıdır( $p=0,001$ ).

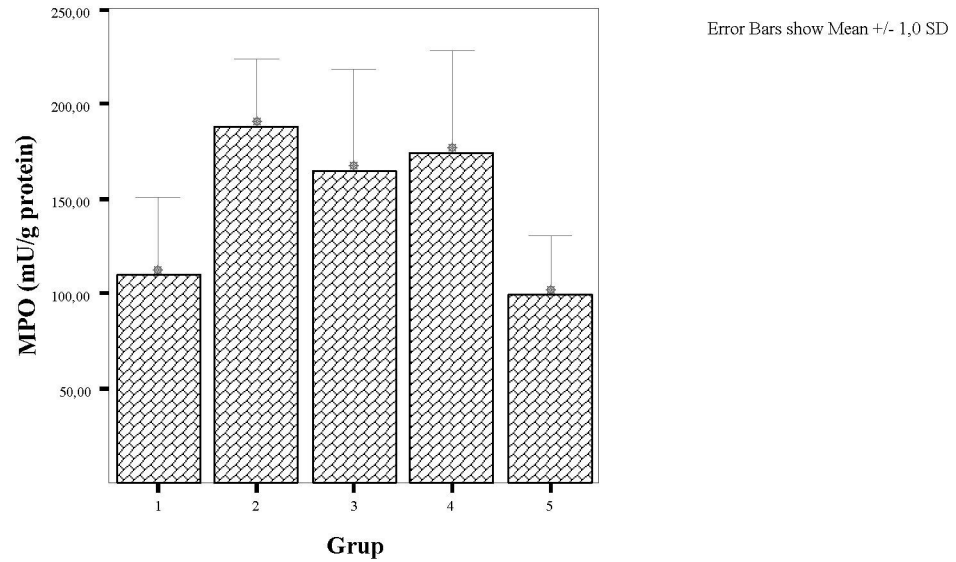
GGT analizinde gruplar arası fark olup kontrol ile 1ml/kg/gün NSY+TAA grubu, kontrol ile 10ml/kg/gün NSY+TAA grubu , TAA ile 1ml/kg/gün NSY+TAA grubu, 1ml/kg/gün NSY+TAA grubu ile 10ml/kg/gün NSY+TAA grubu ve1ml/kg/gün NSY+TAA grubu ile N-Asetil sistein+TAA grubu arasındaki farklar istatistik olarak anlamlıdır ( $p<0.05$ ).

ALT analizinde gruplar arasında fark anlamlı bulunmuştur. Kontrol grubu ile TAA grubu arasındaki fark  $p=0,003$  olarak kontrol grubu ile 1ml/kg/gün NSY +TAA grubu arasındaki fark  $p=0,032$  olarak, kontrol grubu ile 10ml/kg/gün NSY+TAA grubu arasındaki fark  $p=0,022$  olarak ve kontrol grubu ile N-Asetil sistein+TAA grubu arasındaki fark  $p<0.001$  olarak hesaplanmıştır.

ALP analizinde gruplar arası fark gözlemlenmiştir.Kontrol ile TAA grubu arasında  $p=0,017$ , kontrol grubu ile 1ml/kg/gün NSY+TAA grubu arasındaki fark  $p<0.001$  olarak, kontrol grubu ile 10ml/kg/gün NSY+TAA grubu arasındaki fark  $p<0.001$ olarak ve kontrol grubu ile N-Asetil sistein+TAA grubu arasındaki fark anlamsız bulundu. TAA grubu ile 1ml/kg/gün NSY +TAA grubu arası fark  $p<0.001$  TAA grubu ile 10ml/kg/gün NSY+TAA grubu arasında ,1ml/kg/gün NSY+TAA grubu ile N-Asetil sistein+TAA grubu arasındaki fark  $p<0.001$  10ml/kg/gün NSY+TAA grubu ile N-Asetil sistein+TAA Grubu arasındaki fark  $p<0.001$  olarak hesaplanmıştır.

#### **4.8. Sıçanların Karaciğer Dokularında MPO Aktivitesi**

MPO aktivitesi hesaplamalarında 5 grubun ortancaları karşılaştırıldı. Kontrol grubu ile TAA grubu arasında ;kontrol grubu ile 1ml/kg/gün NSY+TAA grubu ve kontrol grubu ile 10ml/kg/gün NSY+TAA grubu ve TAA grubu ile N-Asetil sistein+TAA grubu arasındaki fark istatistik olarak anlamlı  $p< 0.05$  bulunmuştur



**Grafik 3:** Doku MPO (mU/g prot) aktivitelele.1;kontrol grubu,2;TAA, 3;1ml/kg/gun NSY+TAA grubu,4; 10ml/kg/gun NSY+TAA grubu, 5;N-Asetil sistein +TAA grubu

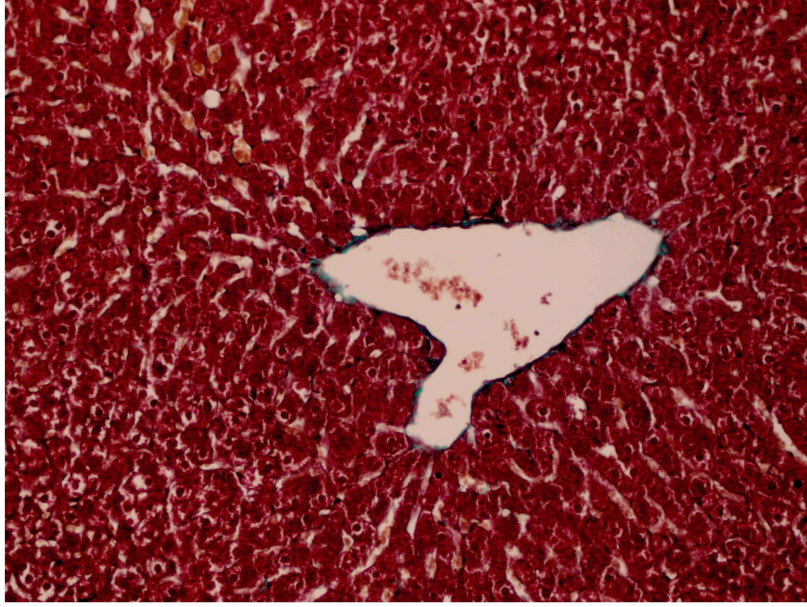
#### 4.9. Sıçanların Karaciğer Dokularında OH-Prolin Seviyesi

Gruplar arası OH-Prolin düzeyi farklı olmasına rağmen ( $p=0.04$ ) sadece kontrol grubu ile TAA Grubu arasındaki fark istatistik olarak anlamlı  $p= 0,050$  bulunmuştur.

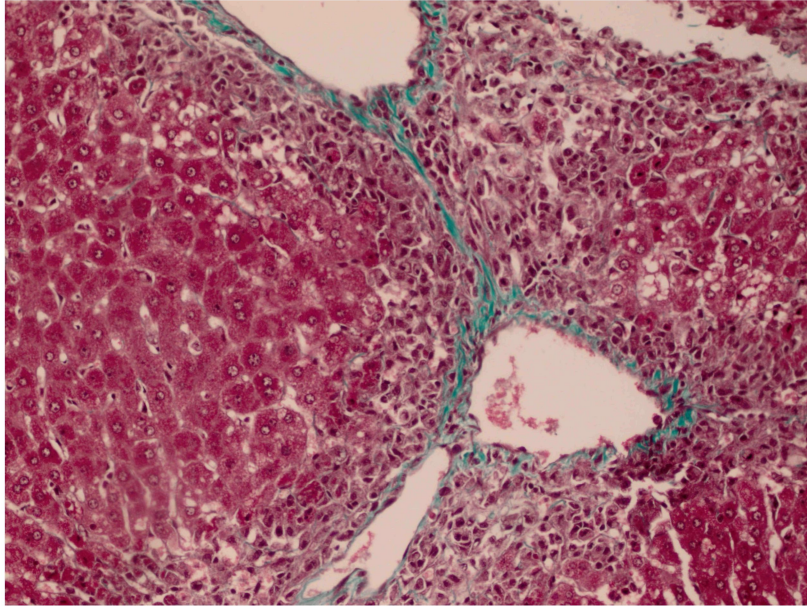
#### 4.10. Karaciğer Dokusunda Histopatolojik Bulgular

**Tablo 4.5:** Kontrol ve deney gruplarının patolojik skor tablosu

|   | 1.Grup(n=7)   | 2.Grup(n=7) | 3.Grup(n=6) | 4.Grup(n=7) | 5.Grup(n=8) |
|---|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 0 | 1,2,3,4,5,6,7 |             |             |             |             |
| 1 |               | 1,2,3,4,5,7 | 1           | 1,6,7       | 4,5,7       |
| 2 |               | 6           | 2,3,4,5,6   | 2,3,4,5     | 1,2,3,6,8   |
| 3 |               |             |             |             |             |
| 4 |               |             |             |             |             |

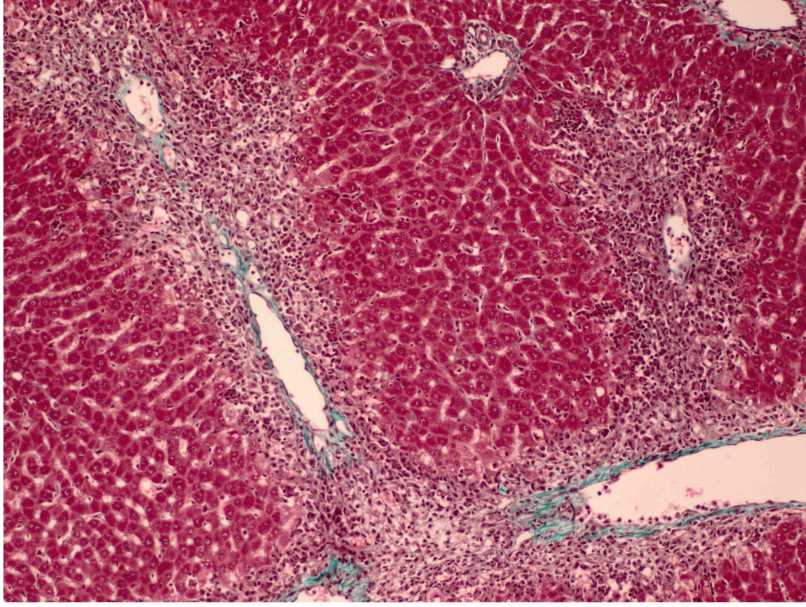


**Resim 4.1.** Kontrol grubunda perivenüler kollajen belirginliği (trikrom boyası x200)

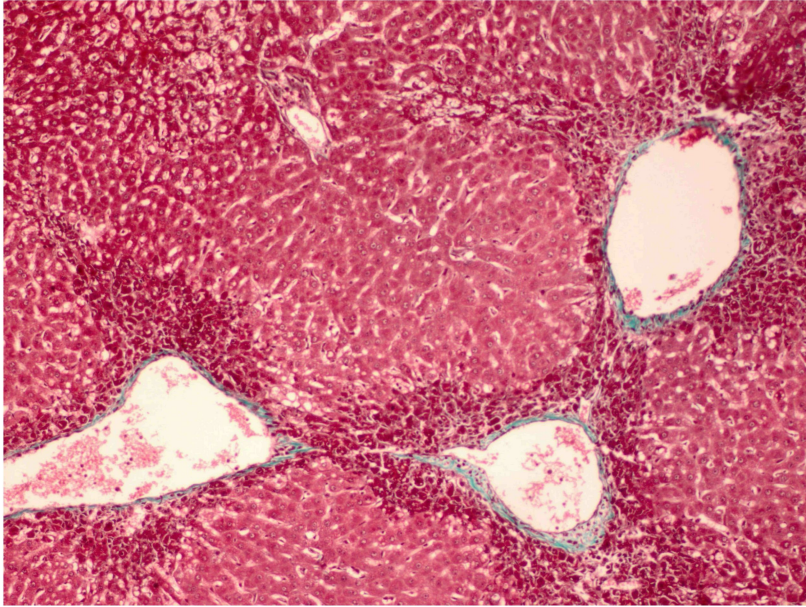


**Resim 4.2** TAA grubunda sentrosentral köprüleşme ve kısmi nodül oluşumu (trikrom boyası x200)

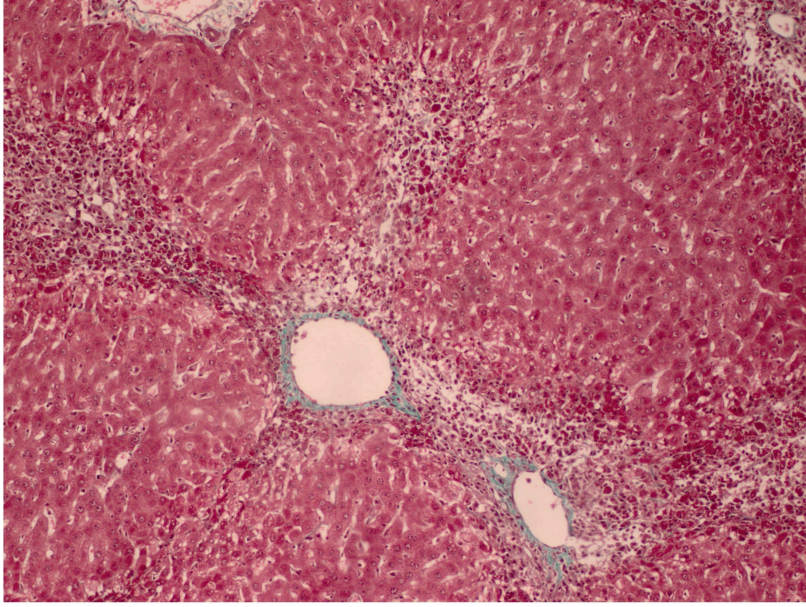




**Resim 4.3** 1ml/kg/gün NSY+TAA grubunda kısmi nodül oluşumu (Trikrom boyası x100)



**Resim 4.4** 10ml/kg/gün NSY+TAA grubunda perisentral kollajen kalınlaşması ve kısmi nodül oluşumu (Trikrom boyası x100)



**Resim 4.5** N-Asetil sistein +TAA grubunda perisentral kollajen kalınlaşması ve kısmi nodül oluşumu (Trikrom boyası x100)

## 5. TARTIŞMA

Karaciğer yaşam için gerekli birçok farklı fonksiyona sahiptir. Aminoasitleri, karbonhidratları, lipidleri alır işler ve depolar .Büyük plazma proteininin, safra asitlerinin sentezinden sorumludur.İlaçlar ve toksinler gibi ekzojen bileşiklerin, lipofilik maddelerin hidrofilik yapıya dönüştürülmesi olarak bilinen biotransformasyon işleminin gerçekleştiği yerdir.Ayrıca tiroid,steroid ve diğer hormonların başlıca katobolizma yeridir ve plazma hormon düzeylerini düzenler.

TAA hepatotoksitesi ispatlanmış tek bir dozu bile hayvanlarda hasara neden olan uzun ve yüksek dozları siroz ve hepatokarsinomaya neden olan toksik bir kimyasaldır. Bizimde çalışmamızda karaciğer hasarı oluşturmak için TAA seçmemizin nedeni TAA'nin karaciğere yüksek spesifitesinden (karaciğer nekrozu-karaciğer yetmezliği) dolayı yıllardır kullanılan ideal bir model olmasıdır.(32–33–34–35–36–44–122 ) TAA toksitesi, özellikle CYP2E1 ve FAD monooksijenazlar gibi, karma fonksiyonlu oksidaz sistemler tarafından biyoaktivasyonu ile giderilir. (44–47–123 ) Karaciğer hasarının TAA'nin verilen dozuyla orantılı bir şekilde arttığı toksokinetik, enzim kinetik çalışmaları ve kovalent bağlanma deneyleriyle kanıtlanmıştır.(44)Bizimde çalışma sonuçlarımızda TAA uygulanmayan kontrol grubu ile TAA uygulanan gruplar arasındaki fark bu bilgileri desteklemektedir.

NAC, mikrosirkülasyonda düzelme ve indirgenmiş glutatyon seviyelerinde artışa yol açarak oksidatif doku hasarına karşı koruma sağlar.(124–125) Bozulmuş hepatik mikrosirkülasyon ile ilişkili süperoksit anyonlarınına karşı koruyabilir.

Ayrıca NAC'ın kemotaksisi ve antiinflamatuvar etki yoluyla insan fagositik hücreleri tarafından oksijen radikallerinin üretimini bozduğu gösterilmektedir(126) NAC ekstra antioksidan özellikleriyle direkt olarak hidrojen peroksiti temizleme özelliğine sahiptir.(127) Aynı zamanda yapısındaki tiyol parçacıklarının kimyasal özelliğinden dolayı farklı kullanım alanlarına sahiptir. NAC indirgenmiş tiyol parçacıkları sayesinde reaktif oksijen türlerini temizleme işlemlerini gerçekleştirmektedir.(127–128) Tiyol redoks durumunu düzelterek oksidatif stresi azaltır. Böylece oksidatif metabolizma ve nötrofil, monosit kemotaksis inhibisyonunu sağlar. Süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerini temizler.(127) Nötrofil aktivasyonunu inhibe eder ve makrofajların fonksiyonunu düzenler.(129)NAC, hepatik kan akışını düzeltir. Aynı zamanda kardiyak göstergede,

hepatik ve splanknik (karıniçi organlar) perfüzyonda artış yoluyla oksijen dağıtımını düzelttiği de gösterilmiştir. NAC hepatik disfonksiyonlu, ağır hastalıklı ve septik şoklu hastalarda hepatik fonksiyonu düzeltir.(130–131) Yine yapılan çalışmalarda NAC'ın karaciğer transplantasyonu sonrası oluşan komplikasyonları engelleyebildiği gösterilmiştir. (132) Çalışmamızda NAC grubu ile kontrol grubunda bakılan hasar parametreleri sonuçları yakın değerlerde bulundu.

*Nigella sativa* yağı (Black Cumin Oil veya kalonji oil) içinde barındırdığı; hoş kokulu yağlar, elementler ve vitaminler gibi içerdiği yüzden fazla öğeden dolayı oldukça faydalıdır. İçinde omega 3 ve omega 6 ihtiva eden % 58 oranında temel yağ asidi vardır. Bunlar, bağışıklık sistemini alerji ve enfeksiyonlara karşı güçlendirip dengeleyerek kronik hastalıklara karşı koruma sağlayan Prostaglandin E1 oluşumu için gereklidir. Bu oluşum sağlıklı hücreleri virüslerden koruyup tümör oluşumunu engeller.(65) Bruits ve Bucar'ın yaptıkları bir çalışmada NS esansiyel yağının antioksidan aktivitesini araştırmışlar ve radikal süpürücü özelliklerini göstermişlerdir. Aynı zamanda etkili bir hidroksil radikal süpürücü ajanlar olduklarını da belirtmişlerdir (66). F. Isik ve ark yapmış oldukları deneysel kolit modelinde NSY nin serum kolestrol ve trigliserit seviyesini düşürdüğü, oksidan parametrelerde azalmaya neden olurken antioksidan enzim seviyelerinde artışa neden olduğu belirtilmiştir(68). NSY'nin biyolojik membranlardaki lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği rapor edilmiştir. El-Abhar ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, NSY'nun 4 hafta oral alımının erkek albino ratlardaki bazı karaciğer fonksiyon testleri üzerindeki etkileri karbon tetraklorürle (CCl<sub>4</sub>) indüklenen hepatoksisite ile araştırılmıştır. NSY, CCl<sub>4</sub> ile hepatoksisitenin indüksiyonundan önce 4 hafta verilmiş ve sonuçta CCl<sub>4</sub> hepatoksisitesine karşı kısmen koruyabildiği görülmüştür. NSY 4 hafta süreyle 800 mg/kg dozunda oral olarak alındığında serum total kolesterol, LDL (düşük dansiteli lipoprotein) ve trigliserid düzeylerinde önemli bir azalmaya yol açarken, serum HDL (yüksek dansiteli lipoprotein)'inde anlamlı bir artış sağlamıştır. Kanter ve arkadaşlarının çok yakın zamanda yaptıkları bir çalışmada, CCl<sub>4</sub> ile muamele edilen ratlarda *Nigella sativa* (NS)'nin lipid peroksidasyonu ve karaciğer enzim aktivitelerini azaltırken, antioksidan savunma sistemini oluşturan enzim aktivitelerini arttırmıştır.(134)



Serbest oksijen radikallerinin dokulara etkisi ile oluşan, lipid peroksidasyonu esnasında bir dizi reaksiyon sonucu meydana gelen, oldukça reaktif olan metabolik ürünler tiyobarbitürik asit reaktif maddeleridir (TBARS). Plazma TBARS düzeyinin belirlenebilmesi dokulardaki lipid peroksidasyonunun ve dolayısıyla oksidatif stresin hassas göstergelerinden birisidir. Lipoperoksidasyon hücre membranı hasarında bir gösterge olup lipoperoksidasyon ara bileşikleri ve malondialdehit oluşumu ile ölçülebilir. J. Balkan ve ark. yaptığı TAA ile oluşturulan karaciğer siroz modelinde TAA uygulamasının TBARS düzeyinde anlamlı bir artış gözlenmiştir.(46) Çalışmamızda TBARS düzeyleri gruplar arasında farklılık gösterirken kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir değişim gözlenmemiştir NSY nin yüksek dozu N-asetil sisteine yakın bir değerde iken düşük dozunun sadece TAA uygulanan gruptan fazla olması NSY nin düşük miktarda lipid peroksidasyonunu arttırmış olabileceğini düşündürmektedir. İ.Yaman ve ark. yaptığı çalışmada NSY nin etkisi bizim bulgularımızı desteklemektedir.(135)

Glutasyon peroksidaz, antioksidan savunma sisteminde oldukça önemli bir enzimdir. Ayrıca selenyum ve indirgenmiş glutatyona bağımlı olarak suda hidrojen peroksitin dönüşümünü katalizler. Bu enzim hepatik nekrozda majör bir koruyucu role sahiptir.(136) NAC glutasyon için substrat olarak görev yaptığından dolayı bu enzimin hepatik seviyesini de yeniden düzenler. (137) J. Balkan ve ark. yaptığı TAA ile oluşturulan karaciğer siroz modelinde taurinin koruyuculuğu araştırılmış ve TAA in GSH-Px aktivitesini düşürdüğü gözlenmiştir.(46) Çalışmamızda TAA verilen gruplarda kontrol grubuna göre bir düşüş gözlenmesine rağmen gruplar arası farklılık değişimi istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Nötrofiller ve monositlerin primer lizozomal granüllerinde Fe-hem içeren miyeloperoksidaz enzimi bulunur. Çeşitli uyarıcıların etkisiyle fagositler miyeloperoksidaz içeren granüllerini ekstrasellüler aralıktaki fagositik vakuol içine boşaltırlar. Miyeloperoksidaz, hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) varlığında klorür, iyodür ve bromürün oksidasyonunu katalizleyerek hipoklorik asit (HOCl), hipoiyodik asit (HOI) ve hipobromik asit (HOBr) oluşturur. Bu bileşikler ve bunların tuzları güçlü oksidanlardır ve biyolojik olarak önemli moleküllerle reaksiyona girerek mikroorganizmayı etkileyen toksik ajanlar meydana getirirler. Mehmet Kanter ve ark yaptığı etonolle oluşturulmuş gastrik hasar modeli çalışmasında *Nigella Sativa*'nın

MPO aktivitesi üzerinde azalma sağlayarak koruyucu etki gösterdiği belirtilmiştir. Çalışmamızda yapılan MPO aktivitesi ölçümüne MPO aktivitesi gruplar arasında farklılık göstermiş ve istatistik olarak anlamlı bulunmuştur. Ve sonuçlarımıza göre NSY 'nin düşük dozu yüksek dozuna göre kontrol grubuna daha yakındır. Buda NSY 'nin etkinliğinin dozuyla ilgili olabileceğini düşündürmektedir.

Normal hücreler kendilerini reaktif oksijen türlerine karşı birçok enzimatik ve nonenzimatik endojen savunma sistemleri ile koruyabilirler. SOR'u elemine etmede görev yapan SOD, CAT gibi enzimler bu savunma sistemlerinin bir parçasını oluştururlar.

SOD enzimi, süperoksit radikalini dismutasyona uğratarak  $H_2O_2$  ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlar. Organizmada substrat olarak serbest radikal kullanan tek enzim SOD'dur.(80) J. Balkan ve ark. yaptığı TAA ile oluşturulan karaciğer siroz modelinde SOD aktivitesinde anlamlı olmayan azalma gözlenmiştir.(46) İhsan Yaman ve ark yapmış oldukları gentamisin ile indüklenen böbrek hasarı çalışmasında NS'nin düşük dozunun yüksek dozundan SOD aktivitesini daha fazla arttırdığı belirtilmiştir.(135) Çalışmamızdaki SOD aktivitesindeki sonuçlara göre düşük doz NSY nin uygulandığı grupta yüksek doza göre aktivite daha yüksektir. Buda MPO bulgularında olduğu gibi NSY'nin dozuyla ilgili olabileceğini düşündürmektedir.

Oksidatif stresin biyomarkırı olarak protein karbonil gruplarının kullanımı, diğer oksidasyon ürünlerinin ölçümü ile kıyaslandığında göreceli erken oluşumları ve karbonile proteinlerin stabiliteleri nedeniyle bazı avantajlar içermektedir. Yüksek düzeyde protein karbonil grupları alzheimer hastalığı, romatoid artrit, diyabet, kronik renal yetmezlik ve respiratuvar distres sendromu gibi birçok hastalıkta gözlemlenir.(138) Süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksil ( $OH^{\cdot}$ ), peroksil ( $RO_2^{\cdot}$ ), alkoksil ( $RO^{\cdot}$ ), hidroperoksil ( $HO_2^{\cdot}$ ) gibi radikal türlerin ve hidrojen peroksid ( $H_2O_2$ ), hipoklorik asit ( $HOCl$ ), ozon ( $O_3$ ), singlet oksijen ( $O_2$ ), peroksinitrit ( $ONOO^{\cdot}$ ) gibi nonradikal türlerin dahil olduğu reaktif oksijen türleri protein oksidasyonuna yol açar. (139) Karbonil grupları (aldehit ve ketonlar) protein yan zincirleri üzerinde üretilirler. Protein karbonil içeriği çok genel bir gösterge olup protein oksidasyonunda kullanılan en yaygın markırdır.(105) Protein oksidasyonu protein karbonillerde artış ve protein tiyol gruplarında düşüş olarak ölçülür (140).Oksidatif stresin diğer

parametreleri ile karşılaştırıldığında protein karbonil grupları erken oluşurlar ve hastaların kanında uzun periyotlarla sirküle olurlar. Serumdaki yüksekliği en az 4 saat stabil kalır.(141) Protein karbonil grupları hemen hemen tüm reaktif oksijen türleri tarafından indüklenebilir. Dolayısıyla bu gruplar oksidatif stresin kaynağını yeterince aydınlatmaz. Yüksek seviyede protein karbonilin tespiti genellikle oksidatif stresin ya da protein disfonksiyonunun işaretidir.(142) Aynı zamanda aktif proteinlerin enzimatik olarak inaktivasyonuna yol açabilirler. Protein oksidasyonu, protein disfonksiyonu ve hastalıklar arasındaki ilişki henüz yeterince aydınlatılamamıştır. Fakat enzimlerin ve yapısal proteinlerin oksidatif modifikasyonu hastalıkların etiyojisinde önemli bir rol oynayabilir.(143) Çalışmamızda N-asetil sistein verilen grubun kontrol grubuna yakın oluşu N-asetil sisteinin koruyuculuğunu desteklemektedir. NSY nin yüksek dozunun koruyuculuğu anlamlı ölçüde mevcuttur fakat düşük dozunun hiçbir koruyucu madde verilmeyen gruptan yüksek olması NSY nin ancak belli dozlarda koruyucu etkisinin olduğunu göstermektedir.

Lizozom enzimleri bakımından organizmanın en zengin organı karaciğerdir (144–145–146). Karaciğer hücrelerinin açlık, hipoksi, endotoksinler veya çeşitli toksik maddelere maruz kalması halinde lizozomlar uyarılarak aktiviteleri artmaktadır.(40–42–147) Karaciğer hücre zedelenmesine neden olan etken çok güçlü ise, lizozom zarları zedelenerek enzimler kontrolsüz şekilde sitoplazmaya, oradan da hücre dışı sıvılara boşalmakta, böylece hücre zedelenmesinin şiddetlenmesine ve genişlemesine yol açmaktadır.(37–40–43–148–149–150–151)

Aminotransferazlar; aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT), karaciğer hasarını ve karaciğer hücre nekrozunu belirlemede en sık kullanılan enzimlerdir. İlk kez 1955 yılında De Ritis ve ark. viral hepatitlerde AST yüksekliğine dikkat çekmişlerdir. Daha sonra Wroblewski ve La Due diğer birçok karaciğer hastalığında da bu enzimin yüksek olduğunu saptamışlar. Sonraki çalışmalarda da AST yüksekliği ile birlikte ALT yüksekliği de saptanmış bu enzimlerin karaciğer hücre hasarının göstergeleri olduğu düşünülmüştür. Ancak bu enzim testlerindeki yükseklik, birçok karaciğer hastalığında mevcut olup hastalıkların ayırıcı tanısında sınırlı bir değere sahiptir.(152–153)

Alkalin fosfatazlar aktif merkezde serin içeren çinkometalloenzim ailesindedir. Çok sayıdaki organik fosfat esterlerinin hidrolizlerini özellikle alkalin

pH'da katalizleyen enzim grubudur. Karaciğerde farklı iki alkalen fosfataz formu vardır. Sinüsoid ve kanalikül membranında olduğu gibi sitozol içinde de enzim bulunmaktadır ve safraya bol miktarda salgılanmaktadır Serum alkalen fosfataz düzeyleri birçok karaciğer hastalığında yükselebilmekle birlikte en sık safra akımının engellendiği intra veya ekstrahepatik kolestazda veya primer metastatik karaciğer tümörlerinde yükselmektedir. GGT membrana bağlı bir glikoprotein olup gama glutamil gruplarını özellikle de glutatyonu gama glutamil peptidlerden diğer peptidlere, amino asitlere ve suya taşımaktadır. Başlıca hücre membranlarında bulunmakta ve yüksek oranda sekresyon ve absorpsiyon aktivitesine sahiptir. Büyük miktarlarda böbreklerde, pankreasta, karaciğerde ve prostatda bulunmaktadır GGT'nin klinik uygulamada en sık kullanım alanı; alkalen fosfataz yüksekliği saptanan hastalarda GGT'nin kemik hastalıklarında yükselmemesi nedeni ile kemik ve karaciğer hastalığının ayırımında yardımcı olarak kullanılmasıdır.(154)

Çalışmamızdaki sonuçlarda göstermiştir ki, TAA uygulaması G. Mehmetcik ve ark. TAA uygulamalı çalışmalarında olduğu gibi sıçanlarda karaciğer hasar enzimlerinin serumdaki miktarında artışa neden olmuş (155) ve N-asetil verilen gruptaki ratlarda enzim aktivitesi kontrol grubuna daha yakın daha sonra 10 ml/kg/gün NSY verilen grup ve en yüksek aktivite 1 ml/kg/gün NSY verilen grup olduğu belirlenmiştir

Birçok çalışma doku hidroksiprolin düzeyini kollajen miktarının bir göstergesi olarak kullanmıştır. Yüksek doku hidroksiprolin düzeyi kollajen sentezinin yüksek olduğunu gösterir. Anastomoz iyileşmesinin biyokimyasal tayini kollajen içeriği ile sınırlıdır ve sadece kollajende bulunan hidroksiprolin içeriği ile temsil edilir. Kollajen konsantrasyonuna dayanan sonuçlar nonkollajenaz substratlardaki değişikliklerden etkilenebileceğinden, kollajen düzeyinin ölçülmesi, anastomoz kollajen içeriğini daha iyi yansıtmaktadır. (156–157)

F.Işık ve ark yapmış oldukları kolit çalışmasında NSY' nin kollajen miktarı üzerinde artışa neden olduğunu bildirmişlerse de henüz literatürlerde NSY' nin hidroksiprolin miktarı üzerindeki etkisine dair bir bilgi yoktur. Çalışmamızdaki gruplarda OH prolin düzeylerindeki farklılıklar sadece kontrol grubu ile koruyucu madde içermeyen TAA uygulanmış grup arasında anlamlıdır.

Organizmaya ait biyomembranlar ve hücre içi organeller; membran fosfolipidlerindeki PUFA (çoklu doymamış yağ asitleri) varlığı nedeniyle oksidatif ataklara duyarlıdır. PUFA, hücre fonksiyonunun yapılabilmesi ve özellikle hücre membranı, endoplazmik retikulum ve mitokondri gibi hayati öneme sahip organeller için gereklidir. Dışardan alınan çoklu doymamış yağ asitlerinin, oksidatif süreç içerisine giren dokudaki azalmaya yüz tutmuş PUFA yerine geçmek suretiyle koruyucu etkisini gösterdiği ileri sürülmüştür. (158–159)

Patalojik incelemeler sonucunda TAA uygulamasının karaciğer dokularında nekroz oluşumuna neden olduğu gözlemlendi. Koruyucu verilen gruplarda belirgin bir nodülleşme ve septa oluşumu izlenmedi. Koruyucu olarak NSY ve NAC verdiğimiz gruplarda sirozlaşma gözlenmemiş ve koruyuculuğunu araştırdığımız NSY, NAC ile aynı düzeyde koruyuculuk göstermiştir. Bu da bize biyokimyasal sonuçlarımızdaki gibi NSY' nin NAC gibi koruyucu bir etkiye sahip olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan TBARS, protein karbonil ve hidroksiprolin düzeylerinin analizi ve oksidan / antioksidan düzeyini belirlemek için SOD, CAT, GSH-Px ve MPO enzim aktivitelerinin ölçümüyle çörek otu yağının tiyoasedamid ile indüklenmiş karaciğer hasarına karşı koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir.

TAA toksisitesine karşı NSY uygulanmasıyla, serbest radikallerin temizlenmesi, antioksidan aktivitenin artışı ve protein karbonil gruplarının oluşumunun kısmen engellenmesi sağlanarak NSY'nin karaciğer hücre hasarının engellenmesinde katkısı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca karaciğer dokularında TAA uygulanan gruba verilen NSY, NAC tedavisi ile oksidan /antioksidan dengeyi tamamen aynı olmasa da hemen hemen paralel bir şekilde olumlu yönde değiştirmiş ve protein karbonil gruplarının oluşumunu engellemiştir. Böylece NSY'nin sıçanlarda NAC tedavisinde olduğu gibi antioksidan bir etki gösterdiği, TAA'in oluşturduğu hasarı kısmende olsa geriletmediği ve koruyucu etkide bulunduğu söylenebilir.

Mevcut çalışmanın sonuçları ile TAA'in indüklediği karaciğer hasarı üzerinde NSY' nin koruyucu etkiye sahip olabileceği gösterilmiştir. Gerek rutin karaciğer fonksiyon testleriyle gerekse oksidan /antioksidan parametreler ve histopatolojik değişikliklerle belirlenen hepatoksisitenin NSY ile kısmen inhibe

edildiği gösterilmiştir. TAA ile ortaya çıkan karaciğer hasarına pek çok faktör katılırken, reaktif oksijen türleri majör rol oynar. Mevcut datalarla NSY'nın SOD, PC ve MPO düzeyleri üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu açık bir şekilde görülmektedir. Bizim çalışmamızın sonuçlarına göre NSY, TAA ile indüklenen hepatoksisitenin şiddetini azaltmaya yardımcı olabilir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, tiyoasetamidle indüklenen karaciğer hasarının sıçan karaciğer dokusu oksidan /antioksidan dengesi üzerine etkisi ile bu etki üzerinde çörek otu (*Nigella sativa*) yağının (NSY) olası koruyucu rolünün olup olmadığını pozitif kontrol olarak NAC'nin kullanıldığı deneysel hayvan modeliyle araştırmayı amaçladık. Bu amaçla, oksidan antioksidan parametrelerden, TBARS ve PC düzeyleri ile SOD, CAT, GSH-Px ve MPO aktivitelerindeki değişiklikler izlenmiştir.

Mevcut çalışmanın sonuçları ile TAA'in indüklediği karaciğer hasarı üzerinde *Nigella sativa* yağının koruyucu etkiye sahip olabileceği gösterilmiştir. Gerek rutin karaciğer fonksiyon testleriyle gerekse oksidan /antioksidan parametreler ve histopatolojik değişikliklerle belirlenen hepatoksisitenin NSY ile kısmen inhibe edildiği gösterilmiştir. TAA ile ortaya çıkan karaciğer hasarına pek çok faktör katılırken, reaktif oksijen türleri majör rol oynar. Mevcut datalarla NSY'nin SOD, PC ve MPO düzeyleri üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu açık bir şekilde görülmektedir. Bizim çalışmamızın sonuçlarına göre NSY, TAA ile indüklenen hepatoksisitenin şiddetini azaltmada yardımcı olabilir.

TAA toksisitesine karşı NSY uygulanmasıyla, serbest radikallerin temizlenmesi, antioksidan aktivitenin artışı ve protein karbonil gruplarının oluşumunun kısmen engellenmesi sağlanarak NSY'nin karaciğer hücre hasarının engellenmesinde katkısı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca karaciğer dokularında TAA uygulanan gruba verilen NSY, NAC tedavisi ile oksidan /antioksidan dengeyi tamamen aynı olmasa da hemen hemen paralel bir şekilde olumlu yönde değiştirmiş ve protein karbonil gruplarının oluşumunu engellemiştir. Böylece NSY'nin sıçanlarda NAC tedavisinde olduğu gibi antioksidan bir etki gösterdiği, TAA'in oluşturduğu hasarı kısmende olsa geriletmediği ve koruyucu etkide bulunduğu söylenebilir.

Hasara maruz kalan sıçanların karaciğer dokusunda lipid peroksidasyonu göstergesi olan TBARS içeriği ile antioksidan savunma sistemlerinden olan CAT ve GSH-Px enzim aktivitelerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir fark gözlenmemiştir. TAA sıçanların karaciğer dokusundaki oksidan/ antioksidan denge üzerinde bu parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı bir değişime yol açmamıştır. NSY'nin antioksidan aktivitesinin değerlendirilmesinde CAT aktivitesinde gruplar arasında

istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamasına rağmen, TAA grubunda azalan CAT aktivitesi 10 ml/ kg/ gün NSY verilen grupta ve NAC grubunda artış kaydetmesi de NSY'nin NAC'ye benzer bir antioksidan aktiviteye sahip olduğunu bir göstergesi olarak değerlendirilebilir.

Karaciğerde TAA ile indüklenen toksisite, TAA grubunda proteinlerin oksidatif hasarını arttırmıştır. 1 ml/kg/gün NSY+TAA grubundaki PC düzeylerinin TAA grubundan daha yüksek olması, NSY'nin düşük düzeylerde toksik etki oluşturabileceğini göstermektedir. 10ml/kg/gün NSY dozunun ise TAA toksisitesiyle oluşan PC düzeylerinde bir miktar azalmaya neden olması, NSY'nin bu hepatoksisite modelinde faydalı olabileceği şeklinde değerlendirilmiştir. TAA+NAC grubundaki PC değerlerinin neredeyse kontrol grubu değerlerine inmesi, NSY dozunun arttırılmasıyla, NAC grubundaki sonuçlara yakın bir korumanın sağlanabileceğini göstermektedir. PC düzeyleriyle ilgili bu sonuçlar sıçan karaciğer dokusunda NSY'nin antioksidan etkisinden dolayı serbest radikalleri yok ettiğini göstermektedir.

Nötrofillerin dokulara infiltrasyonu, primer olarak nötrofillerde bulunan bir enzim olan MPO aktivitesindeki değişikliklerle değerlendirilmektedir. Sıçan karaciğerinde MPO aktivitesinin artışı hepatosellüler toksisiteye karşı inflamatuvar bir cevabın aktivasyonunu önermektedir. Bizim çalışmamızda, TAA verilen sıçanların karaciğer dokularında MPO aktivitesinde kontrol grubuna göre yaklaşık olarak % 50 oranında bir artış olduğunu gözlemledik. Tek başına bu bulgu TAA ile indüklenen karaciğer hasarında nötrofil kaynaklı serbest radikal oluşumunu arttırdığının delili olabilir. NAC uygulanması karaciğer nötrofil invazyonunu, MPO aktiviteleri göz önüne alındığında kontrol grubunda olan değere çok yakın bir aktiviteye düşürürken, NSY gruplarında ise özellikle 1 ml NSY verilen grupta NAC kadar olmasa da TAA grubuyla kıyaslandığında nispeten MPO aktivitelerinde bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Böylece NSY, NAC'ye benzer bir etki sergilerken, bu etki NAC'nin etkinliği kadar göz doldurucu değildir.

Süperoksit radikalini karaciğerde yıkan majör antioksidan enzim SOD'dur. NSY ve NAC, TAA ile birlikte verildiğinde SOD'un enzim aktivitesini sadece TAA verilen gruba göre daha yüksek seviyeye çıkarması bu iki antioksidan karakterli maddenin direkt olarak reaktif oksijen türlerini süpürücü etkilerinin bir göstergesidir.



Sonuç olarak, NSY'nin TAA ile indüklenen hepatoksisitede faydalı olabileceği kanaatindeyiz. Böylece, NSY'nin TAA ile birlikte alınması, hem serbest radikal oluşumunun inhibe edilmesi hemde antioksidan düzeylerinin iyileştirilmesinde rol oynayabileceğini ortaya koymuştur. NSY'nin etki mekanizmasının tam olarak ortaya konulabilmesi için bundan sonraki deneysel çalışmaların farklı patolojik modellerde değişik dozlardaki NSY uygulamaları ile devam etmesi gerekmektedir. NSY karaciğeri oksidatif strese karşı korumada klinik olarak yararlı olabilir. Dolayısıyla deneysel hayvan modelleri doğrudan klinik uygulamalara uyarlanmasa da yaptığımız çalışmanın sonuçları bu konuda ışık tutabilir. İlk kez bizim datalarımızla *Nigella sativa* yağının TAA ile indüklenen toksisiteye karşı karaciğer dokusunda kısmen de olsa koruyucu bir etki sergileyebileceği gösterilmiştir.

## 7.KAYNAKLAR

- 1-Van Eyken, P. Desmet, V.J.(1993). Cytokeratins and the Liver. *Liver*, 13, 113
- 2-Sherlock, S. Dooley, J. (2002). *Diseases of the Liver and Biliary System* (11. bs.) Milan: Blackwell Science.
- 3-Biolac-Sage, P. Lafon, M.E. Saric, J. (1990). Nerves and perisinusoidal cells in human liver. *J.Hepatol*, 10,105
- 4-Liver (anatomy) - Britannica Online Encyclopedia. Erişim: 12 Ekim 2009, <http://www.britannica.com/EBchecked/topic-art/344579/68633/Anterior-and-posterior-views-of-the-liver>
- 5-Van Leeuwen, M.S. Noordzij, J. Fernandez, M.A. (1994) Portal venous and segmental anatomy of the right hemiliver: observations based on three-dimensional spiral CT renderings. *Am. J. Roentgenol.* 163, 1395
- 6-Greene C. *The Anatomy of the rat Transection of the American Philosophical Society Held at Philedelphia for Promoting Useful Knowledge. New Series, Vol. 27.* Hafner Publishing Company. New York;1968
- 7-Liver, Gall Bladder (mouse only). Erişim: 12 Ekim 2009, [http://www.item.fraunhofer.de/reni/trimming/img1/liver\\_m1.jpg](http://www.item.fraunhofer.de/reni/trimming/img1/liver_m1.jpg)
- 8-Schroder, R. Muller, O. Bircher, J. (1985). The portacaval and splenocaval shunt in the normal rat. A morphometric and functional reevaluation. *J Hepatol* 1, 107–123
- 9-Bioulac-Sage, P. Le Bail, B. Balaboud, C. (2007). Liver and biliary tract histology. J. Rodes, J.P. Benhamou, A.T. Blei, J. Reichen, M. Rizzetto. (Ed). *Textbook of Hepatology* (s. 9–19). Singapore: Blackwell Publishing.
- 10-Malarkey, D.E. Johnson, K. Ryan, L. (2005). New insights into functional aspects of liver morphology. *Toxicol Pathol.* 33, 27–34
- 11-MacSween, R.N.M. Scothorne, R.J. (1994). *Developmental anatomy and normal structure.* In: R.N.M. MecSween, P.P. Anthony, P.J. Scheuer. (Ed.). *Pathology of the Liver.* (s. 1–49).
- 12-Edinburgh: Churchill Livingstone Desmet, V. (2001). Organizational principles in the liver. In: I.M. Arias, J.L. Boyer, F.V. Chisari. (Ed.). *The Liver. Biology and Pathobiology.* (4.bs). (s. 3–15). New York: Raven Pres. )
- 13-Digestive System Erişim:12 Ekim 2009, [http://www.mc.vanderbilt.edu/histology/labmanual2002/labsection3/ Pancreas Liver Gallbladder 03.htm](http://www.mc.vanderbilt.edu/histology/labmanual2002/labsection3/Pancreas%20Liver%20Gallbladder%2003.htm))

- 14-Bioulac-Sage, P. Balabaud, C. (1988). Sinusoids in Human Liver: Health and Disease. Rijswijk: Kupffer Cell Foundation
- 15-Wake, K. (1995). Structure of the sinusoidal wall in the liver. In E,Wisse. D.L. Knook. K, Wake. (Ed). Cells of the Hepatic Sinusoid. Leiden: Kupffer Cell Foundation (s. 241–246)
- 16-Enomoko, K. Nishikawa, Y. Omori, Y. (2004). Cell biology and pathology of liver sinusoidal endothelial cells. Med Electron Microsc, 37, 208–215.)
- 17-Braet, F. Luo, D. Spector, I. (2001). Endohelial and pit cell in the liver. In: I.M. Arias, J.L. Boyer, F.V. Chisari.(Ed.) *The liver. Biology and Pathobiology*, (4. bs.) (s.437–453). New York. Raven Pres.
- 18-McCuskey, R.S. (1994) The hepatic microvascular system. In: I.M. Arias, J.L. Boyer, F.V. Chisari.(Ed.) *The liver. Biology and Pathobiology*, (4. bs.) (s.1089–1106). New York. Raven Pres.
- 19-Oda, M. Yokomori, H. Han, J.Y. (2003) Regulatory mechanisms of hepatic microcirculation. Clin Hemorheal Microcirc 29, 167–182.)
- 20-Braet, F. Wisse, E. (2002). Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a riview. Comp Hepatol, 1, 1
- 21-Naito, M. Hasegawa, G. Ebe, Y. (2004). Differentiation and function of Kupffer cells. Med Electron Microsc. 37, 16–28
- 22-Li, D. Friedman, S. (2001) Hepatik stellate cells: morphology, function, and regulation in the liver. İn: I.M. Arias, J.L. Boyer, F.V. Chisari (Ed.). *The Liver. Biology and Pathobiology*, (4. bs.) 455–473, New York: Raven Press.
- 23-Wake, K. (1995). Structure of the sinusoidal wall in the liver. İn E,Wisse. D.L. Knook. K, Wake. (Ed). *Cells of the Hepatic Simusoid. Leiden: Kupffer Cell Foundation* (s. 241–246).
- 24-Greenwel, P. Rojkind, M. (2001) *The extracellular matrix of the liver*. In: I.M. Arias, J.L. Boyer, F.V. Chisari (Ed.). *The Liver. Biology and Pathobiology*, (4. bs.) 469–473, New York: Raven Press.
- 25-Sodeman's Pathologic Physiology, (*Sodeman's Fizyopatoloji*). Mechanism's of disease. Cilt II. Bölüm 4
- 26-Dr. Sevda Müftüoğlu; *Sindirim Sistemi Embriyolojisi*.  
[http://www.medinfo.hacettepe.edu.te/ders/TR/D2/5/2209\\_files/frame.htm](http://www.medinfo.hacettepe.edu.te/ders/TR/D2/5/2209_files/frame.htm)

27. Moore. *Human Embryology* 6th Edition. Saunders Company.
28. Erdoğan Gürsoy, Emel Koptagel. *Embriyoloji Atlası*. 1997. Shf: 125.
- 29-Kim HJ, Graham DW, DiSpirito AA, Alterman MA, Galeva N, Larive CK, Asunskis D, Sherwood PM., 2004 Sep 10;305(5690):1612–5.Methanobactin, a copper-acquisition compound from methane-oxidizing bacteria. USA.
- 30- Schroeder EK, de Souza N, Santos DS, Blanchard JS, Basso LA. 2002 Sep;3(3):197–225.Drugs that inhibit mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*.
- 31-Shepard CC, Jenner PJ, Ellard GA, Lancaster RD.,1985 Dec;53(4):587–94.An experimental study of the antileprosy activity of a series of thioamides in the mouse.
- 32-Mangipudy, R.S., Chanda, S., Mehendale, H.M., 1995. Tissue repair response as a function of dose in thioacetamide hepatotoxicity. *Environmental Health Perspectives* 103, 260–267.
- 33-Okuyama, H., Nakamura, H., Shimahara, Y., Araya, S., Kawada, N., Yamaoka, Y., Yodoi, J., 2003. Overexpression of thioredoxin prevents acute hepatitis caused by thioacetamide or lipopolysaccharide in mice. *Hepatology* 37, 1015–1025 (Okuyama et al., 2003)
- 34-Low, T.Y., Leow, C.K., Salto-Tellez, M., Chung, M.C., 2004. A proteomic analysis of thioacetamide-induced hepatotoxicity and cirrhosis in rat livers. *Proteomics* 4, 3960–3974.
- 35-Moreira, E., Fontana, L., Periago, J.L., Sanchez De Medina, F., Gil, A., 1995. Changes in fatty acid composition of plasma, liver microsomes, and erythrocytes in liver cirrhosis induced by oral intake of thioacetamide in rats. *Hepatology* 21, 199–206.
- 36-Natarajan, S.K., Thomas, S., Ramamoorthy, P., Basivireddy, J., Pulimood, A.B., Ramachandran, A., Balasubramanian, K.A., 2006. Oxidative stress in the development of liver cirrhosis: a comparison of two different experimental models. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 21, 947–957.
- 37.- Alpcers DH, KJ Isselbacher: The effect of carbon tetrachloride on rat liver lysosomes. *Bioch Bioph Acta*, 137: 33–42, 1967.
- 38- Baccino FM, D Cantino, and MF' Zuretti, Studies on the hepatotoxicity of *A. phalloides* in the rat. I. Liver cell vacuolation. *Exp Mol Path*, 24: 156–75, 1976.

- 39- Matsumoto Y, T Suga: Changes in lysosomal enzymes in experimental hepatic damage. *Chem Phar Bull*, 26( 1) : 226–33, 1978.
- 40-Mori K, K Takagi, M Morena, N Akagi: Lysosomal enzyme in endotoxic shock. *Surg GynObs*, 152(4): 427–32, 1981.
- 41-Pagliario L, F Giglio, S Lemoli, A Catania and P Citerella: (3-glucoronidase and acid phosphatase activities of lysosomal preparations from human liver tissue obtained by needle biopsy from subjects with acute hepatitis and cirrosis. *J Lab Clin Med*, 63.977–85,1964.
- 42- Slater T F: Lysosomal changes in experimentally induced liver injury. *Proc Roy Soc Med*, 59.877–79, 1966.
- 43- Zuretti MF, Baccino M M: Studies on the hepatotoxicity of A. phalloides II. Biochemical analysis of the lysosomal changes. *Exp M o l Path*, 24: 176–92, 1976.
- 44- Jaya Chilakapati, Kartik Shankar, Midhun C. Korrapati, Ronald A. Hill, and Harihara M. Mehendale Received May 17, 2005; accepted September 20, 2005  
Saturation Toxicokinetics Of Thioacetamide: Role In Initiation Of Liver Injury
- 45- Bruck R, Aeed H, Shirin H, Matas Z, Zaidel L, Avni Y, et al. The hydroxyl radical scavengers dimethylsulfoxide and dimethylthiourea protect rats against thioacetamideinduced hepatic failure. *J Hepatol* 1999;31.27–38.
- 46-Doğru-Abbasoğlu S, Kanbağlı O, Balkan J, C,evikbas, U, Aykac,-Toker G, Uysal M. The protective effect of taurine against thioacetamide hepatotoxicity of rats. *Human Exp Toxicol* 2001;20.23–7
- 47-Sanz N, Diez-Fernandez C, Andres D, Cascales M. Hepatotoxicity and aging: endogenous antioxidant systems in hepatocytes from 2-, 6-, 12-, 18- and 30-month-old rats following a necrogenic dose of thioacetamide. *Biochim Biophys Acta* 2002;1587,12–20.
- 48- Sehwat A, Khan TH, Prasad L, Sultana S. Buteamonosperma and chemomodulation: protective role against thioacetamide-mediated hepatic alterations in Wistar rats. *Phytomedicine* 2006;13.157–63.
- 49-Sun F, Hayami S, Ogiri Y, Haruna S, Tanaka K, Yamada Y,et al. Evaluation of oxidative stress based on lipid hydroperoxide, vitamin C and vitamin E during apoptosis and necrosis caused by thioacetamide in rat liver. *Biochim Biophys Acta* 2000;1500:181–5.

- 50-Uskukovic-Markovic S, Milenkovic M, Topic A, Kotur-Stevuljevic J, Stefanovic A, Antic-Stankovic J. Protective effects of tungstophosphoric acid and sodium tungstate on chemically induced liver necrosis in Wistar rats. *J Pharm Pharm Sci* 2007;10:340–9
- 51-Cruz A, Padillo FJ, Torres E, Navarrete CM, Munoz-Castaneda JRM, Caballero FJ, et al. Melatonin prevents experimental liver cirrhosis induced by thioacetamide in rats. *J Pineal Res* 2005;39:143–50.
- 52-Sehrawat A, Khan TH, Prasad L, Sultana S. Butea monosperma and chemomodulation: protective role against thioacetamide-mediated hepatic alterations in Wistar rats. *Phytomedicine* 2006;13:157–63.
- 53-Tunez I, Munoz MC, Villavicencio MA, Medina FJ, DePrado EP, Espejo I, et al. Hepato- and neurotoxicity induced by thioacetamide: protective effects of melatonin and dimethylsulfoxide. *Pharmacol Res* 2005;52:223–8.
- 54-Uskukovic-Markovic S, Milenkovic M, Topic A, Kotur-Stevuljevic J, Stefanovic A, Antic-Stankovic J. Protective effects of tungstophosphoric acid and sodium tungstate on chemically induced liver necrosis in Wistar rats. *J Pharm Pharm Sci* 2007;10:340–9.
- 55-[www.sargentwelch.com/pdf/msds/Thioacetamide\\_756.00.pdf](http://www.sargentwelch.com/pdf/msds/Thioacetamide_756.00.pdf)
- 56- De Barber AE, Mdluli K, Bosman M, Bekker LG, Barry CE 3rd., (2000) 15;97(17):9677–82. Ethionamide activation and sensitivity in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. MD 20852, USA.
- 57- Wang T, Shankar K, Ronis MJ, Mehendale HM. (2000) Aug;294(2):473–9. Potentiation of thioacetamide liver injury in diabetic rats is due to induced CYP2E1. 71209–0495, USA.
- 58-Porter ve Neal, 1978 Jul-Aug;6(4):379–88. Metabolism of thioacetamide and thioacetamide S-oxide by rat liver microsomes. Porter WR, Neal RA
- 59- Vannelli TA, Dykman A, Ortiz de Montellano PR. (2002 Apr 12;277(15):12824–9. Epub 2002 Jan 31. The antituberculosis drug ethionamide is activated by a flavoprotein monooxygenase. CA 94143–0446, USA.) 2002.
- 60-Hanzlik ve Cashman, (1983 May-Jun;11(3):201–5. Microsomal metabolism of thiobenzamide and thiobenzamide S-oxide.

- 61- Dodge AG, Richman JE, Johnson G, Wackett LP. 2006 Dec;72(12):7468–76. Epub 2006 Sep 22. Metabolism of thioamides by *Ralstonia pickettii* TA. MN 55108, USA.
- 62-umbbd. msi. umn. edu/.../TAA\_map.html - Amerika Birleşik Devletleri
- 63-Asetilsistein. Erişim: 14 Aralık 2009, <http://tr.wikipedia.org/wiki/Asetilsistein>
- 64-B. H. Ali and Gerald Blunden; REVIEW ARTICLE Pharmacological and Toxicological Properties of *Nigella sativa* PHYTOTHERAPY RESEARCH *Phytother. Res.* 17, 299–305 (2003)
- 65-Terzi A, Coban S, Yildiz F, et al. Protective effects of *Nigella sativa* on intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *J Invest Surg.* 2010;23.21–27.
- 66- Burits M. and Bucar F. (2000) Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil- *Phytother. Res.* 14, 323–328 (s)
- 67- Houghton, PJ; Zarka, R; De Las Heras, B; Hoult, JR (1995). "Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation". *Planta medica* 61 (1): 33–6. Doi:10.1055/s-2006-957994. PMID 7700988.68-
- 68-Protective Effects of Black Cumin (*Nigella sativa*) Oil on TNBS-Induced Experimental Colitis in Rats F. Isik, Tugba Tunali Akbay, A. Yarat, Z. Genc, R. Pisiriciler, E. Caliskan-Ak, S. Cetinel, A. Altıntas ,G. Sener Received: 22 March 2010 / Accepted: 18 June 2010 DOI 10,1007/s10620–010–1333-z
- 69-Al-Shabanah, OA; Badary, OA; Nagi, MN; Al-Gharably, NM; Al-Rikabi, AC; Al-Bekairi, AM (1998). "Thymoquinone protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity without compromising its antitumor activity". *Journal of experimental & clinical cancer research: CR* 17 (2): 193–8. PMID 9700580.
- 70-Yalin S, Sahin NO, Comelekoglu U, Yalin E, Bagis S, Hatungil R, Dincer Kaya N. Chronic cadmium exposure affects the antioxidant defense system in heart of ovariectomized rats. *Journal of the Bulgarian Pharmaceutical Scientific Society* 2005;1.114–7.
- 71-Hatungil R, Yalin S, Comelekoglu U, Bagis S, Sahin NO, Arslan H, Eroglu P, Berkoz M. Cadmium induced changes in lipid peroxidation and antioxidant status in brain of ovariectomized rats. *Asian J Chem* 2006;18.1467–73

- 72-Jacob RA, Burr BJ. Oxidative damage and defence. Am J Clin Nutr 1996;63:985–90)
- 73-Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (2001). *Free Radicals In Biology And Medicine*, Third edition, Oxford Science Publications, 22–24.)
- 74-Altan N., Dinçel A.S., Koca C. (2006). Diabetes mellitus and oksidatif stress. Turk J Biochem. 31 (2), 51–56.
- 75-Akkuş, İ. (1995). *Serbest radikaller ve fizyolojik etkileri* (1.bs). Konya: Mimoza Yayınları.
- 76-Babior, B.M. (2000). Phagocytes and oxidative stress. The American Journal of Medicine. 109 (1), 33-44.) .
- 77-Little RE, Gladen BC. Levels of lipid peroxides in uncomplicated pregnancy: a review of the literature. Reprod Toxicol 1999;13:347–52.
- 78-Cherubini, A. Ruggiero, C., Polidori, M.C., Mecocci, C. (2005). Potential markers of oxidative stress in stroke. Free Radical Biology & Medicine. 39, 841–852.
- 79-Memişoğulları, R. (2005). Diyabette Serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. Düzce Tıp Fakültesi Dergisi. 3, 30–39.)
- 80-Gürdöl, F., Ademoğlu, E. (2006). Serbest radikaller ve oksidatif stres. Biyokimya. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi
- 81-Agar NS Sadrzadeh SM Hallaway PE Eaton JW Erythrocyte catalase. Asomatic defence Clin Invest 1986;77:319–321
- 82-Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W. (2004). Harper Biyokimya (25.bs.).93- (N. Dikmen, T. Özgünen, Çev.). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi.)
- 83-Antioksidanlar - (Bitirme Ödevi). Erişim: 31 Aralık 2009. <http://www.zayim.com/?tag=ozellikleri>
- 84-Akkuş, İ., Kalak, S., Vural, H., Çağlayan, O., Menekşe, E., Can, G., Durmuş, B. (1996). Leukocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and serum and leukocyte vitamin c levels of patients with type II diabetes mellitus. Clin Chim Acta. 244, 221–227.



- 85-Mayes PA. Structure and function of the water-soluble vitamins In: Murray RK, Granner DK, PA-Rodwell vw. Harper's Biochemistry. 23.ed.Lange medical publication, London. 1993,573–587
- 86-Murata A. Smoking and vitamins c. Selected vitamins. Minerals and functional consequences of maternal malnutrition. Vitamins amd hormones. 1991,64:31–57
- 87-Richard A. Larson; Naturally Occuring Antioxidants, Boca Raton (Lewis Publishers, 1997)
- 88-Verit FF, Erel O, Sav M, et al. Oxidative stress is associated with clinical severity of nausea and vomiting of pregnancy. Am J Perinat 2007;24:545–8
- 89-Serafini, M., Del Rio, D. (2004). Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool?Redox Report. 9 (3), 145–152.
- 90-Edwards, A.D. (1995). The pharmacology of inhaled Nitric oxide. Arch Dis Child. 72, 127–130
- 91-Güray, A., Samancı, N., Ovalı, F., Dağoğlu, T. (1997). Nitrik Oksit: Fizyolojisi ve klinik önemi. T Klin J Med. 17, 115-119..
- 92-Vincent, A.M., Russell, J.W., Low, P., Feldman, E.L. (2004). Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. Endocrine Reviews. 25, 612–628
- 93-Borland, C.D.R., Higenbottam, T.W. (1989). A simultaneous single breath measurement of pulmonary diffusing capacity with nitric oxide and carbonmonoxide. Eur Respir J. 2, 56–63
- 94-Azot oksit. Erişim: 10 Ocak 2010. [http://tr.wikipedia.org/wiki/Azot\\_oksit](http://tr.wikipedia.org/wiki/Azot_oksit))
- 95-Aleynik, I.S., Leo, A.M., Ma, Y., Aleynik, K.M., Lieber, S.C. (1997). Polyenyolphosphatidylcholine prevents carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation while it attenuates liver fibrosis. J hepatol. 27, 554–561
- 96-Yılmaz S., Bahçecioğlu, İ.H. (2000). Karbontetraklorür ile siroz oluşturulmuş ratlarda lipid peroksidasyonu, antioksidant enzim ve pirüvat kinaz aktiviteleri. Turk J Vet Anim Sci. 24, 25-28
- 97-Young, I.S., Woodside, J.V. (2001). Antioxidants in health and disease. J Clin Pathol. 54, 176–186
- 98-Stadtman, E.R., Levine, R.L. (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. Amino Acids. 25, 207–218

- 99-Glbahar, . (2007). Protein oksidasyonunun mekanizması, nemi ve yaşlılıkla ilişkisi. Turkish Journal of Geriatrics.10(1), 43–48
- 100-Grandhee, S., Monnier, V.M.(1991). Mechanism of formation of the Maillard protein cross-link pentosidine. J Biol Chem. 266, 11649–11653
- 101- Swallow AJ. Radiation chemistry of organic compounds. New York, John Wiley & Sons, 1960; 211–224.
- 102- Garrison WM, Jayko ME, Bennett W. Radiation-induced oxidation of protein in aqueous solution. Rad Research 1962; 16: 483–502.
- 103- Schuessler H, Schilling K.Oxygen effect in radiolysis of proteins. Part 2. Bovine serum albumin. Int J Radiat Biol. 1984; 45: 267–281.
- 104-Kayalı, R., akatay, U. (2004). Protein oksidasyonunun ana mekanizmaları. Cerrahpaşa J Med. 35, 83–89
- 105- Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. J Biol Chem 1997; 272: 20313–20316
- 106-Aspartat Aminotransferaz (AST, SGO T). Erişim:11 ocak 2010. <http://www.saglikdanic.com/tekgoster.asp>
- 107-Alanin Aminotransferaz (ALT, SGPT). <http://www.saglikdanic.com/tekgoster.asp>
- 108-Gama-Glutamil Transferaz (GGT). Erişim: 11 ocak 2010. <http://www.saglikdanic.com/tekgoster.asp>
- 109-Duman, C., Erden, B.F. (2004). Birinci basamak sağlık hizmetlerine yönelik biyokimyasal laboratuvar verilerinin kısa yorumu. Sted (13). 7, 256–262
- 110-Bilirübin. Erişim: 11 ocak 2010. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Bilir%C3%BCbin> .
- 111-(Kolesterol. Erişim: 11 ocak 2010. <http://homepage.uludag.edu.tr/~mtayar/kolestrol.htm>)
- 112-(Trigliserid: Erişim: 11 ocak 2010. [http://www.turkcebilgi.com/soru\\_cevap\\_16286\\_trigliserid-nedir.html](http://www.turkcebilgi.com/soru_cevap_16286_trigliserid-nedir.html)
- 113-(Sun, Y., Oberley, L.W., Li, Y.A. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Cli. Chem. 34, 497–500
- 114-Durak, I., Yurtaslani, Z., Canbolat, O., Akyol, O. (1993). A methodological approach to superoxide dismutase activity assay based on inhibition of nitroblue tetrazolium (NBT) reduction. Clin. Chem. Acta. 214, 103–104

- 115-Aebi, H. (1974). Catalase. In: Bergmeyer HU (ed). Methods of enzymatic analysis. Academic press: New York and London. 673–677
- 116-Paglia, D.E., Valentine, W.N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70, 158–170.)
- 117-Wei H, Frenkel K. :in vivo formation of oxidized dna bases in tumor promotor treated mouse skin canser res 19991;51:4443–9
- 118-Esterbauer, H., Cheeseman, K.H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation product: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. In: Packer L, Glazer AN, editors. Methods in enzymology: V 186, oxygen radicals in biological systems. California: Academic Press; Methods Enzymol. 186, 407–21
- 119-Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. In: Packer L, Glazer AN, editors. Methods in enzymology. Vol. 186. New York: Academic Press; 1990. p. 464–78
- 120-Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurment with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193, 265–75
- 121-Woessner JB:The determination of hydroxy poline in tissue protein samples containing small proportions of this amino acid. *Arch Biochem Biophysics*1961;93:440-7
- 122-Fitzhugh, O.G., Nelson, A.A., 1948. Liver tumors in rats fed thiourea or thioacetamide. *Science* 108, 626–628.
- 123-Zaragoza, A., Andres, D., Sarrion, D., Cascales, M., 2000. Potentiation of thioacetamide hepatotoxicity by phenobarbital pretreatment in rats. Inducibility of FAD monooxygenase system and age effect. *Chemico-Biological Interactions* 124, 87–101
- 124-Weinbroum, A.A., Rudick, V., Ben-Abraham, R., Karchevski, E. (2000). N-acetyl-L-cysteine for preventing lung reperfusion injury after liver ischemia-reperfusion: A possible dual protective mechanism in a dose-response study. *Transplantation.* 69, 853–859

- 125-Koo, A., Komatsu, H., Tao, G., Inoue, M., Guth, P.H., Kaplowitz, N. (1992). Contribution of no-reflow phenomenon to hepatic injury after ischemia-reperfusion: evidence for a role for superoxide anion. *Hepatology*. 15, 507–514
- 126-Kharazmi, A., Nielsen, H., Schiotz, P.O. (1988). N-acetylcysteine inhibits human neutrophil and monocyte chemotaxis and oxidative metabolism. *Int J Immunopharmacol*. 10, 39–46
- 127-Aruoma, O.I., Halliwell, B., Hoey, B.M., Butler, J. (1989). The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med*. 6, 593–597
- 128-Cuzzocrea, S., Mazzon, E., Costantino, G., Serraino, I., De Sarro, A., Caputi, A.P. (2000). Effects of N-acetylcysteine in a rat model of ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 47, 537–548
- 129-Victor, V.M., Fuente, M. (2002). N-acetylcysteine improves in vitro the function of macrophages from mice with endotoxin-induced oxidative stress. *Free Radic Res*. 36, 33–45.
- 130-Devlin, J., Ellis, A.E., McPeake, J., Heaton, N., Wendon, J.A., Williams, R. (1997). N-Acetylcysteine improves indocyanine green extraction and oxygen transport during hepatic dysfunction. *Crit Care Med*. 25, 236–242
- 131-Rank, N., Michel, C., Haertel, C., Lenhart, A., Welte, M., Meier-Hellmann, A. (2000). N-Acetylcysteine increases liver blood flow and improves liver function in septic shock patients: results of a prospective, randomized, double-blind study. *Crit Care Med*. 28, 3799–3807.
- 132-Regueira, F.M., Cienfuegos, J.A., Pardo, F., Hernandez, J.L., ez-Cabellero, A., Sierra, A. (1997). Improvement in early function of the hepatic graft after treatment of the donor with N-acetylcysteine: clinical study. *Transplant Proc*. 29, 3350–3352
- 133-Gastroprotective activity of *Nigella sativa* oil and its constituent, thymoquinone, against gastric mucosal injury induced by ischaemia/reperfusion in rats. El-Abhar HS, Abdallah DM, Saleh S *J Ethnopharmacol*. 2003 Feb;84(2–3):251–8. PMID: 12648823 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- 134- Kanter M, Coskun O, Uysal H. *Arch Toxicol*. 2006 Apr ;The antioxidative and antihistaminic effect of *Nigella sativa* and its major constituent, thymoquinone on

ethanol-induced gastric mucosal damage.;80(4):217–24.PMID: 16240107 [PubMed - indexed for MEDLINE]

135- İhsan Yaman, Engin Balikci, Turkey Received 19 February 2009; Protective effects of nigella sativa against gentamicin induced nephrotoxicity in rats accepted 20 March 2009; *Experimental and Toxicologic Pathology* 62(2010)183–190

136-Mitchell, J.R., Jollow, D.J., Potter, W.Z., Gillette, J.R., Brodie, B.B. (1973). Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. *J Pharmacol Exp Ther.* 187, 211–217

137-Vendemiale, G., Grattagliano, I., Caruso, M.L., Serviddio, G., Valentini, A.M., Pirrelli, M., Altomare, E. (2001). Increased oxidative stress in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in the rat: effect of acetylcysteine and interferon- $\alpha$ . *Toxicol Appl Pharmacol.* 175, 130–139

138-Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., Colombo, R. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta.* 329, 23–38

139-Dean, R.T., Fu, S., Stocker, R., Davies, M.J. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J.* 324, 1–18

140-Quinlan, G.J., Evans, T.W., Gutteridge, J.M. (1994). Oxidative damage to plasma proteins in adult respiratory distress syndrome. *Free Radic Res.* 20(5), 289–98

141-Pantke, U., Volk, T., Schmutzler, M., Kox, W.J., Sitle, N., Grune, T. (1999). Oxidized proteins as a marker of oxidative stress during coronary heart surgery. *Free Radic Biol Med.* 27(9–10), 1080–6

142-Aksenov, M.Y., Aksenova, M.V., Butterfield, D.A., Geddes, J.W., Markesbery, W.R. (2001). Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *Neuroscience.* 103, 373–83.)

143-Hensley, K., Hall, N., Subramaniam, R., Cole, P., Haris, M., Aksenov, M. (1995). Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. *J Neurochem.* 65, 2146–56.)

144-Van Berkel TJC, JK Krujitad, and JF Köster: Identity and activities of lysosomal enzymes in parenchymal and non-parenchymal cells from rat liver. *Eur J Bioch,* 58: 145–52, 1975.

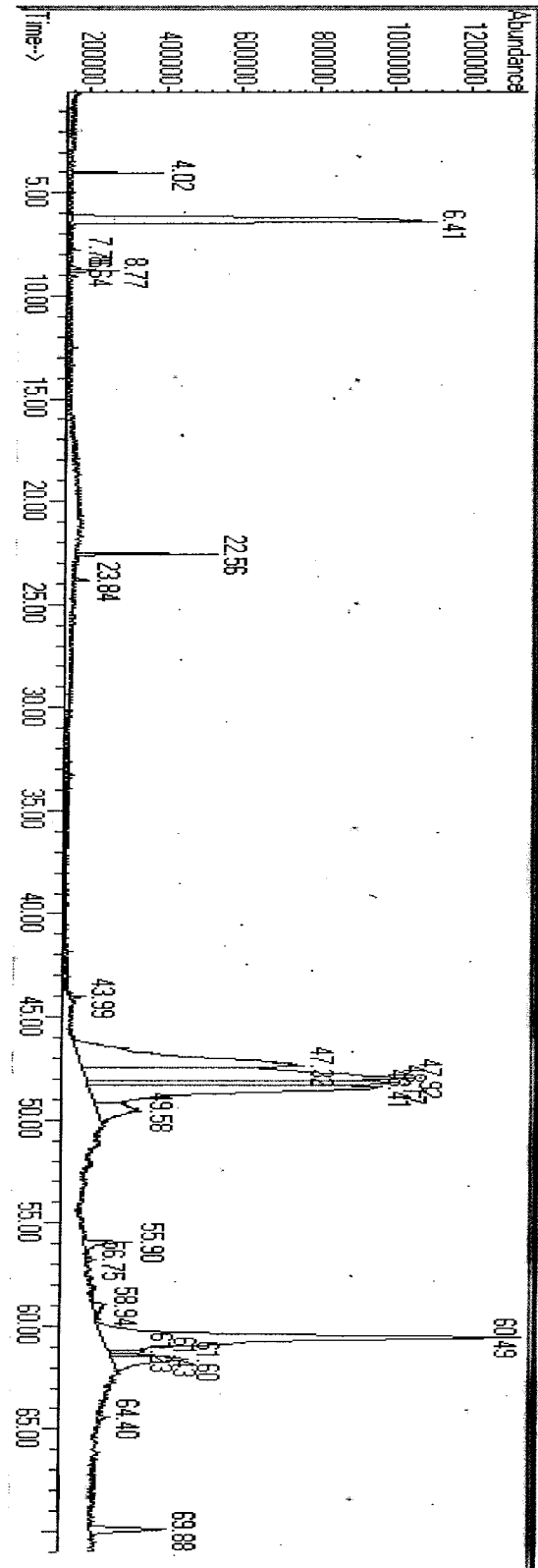
- 145-Glaumann H, and BF Triumph: Lysosomal degradation of cell organelles. IV. Heterophagocytosis and acute inflammation in liver after intravenous injection livercell plasma membranes. *Exp Mol Path*, 25: 371–89, 1976.
- 146- Mazzei HR, F Bertini: The development of lysosomal apparatus. *J Cell Phys*, 95: 269–74, 1978
- 147-Datta DV, WA Jones, and KJ Isselbacher: Lysosomal injury in murine viral hepatitis. *Gastroenterology*, 52(5) : 828–36, 1967.
- 148-Argman RC, DJ Loegering and JJ Smith: Changes in plasma levels of lysosomal and non-lysosomal enzymes during hemorrhagic hypotension. *Proc Soc Exp Biol Med*, 149(4) : 1029–31, 1975
- 149-Gove CD, AN Wardle, and R Williams: Circulating lysosomal enzymes and acute hepatic necrosis. *J Clin Path* 34: 13–16, 1981.
- 150-Iturriaga II, I Posalaki, and E Rubin: Aggravation of hepatic necrosis by lysosomal injury. *Exp Mol Path*, 10: 231–39, 1969.
- 151-Kerry J F R: Lysosomal changes in acute liver injury due to Heliothrine. *Path Bact*, 93: 167–74, 1967. Matsumoto Y, T Suga: Changes in lysosomal enzymes in experimental hepatic damage. *Chem Phar Bull*, 26( 1) :226–33, 1978.
- 152-Rosalki SB, McIntyre N. Biochemical investigations in the management of liver disease. In: J Bircher, JP Benhamou, N McIntyre, M Rizzetto, Editors. *Oxford Textbook of Clinical Hepatology*. Volume 1, Second ed. Oxford University Press, 1999; 503–521.
- 153-Friedman LS, Martin P, Munoz SJ. Laboratory evaluation of the patient with liver disease. In D. Zakim, TD. Boyer, Editors. *Hepatology, A Textbook of Liver Disease*. Volume 1, Fourth ed. Philadelphia. Saunders 2003; 661–708.
- 154-Pratt DS, Kaplan MM. Evaluation of the liver (Laboratory tests). In: ER: Schiff, MF. Sorrell, WC. Maddrey, Editors. *Diseases of the Liver*. Volume 1, Eight ed. Philadelphia, Lippincott- Raven, 1999; 205–244
- 155-Role of carnosine in preventing thioacetamide-induced liver injury in the rat  
Güldal Mehmetcik, Gül Ozdemirler, Necla Kocak Toker, Uğur Cevikbas, Müjdat Uysal; *p e p t i d e s* 29 ( 2 0 0 8 ) 4 2 5 – 4 2 9
- 156-Hendriks T, Walter J, Mastboom B. Healing of experimental intestinal anastomoses. Parameters for repair. *Dis Colon Rectum* 1990; 33(10): 891–901.

157- Bucknall TE. The effect of local infection upon wound healing: an experimental study. *Br J Surg* 1980; 67(12): 851–5.

158- Takezaki T, Inoue M, Kataoka H, et al. Diet and lung cancer risk from a 14-year population-based prospective study in Japan: with special reference to fish consumption. *Nutr Cancer* 2003; 45: 160–167.

159-Hallivel B. Free radicals, antioxidants and human disease; curiosity, course or consequence? *Lancet* 1994; 344: 721–724.

EK-1 :Nigella sativa yağının analiz sonucu.









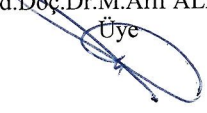
**İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI**



Toplantı Tarihi : 28.12.2009  
 Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya  
 Araştırma Protokol no.su : 2009/51  
 Deneyde Kullanılacak Hayvanın Cinsi : Rat  
 Deneyde Kullanılacak Hayvanın Soyu : Wistar Albino  
 Deneyde Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 36  
 Deneyde Kullanılacak Hayvanın Yaşı : 4 aylık  
 Deneyde Kullanılacak Hayvanın Ağırlığı : 200-250 gram

Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerinden Doç.Dr.Elif ÖZEROL'un yürütücüsü olduğu **"Ratlarda tioasetamidle indüklenen karaciğer hasarına karşı Nigella sativa (çörek otu) yağının etkisi"** isimli 2009/51 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> | Prof.Dr. Yunus KARAKOÇ<br>Raportör<br>Katılmadı  |
| Prof.Dr. Ahmet KIZILAY<br>Üye<br>  | Doç.Dr.Abdurrahman KARAMAN<br>Üye<br>  | Yrd.Doç.Dr.M.Arif ALADAĞ<br>Üye<br> |
| Vetr.Hek.M.Zafer BOZDAĞ<br>Üye<br>Katılmadı   | Bekir ÜNAL<br>Sivil Üye<br>Katılmadı  | Zafer KIRÇUVAL<br>Sivil Toplum Örgütü Üyesi<br>Katılmadı   |

## **8.ÖZGEÇMİŞ**

1986 yılında Malatya’ da doğdum. İlk ve ortaöğrenimimi Malatya’ da tamamladım.2004 yılında Malatya Turgut Özal Anadolu Lisesi ‘nden mezun oldum ve aynı yıl Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde lisans eğitimime başladım. 2008 yılında mezun oldum ve 2009 yılından beri İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı’nda lisansüstü eğitimime devam ediyorum.