

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**6-MERKAPTOPÜRİN İLE OLUŞTURULAN DENEYSEL
HEPATOTOKSİSİTE VE OKSİDATİF STRES ÜZERİNE
CAPPARIS OVATA'NIN KORUYUCU ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Dr. Tuğçe TÜLÜMEN

**UZMANLIK TEZİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

DANIŞMANLAR

Prof. Dr. Ali AYATA

Doç. Dr. Metehan ÖZEN

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Projeleri Birimi
Fonu tarafından 1962-TU-09 Proje numarası ile desteklenmiştir.**

2011-İSPARTA

ÖNSÖZ

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Uzmanı olarak yetişmemde büyük emeği geçen değerli hocalarım Prof. Dr. Ahmet Rifat Örmeci, Prof. Dr. Ali Ayata, Prof. Dr. Duran Canatan, Doç. Dr. Bumin Nuri Dündar, Doç. Dr. Faruk Öktem, Doç. Dr. Mustafa Akçam, Doç. Dr. Metehan Özen ve Yrd. Doç. Dr. Nihal Olgaç Dündar'a bu tezin oluşturulmasında beni başından sonuna kadar yönlendiren, her konuda yardım ve bilgilerini esirgmeden, bilimsel çalışmanın gereklerini öğreten değerli tez hocam Prof. Dr. Ali Ayata ve Doç. Dr. Metehan Özen'e şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmamda büyük destek gördüğüm Biyokimya A.B.D öğretim üyesi Recep Sütçü'ye, başta Dr. Süheyla Çelik olmak üzere biyokimya laboratuvarı asistanları ve çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim süresince birlikte olmaktan keyif aldığım bütün klinik arkadaşlarıma, klinik hemşire ve personeline, eğitimim süresince her zaman en büyük desteği gördüğüm sevgili eşim ve aileme, yaşama sevincim biricik oğlum Tan Teoman'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Tuğçe TÖLÜMEN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
RESİMLER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. İlaçlar ve Karaciğer Hasarı	2
2.1.1. İlacın İndüklediği Karaciğer Hastalığı (İİKH) Açısından Risk Faktörleri..	2
2.1.2. İlacın İndüklediği Karaciğer Hasarının Patofizyolojisi ve Mekanizması ...	3
2.1.3. İlaç Metabolizması	4
2.1.4. İİKH'nın Klinik ve Patolojik Özellikleri.....	5
2.1.5. İİKH'da Tanı	8
2.1.6. İİKH'da Tedavi	9
2.2. Pürin Analogları.....	10
2.2.1. Tiyopürin Analoglarının Yapısı ve Birbirleriyle İlişkisi.....	10
2.2.2. De Novo Pürin Sentezi	12
2.2.3. Tiyopürinlere Karşı Direnç Mekanizması.....	14
2.3. Merkaptopürinin Farmakokinetiği ve Toksisitesi.....	14
2.3.1. 6-MP'nin Tedavide Kullanımı	15
2.3.2. 6-MP Hepatotoksisitesi	15
2.3.3. 6-MP'nin Kemik İliği Toksisitesi.....	16
2.3.4. Diğer Yan Etkiler	16
2.4. Serbest Radikaller	17
2.4.1. Süperoksit Radikali (O ₂ ⁻).....	17
2.4.2. Hidrojen Peroksit.....	18
2.4.3. Hidroksil Radikali	18
2.4.4. Singlet Oksijen	18
2.4.5. Serbest Oksijen Radikal Kaynakları.....	18

2.4.6. Organizmada Serbest Radikal Reaksiyonlarını Artıran Faktörler.....	19
2.4.7. Serbest Radikallerin Etkileri	19
2.4.7.1. Serbest Radikallerin Membran Lipidlerine Etkileri.....	19
2.4.7.2. Serbest Radikallerin Proteinler Üzerine Etkileri.....	20
2.4.7.3. Serbest Radikallerin Karbonhidratlar Üzerine Etkileri.....	20
2.4.7.4. Serbest Radikallerin Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri.....	21
2.4.8. Antioksidan Savunma Sistemleri	21
2.4.8.1. Endojen Antioksidanlar.....	21
2.4.8.1.1. Enzimatik Antioksidanlar	21
2.4.8.1.2. Süperoksit Dismutaz (SOD)	21
2.4.8.1.3. Glutasyon Redüktaz (GSH-Redüktaz)	22
2.4.8.1.4. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px).....	22
2.4.8.1.5. Katalaz	23
2.4.8.2. Enzimatik Olmayan Endojen Antioksidanlar.....	23
2.4.8.2.1. Diğer Enzimatik Olmayan Endojen Ajanlar	23
2.4.9. Eksojen Antioksidanlar	24
2.5. <i>Capparis Ovata</i>	24
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	29
3.1. Gereç.....	29
3.1.1. Deney Hayvanları.....	29
3.1.2. Kullanılan Malzeme ve Aletler	29
3.1.3. <i>Capparis Ovata</i> Aköz Ekstraktının Hazırlanışı.....	29
3.1.4. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneyin Yapılması	30
3.2. Doku ve Kan Örneklerinin Alınması	30
3.3. SOD, GSH-Px, MDA ve Katalaz İçin Karaciğer Dokusunun Homojenizasyonu	31
3.4. Dokularda, Hemolizatlarda Biyokimyasal Analizler.....	31
3.4.1. SOD Aktivitesinin Ölçümü	31
3.4.2. GSH-Px Aktivitesinin Ölçümü.....	32
3.4.3. Katalaz Aktivitesinin Ölçümü	32
3.4.4. MDA Aktivitesinin ve Protein Düzey Ölçümü	33
3.5. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	33

3.5.1. SOD Tayini İçin Kullanılanlar	33
3.5.2. GSH-Px Tayini İçin Kullanılanlar	33
3.5.3. Katalaz Tayini İçin Kullanılanlar	33
3.5.4. MDA ve Protein Tayini için Kullanılanlar	33
3.6. Kullanılan Çözeltiler	34
3.6.1. SOD Tayini İçin Kullanılanlar	34
3.6.2. GSH-Px Tayini için Kullanılanlar	34
3.6.3. Katalaz Tayini İçin Kullanılanlar	34
3.6.4. MDA Tayini için Kullanılanlar	35
3.7. Histopatolojik Analiz Yöntemleri	35
3.7.1. Doku Örneklerinin Değerlendirmesi	36
3.7.2. Doku Örneklerinin İmmünohistokimyasal Hazırlanması	36
3.7.3. Doku Örneklerinin İmmünohistokimyasal Değerlendirmesi	38
3.8. İstatistiksel Analiz	38
4. BULGULAR	39
5. TARTIŞMA	50
ÖZET	56
ABSTRACT	57
KAYNAKLAR	58

KISALTMALAR DİZİNİ

ALL	: Akut lenfoblastik lösemi
ALP	: Alkalin fosfataz
ALT	: Alanin aminotransferaz
AMP	: Adenozin monofosfat
ANA	: Antinükleer antikor
ASMA	: Anti-düzkas antikor
AST	: Aspartat aminotransferaz
ATP	: Adenozin trifosfat
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
CAT	: Katalaz
DNA	: Deoksiribonükleik asit
FAD	: Flavin adenin dinükleotid
FDA	: Food and Drug Administration
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
HAV	: Hepatit-A virusu
Hb	: Hemoglobin
HBc	: Hepatit-B core antijeni
HBsAg	: Hepatit B yüzey antijeni
HGPRT	: Hipoksantin guanin fosforibozil transferaz
HIV	: İnsan immün yetmezlik virüsü
H₂O	: Su
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
IFN	: İnterferon
İİKH	: İlacın indüklediği karaciğer hasarı
IL	: İnterlökin
IMP	: İnozin monofosfat
INH	: İzoniyazid
MDA	: Malondialdehid
ml	: Mililitre

MP	: Merkaptopurin
MTX	: Metotreksat
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADP	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NSAİİ	: Nonsteroid antiinflamatuvar ilaç
O⁻	: Süperoksit radikali
OH⁻	: Hidroksil radikali
PRPP	: Fosforibozil pirofosfat
PUFA	: Çoklu doymamış yağ asitleri
RNA	: Ribonükleik asit
SF	: Serum fizyolojik
SOD	: Süperoksit dismutaz
TAK	: Total antioksidan kapasite
TGN	: Tioguanin
TNF-α	: Tümör nekrozis faktör- alfa
TPMT	: Tiyopürin metil transferaz
UDP	: Uridin di-fosfo-glukoz

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Grupların deney başlangıcı ve deney bitimi hemolizat Glutasyon peroksidaz, Katalaz, Süperoksit dismutaz ve Malondialdehit düzeyleri ve p değerleri.	40
Tablo 2. 6-MP ve 6-MP/CAP gruplarında deney bitiminde hemolizat Glutasyon peroksidaz, Katalaz, Süperoksit dismutaz ve Malondialdehit düzeyleri ve p değerleri	40
Tablo 3. Grupların deney bitimi karaciğer Glutasyon peroksidaz, Katalaz, Süperoksit dismutaz ve Malondialdehit düzeyleri ve p değerleri*.....	41
Tablo 4. Grupların deney başlangıcı ve bitimi hemolizat AST, ALT düzeyleri ve p değerleri	41
Tablo 5. Deney bitiminde 6-MP ve 6-MP/CAP. gruplarının AST ve ALT değerleri karşılaştırılması ve p değerleri	42
Tablo 6. Grupların deney başlangıcı ve bitimi hemolizat Lökosit, trombosit, hemoglobin düzeyleri ve p değerleri.....	43
Tablo 7. 6-MP ve 6-MP/CAP gruplarının deney bitimi lökosit, trombosit, hemoglobin düzeyleri ve p değerleri.....	43
Tablo 8. Grupların karaciğer dokusu histolojik inceleme sonucu, bağ doku artışına göre karşılaştırılması.	44
Tablo 9. Grupların karaciğer histolojik dokusu, enflamasyon oranlarına göre karşılaştırılması.	45
Tablo 10. Gruplarda karaciğer histolojik dokusu, higroskopik çekirdek oranlarının karşılaştırılması.....	46
Tablo 11. Gruplarda karaciğer histolojik dokusu, hemoraji oranlarının karşılaştırılması.	47
Tablo 12. Grupların karaciğer histolojik dokusu, granüler dejenerasyon oranlarının karşılaştırılması.....	47
Tablo 13. Grupların karaciğer histolojik dokusu, piknotik çekirdek oranlarının karşılaştırılması.	47
Tablo 14. Grupların, karaciğer histolojik dokusu, nekrotik hücre oranlarının karşılaştırılması.	48
Tablo 15. Grupların, histolojik doku- safra kanalı proliferasyonu oranlarının karşılaştırılması.	48
Tablo 16. Grupların immüno-histo-kimya boyanma özelliğine göre, apoptozis yoğunluklarının karşılaştırılması.....	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 6-MP metabolizması.....	11
Şekil 2. Tiyopürinlerin metabolizması.....	12
Şekil 3. Reaktif oksijen türevleri	17
Şekil 4. Serbest oksijen radikalleri kaynakları.....	19

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. 6- MP grubuna ait bağ doku artışı (yıldız) gözlenen karaciğer kesiti	44
Resim 2. Portal alanda inflamasyon gözlenen 6- MP grubuna ait karaciğer kesiti. .	45
Resim 3. 6- MP grubuna ait higroskopik çekirdeklerin gözlendiği karaciğer kesiti..	46
Resim 4. 6- MP grubuna ait Aktif Kaspaz-3 antikoruna ile boyanmış immünohistokimyasal kesitler.	49
Resim 5. 6- MP grubuna ait Aktif Kaspaz-3 antikoruna ile boyanmış immünohistokimyasal kesit.....	49

1. GİRİŞ

Günümüzde morbidite ve mortalite bakımından önemli olarak bilinen birçok hastalığın tedavisinde kullanılan ilaçlar, tedavi ediciliği yanısıra ciddi oranda karaciğer zedelenmesine de yol açmaktadır. Bunlardan en sık karşımıza çıkanlar ise anti-kanser ilaçlar, non-steroid antienflamatuvar ilaçlar ve antibiyotiklerdir. İlaçların yol açtığı karaciğer hasarı viral hepatit, safra yolu tıkanıklığı veya diğer karaciğer hastalıklarını taklit edebilir. Klinisyenler karaciğer hastalığı olan her hastada hepatotoksik ilaç kullanımı ve hepatotoksinlere maruziyet konusunda (bitkisel kökenli ürünler de dahil olmak üzere) uyanık olmalıdır. Bazı vakalarda ikinci bir ajanın birlikte kullanımı diğer ilacın hepatotoksisitesini artırır (izoniazid ve rifampin, asetaminofen ve alkol gibi). Anti-kanser kemoterapide kullanılan bir ajan olan 6-merkaptopürin ise kolestatik reaksiyon, portal alanda enflamasyon, nekroz, mikroveziküler yağlanma, peliosis hepatis yaparak hepatotoksisiteye yol açabilir (1).

Capparidaceae familyasından bir tür olan kebere (*capparis ovata*) Akdeniz ve Ege bölgesinde yaygın olarak yetişmektedir. *Capparis*'in birçok türü olmakla birlikte Türkiye'de en sık bulunan *C. ovata* ve *C. spinosa*'dır. Bunların tomurcukları, meyveleri ve kök kabukları halk arasında ağrı kesici, idrar söktürücü, yara iyileştirici, hücre yenileyici olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda capparisin çeşitli türlerinin antioksidan, lipid düşürücü, anti-hepatotoksik ve anti-enflamatuvar etkileri gösterilmiştir (2).

Biz bu çalışmayla *Capparis ovata*'nın hepatoprotektif ve antioksidan özelliklerini araştırmak üzere 6-MP ile oluşturulan deneysel hepatotoksisite üzerindeki koruyucu etkinliğini göstermeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İlaçlar ve Karaciğer Hasarı

İlaç kullanımı karaciğer hasarının önemli nedenlerindedir. Dokuzyüzden fazla ilaç, toksin ve bitkinin karaciğer hasarı yaptığı raporlanmıştır. İlaçlar % 20-40 oranında fulminan karaciğer yetmezliği nedenidir. İlacın indüklediği karaciğer hasarı, ilacın kesilmesi için en yaygın nedenlerdendir (3). Klinisyenler ilaç ilişkili karaciğer hasarı konusunda uyanık olmalıdır. Kullanılan ilacın erken kesilmesi karaciğer hasarlanmasını azaltıp hatta geri dönüşlü hale getirebilir. İlacın indüklediği karaciğer hasarı asemptomatik karaciğer enzim yüksekliğinden, fulminan karaciğer yetmezliğine kadar değişen klinik şekillerde karşımıza çıkabilir (4). Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda yaklaşık 2000 akut karaciğer yetmezliği vakası bildirilmekte ve bunun % 50 kadarı ilaç ilişkili karaciğer hasarı nedeniyle olmaktadır. Bunların da % 39'u asetaminofen, % 13'ü diğer ilaçlara bağlı idiosenkratik reaksiyonlar nedeniyledir. Sarılık nedeniyle hastaneye yatan hastaların % 2-5'inde, akut hepatit nedeniyle yatanların ise % 10 kadarında sebep ilaç kullanımındır (5). Son birkaç yıl içinde FDA tarafından bromfenac (NSAİİ), troglitazone (antidiabetik), pemolin (dikkat eksikliği, narkolepsi) hepatotoksisite yapmaları nedeniyle yasaklanmıştır. Propiltiourasilin ise kullanımı belirgin ölçüde kısıtlanmıştır (6).

2.1.1. İlacın İndüklediği Karaciğer Hastalığı (İİKH) Açısından Risk Faktörleri

1.Etnik köken: İspanyollarda ve siyahlarda izoniazid daha toksik etkiye sahiptir.

2.Yaş: Hepatik ilaç reaksiyonları çocuklarda nadirdir (7).

3.Cinsiyet: Dişi cinsiyet.

4.Alkol alımı: Alkol kullanımı hepatoprotektif olduğu bilinen glutatyon düzeyinde düşmeye, ilaç metabolizmasında değişikliğe neden olarak toksisitede artışa neden olur (8).

5.Karaciğer hastalığı: Genel anlamda kronik karaciğer hastalığı olan hastalar, ilaç toksisitesine daha yatkındır şeklinde bir kaide yoktur. Toplam sitokrom

P450 sayısının azalmasına rağmen aktivitesi iyi olabilir. Karaciğer hastalığına özgün, doz ayarlaması yapılarak ilaçlar kullanılabilir (9). Hepatit B veya C virüsü ile koenfekte olan HIV'li hastalarda antiretroviral tedavi hepatotoksisite açısından artmış risk demektir. Benzer şekilde sirozu olan hastalar ilaç nedeniyle dekompanze olma riski taşırlar (10).

6.Genetik faktörler: P-450 enzim sistemindeki genetik farklılıklar idiosenkratik ilaç reaksiyonları da dahil olmak üzere anormal ilaç reaksiyonlarına neden olurlar.

7. Diğer eşlik eden durumlar: AIDS'li hastalar, malnütrisyon, diyet yapanlar, düşük glutatyon rezervleri nedeniyle hepatotoksisiteye yatkındırlar.

8.İlaç formülasyonu: Uzun etkili ilaçlar, kısa etkili ilaçlardan daha fazla hepatotoksisite yaparlar (10).

2.1.2. İlacın İndüklediği Karaciğer Hasarının Patofizyolojisi ve Mekanizması

1.Patofizyolojik mekanizmalar: İlaç hepatotoksisitesiyle ilgili patofizyolojik mekanizmalar halen araştırılmaktadır. Aşağıda bazı mekanizmalar sıralanmıştır.

A. Hepatositlerin parçalanması: İlacın hepatositlerde intrasellüler proteinlere kovalent bağla bağlanması hücre içi ATP miktarında azalmaya buda aktin fibrillerinde parçalanmaya neden olur. Parçalanmış aktin fibrilleri hepatosit yüzeyinde birikip blep oluşmasına ve hepatosit membranında parçalanmaya neden olur (11).

B. Transport proteinlerinde bozulma: İlaç safra kanaliküler membranındaki transport proteinlerini etkileyerek safra akışını durdurabilir. Villöz proçes kaybı ve multidrug rezistans (MDR) ilişkili protein 3 gibi transport pompasının kaybı bilirubin ekskresyonuna engel olarak kolestaza neden olur.

C. Sitolitik T hücresi aktivasyonu: İlacın P-450 enzimine kovalent bağla bağlanması enzimin immünojen özellik kazanmasına, T hücrelerinin aktifleşmesine ve sitokin salınımına yol açarak çok yönlü immün yanıtı neden olur.

D. Hepatositlerde apopitozis oluşumu: Fas reseptörü (FasR, CD95, Apo-1 ve TNF superfamily member 6 (TNFRSf6) olarak ta bilinir.) tarafından apopitozisin indüklenmesi programlanmış hücre ölümüne neden olur.

E. Mitokondriyal bozulma: İlaç, nikotinamid adenin dinükleotid ve flavin adenin dinükleotid sentezini engeller ve beta oksidasyon önleyerek ATP sentezini durdurur (11).

F. Safra kanalı hasarı: Toksik metabolitlerin safraya salınımı safra kanalı epitelinde hasarlanmaya neden olur (12).

2.İlaç toksisite mekanizmaları: Klasik olarak ilaç reaksiyonları iki major gruba ayrılır. İlaç karaciğeri doğrudan veya immün yanıtta değişikliğe neden olarak etkiler (13).

A. Tahmin edilebilir (intrensek) ilaç reaksiyonları: Bu gruba giren ilaçların toksik etkileri geri döndürülebilir ve doza bağımlıdır. Hasar ilacın kendisine veya metabolitine bağlı olarak gelişir. Asetaminofen ve karbontetraklorür bu grubun klasik ilaçlarıdır (14).

B. İdiosenkratik ilaç reaksiyonları: Bu gruba giren ilaç reaksiyonları iki şekilde karşımıza çıkar. Hipersensitivite-immünoallerjik veya metabolik-idiosenkratik olarak görülür (15,16). Hipersensitivite reaksiyonları tipik olarak ateş, eozinofili, döküntü ile karakterizedir ve 1-4 haftalık latent periyod sonrasında gelişir. Klasik örnek fenitoin dir (17). Metabolik-idiosenkratik tip uygulanan ilacın metaboliti nedeniyle gelişir. İntrensek hepatotoksitenin aksine yanıt oranı değişkendir ve bir hafta ile bir yıl arasında ortaya çıkar. Hastaların azında ortaya çıkar ve hipersensitivite lehine hiç kanıt yoktur. İzoniazid toksisitesi bu gruba girer (18).

2.1.3. İlaç Metabolizması

Karaciğer vücuda giren tüm ilaç ve toksinlerin metabolize edildiği organdır. Çoğu ilaç yağda çözünür (lipofilik) ve bu sayede hücre membranından kolaylıkla geçebilir. İlaçlar vücutta inaktivasyon ve kolay ekskresyon için hidrofilik forma dönüştürülürler. İlaç metabolizması iki fazda meydana gelir (19). Faz 1 ile ilaç hidroksilasyon ve oksidasyon sonucu polar bileşik haline dönüşür. Faz 2 reaksiyonu karaciğerde veya karaciğer dışında meydana gelir. İlaçlar çözünebilirliği artmış

konjuge ürünlere dönüşür (asetat, aminoasit, sülfat, glutasyon, glukronidasyon) (20). Sıklıkla yüksek molekül ağırlıklı ilaçlar karaciğerden, düşük molekül ağırlıklılar ise böbrekten ekskresyona uğrar. Faz 1 reaksiyonlarını sitokrom P-450 enzimleri katalizler. Bu reaksiyonlar sonucu oluşan ara ürünler oldukça reaktiftir ve karaciğer hasarından sıklıkla bu ürünler sorumludur. Sit.P-450 enzimleri karaciğerde düz endoplazmik retikulumda lokalize hemoproteinlerdir. En az 50 çeşit enzim tanımlanmıştır. Bunlar 10 kategoriye ayrılır, grup 1, 2, 3 ilaç metabolizmasında rol oynar. Her P-450 enzimi pek çok ilacı metabolize eder. Spesifik P-450 enzimini kullanan farklı ilaçlar birbirleriyle yarışmaya girer ve birbirlerinin metabolizmasını önlerler. Bazı ilaçlar P-450 enzimlerini önler veya uyarır (21-23).

2.1.4. İİKH'nın Klinik ve Patolojik Özellikleri

İİKH'na bağlı klinik gösterge ve semptomlar altta yatan patolojik hasarlanmanın şekline göre değişir.

Klinik özellikler: İİKH klinik olarak çok farklı şekillerde karşımıza çıkar. Klinik asemptomatik karaciğer enzim yüksekliğinden fulminan karaciğer yetmezliğine kadar değişir. Hepatosellüler hasar kendini aminotransferaz yüksekliği dominant bulgu olacak şekilde gösterir (24). Kolestatik hasar ise alkalen fosfataz yüksekliği (bilirubin yüksekliğiyle beraber veya değil) dominant bulgu olacak şekilde ortaya çıkar.

Asemptomatik aminotransferaz yüksekliği: Bazı ilaçlar ilaç kullanımına devam edilmesine rağmen ilerleme göstermeden sadece asemptomatik aminotransferaz yüksekliği ile seyredebilir. Örneğin tacrine (Alzheimer) (25), metildopa, fenitoin, INH, HMG-CoA redüktaz inhibitörleri, sülfonamidler, salisilatlar, kinidin (26).

Akut hepatosellüler hasarla birlikte aminotransferaz yüksekliği: ALT normalin iki katı veya daha fazla yüksek iken ALP normal veya normalin üst sınırında seyredir. AST yüksekliği, ALT den daha fazla özellikle 2 kat kadar daha fazlaysa alkolik hepatitten şüphelenilir. AST yüksekliği ALT yüksekliğinden daha azsa viral hepatitlerden şüphelenilmeli. Viral ve ilaca bağlı hepatitlerde AST ve ALT düzeyleri 7-14 gün içinde 1000 U/L'in altında olmak üzere yükselişe geçer (27).

Aminotransferaz yüksekliğiyle beraber bilirubin yüksekliği: Bu bulgu subfulminan veya fulminan hepatiti akla getirmelidir. Hepatosellüler hasarda bilirubin değışken olarak yükselir ki bilirubin yüksekliği prognozunu kötü olduğunu gösterir. Normalde total bilirubin seviyesi 1,1 mg/dL'nin altındadır. İndirekt bilirubin ise totalin yaklaşık % 70'i kadardır.

Yüksek ALP seviyesi: Akut kolestatik zedelenmede oluşur. Akut intrahepatik kolestaz iki kategoriye ayrılır. Birincisi hepatosellüler hasarlanma olmadan kolestaz olması; tıkanma sarılığı veya salt kolestazda olur. İkincisinde ise çeşitli derecelerde hepatosit hasarıyla birlikte kolestaz mevcuttur. ALP yüksekliği sıklıkla hiperbilirubinemiyle birlikte dir. Hastalığın gelişimi 4-8 haftayı bulur. Klinik olarak eozinofili, ateş, döküntü eşlik edebilir.

Patolojik bulgular: Klinik ve laboratuvar bulgularının yanında karaciğerdeki histolojik özelliklerine göre İİKH aşağıdaki gibi sınıflandırılır:

1. Akut hepatosellüler hasar: Akut karaciğer hasarı benekli nekrozdan fulminan karaciğer yetmezliğine kadar değışen klinikle karşımıza çıkabilir. Benekli nekroz klasik viral hepatitlere benzer ve tüm asiner zonlar tutulur. Hepatosellüler hasar eozinofili ile birlikte eozinofil infiltrasyonuna eşlik eden balonlaşmış nekroz veya apoptozisten oluşur (28). Bu tür hasarlanmaya örnek İNH, halotan, fenilbutazon, indometazin, disülfiramdır. Submasif nekroz zon 1 (periportal) veya zon 3'ü (santral nekroz) etkiler. Periportal değışiklikler asetaminofen, halotan, metoksifluran, mantar zehirlenmesinde görülür. Masif nekroz submasif nekrozun ilerlemiş halidir ve fulminan karaciğer yetmezliğine ilerler (29).

2. Kronik hepatosellüler hasar: İİKH çok çeşitli şekillerde görülür;

a. Pigment depolanması: Fenotiyazin, fenasetin, aminopirin kullanımı sonrası hepatositlerde lipofusin pigmenti birikimi daha önce bildirilmiştir. Hemosiderin birikimi fazla demir alımı veya parenteral demir kullanımında görülebilir (6).

b. Steatohepatit, fosfolipidozis: İİKH'da görülen steatoz makro veya mikro veziküler yağlanma şeklindedir. Mikroveziküler yağlanma alkol, aspirin, valproik asit, amiodaron, piroksikam, didanozin, sitavudin, nevirapin ve yüksek doz tetrasiklin kullanımında görülebilir (6). Makroveziküler yağlanma alkol,

kortikosteroidler, metotreksat, minosiklin, nifedipin total parenteral nutrisyon nedeniyle görülebilir. Fosfolipidozis ilaçlar tarafından lizozomal fosfolipazın inhibisyonu sonucu lizozomlarda fosfolipid birikimine bağlıdır (30). Sık karşılaşılan nedenleri arasında amiodaron, perhexilin maleat, trimetoprim sülfometoksazol, total parenteral nütrisyon sayılabilir (26).

c. Hepatik fibrozis ve siroz: Pek çok ilaç hafif veya orta ciddiyette kendiliğinden düzelebilen ciddi fibrozisin eşlik etmediği karaciğer hasarı yapabilir. Bazı ilaçlar fibrozis, nodüler rejenerasyon, siroz yapabilir. Fibrozis yapan ilaçlara örnek metotreksat, vinil klorid, hipervitaminoz A, eroin sayılabilir. Metotreksat, INH, enalapril, valproik asit uzun süreli kullanımda siroza neden olabilir (31).

d. Akut kolestaz: Kolestaz, safra akımının tıkanmasına veya salınımının azalmasına bağlanabilir. Histolojik olarak apoptotik hücreler, küçük nekroz odakları, daha az sıklıkla balonlaşmış hücreler ve zon 3 (santral nekroz) nekrozu görülür (32). Safra hepatosit, kanalikül stoplazmasında, Kupffer hücrelerinde birikir. Anabolik steroidler (metil testosteron, oksimetolon, fluoksimesterol), oral kontraseptifler kolestatik reaksiyon yapabilirler. Kolestatik hepatit, kolestazla birlikte hepatosellüler hasar kanıtının birlikte olması durumudur. Kolestatik hepatit yapan ilaçlara örnek, eritromisin, azitromisin, siprofloksasin, ofloksasin, ranitidin, simetidin, fenitoin, altın tuzları, terbinafindir (33).

e. Kronik kolestaz: Histolojik olarak progresif duktopeni, safra kanal yokluğu sendromuna bağlı gelişen kronik portal enflamasyon ve safra bezi dejenerasyonudur. İlacın indüklediği kolestaz sıklıkla ilacın vücuttan atılmasını izleyen günlerde hızlı bir şekilde iyileşir. Bununla birlikte bazı hastalarda anormal karaciğer fonksiyon testi sonuçlarında devamlılık ve primer biliyer siroz benzeri klinik tablo oluşabilir. Klorpropamid, amoksisilin klavulonik asid, trimetoprim-sülfometoksazol, karbamazepin, TPN intrahepatik kolestaz yapan ilaçlardır (33).

f. Granümatöz hepatit: Bu tür reaksiyonlar sıklıkla periportal veya portal alanlarda nonkazeifiye epitelooid granülomlarla karakterizedir. Hasar sıklıkla sekel bırakmaz ve geçicidir. Sülfonamidler, sülfonilüre, fenitoin, kinidin, hidralazin bu tür reaksiyona neden olan ilaçlardır. Kabızlık tedavisinde uzun süre mineral yağ kullanımı lipogranülom gelişimine neden olur.

g. Otoimmün hepatit: Histolojik olarak plazma hücreleri dominant olmak üzere aktif nekro-enflamatuvar lezyonlarla karakterizedir. Kadınlar erkeklere nazaran daha fazla etkilenirler. Otoimmün hepatit yorgunluk, kilo kaybı, sarılık, asit, portal hipertansiyon, hepatomegali, splenomegali ile kendini gösterir. Anti-nükleer antikor, anti-düzkas antikoru (ASMA), lupus eritematozus faktör ile birlikte yüksek serum gama globulin seviyesi mevcuttur. Metildopa, minosiklin, nitrofurontain, dihidralazin, lizinopril ve trazadon bu tabloya neden olabilen ilaçlardır.

h. Vasküler lezyonlar - venooklüziv hastalık: Bazı ilaçlar karaciğer sinüsleri, hepatik venler ve arterlerine zarar verebilir. Azotiyopürin böbrek veya kemik iliği nakli yapılan hastalarda, enflamatuvar bağırsak hastalığı nedeniyle uzun süreli tedavi uygulananlarda venooklüziv hastalık yapabilir. Alkol, vitamin A fazlalığı, floksiüridin ve dakarbazin zon 3 nekrozuyla beraber veya değil venooklüziv hastalığa neden olabilen diğer ilaçlardır (34,35). Bitkisel çay preparatları (alkaloidler) akut asit, hızlı kilo alımı, karın ağrısı, hepatomegali yapabilirler. Bazen fatal sonuçlanabilir (36). Oral kontraseptifler ve anabolik steroidler fokal sinüzoidal dilatasyon yapabilirler (37). Her iki ilaç peliozis hepatis de (ekstrasinüzoidal kanla dolu lakünler) neden olabilir (38).

i. Neoplastik lezyonlar: Oral kontraseptifler, steroidler fokal nodüler hiperplazi ve hepatosellüler adenoma neden olabilir (39).

2.1.5. İİKH'da Tanı

Tek ajan kullanımında tanı göreceli olarak daha kolaydır fakat birden fazla ilaç kullanımında hangi ajanın ne şekilde hepatotoksisite yaptığını tespit etmek oldukça güçtür. Bunun için;

Öykü: Kullanılan ilacın dozu, kullanım süresi, kullanım yolu, daha önceki kullanımlar, birlikte kullanılan ilaçlar ya da bitkisel preparatlar sorgulanmalıdır. İdiosenkratik ilaç reaksiyonlarının latent periyodu oldukça değişken olduğu için en az son üç ay içinde kullanılan ilaçlar sorgulanmalı, diğer karaciğer hastalıkları ve kolestaz dışlanmalıdır. İlacı bıraktıktan sonraki sekiz gün içinde serum transaminazlarında % 50'den fazla düşüş olması birden fazla ilaç kullanan hastalarda tanıya yaklaştırma açısından önemlidir. Daha önceden gelişen ilaç reaksiyonlarının

listelenmesi de tanıda değerlidir. Ayırıcı tanıda aklımıza gelmesi gerekenler; akut viral hepatitler, otoimmün hepatitler, kolesistit, kolanjit, Budd-Chiari sendromu, alkolik karaciğer, kolestatik karaciğer hastalıkları, maligniteler, Wilson hastalığı, hemokromatozis, pıhtılaşma bozuklukları (20).

Laboratuvar: Laboratuvar testleri tam kan sayımı, biyokimya, idrar analizi şeklinde olmalıdır. Hepatosellüler etkilenimde transaminaz yüksekliği ALP yüksekliğine göre daha belirgindir. Kolestatik ise durum tersinedir. Hepatit serolojisi viral nedenleri dışlamak açısından değerlendirilmelidir. Otoimmün hepatitler açısından ANA faydalı olabilir. Pozitif ANA, ASMA tanıya yardımcı olabilir fakat sıklıkla kafa karıştırıcıdır ve bakılması önerilmez. Bazı sit-P-450 enzimlerine özgül antikorların saptanması ilacın tespiti açısından faydalı olabilir. Örneğin dihidralazin - Sit-P1A2, antikonvülzanlar-Sit-P3A1, halotan-Sit-P2E1'e karşı oluşturduğu antikorlar tanıda kullanılabilir (22).

Görüntüleme yöntemleri: Bu yöntemler tanı konduktan sonra karaciğere ait nedenleri dışlamak için kullanılır. Ultrasonografi, Bilgisayarlı Tomografi, Manyetik Rezonans Görüntüleme bu amaçla kullanılabilir.

Karaciğer Biyopsisi: Histopatolojik inceleme tanı için önemli bir araçtır. Normalde karaciğer biyopsisi İİKH'da rutin değildir fakat düşünülen tanıyı desteklemek amaçlı yapılması tanıyı destekler (20).

2.1.6. İİKH'da Tedavi

Erken tanı hepatik hasarlanmayı azaltmada temel rol oynar. Hepatik enzimlerin monitörizasyonu gereklidir. Özellikle ALT yüksekliği, AST yüksekliğinden daha özgüldür. ALT seviyesi normal aralığın 2-3 katına ulaşmışsa yakın takip, 4-5 katına ulaşmışsa ilacın kesilmesi gerekir. İİKH'nın spesifik bir tedavisi yoktur. Destekleyici tedavi temeldir. İlk adım ilacı kesmektir. Örneğin asetaminofen toksisitesinin erken döneminde N-Asetilsistein kullanımı, valproik asid hepatotoksitesinde ise L-karnitin kullanımı tanımlanmış spesifik tedavi yöntemlerindedir (40). Genellikle kortikosteroidler tedavide kullanılmaz. İlacın indüklediği kolestatik tedavisi primer biliyer sirozun tedavisine benzer. Kaşıntı için

kolestiramin kullanılabilir. Ursodeoksikolik asid kullanımı gerekebilir. Son aşama bir hepatolog görüşünün alınmasıdır (41).

Karaciğer nakli kararı: Hepatotoksik ajanlara özgül antidot mevcut değildir. Bu sebeple ilacın indüklediği fulminan karaciğer yetmezliği olan hastada karaciğer naklini erken dönemde düşünmek ve nakil hazırlıklarına başlamak oldukça hayat kurtarıcı bir yaklaşımdır (42).

Prognoz: Hastanın klinik durumu ve karaciğer hasarının derecesine bağlı olarak oldukça değişkendir. Amerika Birleşik Devletleri'nde 1998-2001 yılları arasında yapılan prospektif bir çalışmaya göre İKH'dan sağ kalım oranı (karaciğer nakli yapılanlar da dahil) % 72 olarak bulunmuştur (9). Akut karaciğer yetmezliğinin sonuçları etyolojiye, ilacın uygulanmasından ensefalopati gelişimine kadar geçen sürenin uzunluğuna ve eşlik eden veya araya giren enfeksiyonlara bağlıdır (43).

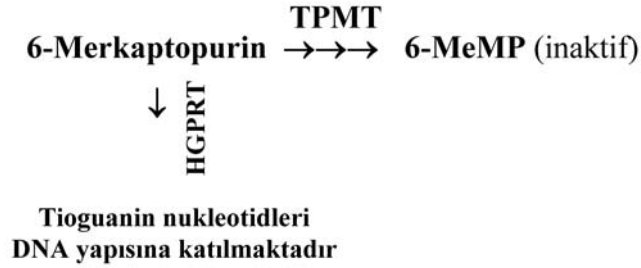
2.2. Pürin Analogları

İlk olarak 1942 yılında Hitchings ve Elion öncülüğünü yaptıkları çalışmalarla pürin baz analoglarının anti-lösemik ve immünsüpresif özelliklerini ortaya koymuşlardır. Bu çalışmalar pürin analoglarının sadece malign hastalıklarda (merkaptopürin-tiyoguanin) kullanılmayıp aynı zamanda immünsüpresyon (azotiyopürin) ve antiviral kemoterapide de (asiklovir, gansiklovir, vidarabin, zidovudin) kullanılabilmesini sağlamıştır. Bir hipoksantin analogu olan allopürinol ksantin oksidazın potent bir inhibitörüdür. Diğer bir pürin analogu da, saçlı hücreli lösemnin tedavisinde etkinliği ilk olarak gösterilmiş olan pentostatin'dir (deoksikoformisin). Fludarabin fosfat kronik lenfositik lösemi ve foliküler lenfomaların standart tedavisinde kullanılırken pentostatin büyük ölçüde yerini adenosin analogu olan kladribine bırakmıştır.

2.2.1. Tiyopürin Analoglarının Yapısı ve Birbirleriyle İlişkisi

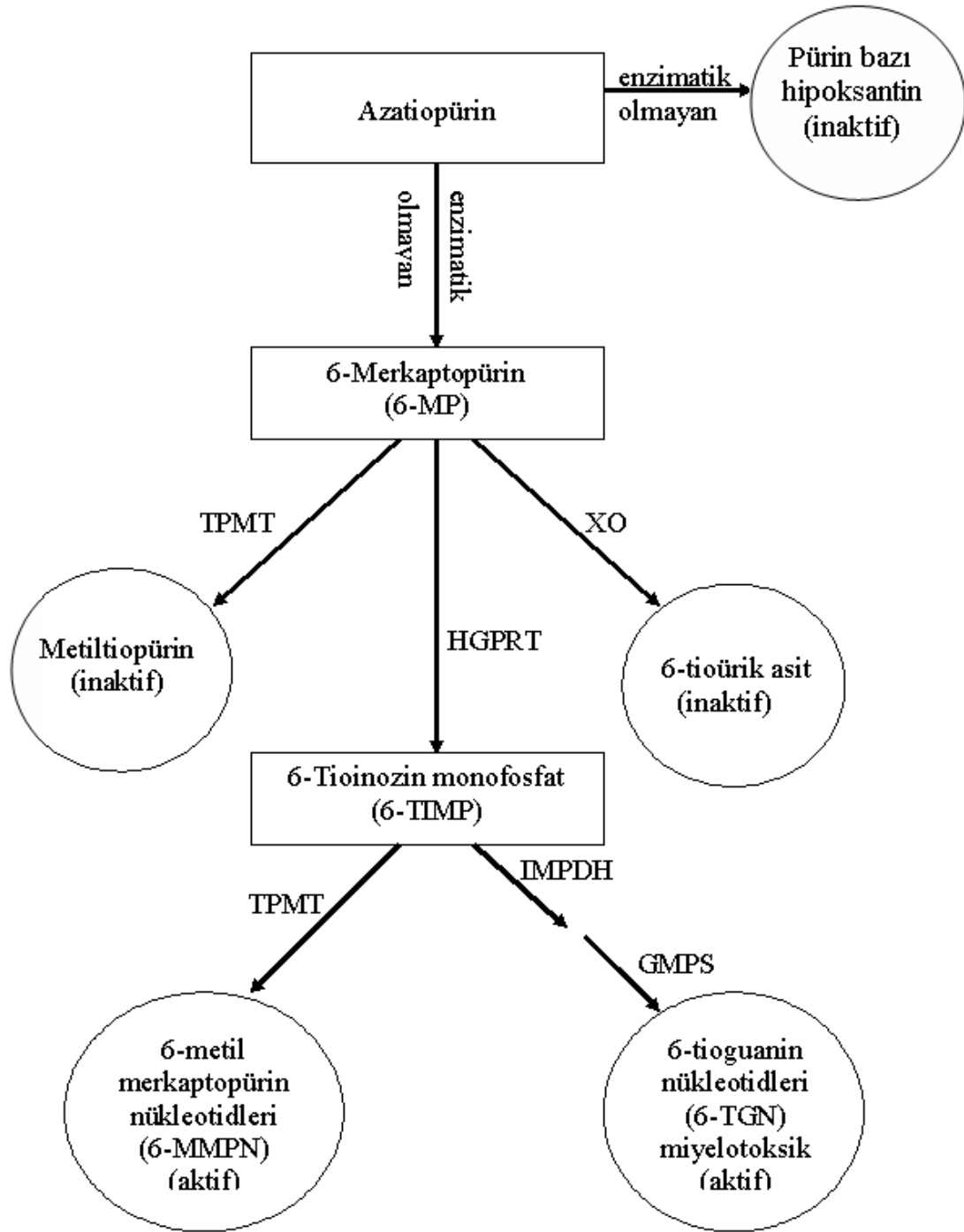
Tiyopürinler, merkaptopürin, tioguanin (TGN) ve azatiopürinden oluşan bir ilaç grubudur. Tiopürinler inaktif prodrug olup, sitotoksik olan TGN'ye metabolize edilmesi gerekir (44-45). Bu aktivasyon multiple enzim tarafından katalizlenmektedir. İlk basamaktaki reaksiyon, hipoksantin guanin fosforibozil

transferaz (HGPRT) tarafından katalizlenmektedir. Alternatif olarak bu ilaçlar, ksantin oksidaz (XO) ile oksidasyonu veya tiyopürin S-metil transferaz (TPMT) ile metilasyonu sonucunda inaktive edilebilmektedir (46-47). TPMT, azatiopürin, merkaptopürin ve tioguanin gibi tiopürin ilaçların S-metilasyonunu katalizlemesinden dolayı bu ilaçları TGN formasyonundan kaçırılmaktadır.



Şekil 1. 6-MP metabolizması

6-TG ve 6-MP hipoksantin guanin fosforibozil transferaz için mükemmel substratlardır. Hızla tek basamakta ribonükleotidlere (6-tiyoinozin-5-monofosfat <T-IMP> ve 6-tiyoguanozin-5-monofosfat <6-tiyogMP>) dönüşürler. Guanozin monofosfatı (GMP) guanozin di fosfata (GDP) çeviren guanilil kinaz için T-IMP zayıf substrattır. Bu sebeple T-IMP hücre içinde birikir. 6-MP 'nin az bir kısmı tiyoguanin deoksiribonükleotid formunda hücre DNA'nın yapısına katılır. T-IMP de novo pürin sentezinin ilk basamağını inhibe eder. Ribozil 5 fosfat oluşumu, IMP'nin adenin ve guanin nükleotidlerine dönüşümü inhibe olur. Bunlardan en önemlisi riboz 5 fosfatın PRPP'ye dönüştüğü basamağın inhibisyonudur (pürin nükleotid sentezinin ilk basamağı). 6-MP ve 6-TG lösemilerin tedavisinde doğal pürinler olan hipoksantin ve guanin analogu olarak kullanılan onaylanmış ilaçlardır. Malign ve normal hücrelerde pürin halkasında 6. karbondaki oksijen yerine sülfür geçerek pürin nükleotidlerinin yerini alır. 6-MP ve 6-TG'den oluşan pürin nükleotidleri de novo pürin sentezinin inhibisyonuna, bununla birlikte nükleik asit yapımının engellenmesine neden olurlar. Konsepsiyondan önceki 3 ay içinde babanın 6-MP kullanması hamilelik ilişkili komplikasyonlarda artışa neden olur (48). Bu bileşikler özellikle poliadenilat içeren RNA ve DNA sentezinde görevli farklı enzimlerin inhibisyonuna neden olurlar.



Şekil 2. Tiyopürinlerin metabolizması

2.2.2. De Novo Pürin Sentezi

Organizmada pürin ve pirimidin nükleotidleri genetik bilgi transferi dışında çeşitli fonksiyonlara sahiptir. Bunların başlıcalarını özetleyecek olursak:

1. Nükleik asitlerin yapı taşı olmaları (DNA, RNA),
2. Enerji metabolizmasında kritik molekül olmaları (ATP, GTP),
3. Çeşitli biyosentezlerde aktive edilmiş metabolitlerin taşıyıcısı olmaları (örneğin nükleozid difosfat şeker gibi, UDP-glukoz),
4. Bazı ko-enzimlerin yapısında yer almaları (NAD⁺, FAD),
5. Regülatör molekül olmaları (AMP),
6. Sinyal molekülü olmaları (özellikle cAMP).

Memeliler, pürin ve pirimidin nükleotidlerini, düşük molekül ağırlıklı öncü bileşiklerinden, gerektiği kadar, yeni baştan (de novo) sentez edebilme yeteneğine sahiptir. Ayrıca nükleotidleri, nükleik asitlerin enzimatik yıkımlarından elde edilen veya diyet ile alınan nükleozidlerden veya pürin veya pirimidin bazlarından da sentezleyebilirler. Bu şekilde aslında atık olan moleküller yeniden kullanılmaktadır ("salvage" metabolik yolu). Hücrelerde bulunan nükleik asitler (DNA, RNA) genelde proteinler ile birleşmiş nükleoprotein yapısında bulunur. Pürin nükleotidlere ait yeni baştan sentez reaksiyonları, John Buchanan ve Robert Greenberg tarafından ortaya konulmuştur.

Yeni baştan pürin nükleotid sentezinde 5-fosforibozil- 1-pirofosfat (PRPP) oluşumu pürin nükleotidlerin sentezindeki ilk basamak olarak kabul edilir. Reaksiyon bir mol ATP'nin AMP'ye dönüştüğü fosforibozil pirofosfat sentetaz (PRPP sentetaz) tarafından katalizlenir. PRPP dönüşüm reaksiyonu, pürin nükleotidlerin de novo sentez reaksiyonlarının kontrolünde oldukça önemlidir. Pürin nükleotidlerinin de novo sentezinde oluşan ilk nükleotid Inozin Monofosfat'tır (IMP). Enzim IMP Sentazdır. IMP 2 basamak üzerinden guanozin monofosfata dönüşür.

Pürinleri ve onların nükleozidlerini yıkımdan kurtarmak (Salvage-kurtarma yolları) için iki mekanizma bulunmaktadır. Birincisi serbest pürin bazlarının fosforibozilasyonu olup reaksiyonlarda riboz fosfat vericisi olarak PRPP kullanılır. İkinci mekanizma ise pürin nükleozidlerin 5' gruplarının fosforilasyonudur.

1. İnsan dokularında pürin bazlarının fosforibozilasyonunu sağlayan 2 enzim vardır. Enzimlerden bir tanesi, AMP üretmek için adenini, PRPP ile fosforibozile

eden adeninfosforibozil transferaz'dır. Diğeri de hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz olup hem hipoksantini hemde guanini PRPP ile fosforibozile eden enzimdir. Reaksiyonda kullanılan substrata göre IMP veya GMP oluşmaktadır.

2.2.3. Tiyopürinlere Karşı Direnç Mekanizması

6-MP'ye karşı gelişen en yaygın direnç mekanizması HGPRT enzim aktivitesinin az olması veya tamamen yokluğudur. Diğer bir mekanizma lösemik hastaların hücrelerinde alkalen fosfataz aktivitesinde artış olmasıdır. Diğer mekanizmalar azalmış ilaç transportu, ribozilamin 5 fosfat sentazın allosterik inhibisyonunda değişiklik, 6-MP tarafından DNA'nın tanınma bölgelerinin değişmesi, multidrug rezistans proteini 5'in ekspresyonunun artmasıdır.

2.3. Merkaptopürinin Farmakokinetiği ve Toksisitesi

6-Merkaptopürin, ribonükleotide dönüştürülerek pürin sentezini inhibe eden oral pürin analogudur. Merkaptopürin oral kullanımında ksantin oksidaz tarafından karaciğerde ilk geçiş eliminasyonuna uğradığı için biyo-yararlanımı düşüktür. Oral biyo-yararlanım % 10-50 arasında değişir. Yiyecek veya oral antibiyotiklerle birlikte alındığında emilimi daha da azalır. Oral doz alındıktan 1-2 saat sonra konsantrasyonu pik yapar (48,49). Yarılanma ömrü pediatrik hastalarda 21 dakika ve yetişkinlerde ise 47 dakikadır. Ancak yüksek doz metotreksat ile birlikte alındığında biyoyararlanımı artar (50). İntravenöz uygulamadan sonra ksantin oksidaz ve tiyopürin s-metil transferaz tarafından elimine edildiği için yarı ömrü göreceli olarak kısadır (yaklaşık 50 dakika). Kan beyin bariyeri nedeniyle merkezi sinir sistemine geçişi oldukça düşüktür (51).

Son zamanlarda merkaptopürin anabolizmasını katalizleyen HGPRT enzimiyle ilgili iki yolak daha gösterilmiştir. Birincisi sülfidril grubunun metilasyonu ve daha sonrada oksidasyona uğramasıdır. Tiyopürin S-metil transferaz enziminin miktarındaki değişiklikler otozomal kodominant kalıtım gösterir (52). TPMT enzim aktivitesi Kafkas kökenlilerde düşüktür buda ilacın toksisitesinde artış, relaps olasılığında ise düşme ile sonlanır (53). 6-MP uygulamasından sonra vücutta 6-metil MP miktarı artar. 6-MP, azotiyopürin uygulanan hastaların kemik iliği, kan hücrelerinde 6-metil MP ribonükleotidlerinin monofosfat, difosfat, trifosfat nükleotid

bileşenlerinin miktarı artar. Bu metabolitler 6-MP'den daha az potenttirler. 6-MP'nin bir diğer metabolizma yolağı ise ksantin oksidaz tarafından 6-tiyourik asite (inaktif form) oksidasyonudur. Ksantin oksidaz inhibitörü olan allopürinol kullanımında 6-MP düzeyi yükselir.

2.3.1. 6-MP'nin Tedavide Kullanımı

6-MP'nin genel kullanım dozu 50-100 mg/m²/gün'dür. Beyaz küre sayısı, trombosit sayısına göre doz değiştirilebilir. Non hematolojik malignitesi olan hastalarda total kemik iliğı depresyonu yapıcı doz 45 mg/kg'dir. Aralık 18-100 mg/kg arasında değışir. Tedavi sırasında hiperürisemi ve hiperürikozüri oluşabilir. Ürik asit birikimi hücrelerin yıkımı sonucu açığa çıkan pürin nükleotidlerinin ksantin oksidaz tarafından okside edilip dolaşıma geçtiğinin göstergesidir. Bu şekilde nükleik asit prekürsörü olan inozinik asit oluşamaz. Bu durum karşısında ksantin oksidaz inhibitörü allopürinol kullanım endikasyonu oluşabilir. 6-MP ve onun imidazol türevi azotiyopürin allopürinol ile birlikte kullanıldıkları zaman pürin analoglarının katabolizması gecikir. 6-MP allopürinol ile birlikte verilecekse dozu normal dozun yaklaşık % 25'i kadar verilmelidir. Metotreksat ile 6-MP'nin birlikte kullanımı (MTX pürin sentezini inhibe ettiği için) sinerjistik etki yaratır (54,55).

2.3.2. 6-MP Hepatotoksisitesi

6-MP ksantin oksidaz ile inaktif formu olan 6-tiyourikasite dönüşürken reaktif oksijen türevleri (ROT) meydana gelir. Oluşan ROT'larla hepatosit hücre membranının lipid peroksidasyonu, mitokondriyal ATP sentezinin inhibe olmasıyla mitokondri membranının geçirgenliğı artar ve sonuç olarak apoptozis ve hücre nekrozu tetiklenmiş olur (56). Hepatositlerde redükte glutatyon miktarında, katalaz, GSH-Px, hepatic TAK'ta düşmeye, okside glutatyon ve MDA birikimine ayrıca karaciğer TNF- α ve caspaz -3 seviyesinde artışa neden olarak karaciğerde histopatolojik olarak daha öncelide gösterilmiş hepatic sinüzoidlerde dilatasyon ve enflamatuvar hücre infiltrasyonu ile birlikte hemoraji, nekroz, peliosis hepatis, venookluziv hastalık, nodüler rejeneratif nekroz yapabilir. Hepatositlerde enflamasyon bağdoku artışı, safra kanalı proliferasyonu şeklinde kendini gösterir. Nekroz ise higroskopik çekirdek, granüler dejenerasyon bulgularıyla kendini

gösterebilir. Granüler dejenerasyon apoptoz, piknotik çekirdek ise apoptozun son aşamalarının göstergesidir. Caspaz-3 enzimi apoptoz belirteci olarak kullanılan bir belirteçtir (57-59).

2.3.3. 6-MP'nin Kemik İliği Toksisitesi

6-MP genellikle doz bağımlı ve geri dönüşümlü kemik iliği baskılanması yapar. Bu yan etkisi folik asit antagonistlerinden daha belirgindir. Kemik iliğindeki normal hücrelerde baskılanma meydana gelirse dozunda azaltma yapmak hızla düzelmeye neden olur. 6-MP kullanan lösemik çocuklardan alınan malign T4 lenfoblastlarında metilmerkaptopürin ribonükleozidlerinin (Me-MPR) pürin *de novo* sentezini inhibe etmesinin yanı sıra, metiltiyoinozin monofosfatata (Me-tioIMP) dönüşümü sitotoksiteden sorumlu bulunmuştur. Pürin sentezinin *de novo* inhibisyonu nedeniyle pürin nükleotidlerinde artış sonucu PRPP ve pirimidin sentezinde artış olduğu saptanmış (60). 2010 yılında Çin'de ALL tedavisi gören 133 çocukta yapılmış bir çalışmada ciddi granülositopeni olguların % 46'sında görülmüş (61). TPMT aktivitesinin kemik iliği depresyonu için risk faktörü olduğu, TPMT aktivitesinin yokluğu veya orta derecede olmasının kemik iliği toksisitesinde artış yaptığı pek çok çalışmayla gösterilmiştir (62,63). 1984 yılında yapılan bir çalışmada dişi ratlara sitotoksik busulfan, nitrozüre, siklofosfamid, 5-florourasil, 6-MP, metotreksat, vinblastin 2 ay süresince uygulanmış ve sonra kemik iliği incelenmiş. Siklofosfamid, 5-florourasil, 6-MP, metotreksat, vinblastin ile kalıcı kemik iliği zedelenmesi olmadığı görülmüştür (64).

2.3.4. Diğer Yan Etkiler

Anoreksi, bulantı, kusma yetişkinlerde % 25 oranında görülür. Stomatit, ishal nadir görülen komplikasyonlardır. Hiper sensitivite reaksiyonları (ateş, döküntü, eozinofili, lenfadenopati, atipik lenfositozis) daha ender görülen yan etkilerdir (65). 6-MP ve onun imidazol türevi azotiyopürinin uzun süreli kullanımında derinin yassı hücreli karsinomu ve fırsatçı enfeksiyon gelişimi oluşabilir (66). AML ve enflamatuvar bağırsak hastalıklarında ilk trimesterde kronik kullanımda teratojenik yan etkiler (özellikle de rombensefalon, telensefalon, trunkus kaudatus, kardiyak, ekstremitte tutulumlu anomaliler) gelişir (67,68).

2.4. Serbest Radikaller

Atomun yapısını oluşturan elektronlar, orbita adı verilen yörüngede çiftler halinde bulunurlar. Az sayıda molekülde ise elektronlar çiftler halinde olmayıp tek olarak bulunurlar. Eksik elektronlu bu moleküller karşılaştıkları herhangi bir molekül ile aşırı şekilde reaksiyona girmeye eğilimli olup diğer moleküllerle elektron alışverişinde bulunurlar. İşte diğer moleküllerle kolayca elektron alışverişi yaparak onların yapısını bozan bu moleküllere radikal, serbest radikal veya oksidan moleküller denilir. Tek olan bu elektron yapıları genellikle üst kısma yazılan bir nokta (O^{\bullet}) veya çizgi (O^{\ominus}) ile gösterilir (69,70).

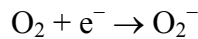
Biyolojik sistemlerde en önemli serbest radikaller oksijenden oluşanlardır. Moleküler oksijenin (O_2), iki tane eşlenmemiş elektronu bulunduğundan dolayı kendisi aynı zamanda bir radikaldir. Oksijenin bu özelliği onun diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girmesini sağlar. Organizmada oksijenin kısmi redüksiyonuyla, çok sayıda ve yüksek derecede reaktif ürünler (ROT) oluşur. Oksijen, hücre içinde çeşitli reaksiyonlardan sonra en son H_2O 'ya indirgenir (71).

Radikaller		Radikal Olmayanlar	
Hidroksil	(HO^{\bullet})	Hidrojen peroksit	(H_2O_2)
Alkoksil	(RO^{\bullet})	Singlet oksijen	(1O_2)
Peroksil	(ROO^{\bullet})	Ozon	(O_3)
Süperoksit	(O_2^{\ominus})	Hipoklorid asit	($HOCl$)
Nitrik oksit	(NO^{\bullet})	Lipid hidroperoksit	($LOOH$)
Azot dioksit	(NO_2^{\bullet})	Peroksinitrit	($ONOO^{\bullet}$)

Şekil 3. Reaktif oksijen türevleri

2.4.1. Süperoksit Radikali (O_2^{\ominus})

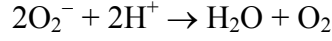
Süperoksit radikali, tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu meydana gelir (72).



Süperoksit, serbest radikal olmakla beraber kendisi çok zararlı değildir. Asıl önemi H_2O_2 kaynağı ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır (73).

2.4.2. Hidrojen Peroksit

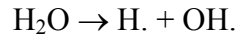
Hidrojen peroksit, O₂'nin enzimatik olarak iki elektron alması ya da O₂'lerin enzimatik/nonenzimatik dismutasyon tepkimeleri sonucu oluşur (69).



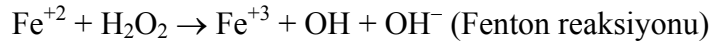
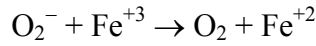
Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özelliği taşımaz, reaktif bir tür değildir.

2.4.3. Hidroksil Radikali

Hidroksil radikali (OH⁻) hemen bütün biyomoleküllerle reaksiyona girebilen serbest radikaller içinde en kuvvetli oksidan olan radikaldir. Suyun iyonize radyasyona maruz kalması ile oluşur (69,73,74)



Hidroksi radikalleri, fenton reaksiyonu ile H₂O₂'nin Fe⁺² ve diğer geçiş elementleri varlığında (Cu, Mn, Zn, Cr, Co, Ni, Mo) indirgenmesiyle, H₂O₂'nin O₂⁻ radikali ile reaksiyona girmesiyle de (Haber-Weis reaksiyonu) oluşmaktadır (75).



2.4.4. Singlet Oksijen

Singlet oksijen (1O₂), ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Doymuş yağ asitleri ile doğrudan tepkimeye girerek peroksi radikalini (ROO⁻) meydana getirir ve lipid peroksidasyonu'nu (LPO) başlatabilir.

2.4.5. Serbest Oksijen Radikal Kaynakları

Organizmada serbest radikaller hem normal metabolizmanın yan ürünü olarak, hem de radyasyon, ilaçlar ve diğer zararlı kimyasal maddelerin etkisi ile endojen ve eksojen kaynaklardan oluşabilmektedir.

Endojen kaynaklar	Eksojen kaynaklar
Mitokondriler (solunum zinciri)	Radyasyon
Hücre zarı (prostoglandin sentezi)	İlaçlar
Sitokrom P-450	Sigara, alkol, uyuşturucu
Aktive lökositler (fagositoz)	Metal iyonları
Mikrozomal elektron taşıma zinciri	
Oksidan enzimler	

Şekil 4. Serbest oksijen radikalleri kaynakları

2.4.6. Organizmada Serbest Radikal Reaksiyonlarını Artıran Faktörler

Eksojen ve endojen faktörlerle ROT oluşumu artabilir (76).

2.4.7. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerini etkilerler (77).

2.4.7.1. Serbest Radikallerin Membran Lipidlerine Etkileri

Serbest radikaller, savunma mekanizmalarının kapasitesinin aşacak oranlarda oluştukları zaman organizmanın çeşitli yapılarında bozukluklara yol açarlar. Biyomoleküllerden en hassas olanı lipidlerdir (78). Lipid peroksidasyonu çoklu doymamış yağ asitleri'nin (PUFA) oksidan maddeler etkisiyle alkol, aldehit, hidroksi asit, etan ve pentan gibi çeşitli ürünlere yıkılmasını kapsayan reaksiyonlar dizisidir. Peroksidasyon ROT'un PUFA'nın yan zincirdeki metilenik karbonlardan hidrojen atomunu çıkarmak için yaptıkları atak ile başlar. Hidrojen atomunun zincirden çıkarılması, karbon atomu üzerinde eşleşmemiş bir elektron bırakarak karbon merkezli radikal oluşumuna yol açar. Bu radikal moleküler düzenleme ile konjuge dien şekline çevrildikten sonra moleküler oksijenle reaksiyona girerek ROO^- radikali oluşur. Bu ROO^- radikali diğer ROO^- radikali ile birleşebilir ya da membran proteinleri ile etkileşebilir. En önemlisi ROO^- radikalinin membrandaki diğer yağ asitlerinden hidrojen atomlarını çıkarması ve peroksidatif zincir reaksiyonunu yaymalarıdır. Böylece her defasında lipid hidroperoksitler (LOOH) ve yeni bir ROO^- radikali oluşacaktır. Peroksidasyon bir kere başladıktan sonra yayılabilmekte,

yüzlerce yağ asiti zincirleri LOOH'lere çevrilebilmektedir. Bu şekilde yağ asitlerinin kaybı membran hasarına yol açmaktadır (78).

Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu malondialdehit (MDA) üretimi ile sonuçlanır. Malondialdehit LPO'nun derecesinin saptanmasında kullanılan bir belirteçtir (79). Lipid LOOH ve lipid ROO⁻ radikalleri hücrenin birçok komponenti ile reaksiyona girer. Malondialdehit, membran komponentlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağlanmalarına neden olarak iç membranın bazı özelliklerini değiştirir. Ayrıca diffüze olabildiğinden deoksiribonükleik asit'in (DNA) nitrojen bağları ile reaksiyona girebilir. Malondialdehit bu özelliklerinden dolayı mutajenik, genotoksik ve karsinojenik bir bileşiktir (80). Membrandaki PUFA ve protein içeriğinin fazla olması peroksidasyonun yayılmasını artıran faktörlerdir. Bunun yanında kolesterolün varlığı peroksidasyonu baskılamaktadır. Demir ve bakır iyonları ya da bu iyonların fosfat esterleriyle oluşturduğu basit şelatlar (Fe⁺²-ADP) hem, Hb ve miyoglobini de içeren bazı demir proteinleri lipid LOOH'ın yapısını bozarak peroksidasyonu sonlandırılmaktadır. Ayrıca C ve E vitamini gibi zincir reaksiyonlarını durduran, kıran antioksidanların varlığı da peroksidasyonun sonlandırılmasında önemlidirler. (81).

2.4.7.2. Serbest Radikallerin Proteinler Üzerine Etkileri

Proteinler serbest radikal etkisine PUFA'dan daha az hassastırlar ve başlayan zincir reaksiyonlarının hızla ilerleme ihtimali daha azdır. Doymamış bağ ve sülfür ihtiva eden moleküllerin ROT ile reaktivitesi yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metionin ve sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Serbest radikallerin neden olduğu hasar sonucu proteinlerde parçalanma, çapraz bağlanma ve agregasyon oluşur (74).

2.4.7.3. Serbest Radikallerin Karbonhidratlar Üzerine Etkileri

Glikoz ve mannoz gibi monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu H₂O₂, peroksitler ve okzalaldehitler oluşabilir. Okzalaldehitler DNA, ribonükleik asit ve proteinlere bağlanarak antimitotik etki göstererek kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar (76).

2.4.7.4. Serbest Radikallerin Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri

Serbest oksijen radikallerinin nükleik asitler ve DNA üzerine etkisiyle, DNA zincirinde kopmalar, bazlarda ve deoksiribozlarda kırılmalar ve hasar oluşur. Sonuçta sitotoksisite, mutasyon ve malign değişim potansiyeli oluşabilir.

2.4.8. Antioksidan Savunma Sistemleri

Serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere organizmada antioksidan savunma sistemleri veya kısaca antioksidanlar olarak adlandırılan çeşitli savunma mekanizmaları gelişmiştir. Sağlıklı bireylerde oluşan ROT ile antioksidan savunma sistemi arasında bir denge söz konusudur. Antioksidanlar genel olarak endojen ve eksojen olmak üzere iki grupta incelenir.

2.4.8.1. Endojen Antioksidanlar

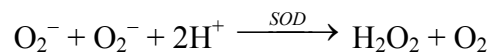
a.Enzimatik antioksidanlar (mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi, SOD, CAT, glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon S transferaz, glutatyon redüktaz).

b.Enzimatik olmayan antioksidanlar (vitamin E, β karoten, vitamin C, melatonin, sistein, seruloplazmin, transferrin, laktoferrin, miyoglobulin, albumin, bilirubin ve glutatyon).

2.4.8.1.1. Enzimatik Antioksidanlar

2.4.8.1.2. Süperoksit Dismutaz (SOD)

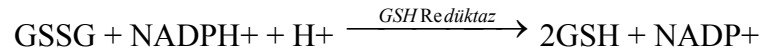
Süperoksit genel olarak, zincirleme radikalik tepkimeleri başlatır ve tepkimeler boyunca hidroksil radikali, O_2 ve organik radikallerin oluşumuna neden olur. Radikalik zincir tepkimelerinin başlaması ve tepkimeler boyunca O_2^- en çok daha reaktif ve toksik etkili radikallerin yapımı SOD tarafından engellenir. Serbest radikallere karşı organizmada ilk savunma SOD enzimiyle gerçekleşir. SOD, CAT ve GSH-Px'den farklı olarak serbest radikali substrat olarak kullanır.



Süperoksit dismutaz ile katalizlenen tepkimenin ürünü olan H₂O₂ ise CAT ile H₂O'ya indirgenmektedir.

2.4.8.1.3. Glutatyon Redüktaz (GSH-Redüktaz)

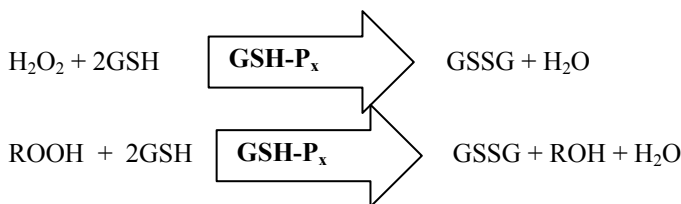
Redükte glutatyon (GSH)'un yüksek konsantrasyonları ve okside glutatyonun (GSSG) düşük düzeyleri organizmanın yaşamı için gereklidir. Redükte glutatyon, protein sülfhidrillerinin oksidasyonunu geriye çevirir. Yüksek GSSG düzeyleri protein sülfhidrilleriyle reaksiyona girer ve proteinleri inaktive eden karışık GSH-protein sülfhidrilleri oluşturur. Antioksidan savunmanın etkinliğini sürdürebilmesi için oksitlenmiş GSH'ın tekrar indirgenmiş şekle dönüşmesi gerekir. Glutatyon redüktaz, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) varlığında indirgenme reaksiyonunu katalizler.



NADPH/NADP⁺ ve GSH/GSSG oranlarındaki değişiklikler akut prooksidan stres ile antioksidan savunma arasındaki dengesizliğin belirtisidir.

2.4.8.1.4. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)

Hidrojen peroksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. Tetramerik yapıdadır. Dört selenyum atomu içeren sitozolik bir enzimdir. Tepkime sonucunda okside glutatyon (GSSG) oluşmaktadır. Enzim aktivitesinin %60-75'i hücrelerin sitoplazmasında, %25-40'ı ise mitokondridedir. Enzim aktivitesi eritrositler ve hepatositlerde çok yüksektir. İntrasellüler lipidleri peroksidasyondan koruyan en önemli enzimdir. Ayrıca hücre membranında oluşan lipid peroksidasyonunda da etkilidir. ROT maruziyeti sonrası membranda fosfolipid hidroperoksitler oluşur ve bunları alkole indirgeyerek membran bütünlüğünü korur. Bu enzime de fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz (PLGSH-P_x) adı verilir (82,83).



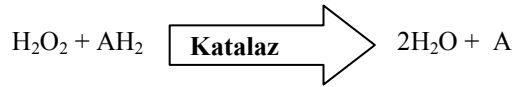
Tepkime sonucunda oluşan okside glutatyon, glutatyon redüktazın (GSSG-R) etkisi ile tekrar glutatyona dönüşür.



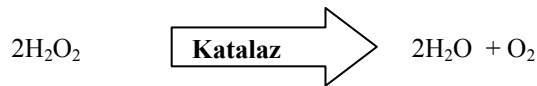
2.4.8.1.5. Katalaz

Katalaz tüm hücre tiplerinde değişik konsantrasyonlarda bulunur. Hidrojen peroksidin O_2 ve H_2O 'ya indirgenmesini katalizler. Dört adet hem grubu içeren hemoproteindir. Eritrositler katalaz enzimini yüksek miktarlarda bulundurmaktadır. Katalaz enzimi antioksidan etkinliğin %98'inden fazlasını karşılamaktadır. Hidrojen peroksidi suya ve oksijene indirger. Katalaz enzimi 2 ana mekanizma kullanır: Birincisi oksidatif stresin düşük olduğu dönemlerde peroksidatif reaksiyon, ikincisi ise oksidatif stresin yüksek olduğu dönemlerde katalitik reaksiyondur (84).

Peroksidatif mekanizma;



Katalitik mekanizma;



2.4.8.2. Enzimatik Olmayan Endojen Antioksidanlar

C vitamini (askorbik asit), E vitamini (α -tokoferol), β karoten, melatonin, glutatyon

2.4.8.2.1. Diğer Enzimatik Olmayan Endojen Ajanlar

Bazı durumlarda ürik asit, sistin, albumin, bilirubin, seruloplazmin, transferin, laktoferrin, kreatinin ve östrojenler de serbest radikallere karşı koruyucu rol oynarlar (79).

2.4.9. Eksojen Antioksidanlar

Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol), NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezipler), kalsiyum kanal blokerleri (verapamil, nifedipin), non-steroid antiinflamatuar ilaçlar (ibuprofen), demir tutucuları (desferroksamin, EDTA), rekombinant SOD (r-SOD), nötrofil adezyon inhibitörleri, Asetil sistein, mannitol, melatonin

2.5. *Capparis Ovata*

Kapari, Capparidaceae familyasının en geniş iki genusundan biri olup, dünya üzerinde 350 tür ile temsil edilmektedir. Türkiye’de *Capparis ovata* ve *spinosa* türleri bulunmaktadır. Arkeolog Krügerin araştırmasına göre, 7800 yıldan beri bu bitki bilinmektedir. Aristo ve Hipokrat zamanlarında da (M.Ö. 384- 322, M.Ö. 400), bu bitkiden söz edilmektedir. Antik Mısır ve Araplarda böbrek, karaciğer, mide, diş ve baş ağrısı için kullanıldığı bilinmektedir. Yine antik dönemde Romalılar parali, konvülsiyon tedavisinde kullanmıştır. Yine antik mısır ve Yunanlılar menstruasyonu artırmak için kullanmışlardır (86-88). Hawaii’de (*C.cordofilia*) bitkinin tamamı kırık kemiklerin tedavisinde kullanılmaktadır (89).

Kaparinin içeriği:

100 gr. kuru maddede protein 21 g., yağ 1.6 g., Kalsiyum 123 mg., Fe 6.8 mg., Beta karoten 165 mcg, Vitamin B1 0.02 mg., Vitamin B2 0.03 mg., Niasin 8.8 mg., Vitamin C 5 mg., enerji 341 kcal; 100 gr pişirilmiş maddede; Protein 5.4 g., yağ 0.2 g., kalsiyum 33 mg., Fe 2.8 mg., Beta karoten 25 mcg., Vitamin B1 0.01 mg., enerji 92 kcal bulunmaktadır. İşlenmiş kaparinin 100 gramında ise Protein % 29.3, Yağ % 0.7, Fiber % 2.7, Nişasta % 39.5, Sukroz % 4.3, D-glukoz % 0.2, D-fruktoz % 0.7, Amino asit (g [16g N]⁻¹), Aspartik asit 7.7 g, Threonin 1.7 g, Serin 2.3 g, Glutamik asit 9.0 g. Prolin 6.5 g, Glisin 3.5 g, Alanin 3.2 g, Valin 4.5 g, Sistein 1.3 g., Methionin 1.8 g, İzolösin 2.9 g, Lösin 7.0 g, Tirozin 2.3 g, Histidin 1.3 g., Lizin 1.5 g., Arginine 15.1 g., Çinko 4.2 mg bulunmaktadır (90).

Kaparinin etkileri:

Halk arasında analjezik, diüretik, yara iyileştirici ve hücre yenileyici olarak kullanılan kapari bitkisinin tomurcuk ve yaprakları da ilaç ve kozmetik sanayisinde kullanılmaktadır (91).

Antioksidan etkileri;

Kaparinin tomurcuklarında lipid, alkaloid, glucocapperin gibi glukozinolatlar ve antioksidan özelliği bulunan flavonoid ve diğer polifenoller bulunur. Rutin ise en sık rastlanan flavonoiddir. Ayrıca yapılan çalışmalarda metanolik ekstraktların da antioksidan özellikleri gösterilmiştir (92). Kaparinin tomurcuklarında benzil alkol (% 20.4), furfural (% 7.4), ethanal metil pentil acetal (% 5.9), 4-vinil guaiacol (% 5.3), thymol (% 5.1), octanoic acid (% 4.8) ve metil isothiocyanate (% 4.5) bulunurken, yapraklarında ise metil isothiocyanate (% 20.0), thymol (% 15.5), 4-vinyl guaiacol (% 4.3), hexyl acetate (% 3.6) ve trans-theaspirane (% 2.6) bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda kapari ekstrelerinin hidrojen donörü olarak görev yaptığı, lipid radikallerle reaksiyon vererek antioksidan özellik gösterdiği kanıtlanmıştır. Ayrıca metanolik ekstraktın demir oto-oksidasyonunu artırarak ferröz demiri ferrik hale dönüştürerek hidroksil radikal oluşumunu inhibe ettiği, *Capparis spinosa*'nın antioksidan özelliğinin de benzer olarak içerdiği fenollere bağlı olduğu ve glukozinolatların dışlanması ile antioksidan etkinin devam ettiği gösterilmiştir (93).

Bazı bitkilerdeki (çay, fasülye, karanfil tohumu, kekik) esansiyel yağların antioksidan özellikleri bilinmektedir. Yağların antioksidan özelliğinin ise fenolik içeriğinden kaynaklandığı kanıtlanmıştır. *Capparis ovata*'nın antioksidan özelliğininde guaiacol, 4-vinyl guaiacol, thymol ve vanillin gibi fenol içeriğinden kaynaklandığı söylenebilir (94,95).

Kan şekeri üzerine etkileri;

Alloxan (2,4,5,6-tetraoxypyrimidine; 2,4,5,6-pyrimidinetetrone) oksitlenmiş pirimidin analogudur ve pankreas beta hücrelerinin insülin yapımını inhibe eder. Alloxan ile indüklenerek diabet oluşturulan ratların bir kısmına insülin bir kısmına *Capparis decidua* ekstraktları verilerek yapılan bir çalışmada *C. decidua* verilen grubun kan şekerinde anlamlı düşüklük olması ile birlikte kronik diabet zemininde gelişen oksidatif stresin de azaldığı gösterilmiştir (96). Benzer olarak streptozosin

verilerek diabet oluşturulan ratlara rutin (100 mg/kg'dan 45 gün süresince) uygulandığında açlık plazma kan şekerinde düşme, plazma insülin düzeyinde artma, lipid peroksidasyon ürünlerinde azalma ile birlikte enzimatik ve non-enzimatik antioksidan düzeylerinde artış olduğu gösterilmiştir (97).

Hipoglisemik etkileri ile ilgili olarak yapılan başka bir çalışmada streptozosin ile diabet oluşturulan ratlara 14 gün süre ile 20 mg/kg dozunda *C. spinosa* verilerek, bazal insülin değerlerinde değişiklik olmaksızın kan şekerinin normale döndüğü gözlenmiştir (98). Yeni yapılmış bir çalışmada *C. moonii*'nin meyvelerinin hidro-alkolik ekstraktlarının 2 çeşit gallotannins (chebulinik asit ve deriveleri) içerdiği ve bunların glukozun hücre içine alımını arttırdığı bunu belirgin bir şekilde insülin reseptör (IR ve IRS-1) fosforilasyonu, GLUT4 gen ekspresyonu yaparak sağladığı gösterilmiştir (99).

Antikonvülsan ve sedatif etkileri;

Son yıllarda yapılan bir başka çalışmada *C. desidua*'nın alkolik ekstraktlarının antikonvülsan ve sedatif etkilerinin olduğu bildirilmiştir (100).

Antiaterosklerotik etkileri;

Yue-lan ve arkadaşları *C. spinosa*'nın oksidatif stres üzerine negatif etkilerini ROT oluşumunu azaltarak yaptığını ve bu etkisini sistemik skleroz hastalarında dermal fibroblastları etkileyerek hastalık ilerlemesini yavaşlattığını bildirmişlerdir (101). Bir çalışmada *C. desidua* meyvelerinin antioksidan özelliği nedeniyle anti-aterosklerotik olduğu ve aterom plağı oluşumunu önlediği bildirilmiştir (102). *C. spinosa*'nın etanolik ekstraktlarının fibroblast proliferasyonu ve tip-1 kollajen yapımını önleyerek progresif sistemik skleroz tedavisinde yararlı olduğu bir başka çalışmada da bildirilmiştir (103). Hiperlipidemik 15 erişkinde yapılan bir çalışmada *C. desidua* ekstraktları kullanılmış ve plazma trigliserid, total lipid ve fosfolipid konsantrasyonlarında azalma olduğu saptanmıştır (104). Yine *C. spinosa* ekstraktları ile yapılan streptozosinin indüklediği diabetik ratlarda kolesterol ve trigliserid düzeylerinin iki hafta süre ile düşük kaldığı gösterilmiştir (90). Tavşanlarda yapılan başka bir çalışmada ise *C. desidua* ekstraktları kullanılmış ve serum total kolesterol, LDL, trigliserid ve fosfolipid düzeylerinde azalma saptanmıştır.

Antibakteriyel, viral, paraziter, fungal etkileri;

C. decidua tohumlarının *Vibrio kolera ogava, inaba, ettor* suşlarına karşı, *C. zeylanica* 'nın petroleum eter ekstraktının *Staf.Aureus, Klebsiella pnömonia, Proteus vulgarise* karşı antibakteriyel etkinliği bildirilmiştir (105,106). *Capparis spinosa* 'nın *Microsporum Canis* ve *Tricophyton Violaceum* üzerinde antifungal özelliği bulunurken (107), *Capparis tomentosa* 'nın *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus cereus* üzerinde büyümeyi inhibe ettiği de gösterilmiştir (108). Yine *Capparis spinosa* 'nın butanol ekstraktının gram-pozitif ve gram-negatif antibakteriyel özelliği saptanmıştır. *C.spinosa* 'nın metanolik ekstraktlarının *Herpes simpleks* tip 2 enfeksiyonlarında periferik mononükleer hücrelerin ömrünü uzatıp proenflamatuvar sitokinlerin (IL-12, IFN gama, TNF-alfa) salınımını arttırdığı gösterilmiştir (109). Jacobsan ve Schlein *capparis* ekstraktlarının *Leishmania* parazitine agglütine olup paraziti öldürdüğünü bildirmişlerdir (110). Çalışmalar antiparaziter, antiviral, antifungal özelliklerinin uzun alkil zincirleri, kuarterner amonyum, glukosinolatlara bağlı olduğu görüşündedir (111-113).

Antihepatotoksik etkileri;

Capparis spinosa 'nın ekstraktlarından olan p-methoxy benzoic asidin, in-vivo karbontetraklorür ve parasetamol ile, in vitro galaktozamin ve thioacetamide ile oluşan hepatotoksisitede anti-hepatotoksik olarak rol oynadığı gösterilmiştir (114). Son zamanlarda akut viral hepatitin tedavisinde kullanılan Liv.52 DS tablet içeriğinde de *Capparis spinosa* ekstraktları bulunmaktadır (115).

Antipiretik, analjezik etkileri;

Capparis spinosa ve *C. decidua* ekstraktlarının anti-enflamatuvar özellikleri çeşitli çalışmalarda kanıtlanmıştır (116,117). Ayrıca *C.decidua* 'nın antipiretik özelliği olduğu fakat her ikisinin analjezik özelliklerinin olmadığı gösterilmiştir (116). Buna karşın bir çalışmada farelerde *C. ovata* 'nın metanolik ekstraktlarının morfin sülfat, naloksan ve dipyrone ile karşılaştırıldığında benzer şekilde analjezik etkinliğinin olduğu gösterilmiştir (118).

Antitümöral, immünostimülan özellikleri;

Yeni yayınlarda, *Capparis zeylanica*'nin analjezik, antipiretik, spesifik ve nonspesifik olarak immünostimülan özelliği olduğu bildirilmiştir (119). *C.sikkimensis*'in in vitro olarak tümör hücrelerinin replikasyonunu önlediği bildirilmiştir (120). *C.spinosa*'nın tohumlarının içerdiği proteinlerin tümör hücrelerine karşı antiproliferatif etkinliği, HIV-1 reverse transkriptazını inhibe ettiği ve antifungal etkinlik gösterdiği bildirilmiştir (121). Kaparilerin içerdiği karotenoidlerin kimyasal olarak hamsterlarda bukkal mukazada oluşturulan karsinogenezisi engellediği gösterilmiştir (122). İçerdikleri tokoferol ve fenolik içeriklerinin antitümör, antimelanoma özelliği taşıdığı düşünülmektedir (120,123). Yine başka bir çalışmada *Capparis zeylanica*'nin 150-300 mg/kg dozunda nötrofil adezyonunu artırdığı, koyun eritrositlerine karşı hümorale immün cevapta artış oluşturduğu, siklofosfomidle oluşturulan immünsüpresyonu önleyerek immünstimülan rol oynadığı gösterilmiştir (124).

Diğer etkileri, yan etkileri;

Japonya'da yapılmış bir çalışmada *C. flavicans*'in antiöstrojenik etkisi nedeniyle süt veren kadınlarda laktasyonu arttırdığı bildirilmiştir (125).

Capparis spinosa'nın antiallerjik özelliği bulunduğu da gösterilmiştir (126). *Capparis cartilaginea*'nin ise kolinerjik ve adrenerjik reseptörlerden bağımsız olarak, myokard ve kan damarlarında doğrudan relaksan etki ile hipotansiyon ve bradikardi oluşturduğu saptanmıştır. Şimdiye kadar yan etki olarak epikondilit nedeni ile cilt üzerine *C. spinosa* solüsyonundan ıslak kompres yapan bir kadında allerjik kontakt dermatit oluştuğunu bildiren bir olgu sunumu bulunmaktadır. Keberenin içermiş olduğu glukokapparin adlı protein enzimatik hidroliz ile (mirosinaz) izotiyosiyanata dönüştürülebilen bir izotiyoglukoziddir. İzotiyosiyanatları içeren bitkilerin iritan dermatite ve allerjik kontakt dermatite yol açtıkları bilinmektedir. Bunun haricinde yan etki veya toksisite ile karşılaşılması (127).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma, SDÜ Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan onay alınarak, SDÜ Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Merkezi, Biyokimya ve Histoloji Laboratuvarlarında, etik kurulu kurallarına uygun olarak gerçekleştirildi.

3.1. Gereç

3.1.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada; SDÜ Deney Hayvanları Üretim Merkezinden alınan 38 adet Spraque Dawley cinsi, 8 haftalık, ağırlıkları 223-272 g arasında olan dişi rat kullanıldı. Çalışmadaki ratların hepsi deney süresince % 50-60 nemli ortamda, 12 saat aydınlık ve 22-24°C oda ısısı koşullarında bulunduruldu. Ratlar gruplar halinde ayrı kafeslere konarak yeterli miktarda içme suyu ve standart rat yemi verildi. Deneyden 10 gün önce alınan ratlar, 10 günlük uyum dönemi geçirdiler.

3.1.2. Kullanılan Malzeme ve Aletler

Soğutmalı santrifüj eppendorf MR 5415 (Almanya), derin dondurucu Facis (Fransa), hassas terazi Scaltec (İsviçre), Vorteks (karıştırıcı) Nüve NM 100 (Türkiye), otomatik pipetler Gilson (Fransa), eppendorf, ultraviyole spektrofotometre Shimadzu UV 1601 (Japonya), homojenizatör Ultra Turrax T25 (Almanya), Viva (ilaç düzeyi ölçüm cihazı) Dade Dehring (Almanya- ABD).

3.1.3. *Capparis Ovata* Aköz Ekstraktının Hazırlanışı

Burdur ilinde 2009 yılı, Mayıs ile Eylül ayları arasında yetişen ovata cinsi kapari tomurcuk (açmış, olgunlaşmış) ve çiçeklerinin Aşçı Murat Kapari Araştırma ve Geliştirme Merkezi'nde gölgede kurutulup, öğütülmüş ve 1 gramlık toz halinde poşet çay haline getirilmiş preparatından 2 adet 1 gramlık poşet çay SDÜ Araştırma ve Uygulama Hastanesi Biyokimya laboratuvarında günlük olarak 100 mL kaynamış distile su içinde 10 dakika kaynatılıp 15 dakikada buzdolabında +4°C'de soğutulurak % 2'lik solüsyon haline getirilip, 1 mililitresi gavaj ile ratlara uygulandı (128,129).

3.1.4. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneyin Yapılması

Deney Grupları	n
Kontrol grubu	8
6-MP grubu	10
CAP grubu	10
6-MP/CAP grubu	10

- **Kontrol grubu:** Fizyolojik serum, 14 gün süreyle, her gün 1 mL, tek dozda gavaj ile sabah saat 08'de,
- **6-MP grubu (6-MP):** 6-mp, 14 gün süreyle, 5mg/gün, 1 mL, tek dozda gavaj ile öğlen saat 12'de,
- ***Capparis ovata* grubu (CAP):** *C. ovata* % 2'lik solüsyonu, 14 gün süreyle, her gün 1 mL tek dozda gavaj ile sabah saat 08'de,
- ***Capparis ovata* + 6-MP grubu (6-MP/CAP):** 14 gün süreyle, belirlenen dozda saat 08:00'de *C. ovata* (1 mL), saat 12:00'de 6-MP 1 mL (5mg) gavaj ile uygulandı.

3.2. Doku ve Kan Örneklerinin Alınması

Deney başlangıcında ratların kuyruk veninden 2 ml hemogram bakılması ve antioksidan enzim çalışması için hemolizat oluşturmak üzere sitratlı tüpe, geri kalan kan örnekleri de AST, ALT çalışılmak üzere biyokimya numune tüpüne alındı. Ayrılan serum örneklerinden aynı gün serum AST, ALT değerlerine Abbott Aeroset cihazı ile bakıldı. Ayrıca hemogram çalışıldı. Hemogram çalışıldıktan sonra SOD, GSH-Px, Katalaz, MDA çalışılmak üzere serumlardan hemolizat oluşturuldu.

Deney bitiminde intraperitoneal Ketamin (Ketalar, Pfizer) 80 mg/kg ve Xylazine (Alfamin, Alfasan IBV) 10 mg/kg ile anestezi sağlanarak dekapitasyon sonrası orta hat insizyonuyla ratların batinları açıldı. Inferior vena cava'dan kan örnekleri alındı. Kan örneklerinden 2 ml'lik kısım hemogram bakılması için sitratlı numune tüpüne ve geri kalan kan örnekleri de biyokimya numune tüpüne alındı. Ayrılan serum örneklerinden aynı gün serum AST, ALT Abbott Aeroset cihazı ile bakıldı. Hemogramları çalışıldıktan sonra SOD, GSH-Px, Katalaz, MDA çalışılmak

üzere hemolizatlar ayrıldı. Histolojik incelemeler için karaciğer sağ lobları alındı. Karaciğer sol lobu SOD, GSH-Px, Katalaz, MDA çalışılmak üzere ayrıldı.

3.3. SOD, GSH-Px, MDA ve Katalaz İçin Karaciğer Dokusunun Homojenizasyonu

Doku örnekleri önce kanı uzaklaştırmak için soğuk distile suyla yıkandı. Dokular hassas terazide tartılıp, 1/10 oranında fosfat tamponu ile dilüe edildi. Daha homojenizör (Ultr-Turrax T25, Ika labor Technik, Almanya) ile 9600 devir/dk'da 30 saniye süreyle soğuk zincirde mekanik olarak homojenize edildi. Burada parçalanmış numuneler 30 saniye süreyle sonifikasyon işlemine (Bandelin Sonoplus, HD2070, Almanya) tabi tutuldular. Bu süre sonunda elde edilen % 10'luk homojenatlar, +4°C'de 10 dakika süreyle 5000 g'de santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi. Bu süpernatantlarda protein, MDA düzeyleri ile GSH-Px, SOD ve CAT aktiviteleri çalışıldı.

3.4. Dokularda, Hemolizatlarda Biyokimyasal Analizler

3.4.1. SOD Aktivitesinin Ölçümü

Deneyin prensibi: SOD çeşitli yollarla ortaya çıkan süperoksit radikalinin H_2O_2 'ye dismutasyonu reaksiyonunu katalizler. Ksantin-ksantin oksidaz (XOD) sistemi tarafından üretilen süperoksit radikallerinin, 2-(4-iyodofenil)-3-(4-(4-nitrofenol)-5-fenil tetrazolyum klorit (INT) ile meydana getirdiği kırmızı renkli formazon boyasının, 505 nm dalga boyunda verdiği optik dansitenin spektrofotometrik olarak okunması esasına dayanmaktadır. Bu reaksiyona dayanan optik dansitedeki azalmadan yararlanarak, reaksiyonun % inhibisyonu belirlendi.

Deneyin Yapılışı: Yirmibeş µl homojenattan alındı ve % inhibisyonun % 30-60 arasında olması için örnekler dilüe edilmedi. 0.025 ml homojenata, 0.850 ml 0.05 mM ksantin çözeltisi (0.025 mM INT içeren) ve 40 mM'lık CAPS (0.94 mM'lık EDTA içeren) ilave edildi. 0.125 ml ksantin oksidaz (80 U/L) ilave edildikten hemen sonra 505 nm'de 37 °C'de 30 saniyelik gecikme fazının ardından, havaya karşı başlangıç absorbansı (A1) ve 3 dakika sonra da son absorbans (A2) okundu. Aynı işlemler köre karşı denemeyle de tekrarlandı. Standart (5.2 U/mL) çalışılarak

hazırlanan % inhibisyon-konsantrasyon grafiğinden yararlanılarak konsantrasyonlar saptandı. Enzim aktivitesi U/ml olarak bulundu. Bu değerler homojenizasyon sırasındaki dilüsyon katsayısı ile çarpılıp dokunun protein değerine bölünerek U/gr birimi şeklinde sonuçlar verildi.

3.4.2. GSH-Px Aktivitesinin Ölçümü

Deneyin prensibi: Paglia ve Valentine'nin metoduna dayanmaktadır (76). Glutasyon peroksidaz, kümen hidroperoksid ile glutasyonun oksidasyonunu katalizler. Okside glutasyon, NADPH varlığında glutasyon redüktaz tarafından indirgenir. Bu arada NADPH, NADP⁺'ye oksitlenir. Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat'ın azalmasına bağlı olarak 340 nm'de meydana gelen absorbans değişimi ölçülerek enzim aktivitesi hesaplandı. Deneyin yapılışı: Bir deney tüpünde 1 ml; glutasyon (4 mM), glutasyon redüktaz (≥ 0.5 U/L) ve β -NADPH (0.34 mM) çözeltilerini içeren reaktif ile 20 μ L numune karıştırılıp, ölçümden hemen önce 40 μ L kümen hidroperoksid (0.18 mM) ilave edildi. Enzim aktivitesini ölçmek için 340 nm'deki absorbans değişimi hesaplandı. U/L cinsinden bulunan enzim aktivitesi, homojenizasyon esnasındaki dilüsyon katsayısı ile çarpıldıktan sonra doku protein değerine bölünerek sonuçlar U/gr birimi olarak ifade edildi.

3.4.3. Katalaz Aktivitesinin Ölçümü

Deneyin prensibi: Aebi metoduna dayalı olarak yapıldı. Hidrojen peroksidin CAT tarafından parçalanması temeline dayalı UV spektrofotometrik yöntem ile CAT aktiviteleri tayin edilmiştir. Hazırlanan homojenat, fosfat tamponuyla 10 kat dilüe (0.2 mL homojenat + 1.8 mL fosfat tamponu) edildi. 2 mL'lik bu dilüe homojenat üzerine taze hazırlanan ve 30 mM H₂O₂ içeren fosfat tampon çözeltisinden 1 mL eklendi. 240 nm'de ilk 30 saniye içinde 15'er saniyelik absorbans azalması bulunarak, k değeri aşağıdaki şekilde hesaplandı:

$$k = 2.3 / \Delta t \times (\log A1/A2) \times (a / b)$$

A1: 240 nm deki başlangıç absorbansı (t1=0), A2: 240 nm deki 15. sn'deki absorbansı (t2=15), a: dilüsyon faktörü, b: homojenatın protein miktarı

3.4.4. MDA Aktivitesinin ve Protein Düzey Ölçümü

MDA; HPLC ile dokuda, hemolizatta MDA analizi Mateos ve ark. metodu ile çalışıldı (130). Protein; Otoanalizör ile Lowry ve ark. metoduna göre ticari kitle çalışılmıştır (DC Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, California, USA) (131).

3.5. Kullanılan Kimyasal Maddeler

3.5.1. SOD Tayini İçin Kullanılanlar

Potasyum dihidrojen fosfat, Merck (Almanya), Disodyum hidrojen fosfat dihidrat, Merck (Almanya), CAPS, Sigma (Almanya), Iodonitrotetrazolyum violet, Sigma (Almanya), Ksantin, Merck (Almanya)X Ksantin oksidaz, Sigma (Almanya), Titripleks III, Merck (Almanya).

3.5.2. GSH-Px Tayini İçin Kullanılanlar

Potasyum dihidrojen fosfat, Merck (Almanya)X Disodyum hidrojen fosfat dihidrat, Merck (Almanya)X Glutasyon redüktaz, Fluka (İsviçre), β -NADPH, Sigma (Almanya), Glutasyon-redükte, Sigma (Almanya), Kümen hidroperoksit, Sigma (Almanya), Titripleks III, Merck (Almanya).

3.5.3. Katalaz Tayini İçin Kullanılanlar

Potasyum dihidrojen fosfat, Merck (Almanya), Disodyum hidrojen fosfat dihidrat, Merck (Almanya), Hidrojen peroksid, Merck (Almanya).

3.5.4. MDA ve Protein Tayini için Kullanılanlar

MDA; ThermoFinnigan Spectra High Performance Liquid Chromatograph with Diode Array Detector San Jose, California, USA. **Protein**; Aeroset Automated Analyzer, Abbott Laboratories, Illinois, USA.

3.6. Kullanılan Çözeltiler

3.6.1. SOD Tayini İçin Kullanılanlar

- CAPS tamponu (pH: 10.2), 40 mM: 8.85 gr CAPS tartılıp 400 mL distile suda çözülüp pH'ı 10.2'ye ayarlandıktan sonra hacmi 1000 mL'ye tamamlandı. 0.94 mM EDTA (0.36 gr) tartılıp CAPS tamponuna katıldı.

- Ksantin çözeltisi (0.05 mM): 7.6 mg ksantin tartıldı ve hacmi 40 mM CAPS tamponu (0.94 mM EDTA içeren; pH: 10.2) ile 1000 mL'ye tamamlandı. Çözelti, 0.025 mM 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolyum klorür (INT) içermektedir ve +2 / +8⁰C'de muhafaza edildiğinde 10 gün süreyle kararlıdır.

- Ksantin oksidaz çözeltisi (80 U/L): 56 µl ksantin oksidaz standardından alınır, 10 mL distile su ile seyreltilir. Çözelti, günlük hazırlanır.

3.6.2. GSH-Px Tayini için Kullanılanlar

- Kümen hidroperoksit çözeltisi (0.18 mM): Kümen hidroperoksitten 1.62 µl alınır, 50 mL distile su ile seyreltilir. Çözelti, günlük hazırlanır.

- Glutasyon çözeltisi (4 mM): 0.0614 gr glutasyon tartılır ve hacmi 50 mM fosfat tamponu (pH: 7.2 olan ve 4.3 mM EDTA içeren) ile 50 mL'ye tamamlanır.

- Glutasyon redüktaz ($\geq 0,5$ U/L): 10 µL glutasyon redüktaz alınır, 10 mL distile su ile seyreltilir. Bundan 50 µL çekilip, 50 mM fosfat tamponu (4.3 mM EDTA içeren ve pH: 7.2 olan) ile 50 mL'ye seyreltilir. Çözelti, günlük hazırlanır. β -NADPH çözeltisi (0.34 mM): 0.0116 gr β -NADPH tartılıp hacmi 50 mM fosfat tamponu (pH: 7.2 olan ve 4.3 mM EDTA içeren) ile 50 mL'ye tamamlanır.

3.6.3. Katalaz Tayini İçin Kullanılanlar

- 50 mM fosfat tamponu: 2.7218 gr KH_2PO_4 ve 5.3397 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tartılarak 500 mL distile suya tamamlandı..

- 30 mM hidrojen peroksit için: 0.34 mL% 30'luk hidrojen peroksit, 100 ml fosfat tamponu ile dilüe edildi.

3.6.4. MDA Tayini için Kullanılanlar

Tartılan dokular pH 7.16 olan fosfat tamponuna kondu ve alındıktan hemen sonra -20°C 'de saklandı. Numuneler çalışılacakları zaman eritildi ve 500 ppm BHT ilavesinden sonra bu tamponda Ultra Turrax T25 Homogenizer ile 2500 rpm'de $+4^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta homojenize edildi. Homojenatlar 10,000 X g'de 30 dakika boyunca $+4^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüj edildi. Süpernatantlardan 250 μL eppendorf tüplere alındıktan sonra üzerine 6M 50 μL NaOH solüsyonu eklenerek final hacim 300 μL 'ye çıkarıldı. Alkali süpernatantlar daha sonra 60°C su banyosunda 30 dakika inkübe edildi (proteine bağlı MDA'nın hidrolizi). Numuneler soğutulduktan sonra % 35'lik (v/v) perklorik asit ilavesiyle proteinlerin presipitasyonu sağlandı. Karışım 2800 X g'de 10 dakika santrifüj edilip süpernatantlardan 250 μL eppendorf tüplere aktarıldı ve üzerine 25 μL dinitro fenil hidrazin (DNPH, 5 mM) eklenerek vortekslendi. 30 dakika karanlıkta türevlenmeye bırakılan numunelerden 50 μL HPLC sistemine enjekte edildi.

Kromatografik Koşullar:

Kolon: 5 μm , 125x4mm Nucleosil 100C18 RP

Mobil Faz (Izokratik): Acetonitril/ H_2O /Acetic Acid (38/62/0,2 -v/v/v)

Akım Hızı: 0.6 mL/min

Isı: 23°C , UV λ : 310 nm

3.7. Histopatolojik Analiz Yöntemleri

% 4'lük paraformaldehit solüsyonunda, immersiyon fiksasyon yöntemi uygulanan doku örnekleri tespitten sonra bir gece akan suda yıkama işlemine tabi tutulduktan sonra aşağıda gösterilen işlemlerden geçirildi.

A) Dehidratasyon

<u>Alkol derecesi</u>	<u>Süre</u>
% 70	1 gece
% 80	1 saat
% 90	1 saat
% 96	1 saat
% 100	1 saat
% 100	1 saat

B) Şeffaflaştırma

<u>Alkol</u>	<u>Süre</u>
Ksilol	1/2 saat
Ksilol	1/2 saat

C) Emdirme

Ksilol+parafin (60⁰C etüvde).....15 dakika

Parafin (60⁰C etüvde)..... 4 saat

D) Gömme

4 saatin ardından doku örnekleri parafin bloklara gömüldü.

3.7.1. Doku Örneklerinin Değerlendirmesi

Hazırlanan parafin bloklardan, Leica tipi kızaklı mikrotom kullanılarak 4–5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Histolojik değerlendirme için preparatlar Hematoksilen-Eozin ile boyandı. Boyanan örnekler Olympus BX50 tipi binoküler mikroskopta incelendi ve fotoğraflar elde edilerek değerlendirildi. Değerlendirmede hasarı belirlemek için skorlama sistemi kullanıldı. Elde edilen dokular bağ doku artışı (enflamasyon belirteci), enflamasyon, hemoraji, higroskopik çekirdek (nekroz belirteci), granüler dejenerasyon (apoptoz veya nekroz göstergesi), piknotik çekirdek (apoptozisin son aşamaları), safra kanalı proliferasyonu, nekrotik hücre, apoptozis olmak üzere 9 ana patoloji ele alınarak değerlendirildi. Değerlendirmede her bir preparata yukarıdaki sözü edilen parametreler doğrultusunda (yok, hafif-orta ve şiddetli olmak üzere) sırasıyla 0'dan 3'e kadar puan verildi ve doku hasarı skorlandı

3.7.2. Doku Örneklerinin İmmünohistokimyasal Hazırlanması

İmmünohisto-kimyasal Boyama Protokolü: Parafin bloklara gömülü örneklerden Poly-L-Lisin kaplı lamlara 4-5 µ'luk kesitler alındı. Bir gece oda ısısında kurumaya bırakılan kesitlere aşağıdaki işlemler uygulandı;

1. Ksilol, 5 dk x 3 kez
2. Alkol % 100'lük, 3 dk

3. Alkol % 96'lık, 3 dk
4. Alkol % 90'lık, 3 dk
5. Alkol % 80'lik, 3 dk
6. Alkol % 70'lik, 3 dk
7. Distile su, 5 dk

Dokudaki maskelenmiş antijenlerin açığa çıkartılması için kesitler pH'ı 6.0'ya ayarlanmış Sodyum Sitrata tamponunda 600 W'ye ayarlı mikrodalga fırında 1 dk ısıtıldı. Oda ısısında 20 dk soğumaya bırakılan kesitler ardından üç kez birer dk boyunca PBS'de bekletildi. Kullanılan PBS solüsyonları her aşamada yenilendi. Endojen peroksidaz aktivitesinin önlenmesi için kesitler % 3'lük Hidrojen peroksitte oda ısısında 10 dk bekletildi. Sonrasında yine üç kez birer dk boyunca PBS'te yıkandı. Lam üzerindeki kesitlerin çevresi Pap Pen ile çevrilerek kimyasalların birbirine karışması engellendi. Bu işlem sonraki aşamalarda gerek oldukça tekrarlandı. Fon boyanmasını engellemek için kesitlerin üzerine Ultra V Block (Labvision) damlatılarak 5 dk bekletildi. Solüsyon kurutma kağıdı ile dokulardan uzaklaştırılıp yıkama yapılmadan primer antikor ile boyamaya geçildi. Kesitler üzerine 1:600 oranında dilüe edilmiş Aktif Kaspaz-3 (Abcam, MA. USA) damlatıldı. Kontrol amacıyla her lam üzerindeki bir örneğe de primer antikor yerine aynı ölçüde dilüe edilmiş sekonder antikor damlatıldı. Kesitler +4⁰C'de bir gece bekletildi. Ertesi gün PBS'te üç kez üçer dk boyunca yıkama yapıldı. Kesitlere 1:200 oranında dilüe edilmiş biyotin bağlı goat anti-rabbit (Santa Cruz) antikoruna damlatılarak primere tutunması sağlandı. 10 dk sonra kesitler yine üç kez üçer dk boyunca PBS ile yıkandı. Biyotinli sekonder antikora tutunması için kesitlere Streptavidin Horseradish Peroksidaz (Labvision) solüsyonu damlatılarak 10 dk bekletildi. Yine PBS'te üç kez üçer dk boyunca yıkama yapıldı. Antikoru görünür kılmak için örnekler DAB solüsyonu (Labvision) damlatılarak 10 dk bekletildi. PBS ile yeniden aynı şekilde yıkama yapıldı. Zıt boyama için örnekler Mayer Hematoksilen (J.T. Baker) ile 30 sn boyanarak önce bir dk için PBS'e ardından iki kez üçer dk çeşme suyunda yıkamaya alındı. Sırasıyla % 70'lik, % 80'lik, % 90'lık, % 96'lık ve % 100'lük alkollere batırılıp çıkarılan örnekler iki kez ksilolden geçirilerek entellan ile kapatıldı.

3.7.3. Doku Örneklerinin İmmünohistokimyasal Değerlendirmesi

Yapılan immünohistokimyasal boyamalar sonucunda karaciğer dokularında Aktif Kaspaz 3'ün (Abcam, MA. USA) bulunduğu bölgeler belirlendi. Boyamalar incelenirken aynı lam üzerindeki primer antikor damlatılmadan aynı işlemlerden geçirilen kontrol kesitleri temel alınarak inceleme yapıldı. Karaciğer yoğun kan akışı bulunan organlar olduğundan, özellikle kan hücrelerinde yoğun olarak gözlenen endojen peroksidaz aktivitesinden dolayı eritrositlerde meydana gelen pozitif boyanmalar inceleme sırasında dikkate alınmadı.

3.8. İstatistiksel Analiz

Çalışmanın analizi bilgisayar ortamında SPSS 15.0 istatistik programında yapıldı. Analizde; ölçüm verileri aritmetik ortalama \pm standart hata şeklinde gösterildi. Ki-kare, Kruskal- Wallis, Mann- Whitney U ve Wilcoxon testleri ile analiz edildi. Deney grupları arasındaki farklılığı değerlendirmek için Kruskal- Wallis varyans analizi kullanıldı. Kruskal-Wallis testi önemli farklılaşma gösterirse, hangi grubun diğerinden farklı olduğu Mann-Whitney u testi ile araştırıldı. Önemlilik düzeyi $p < 0.05$ kabul edildi.

4. BULGULAR

Araştırmamıza; sekiz rat fizyolojik serum verilen kontrol grubu (SF), 10 rat 6-Merkaptopürin verilen grup (6-MP), 10 rat *C. ovata* grubu (CAP), 10 rat ise 6-Merkaptopürin ve kapari ovata'nın birlikte verildiği grup (6-MP/CAP) olmak üzere toplam 38 rat alındı.

Çalışmaya dahil edilen dört grup rattan deneye başlarken (kuyruk veninden) ve 14 günlük ilaç kullanımı sonrasında (kalp ve VCI'dan) kanları alındı. Alınan kanlardan hazırlanan hemolizatlarda karaciğer enzimleri, hemogram, antioksidan enzim düzeyleri çalışıldı. Ayrıca deney bitiminde ratların karaciğer dokularından hazırlanmış homojenatlardan antioksidan enzim düzeyleri çalışıldı. Karaciğer sol lobları da histolojik inceleme için ayrıldı.

Hemolizatlarda deney başlangıcı ve bitiminde GSH-Px değerleri kontrol grubu dışında anlamlı değişiklikler gösterdi. 6-MP grubunda enzimde anlamlı düşüklük saptanırken 6-MP/*C. ovata* ve *C. ovata* gruplarında düşme görülmeyip aksine yükselme gözlemlendi ($p=0.005$). Katalaz değerleri kontrol grubu dışında anlamlı değişiklikler gösterdi. 6-MP grubunda deney bitiminde düşerken ($p=0.005$), 6-MP/CAP grubunda ve CAP grubunda düşme gözlenmedi. Ek olarak CAP grubunda yükselme gösterdi. SOD değerleri kontrol grubu dışında anlamlı değişiklikler gösterdi. 6-MP grubunda enzimde anlamlı düşüklük saptanırken ($p=0.007$) 6-MP/CAP ($p=0.022$) ve CAP ($p=0.009$) gruplarında yükselme görüldü. Hemolizat MDA değerleri yine kontrol grubu dışında anlamlı değişiklikler gösterdi. 6-MP grubunda enzimde belirgin yükselme saptanırken ($p=0.005$) 6-MP/CAP ($p=0.005$) ve CAP grubunda ($p=0.005$) düşme gözlemlendi (Tablo 1).

Tablo 1. Grupların deney başlangıcı ve deney bitimi hemolizat Glutasyon peroksidaz, Katalaz, Süperoksit dismutaz ve Malondialdehit düzeyleri ve p değerleri*.

Gruplar (n: 38)	GSH-Px (ü/gr Hb)		p	Katalaz (ü/gr Hb)		p	SOD (ü/gr Hb)		p	MDA (mmol/gr Hb)		p
	Deney başlangıcı (Ort. ± S. Sapma)	Deney bitimi (Ort. ± S. Sapma)		Deney başlangıcı (Ort. ± S. Sapma)	Deney bitimi (Ort. ± S. Sapma)		Deney başlangıcı (Ort. ± S. Sapma)	Deney bitimi (Ort. ± S. Sapma)		Deney başlangıcı (Ort. ± S. Sapma)	Deney bitimi (Ort. ± S. Sapma)	
SF (n: 8)	3202,1 ± 1206,1	3256,3 ± 878,2	<i>1,000</i>	169,8 ± 34,8	155,1 ± 22,2	<i>0,123</i>	2732,8 ± 647,1	2809,7 ± 404,0	<i>0,674</i>	2786,4 ± 2225,3	2648,5 ± 2157,3	<i>0,067</i>
6-MP (n: 10)	5604,7 ± 2257,7	1205,1 ± 679,2	<i>0,005</i>	180,9 ± 25,1	151,5 ± 36,0	<i>0,005</i>	3356,3 ± 839,5	1667,7 ± 1257,8	<i>0,007</i>	2894,9 ± 1515,5	5122,4 ± 1530,2	<i>0,005</i>
CAP (n: 10)	3640,1 ± 1350,7	6344,7 ± 1612,9	<i>0,005</i>	151,5 ± 48,1	186,4 ± 27,5	<i>0,017</i>	3412,3 ± 707,0	4816,1 ± 896,1	<i>0,009</i>	4707,8 ± 2738,8	1656,5 ± 634,1	<i>0,005</i>
6-MP/CAP (n: 10)	3547,2 ± 1534,4	5880,9 ± 1754,7	<i>0,005</i>	165,7 ± 34,1	159,8 ± 33,5	<i>0,386</i>	2923,3 ± 1434,2	3738,0 ± 1275,6	<i>0,022</i>	5989,0 ± 4026,7	1142,7 ± 367,5	<i>0,005</i>

*Wilcoxon testi.

Deney bitiminde 6-MP grubu ile 6-MP/CAP grupları antioksidan enzim düzeyleri açısından karşılaştırıldığında 6-MP grubunda GSH-Px, Katalaz, SOD düzeylerinde düşme MDA düzeylerinde ise yükselme gözlenirken 6-MP yanı sıra C. ovata verilen grupta GSH-Px, Katalaz, SOD düzeylerinde düşme, MDA düzeylerinde ise yükselme gözlenmedi (Tablo 2).

Tablo 2. 6-MP ve 6-MP/CAP gruplarında deney bitiminde hemolizat Glutasyon peroksidaz, Katalaz, Süperoksit dismutaz ve Malondialdehit düzeyleri ve p değerleri*.

Gruplar (n: 38)	6-MP (n: 10)	6-MP/CAP (n: 10)	p
GSH-Px (ü/gr Hb)	1205,1±679,2	5880,9±1754,7	<i>0,000</i>
Katalaz (ü/gr Hb)	151,5±36,0	159,8 ±33,5	<i>0,036</i>
SOD (ü/gr Hb)	1667,7±1257,8	3738,0±1275,6	<i>0,000</i>
MDA (mmol/gr Hb)	5122,4±1530,2	1142,7±367,5	<i>0,000</i>

*Mann-Whitney U

Deney bitiminde karaciğer dokusundan hazırlanan homojenatta 6-MP grubunda GSH-Px, katalaz, SOD değerlerinde düşme gözlenirken, MDA değerlerinde yükselme saptandı. 6-MP/CAP grubunda ise GSH-Px, katalaz, SOD değerlerinde düşme gözlenmedi, MDA değerleri yükselmedi ($p=0.000$) (Tablo 3).

Tablo 3. Grupların deney bitimi karaciğer Glutasyon peroksidaz, Katalaz, Süperoksit dismutaz ve Malondialdehit düzeyleri ve p değerleri*.

Gruplar (n: 38)	6-MP (n: 10)	6-MP/CAP (n: 10)	<i>p</i>
GSH-Px (ü/gr Hb)	3,7±1,6	14,6±7,6	0,000
Katalaz (ü/gr Hb)	0,03±0,03	0,09±0,05	0,000
SOD (ü/gr Hb)	2,3±2,2	12,4±1,4	0,000
MDA (mmol/gr Hb)	25,4±6,0	11,5±4,0	0,000

*Mann-Whitney U

Çalışmamızda deney başlangıcı ve deney bitiminde alınan kanlardan hazırlanan hemolizatlarda 6-MP grubunda AST ve ALT başlangıç değerlerine göre yüksekti. Diğer gruplarda anlamlı değişiklik gözlenmedi (Tablo 4).

Tablo 4. Grupların deney başlangıcı ve bitimi hemolizat AST, ALT düzeyleri ve p değerleri*.

Gruplar (n: 38)	AST (Ü/L)		<i>p</i>	ALT (Ü/L)		<i>p</i>
	Deney başlangıcı (Ort. ± S. Sapma)	Deney bitimi (Ort. ± S. Sapma)		Deney başlangıcı (Ort. ± S. Sapma)	Deney bitimi (Ort. ± S. Sapma)	
SF (n: 8)	121,8 ± 27,7	127,0 ± 24,2	0,106	29,3 ± 12,9	25,1 ± 6,1	1,000
6-MP (n: 10)	146,7 ± 38,6	286,6 ± 39,1	0,005	33,1 ± 10,0	98,9 ± 11,9	0,005
CAP (n: 10)	136,2 ± 34,7	132,5 ± 30,7	0,068	30,4 ± 11,3	29,4 ± 8,1	0,758
6-MP/CAP (n: 10)	154,3 ± 69,2	137,3 ± 47,9	0,092	40,8 ± 15,5	33,7 ± 6,9	0,091

* Wilcoxon testi.

Deney sonunda alınan kanlarda 6-MP grubunda AST, ALT değerleri ortalaması 6-MP/CAP grubu ile karşılaştırıldığında yükselmiş olarak bulundu ($p=0.000$) (Tablo 5).

Tablo 5. Deney bitiminde 6-MP ve 6-MP/CAP. gruplarının AST ve ALT değerleri karşılaştırılması ve p değerleri*

	6-MP grubu (n: 10)	6-MP/CAP grubu (n: 10)	<i>p</i>
AST (U/L)	286,6 ± 39,1	137,3 ± 47,9	<i>0,000</i>
ALT (U/L)	98,9 ± 11,9	33,7 ± 6,9	<i>0,000</i>

*Mann-Whitney U testi.

Çalışmamızda deney başlangıcı ve bitiminde alınan kanlardan çalışılan hemogramda beyaz küre sayısı 6-MP grubunda düşme gösterdi ($p=0.005$). Trombosit düzeyleri de aynı grupta ayrıca 6-MP/CAP grubunda düştü ($p=0.005$). Hemoglobin değerlerinde ise gruplarda deney başlangıcı ve bitiminde fark saptanmadı (Tablo 6).

Deney sonunda 6-MP grubunda lökosit sayısı 6-MP/CAP grubuyla karşılaştırıldığında düşük olarak saptandı ($p=0.000$), aynı gruplar trombosit ve hemoglobin değerleri açısından karşılaştırıldığında fark saptanmadı (Tablo 7).

Tablo 6. Grupların deney başlangıcı ve bitimi hemolizat Lökosit, trombosit, hemogloblin düzeyleri ve p değerleri*.

Gruplar (n: 38)	Lökosit (10 ³ /μL)		p	Trombosit (10 ³ /μL)		p	Hemogloblin (g/dL)		p
	Deney başlangıcı (Ort. ± S. Sapma)	Deney bitimi (Ort. ± S. Sapma)		Deney başlangıcı (Ort. ± S. Sapma)	Deney bitimi (Ort. ± S. Sapma)		Deney başlangıcı (Ort. ± S. Sapma)	Deney bitimi (Ort. ± S. Sapma)	
SF (n: 8)	5,8 ± 1,6	5,5 ± 1,6	0,207	709,5 ± 147,1	695,3 ± 148,6	0,484	12,7 ± 1,7	11,7 ± 2,3	0,674
6-MP (n: 10)	6,6 ± 2,0	2,3 ± 1,3	0,005	775,3 ± 127,0	615,9 ± 130,1	0,005	13,1 ± 1,2	12,3 ± 1,9	0,262
CAP (n: 10)	6,4 ± 2,6	6,2 ± 2,6	0,065	829,9 ± 173,7	812,3 ± 177,5	0,169	12,9 ± 2,2	12,3 ± 2,2	0,475
6-MP/CAP (n: 10)	8,2 ± 2,0	8,1 ± 2,0	0,068	752,1 ± 173,5	708,7 ± 170,1	0,005	14,0 ± 1,8	13,9 ± 1,7	0,329

*:Wilcoxon testi.

Tablo 7. 6-MP ve 6-MP/CAP gruplarının deney bitimi lökosit, trombosit, hemogloblin düzeyleri ve p değerleri*.

	6-MP (n: 10)	6-MP/CAP (n: 10)	p
Lökosit 10 ³ /μL	2,3 ± 1,3	7,8 ± 2,0	0,000
Trombosit 10 ³ /μL	615,9 ± 130,1	708,7 ± 170,1	0,103
Hemogloblin g/dL	12,3 ± 1,9	13,9 ± 1,7	0,134

*Mann-Whitney U testi.

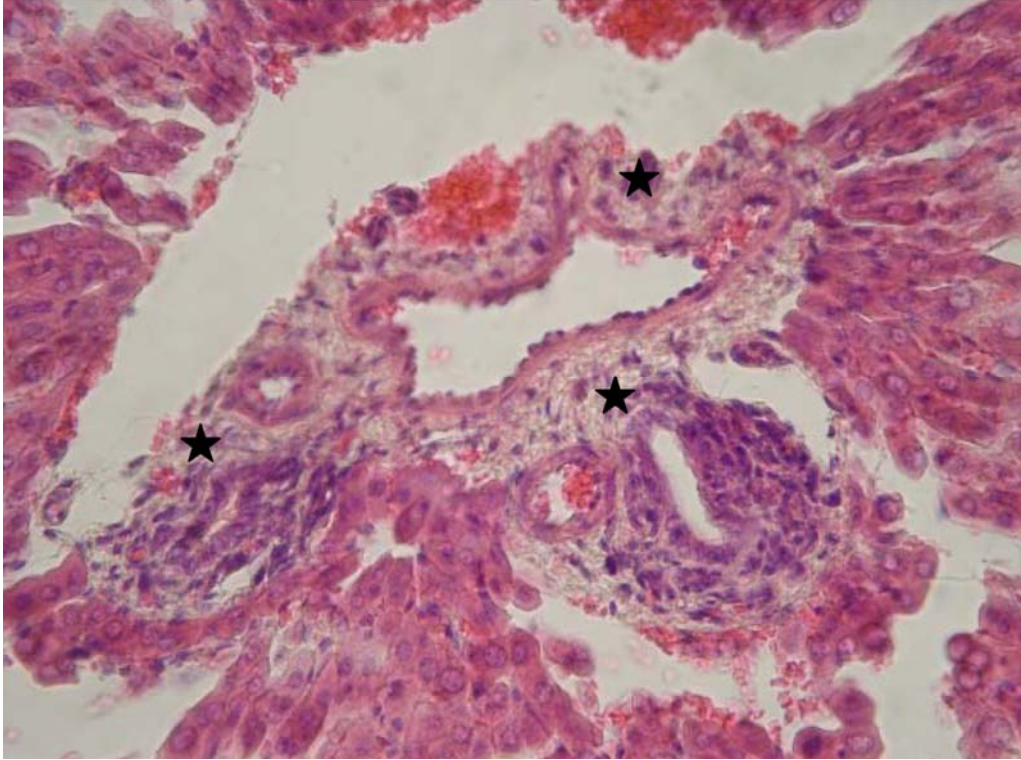
Deney sonunda karaciğer sol loblarının histolojik olarak incelemesi sonucunda 6-MP grubunda enflamasyon belirteci olan bağ doku artışı diğer gruplara

göre yüksek saptanmıştır ($p=0.005$). 6-MP/CAP verilen grupta bu artış gözlenmemiştir (Tablo 8).

Tablo 8. Grupların karaciğer dokusu histolojik inceleme sonucu, bağ doku artışına göre karşılaştırılması.

	KARACİĞER BAĞ DOKU ARTIŞI			p
	<i>Artış Yok</i> (Sayı- %)	<i>Az Artış</i> (Sayı- %)	<i>Yoğun Artış</i> (Sayı- %)	
Kontrol (n: 8)	7- 87,5	1- 12,5	-	0,005
6- MP (n: 10)	1- 10,0	6- 60,0	3- 30,0	
CAP (n: 10)	7- 70,0	3- 30,0	-	
6- MP/CAP (n: 10)	4- 40,0	6- 60,0	-	

*: Ki- kare testi.



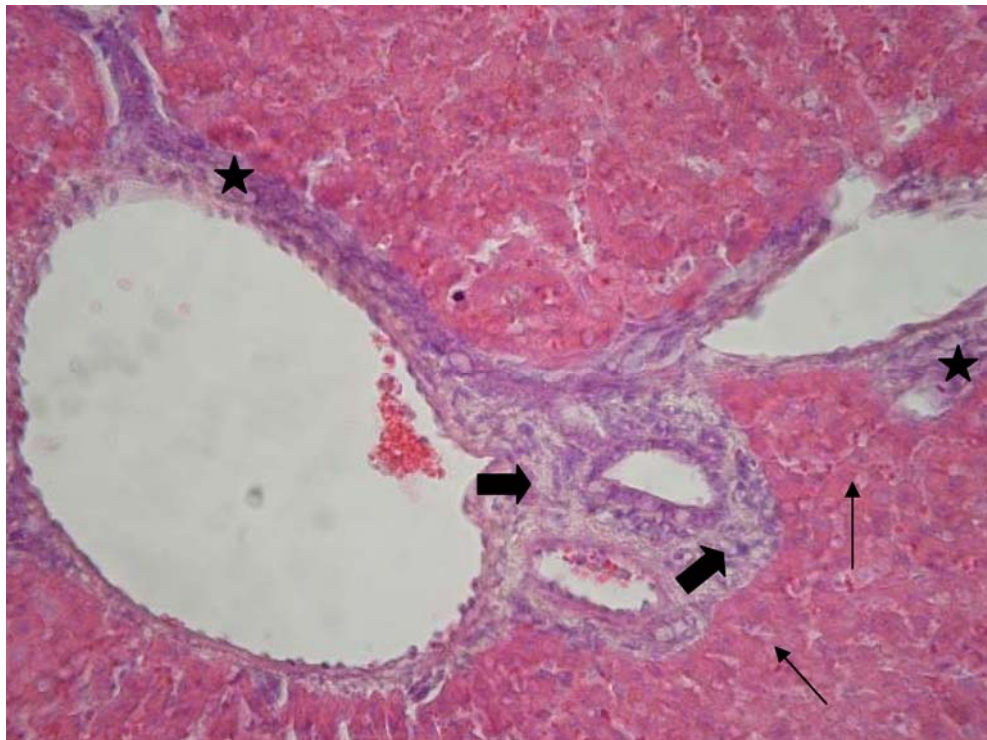
Resim 1. 6- MP grubuna ait bağ doku artışı (yıldız) gözlenen karaciğer kesiti (Boyama Hematoksilen-Eosin, büyütme 40X)

Deney sonunda karaciğer dokusunda enflamasyon derecesinde yoğun artış 6-MP grubunda diğer gruplara göre yüksek saptandı ($p=0.001$). 6-MP/CAP grubunda ise enflamasyonda artış saptanmadı (Tablo 9).

Tablo 9. Grupların karaciğer histolojik dokusu, enflamasyon oranlarına göre karşılaştırılması.

	Karaciğer Dokusu Enflamasyon Derecesi			<i>p</i>
	Artış Yok (Sayı- %)	Az Artış (Sayı- %)	Yoğun Artış (Sayı- %)	
Kontrol Grubu (n: 8)	4 - 50,0	3 - 37,5	1 - 12,5	0,001
6- MP (n: 10)	-	3 - 30,0	7 - 70,0	
CAP (n: 10)	4 - 40,0	6 - 60,0	-	
6- MP/CAP (n: 10)	3 - 30,0	7 - 70,0	-	

*: Ki- kare testi.



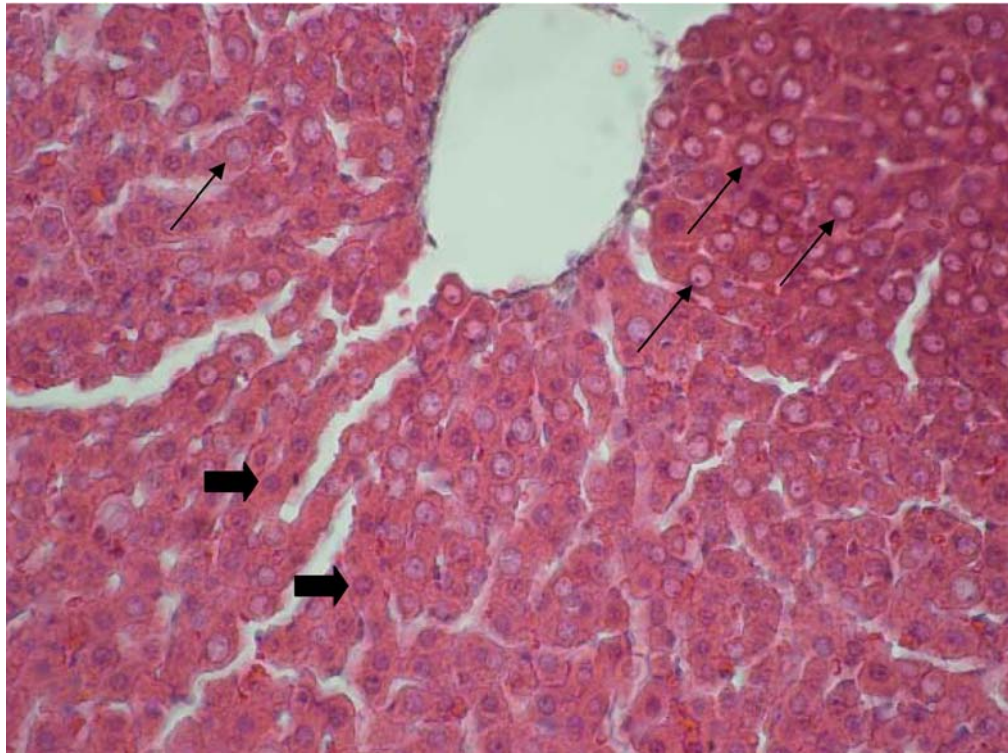
Resim 2. Portal alanda inflamasyon gözlenen 6- MP grubuna ait karaciğer kesiti. Higroskopik çekirdekler ince oklarla, inflamasyon yıldızlar ile bağ doku artışı kalın oklarla gösterilmiştir (Boyama Hematoksilen-Eosin, büyüme 40X).

Nekroz belirteci olan higroskopik çekirdekteki yoğun artış görülme oranı (% 50.0) 6-MP verilen ratlarda karaciğer dokusunda diğer gruplara göre yüksek tespit edildi ($p=0.001$) (Tablo 10).

Tablo 10. Gruplarda karaciğer histolojik dokusu, higroskopik çekirdek oranlarının karşılaştırılması.

	Karaciğer Dokusu Higroskopik Çekirdek Derecesi			<i>p</i> *
	Artış Yok (Sayı- %)	Az Artış (Sayı- %)	Yoğun Artış (Sayı- %)	
Kontrol Grubu (n: 8)	6 - 75,0	-	2 - 25,0	0,001
6- MP (n: 10)	-	5- 50,0	5 - 50,0	
CAP (n: 10)	5 - 50,0	5- 50,0	-	
6- MP/CAP (n: 10)	3 - 30,0	7- 70,0	-	

*: Ki- kare testi.



Resim 3. 6- MP grubuna ait higroskopik çekirdeklerin gözlemlendiği karaciğer kesiti. Higroskopik çekirdekler ince oklarla, normal hepatosit çekirdekleri kalın oklarla gösterilmiştir (Boyama Hematoksilen-Eosin, büyütme 40X).

Çalışmamızda karaciğer dokusunda histolojik olarak hemoraji, granüler dejenerasyon, piknotik çekirdek oranları, nekrotik hücre oranları, safra kanalikülleri proliferasyon derecesi bakımından gruplar arasında fark saptanmadı (Tablo 11-15).

Tablo 11. Gruplarda karaciğer histolojik dokusu, hemoraji oranlarının karşılaştırılması.

	Karaciğer Dokusu Hemoraji Derecesi			<i>p</i> *
	Artış Yok (Sayı- %)	Az Artış (Sayı- %)	Yoğun Artış (Sayı- %)	
Kontrol Grubu (n: 8)	5 - 62,5	1 - 12,5	2 - 25,0	0,110
6- MP (n: 10)	1 - 10,0	8 - 80,0	1 - 10,0	
CAP (n: 10)	5 - 50,0	4 - 40,0	1 - 10,0	
6- MP/CAP (n: 10)	6 - 60,0	3 - 30,0	1 - 10,0	

*: Ki- kare testi.

Tablo 12. Grupların karaciğer histolojik dokusu, granüler dejenerasyon oranlarının karşılaştırılması.

	Karaciğer Dokusu Granüler Dejenerasyon Derecesi			<i>p</i> *
	Artış Yok (Sayı - %)	Az Artış (Sayı - %)	Yoğun Artış (Sayı - %)	
Kontrol Grubu (n: 8)	2 - 25,0	5 - 62,5	1 - 12,5	0,109
6- MP (n: 10)	4 - 40,0	5 - 50,0	1 - 10,0	
CAP (n: 10)	9 - 90,0	1 - 10,0	-	
6- MP/CAP (n: 10)	3 - 30,0	6 - 60,0	1 - 10,0	

*: Ki- kare testi.

Tablo 13. Grupların karaciğer histolojik dokusu, piknotik çekirdek oranlarının karşılaştırılması.

	Karaciğer Dokusu Piknotik Çekirdek Derecesi		<i>p</i> *
	Artış Yok (Sayı- %)	Az Artış (Sayı- %)	
Kontrol Grubu (n: 8)	5 - 62,5	3 - 37,5	0,293
6- MP (n: 10)	3 - 30,0	7 - 70,0	
CAP (n: 10)	6 - 60,0	4 - 40,0	
6- MP/CAP (n: 10)	3 - 30,0	7 - 70,0	

*: Ki- kare testi.

Tablo 14. Grupların, karaciğer histolojik dokusu, nekrotik hücre oranlarının karşılaştırılması.

	Karaciğer Dokusu Nekrotik Hücre Derecesi		p*
	Artış Yok (Sayı - %)	Az Artış (Sayı - %)	
Kontrol Grubu (n: 8)	3 - 37,5	5 - 62,5	0,089
6- MP (n. 10)	8 - 80,0	2 - 20,0	
CAP (n: 10)	9 - 90,0	1 - 10,0	
6- MP/CAP (n: 10)	7 - 70,0	3 - 30,0	

*: Ki- kare testi.

Tablo 15. Grupların, histolojik doku safra kanalı proliferasyonu oranlarının karşılaştırılması.

	Karaciğer Dokusu Safra Kanalı Proliferasyonu Derecesi		p*
	Artış Yok (Sayı- %)	Az Artış (Sayı- %)	
Kontrol Grubu (n: 8)	8 - 100,0	-	0,411
6- MP (n. 10)	10 - 100,0	-	
CAP (n: 10)	10 - 100,0	-	
6- MP/CAP (n: 10)	9 - 90,0	1 - 10,0	

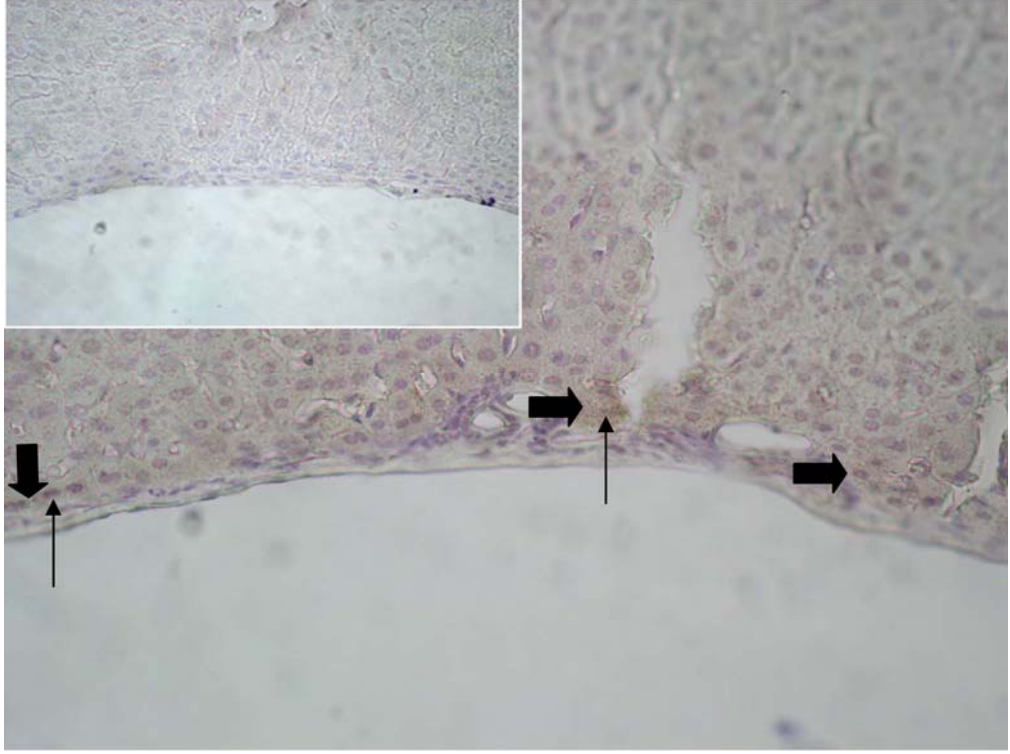
*: Ki- kare testi.

Karaciğer dokusunda aktif Caspase-3 ile belirlenen apoptozis yoğunluğu karşılaştırıldığında, 6-MP verilen grubun apoptozis yoğunluğu diğer tüm gruplara göre yüksek saptandı (p: 0.000) (Tablo 16).

Tablo 16. Grupların immüno-histo-kimya boyanma özelliğine göre, apoptozis yoğunluklarının karşılaştırılması.

	Apoptozis Yoğunluğu (Ortalama ± S. Sapma)	p*
Kontrol Grubu	4,5 ± 0,0	0,000
6- MP	7,5 ± 0,0	
CAP	4,5 ± 0,0	
6- MP/CAP	4,5 ± 0,0	

*: Kruskal- Wallis testi.



Resim 4. 6- MP grubuna ait Aktif Kaspaz-3 antikoruna ile boyanmış immünohistokimyasal kesitler. Küçük resim primer antikor kullanılmamış negatif kontrol. Büyük resimde damar çeperinin hemen altında pozitif boyanmış apoptotik hücreler (kalın oklar) görünmekte.



Resim 5. 6- MP grubuna ait Aktif Kaspaz-3 antikoruna ile boyanmış immünohistokimyasal kesit. Pozitif boyanmış apoptotik hücreler (ince oklar) kahverengi renkte görünüyor (Büyütme 40X).

5. TARTIŞMA

Son yıllarda çocukluk çağı kanserlerinde kullanılan çoklu ilaç uygulamaları tedavideki başarı şansını arttırmış ve bu oran özellikle akut lösemilerde % 95'lere dek yükselmiştir. Bazı ALL ve lenfoma türlerinin güncel tedavisinde asal bir ilaç olarak yer alan 6-MP'nin, kemoterapi protokolleri gereğince bir yılı aşkın sürelerde kullanılması gerekmektedir. İlacın bu şekilde uzun süreli kullanımında yan etki olarak karaciğer hasarlanması ve kemik iliği baskılanması çoğu kez kaçınılmaz olup, bu durum karşısında başvurulmuş çözüm ise genellikle ilacın kesilmesinden ibaret olmaktadır. Ancak kemoterapideki bu tür kesintiler tedavi şansını ve başarısını düşürerek, primer malignitenin nüks etme riskini ortaya çıkarmaktadır. Anti-kanser protokollerde tedaviyi kesintisiz bir şekilde sürdürmek hayati açıdan önem arz ettiğinden, ilaç yan etkilerini en aza indirerek tedavinin aralıksız sürdürülmesini sağlayacak yöntem ve uygulamalara gereksinim duyulmaktadır. Literatüre girmiş çoğu çalışmada deneysel karaciğer hasarını önlemek ya da iyileştirmek için bir çok maddenin (ilaç, bitki, kimyasallar) kullanıldığı görülmektedir. *Capparis ovata*'nın doku hasarını önleyici etkisinin yanında, antitümör, antibakteriyel, antifungal, antiviral ve antiparaziter etkinliğinin olduğu da vurgulanmaktadır (107,111-113). Bitkinin bu özelliklerinden yola çıkarak, gelecek dönemlerde kanser kemoterapisi gören hastaların yandaş tedavisinde kullanılması da olası görünmektedir. Biz de aynı amaçla, deneysel karaciğer hasarı oluşturmak için 6-MP'yi kullandık ve ilacın hepatotoksik etkilerini önlemek için de *C. ovata* bitkisini tercih ettik.

Klinik uygulamalarda ağız yoluyla kullanılan 6-MP pürin analogu bir ilaç olup, pürin sentezini inhibe ederek etki göstermektedir. Bu esnada karaciğerde ksantin oksidaz ile inaktif formu olan 6-tiyourikasite dönüşürken reaktif oksijen türevleri meydana gelir ve oluşan ROT'larla hepatosit hücre membranının lipid peroksidasyonu gerçekleşir. Mitokondriyal ATP sentezinin inhibe olmasıyla da mitokondri membranının geçirgenliği artar ve sonuç olarak apoptozis ve hücre nekrozu indüklenmiş olur (56). Böylece hasarlanan karaciğer dokusu biyokimyasal olarak transaminaz yüksekliği şeklinde bulgu verir (132). Bu nedenle hepatoprotektif madde araştırmasının yapıldığı bir çok çalışmada, transaminaz değerlerindeki yükselmeler hasar göstergesi olarak kabul edilmektedir. Kiso ve ark. galaktozamin

uygulamasından 24 saat sonra rat hepatositlerindeki ALT yükselmesini hasarlanma olarak göstermiş, antioksidan olarak *deokspodofilotoksin*, *silybin*, *glikirretinikasit* verilen gruplarda ise bu yükselmenin olmadığını, dolayısıyla bu maddelerin hepatoprotektif olduğunu göstermişlerdir (16).

Hong ve ark. ratlarda *karbontetraklorür* (CCl₄) ile oluşturdukları hepatotoksisteyi transaminaz yükselmesiyle göstermiş, koruyucu olarak kullandıkları *ENA*'nın (rafine edilmiş mürekkep balığı kemiği ve iki farklı deniz yosunundan hazırlanmış alkali su bileşimi) enzim yükselmesini önlediğini ve hepatoprotektif olduğunu ileri sürmüşlerdir. Haleagrehara ve ark. da asetat ile oluşturulan hepatotoksisteye karşı *etlingera elatior* bitkisini kullanarak transaminaz yükselmesini önlemiş ve bu ajanların koruyucu olduğunu vurgulamışlardır (133,134). Sun ve ark. 6-MP ve MTX uyguladıkları ratlara, birlikte *aktif hegsoz* bileşimi vermişler ve deney sonunda ALT, AST düzeylerinde ve histolojik olarak karaciğer hasarlanmasında gerileme saptamışlardır (135). Amin ve ark. ratlara bir tiyopürin analogu olan azotiyopürin uygulamadan önce antioksidan özellikleri bilinen bitki ekstraktlarından (*Hibiscus sabdariffa*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*) vererek transaminaz düzeylerinde yükselme olmadığını göstermiş, bu bitkilerin hepatoprotektif olduğunu belirtmişlerdir (136). Ancak bu çalışmalarda, karaciğer hasarlanmasını önlemek amacıyla kullanılan tüm bitkisel maddelerin gereç ve yöntem zorlukları olduğu gibi kullanımları da pratik değildir. *Capparis ovata* ise, tomurcuk ve çiçeklerinden hazırlanmış içime hazır demlik poşetleri bulunduğundan, taşınabilirlik ve hazırlama kolaylığı gibi tercih sebepleriyle öne çıkmaktadır.

Klinik uygulamalarda 6-MP kullanan lösemi hastalarında karaciğer toksisitesi geliştiğini vurgulayan pek çok çalışma mevcuttur (56,59,61). Bunun dışında enflamatuvar bağırsak hastalığı (EBH) nedeniyle 6-MP tedavisi gören hastalarda da çalışmalar yapılmıştır. Enflamatuvar bağırsak hastalığı olup 6-MP kullanan erişkin hastalarda % 3.5-4.5 oranında hepatit geliştiği, AST ve ALT düzeylerinde 3-4 kat artış olduğu bildirilmiştir (137,138). Yine EBH nedeniyle 6-MP kullanan 786 erişkin hastada yapılmış retrospektif bir çalışmada ALT, AST yüksekliği gözlenmiş, bu yükseklik dozun düşürülmesiyle spontan olarak düzelmiş, ancak olguların % 3-4'ünde kalıcı yükseklik saptanmıştır (139). Biz çalışmamızda, önceden yapılmış

deneysel araştırmalardaki doz uyumunu da göz önünde bulundurarak, 6-MP'yi günde 5 mg. olacak şekilde ve gavaj yoluyla uyguladık (140-143).

Böylece kullandığımız 6-MP dozunun deneysel hepatotoksisite oluşturmadaki uygunluğunu ve bunun literatürle de uyumlu olduğunu göstermiş olduk.

Capparis türlerinin antioksidan ve karaciğer koruyucu etkileri önceden yapılmış bazı çalışmalarda gösterilmiştir (93,95,114-117,119,129), immün-stimülan etkinliği de vurgulanmıştır (119,124). Capparis türü bitkiler tarih boyunca analjezik ve antiinflamatuvar özellikleri nedeniyle kullanılmış olup, son zamanlarda antioksidan ajan arayışlarıyla deneysel çalışmalarda yer almaya başlamıştır. Fakat literatürde tiyopürin toksisitesine karşı Capparis türlerinin koruyuculuğunu irdeleyen az sayıda çalışma bulunduğundan, araştırmamız ayrıca önem kazanmaktadır. Bu çalışmada capparis'in karaciğer hasarını önleyici etkisini gösterebilmek amacıyla, Türkiye'de özellikle Akdeniz ve Ege bölgesinde yabani olarak yetişen *Capparis ovata* isimli türünü kullandık. Deney sonunda 6-MP grubunda gözlenen AST, ALT yüksekliğinin 6-MP/CAP grubunda olmadığını gözlemledik. Çalışmamızda 6-Merkaptopürin grubunda deney başlangıcında sırasıyla 146.7±38.6 ve 33.1±10.0 olan AST, ALT değerleri, deney sonunda 286.6±39.1 ve 98.9±11.9 olarak yükselmişti. 6-MP/CAP grubunda ise deney başlangıcında sırasıyla 154.3±69.2 ve 40.8±15.5 olan AST, ALT değerleri deney sonunda 137.3±47.9 ve 33.7±6.9 olarak bulundu. Bu sonuçlarımız *C. ovata*'nın 6-MP'nin toksik etkilerine karşı, karaciğer hasarlanmasını önlediğini gösteriyordu.

6-Merkaptopürin'in hepatositlerde redükte glutasyon, katalaz, GSH-Px ve hepatic TAK'ta düşmeye, bunların yanı sıra okside glutasyon ve MDA düzeylerinde ise yükselmeye neden olduğu pek çok çalışmada bildirilmiştir (56-59,65,144). Petit ve ark. insan ve rat hepatosit kültürü kullanarak yaptıkları çalışmada, 6-MP uygulandıktan 24 saat sonra karaciğer dokusunda SOD, GSH-Px, GSH ve ATP düzeylerinin azaldığını göstermiştir (140). Amin ve ark. ratlarda azotiyopürin ile oluşturdukları AST, ALT, MDA yükselmesini antioksidan özellikleri bilinen bitki ekstraktları kullanarak (*Hibiscus sabdariffa*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*) önlemişlerdir. Aynı çalışmada SOD, katalaz, GSH-Px ve glutasyon seviyelerinde yükselme sağlayarak, bu bitkilerin hepatoprotektif olduğunu

savunmuşlardır (136). Çalışmamızda, ratların deney öncesi ve sonrası alınan kan örneklerinde 6-MP grubunda antioksidan enzim düzeylerinde (SOD, GSH-Px, katalaz) düşme, lipid peroksidasyon ürünü olan MDA düzeylerinde ise yükselme gözlemlendi. Nitekim 6-MP grubunda deney başlangıcında sırasıyla 3356.3 ± 839.5 , 5604.7 ± 2257.7 ve 180.9 ± 25.1 olan SOD, GSH-Px, katalaz değerleri, deney sonunda 1667.7 ± 1257.8 , 1205.1 ± 679.2 ve 151.5 ± 36.0 olarak düşmüştü. MDA düzeyleri ise başlangıçta 2894.9 ± 1515.5 iken deney bitiminde 5122.4 ± 1530.2 idi. Buna karşın 6-MP/CAP grubunda GSH-Px, katalaz, SOD düzeylerinde düşme olmadı ve MDA düzeyinde yükselme gözlenmedi. Aksine bu grupta GSH-Px ve SOD düzeyleri başlangıç değerlerine göre yükselirken, MDA başlangıç değerine göre düştü. Ayrıca CAP grubunun deney sonu GSH-Px, SOD, katalaz düzeyinde deney başlangıcına göre yükselme, MDA düzeylerinde ise düşme saptandı. Bu bulguların ışığında *C. ovata*'nın antioksidan enzim düzeylerinde yükselme yaparak lipid peroksidasyonunu önlediği ve böylece karaciğer hasarlanmasının önüne geçtiği gösterilmiş oldu.

Daha önceki çalışmalarda gösterildiği gibi tiyopürin türevleri karaciğer hepatositlerinde antioksidan enzim seviyeleri ve ATP'de düşme, MDA, okside glutasyon, TNF-alfa ve caspase-3 seviyesinde ise artışa neden olmaktadır. Bu etkilerle de hepatik sinüzoidlerde dilatasyon, enflamatuvar hücre infiltrasyonu, hemoraji, nekroz, peliosis hepatis, venookluziv hastalık ve nodüler rejeneratif nekroza yol açabilmektedir (56-59,65,144). El Beshbishy ve ark. azotiyopürin verilen ratların karaciğer hücrelerinde oluşan apoptozis ve oksidan stresin yeşilçay ile engellendiğini bildirmişlerdir (58). Habnen ve ark. ALL nedeniyle 6-MP tedavisi gören 16 çocuğa tedavi bitiminde perkütan karaciğer biyopsisi yaparak, 6-MP'nin karaciğer dokusunda fibrozis ve yağlı değişikliklere yol açtığını histopatolojik olarak saptamışlardır (145). Aynı çalışmada eritrositlerde 6-MP düzeyine de bakarak, karaciğer hasarı ile eritrositlerde biriken ilaç düzeyi arasında ilişki olmadığını göstermişlerdir. Sun ve ark. ratlara 6-MP ve MTX ile birlikte *aktif hegsoz* bileşimi vererek, karaciğer hasarlanma yüzdesinde anlamlı gerileme olduğunu histolojik düzeyde saptamış ve aktif hegsoz bileşiminin hepatoprotektif olduğunu savunmuşlardır (135).

Bizim çalışmamızda karaciğer dokusundan hazırladığımız homojenatta antioksidan enzimlerle MDA düzeylerine bakıldı ve 6-MP grubunda diğer gruplara

göre SOD, GSH-Px, katalaz düzeylerinde düşme, MDA düzeylerinde ise yükselme olduğu gösterildi. 6-MP grubunda deney bitiminde sırasıyla 2.3 ± 2.2 , 3.7 ± 1.6 ve 0.03 ± 0.03 olan SOD, GSH-Px, katalaz değerleri, 6-MP/CAP grubunda 12.4 ± 1.4 , 14.6 ± 7.6 ve 0.09 ± 0.05 olarak bulundu. MDA düzeyleri ise 6-MP grubunda 25.4 ± 6.0 iken, 6-MP/CAP grubunda 11.5 ± 4.0 idi. Bu sonuçlar doğrultusunda 6-MP'nin antioksidan enzim defansını bozarak, karaciğer hücreleri üzerine toksik etki gösterdiğini düşündük. Aynı şekilde oluşan reaktif oksijen türevlerinin yaptığı lipid peroksidasyonu sonucunda da MDA düzeyinde yükselme olduğunu belirledik. Buna karşın 6-MP/CAP grubunda antioksidan enzim (SOD, CAT, GSH-Px) düzeylerinde azalma olmadığını gördük. Böylece *C. ovata*'nın antioksidan etki oluşturarak karaciğer dokusunu reaktif oksijen türevlerine karşı korumada etkin olduğunu göstermiş olduk.

Karaciğer dokusunun histolojik incelemesinde, 6-MP verilen grupta enflamasyon, bağdoku artışı, nekroz belirteci olan higroskopik çekirdek oranında artış saptadık. Doku hasarının tipik göstergeleri olan bu bulgulara 6-MP/CAP grubunda daha az yoğunlukta rastladık. Bu sonuçlarla *C. ovata*'nın karaciğer dokusunda enflamasyonu ve nekroz oluşumunu azalttığını gördük. Ayrıca apoptozisi değerlendirmek için yaptığımız caspase-3 ile boyama sonucunda 6-MP grubunda anlamlı olarak yoğun boyanma, 6-MP/CAP grubunda ise düşük düzeyde boyanma saptadık ve *C. ovata*'nın karaciğer hücrelerini apoptozise karşı da koruduğunu gösterdik.

Tiyopürinlerin kemik iliği üzerinde yaptıkları miyelotoksisite, ilacın metil türevleri tarafından oluşturulmaktadır. 6-Merkaptopürin'e bağlı gelişen başlıca hematolojik yan etkiler nötropeni, anemi ve trombositopeni olarak bilinmekle beraber, klinikte en sık görülen yan etki lökopenidir (146,147). 2010 yılında Çin'de ALL tedavisi gören 133 çocuk üzerinde yapılmış bir çalışmada, olguların % 46'sında ciddi granülositopeni görülmüştür (61). Kim ve ark. enflamatuvar bağırsak hastalığı nedeniyle 6-MP tedavisi almış çocuk hastalar üzerinde yaptıkları retrospektif çalışmada, tiyopürin S-metil transferaz (TPMT) enzim aktivitesinin yokluğunun lökopeni riskini arttırdığını, Higgs ve ark. da TPMT enzim aktivitesinin orta dereceli oluşunun kemik iliği depresyonu ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir (62,63). Biz bu çalışmada deney başlangıcı ve bitiminde ratlardan hemogram alarak, 6-MP'nin

kemik iliği üzerindeki toksik etkilerini de değerlendirdik. Araştırmamızın sonunda 6-MP grubunda deney başlangıcında sırasıyla $6.6 \pm 2.0 \times 10^3/\mu\text{L}$ ve $775.3 \pm 127.0 \times 10^3/\mu\text{L}$ olan lökosit ve trombosit sayılarının, deney sonunda $2.3 \pm 1.3 \times 10^3/\mu\text{L}$ ve $615.9 \pm 130.1 \times 10^3/\mu\text{L}$ değerlerine düştüğünü gördük. Buna karşın 6-MP/CAP grubunda ise deney başlangıcında sırasıyla $8.2 \pm 2.0 \times 10^3/\mu\text{L}$ ve $752.1 \pm 173.5 \times 10^3/\mu\text{L}$ olan lökosit ve trombosit sayıları, deney sonunda $8.1 \pm 2.0 \times 10^3/\mu\text{L}$ ve $708.7 \pm 170.1 \times 10^3/\mu\text{L}$ değerlerinde bulundu. Sonuçta, literatüre benzer şekilde 6-MP verilen grupta lökopeni ve trombosit sayısında anlamlı düşme geliştiğini, 6-MP/CAP grubunda lökosit sayısının düşmediğini, ancak trombosit sayısındaki düşüklüğün devam ettiğini gözlemledik. Bu bulguya dayanarak *C. ovata*'nın, 6-MP'nin oluşturduğu lökopeniyi önlediğini, trombosit sayısındaki azalmaya karşı ise etkili olmadığını tespit ettik.

Günümüzde çocukluk çağı kanserlerinin tedavisinde modern kemoterapi yöntemleri başarıyla uygulanmaktadır. Özellikle akut lösemilerde ve bazı lenfoma tiplerinde başarı oranları oldukça yüksek olup, güncel tedavilerin alternatifsiz olduğu görülmektedir. Bu açıdan bakıldığında kemoterapi protokollerinde güncelleme ve/veya değişikliğe gidilmesinden çok, mevcut ilaçların yan etkilerini azaltarak tedavilerin kesintisiz sürdürülmesi hedeflenmektedir.

Genel olarak klinik uygulamalarda ilaca bağlı karaciğer hasarı geliştiğinde en sık başvurulan yol ilacın kesilmesinden ibaret olup, bu yöntem kanser tedavisinde nüks gibi çok olumsuz bir tablo ile sonuçlanabilmektedir. Diğer yandan ilaç yan etkilerini azaltma ve önlemede kullanılacak metotların da organizmaya hasar vermeden bu işlevi yerine getirmesi çok önemlidir. Çalışmamızın sonuçlarına bakıldığında *C. ovata*'nın bu konuda iyi bir seğenek olduğu ortaya çıkmaktadır. Gerek kanser tedavisinde, gerekse farklı bir endikasyonla 6-MP verilen hastalarda ilaç yan etkilerini önleyerek tedavinin aralıksız sürdürülebilmesi için Kaparinin pratik uygulamalarda yer alması düşünülebilir. Sonuç olarak *C. ovata*'nın 6-MP'ye bağlı gelişen karaciğer hasarını önlemede etkin olduğunu gösteren çalışmamız, bu konuda yapılan ilk deneysel araştırma olduğundan literatüre yapacağı katkı da oldukça önemlidir.

ÖZET

6-Merkaptopürin ile Oluşturulan Deneysel Hepatotoksisite ve Oksidatif Stres Üzerine *Capparis Ovata*'nın Koruyucu Etkilerinin Araştırılması

6-merkaptopürin, ribonükleotide dönüştürülerek pürin sentezini inhibe eden oral pürin analogudur. Çocukluk çağında kanser kemoterapisi ve immünsüpresif tedavi amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Klinik kullanımını kısıtlayan en önemli yan etkisi hepatotoksisite ve kemik iliği depresyonudur. Bu çalışmada 6-MP'nin karaciğer dokusunda oluşturduğu toksisiteye karşı antioksidan bir bitki olan *Capparis ovata*'nın koruyucu etkileri araştırıldı. Ratlar "kontrol" (n:8), "6-MP" (n:10), "CAP" (n:10) ve "6-MP/CAP" (n:10) grupları olmak üzere dört gruba ayrıldı. Ondört gün boyunca kontrol grubuna serum fizyolojik, 6-MP grubuna sadece 6-MP, CAP grubuna sadece *C. ovata*, 6-MP/CAP grubuna ise 6-MP ve *C. ovata* birlikte uygulandı. Deney 15. günde sonlandırılarak kanda biyokimyasal, karaciğer dokusunda biyokimyasal ve histopatolojik analizler yapıldı.

Deney sonunda doku ve kan örneklerinde 6-MP grubunda SOD, GSH-Px, katalaz düzeyleri düşük, MDA ise yüksek olarak saptandı ($p<0.005$). 6-MP/CAP grubunda ise antioksidan enzimlerde düşme, MDA değerinde ise yükselme saptanmadı ($p<0.005$). Aynı şekilde 6-MP grubunda transaminaz yüksekliği gelişirken, 6-MP/CAP grubunda yükselme saptanmadı ($p<0,05$). Hemogramda ise 6-MP grubunda beyaz küre ve trombosit sayıları düşerken, 6-MP/CAP grubunda beyaz kürede düşüklük saptanmadı ($p<0.005$). Bu bulgular 6-MP'nin lipid peroksidasyonu ve serbest oksijen radikallerinin sentezini artırıp, antioksidan enzim etkinliğini azaltarak hepatotoksisite ve kemik iliği depresyonuna yol açtığını, *Capparis ovata*'nın histopatolojik ve biyokimyasal düzeyde hepatotoksisiteyi önlediğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Capparis ovata*, ilacın indüklediği hepatotoksisite, 6-merkaptopürin

ABSTRACT

Protective effects of *Capparis ovata* on experimental 6-mercaptopurine hepatotoxicity and oxidative stress in rats.

6-Mercaptopurine (6-MP) is an oral purin analogue which inhibits the purine synthesis via being converted to ribonucleotide. 6-MP is being widely used in cancer chemotherapy and immunosuppressive therapy. The major side effects which limit the clinical practice of 6-MP are hepatotoxicity and bone marrow suppression. In this study, the protective effect of *Capparis ovata* (CAP) which is an antioxidant plant, against to the hepatotoxicity of 6-MP is investigated. The experiment animals (rats) were divided to 4 groups as “control” (n=8), 6-MP (n=10), *C. ovata* (n=10) and 6-MP/CAP respectively. Serum physiologic was given to the control group, while 6-MP group received only 6-MP; *C. ovata* group received only *C. ovata* and the 6-MP-*C. ovata* group received both *C. ovata* and 6-MP during the study period of 14 days. On the fifteenth day, biochemical tests in blood besides the histopathological and biochemical analyses in liver tissue were performed after the study was terminated.

SOD, GSH-Px, catalase levels were low and MDA was high in blood and tissue samples of 6-MP group at the end of the study ($p<0.05$). There were neither any decrease in antioxidant enzyme levels nor any increase in MDA levels in 6-MP/CAP group ($p<0.05$). Transaminase levels were high, thrombocyte and leukocyte levels were low in 6-MP group, despite normal transaminase levels and normal leukocyte levels which was observed in 6-MP/*C. ovata* group ($p<0.05$). These findings reveal that *C. ovata* prevents the biochemical and histopathological hepatotoxicity and bone marrow suppression which was induced by 6-MP via increasing the lipid peroxidation, synthesis of free oxygen species and decreasing the antioxidant enzyme activity.

Key Words: *Capparis ovata*, drug-induced hepatotoxicity, 6-mercaptopurine

KAYNAKLAR

1. Fontana RJ. Acute liver failure due to drugs. *Semin Liver Dis.* 2008;28:175-87.
2. Germano MP. Evaluation of extracts and isolated fraction from *Capparis spinosa* L. buds as an antioxidant source. *J Agric Food Chem.* 2002;50:1168-71.
3. Chalasani N. Causes, clinical features, and outcomes from a prospective study of drug-induced liver injury in the United States. *Gastroenterology.* 2008;1924-34.
4. Batt AM, Ferrari L. Manifestations of chemically induced liver damage. *Clin Chem.* 1995;41:1882-7.
5. Bass NM. Drug-Induced Liver Disease. In: Friedman S, McQuaid K, Grendell, eds. *Current Diagnosis and Treatment in Gastroenterology.* 2nd ed. New York, NY: McGraw-Hill Professional. 2003;p.:664-79.
6. Watkins PB, Seeff LB. Drug-induced liver injury: summary of a single topic clinical research conference. *Hepatology.* 2006;43:618-31.
7. Sgro C, Clinard F, Ouazir K, Chanay H, Allard C, Guilleminet C, et al. Incidence of drug-induced hepatic injuries: a French population-based study. *Hepatology.* 2002;36:451-5.
8. Lee WM. Acute liver failure in the United States. *Semin Liver Dis.* 2003;23:217-26.
9. Dienstag JL, Isselbacher KJ. Toxic and Drug-Induced Hepatitis. In: Kasper DL, Braunwald E, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson JL, eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine.* New York, NY: McGraw-Hill Professional; 2003;p.:296.
10. Lee WM. Drug-induced hepatotoxicity. *N Engl J Med.* 2003;349:474-85.
11. Ishak KG. Drug-induced liver injury pathology. In: clinical and pathological correlations in liver disease. *American Association for the Study of Liver Disease Post Graduate Course.* 1998:236.
12. Bolton JS, Bowen JC. Biliary sclerosis associated with hepatic artery infusion of floxuridine. *Surgery.* 1986;99:119-22.
13. Uetrecht J. Idiosyncratic drug reactions: past, present, and future. *Chem Res Toxicol.* 2008;21:84-92.
14. Bernal W, Donaldson N, Wyncoll D, Wendon J. Blood lactate as an early predictor of outcome in paracetamol-induced acute liver failure: a cohort study. *Lancet.* 2002;359:558-63.
15. Senior JR. What is idiosyncratic hepatotoxicity? What is not? *Hepatology.* 2008;47:1813-5.
16. Kiso Y, Tohkin M, Hikino H. Assay Method For Antihepatotoxic Activity Using Galactosamine-Induced Cytotoxicity In Primary-Cultured Hepatocytes. *Journal of Natural Products.* 1983;46:841-7.
17. Bjornsson E, Kalaitzakis E, Olsson R. The impact of eosinophilia and hepatic necrosis on prognosis in patients with drug-induced liver injury. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007;25:1411-21.
18. Andrade RJ, Lucena MI, Fernandez MC. Drug induced liver injury: an analysis of 461 incidences submitted to the Spanish registry over a 10-year period. *Gastroenterology.* 2005;129:512-21.

19. De Valle MB, Klinteberg VA, Alem N. Drug induced liver injury in a Swedish University Hospital out-patient hepatology clinic. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006; 24:1187-95.
20. Lee WM. Impact of drug induced liver toxicity on hepatology and practice of medicine. US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. 2001;155-164.
21. Wrighton SA, Stevens JC. The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism. *Crit Rev Toxicol.* 1992;22:1-21.
22. Hunt CM, Westerkam WR, Stave GM. Effect of age and gender on the activity of human hepatic CYP3A. *Biochem Pharmacol.* 1992;44:275-83.
23. Hunt CM, Westerkam WR, Stave GM, Wilson JA. Hepatic cytochrome P-4503A (CYP3A) activity in the elderly. *Mech Ageing Dev.* 1992;64:189-99.
24. Batt AM, Ferrari L. Manifestations of chemically induced liver damage. *Clin Chem.* 1995;41:1882-7.
25. Monteith DK, Emmerling MR, Garvin J, Theiss JC. Cytotoxicity study of tacrine, structurally and pharmacologically related compounds using rat hepatocytes. *Drug Chem Toxicol.* 1996;19:71-84.
26. Chalasani N. Statins and hepatotoxicity: focus on patients with fatty liver. *Hepatology.* 2005;41:690-5.
27. Danan G, Benichou C. Causality assessment of adverse reactions to drugs - I. A novel method based on the conclusions of international consensus meeting. *J Clin Epidemiol* 1993;46:1323-30.
28. Mehendale HM. Role of tissue repair in liver injury. In: Kaplowitz N, Delves L, eds. *Drug induced liver injury.* 2nd ed. Philadelphia, PA: Informa Health Care. 2007;p.:1924-34.
29. Ostapowicz G, Fontana RJ, Schiodt FV, Larson A, Davern TJ, Han SH, et al. Acute Liver Failure Study Group. Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Ann Intern Med.* 2002;137:947-54.
30. Poucell S, Ireton J, Mayoral VP, Downar E, Larratt L, Patterson J, et al. Amiodarone-associated phospholipidosis and fibrosis of the liver. Light, immunohistochemical, and electron microscopic studies. *Gastroenterology.* 1984; 86:926-36.
31. Lee WM. Drug-induced hepatotoxicity. *N Engl J Med.* 1995;333:1118-27.
32. Chang CC, Petrelli M, Tomashefski JF, McCullough AJ. Severe intrahepatic cholestasis caused by amiodarone toxicity after withdrawal of the drug: a case report and review of the literature. *Arch Pathol Lab Med.* 1999;123:251-6.
33. Sherlock S, Dooley J. *Drugs and the Liver.* In: *Diseases of the Liver and Biliary System.* 11th ed. Oxford, England: Blackwell Science. 2002;5:335-64.
34. McDonald GB, Hinds MS, Fisher LD. Veno-occlusive disease of the liver and multiorgan failure after bone marrow transplantation: a cohort study of 355 patients. *Ann Intern Med.* 1993;118:255-67.
35. Ludwig J, Kim CH, Wiesner RH, Krom RA. Floxuridine-induced sclerosing cholangitis: and ischemic cholangiopathy? *Hepatology.* 1989;9:215-8.
36. Gordon DW, Rosenthal G, Hart J, Sirota R, Baker AL. Chaparral ingestion. The broadening spectrum of liver injury caused by herbal medications. *JAMA.* 1995;273:489-90.

37. Valla D, Le MG, Poynard T, Zucman N, Rueff B, Benhamou JP. Risk of hepatic vein thrombosis in relation to recent use of oral contraceptives. A case-control study. *Gastroenterology*. 1986;90:807-11.
38. Zafrani ES, von Pinaudeau Y, Dhumeaux D. Drug-induced vascular lesions of the liver. *Arch Intern Med*. 1983;143:495-502.
39. Edmondson HA, Henderson B, Benton B. Liver-cell adenomas associated with use of oral contraceptives. *N Engl J Med* 1976;294:470-2.
40. Bernal W, Donaldson N, Wyncoll D, Wendon J. Blood lactate as an early predictor of outcome in paracetamol-induced acute liver failure: a cohort study. *Lancet* 2002;359:558-63.
41. Bass NM. Drug-Induced Liver Disease. In: Friedman S, McQuaid K, Grendell, eds. *Current Diagnosis and Treatment in Gastroenterology*. 2nd ed. New York, NY: McGraw-Hill Professional. 2003:664-79.
42. Bjornsson E, Olsson R. Outcome and prognostic markers in severe drug-induced liver disease. *Hepatology*. 2005;42:481-9.
43. Farrell GC. Drug-induced hepatic injury. *J Gastroenterol Hepatol* 1997;12:242-50.
44. Panagiotidis G, Bertilsson L, Kaloe W, Meyer UA, Tyndale RF. Pharmacogenetics of drug metabolism: two clinically important polymorphic enzymes, CYP2D6 and TPMT.. Executive Editor Swarbrick J. *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*. 2nd Ed., New York & London: Taylor & Francis Group, 2005;p.:51-69.
45. Meyer UA, Flockhart DA, Kaloe W, Meyer UA, Tyndale RF. Clinical perspectives.. Executive Editor Swarbrick J. *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*. 2nd Ed., New York & London: Taylor & Francis Group, 2005;p.:247-63.
46. Hall AG, Hamilton P, Minto L, Coulthard SA. The use of denaturing high-pressure liquid chromatography for the detection of mutations in thiopurine methyltransferase. *J Biochem Biophys Methods*. 2001;47:65-71.
47. McLoad HL, Eby C and Gage B. Hematological Pharmacogenetics. Hall IP and Pirmohamed M. *Pharmacogenetics*. New York: Taylor & Francis Group, 2006;111-28.
48. Rajapakse RO, Korelitz BI, Zlatanic J, Baiocco PJ, Gleim GW. Outcome of pregnancies when fathers are treated with 6-mercaptopurine for inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2000;95:684-8.
49. Brundage D. Cancer chemotherapy and treatment. Chisholm-Burns MA, Wells BG, Schwinghammer TL, Malone PM, Kolesar JM, Rotschafer JC, Dipiro JT. *Pharmacotherapy Principles & Practice*. USA: McGraw-Hill Companies, Inc. 2008;p.:1277-302.
50. Innocenti F, Danesi R, Di Paolo A, Loru B, Favre C, Nardi M, et al. Clinical and experimental pharmacokinetic interaction between 6-mercaptopurine and methotrexate. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1996;37:409-14.
51. Deguchi Y, Yokoyama Y, Sakamoto T, Hayashi H, Naito T, Yamada S, et al. Brain distribution of 6-mercaptopurine is regulated by the efflux transport system in the blood-brain barrier. *Life Sci*. 2000;66:649-62.
52. Richard M. Weinshilboum and Susan L. Sladek Mercaptopurine pharmacogenetics: Monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity *Am J Hum Genet*. 1980;32:651-662.

53. Ganiere-Monteil C, Medard Y, Lejus C. Phenotype and genotype for thiopurine methyltransferase activity in the French Caucasian population: impact of age. *Eur J Clin Pharmacol.* 2004;60:89-96.
54. Sahasranaman S, Howard D, Roy S. Clinical pharmacology and pharmacogenetics of thiopurines. *Eur J Clin Pharmacol.* 2008;64:753-67.
55. Giverhaug T, Loennechen T, Aarbakkes L. The interaction of 6-mercaptopurine (6-MP) and methotrexate (MTX) *General Pharmacology.* 1999;33:341-6.
56. Lee AU, Farrell GC. Mechanism of azathioprine-induced injury to hepatocytes: roles of glutathione depletion and mitochondrial injury. *J Hepatol.* 2001;35:756-64.
57. Omar S, Khokhar JH. Lewis Hepatotoxicity of Agents Used in the Management of Inflammatory Bowel Disease. 2010;28:508-18.
58. El Beshbishy HA. Antioxidant and antiapoptotic effects of green tea polyphenols against azathioprine-induced liver injury in rats, *Pathophysiology* 2010; epub ahead of print.
59. Clark PA, Hsia YE, Huntsman RG. Toxic complications of treatment with 6-mercaptopurine. Two cases with hepatic necrosis and intestinal ulceration. *Br Med J* 1960;1:393-5.
60. Vogt MH, Stet EH, De Abreu RA, Bökkerink JP, Lambooy LH, Trijbels FJ. The importance of methylthio-IMP for methylmercaptopurine ribonucleoside (Me-MPR) cytotoxicity in Molt F4 human malignant T-lymphoblasts. *Biochim Biophys Acta.* 1993;1181:189-94.
61. Ma XL, Wang B, Guo HY, Zhang YH, Zhu GH, Duan YL, et al. Tolerability of 6-mercaptopurine in children with acute lymphoblastic leukemia *Zhonghua Er Ke Za Zhi.* 2010;48:289-92.
62. Kim JH, Cheon JH, Hong SS, Eun CS, Byeon JS, Hong SY, et al. Influences of thiopurine methyltransferase genotype and activity on thiopurine-induced leukopenia in Korean patients with inflammatory bowel disease: a retrospective cohort study. *J Clin Gastroenterol.* 2010;44:242-8.
63. Higgs JE, Payne K, Roberts C, Newman WG. Are patients with intermediate TPMT activity at increased risk of myelosuppression when taking thiopurine medications? *Pharmacogenomics.* 2010;11:177-88.
64. Trainor KJ, Morley AA. Screening of cytotoxic drugs for residual bone marrow damage. *Natl Cancer Inst.* 1976;57:1237-9.
65. Menor C, Fernandez-Moreno MD, Fueyo JA. Azathioprine acts upon rat hepatocyte mitochondria and stress-activated protein kinases leading to necrosis: protective role of N-acetyl-L-cysteine. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;311:668-76.
66. Korelitz BI, Mirsky FJ, Fleisher MR, Warman JI, Wisch N, Gleim GW. Malignant neoplasms subsequent to treatment of inflammatory bowel disease with 6-mercaptopurine. *The American journal of gastroenterology.* 1999;94:3248-53.
67. Schmid BP. Monitoring of organ formation in rat embryos after in vitro exposure to azathioprine, mercaptopurine, methotrexate or cyclosporin A. *Toxicology* 1984; 31:9-21.
68. Bertino JR. Improving the curability of acute leukemia: pharmacologic approaches. *Semin Hematol.* 1991;28:9-11.

69. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull.* 1993;49:481-93.
70. Mc Cord JM. Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clin Biochem.* 1993;26:351-7.
71. Uysal M. Serbest radikaller, lipid peroksidleri organizmada prooksidan-antioksidan dengeyi etkileyen koşullar. *Klinik Gelişim.* 1998;11:336-41.
72. Williams AT, Burk RF. Carbon tetrachloride hepatotoxicity: an example of free radical-mediated injury. *Semin Liver Dis.* 1990;10:279-84.
73. Barber DA, Harris SR. Oxygen free radicals and antioxidants: a review. *Am Pharm.* 1994;34:26-35.
74. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya: Mimoza Yayınları; 1995:3-95.
75. Das DK, Maulik N. Antioxidant effectiveness in ischemia-reperfusion tissue injury. *Methods Enzymol.* 1994;233:601-10.
76. Chopineau J, Sommier MF, Sautou V. Evaluation of free radical production in an ischaemia-reperfusion model in the rabbit using a tourniquet. *J Pharm Pharmacol.* 1994;46:519-20.
77. Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J.* 1984;222:1-15.
78. Valenzuela A. The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life Sci.* 1991;48:301-9.
79. Slater TF, Cheeseman KH, Davies MJ, Proudfoot K, Xin W. Free radical mechanisms in relation to tissue injury. *Proc. Nutr. Soc.* 1987;46:1-12.
80. Stahl W, Sies H. Antioxidant defense: vitamins E and C and carotenoids. *Diabetes.* 1997;46:14-8.
81. Yalçın AS. Antioksidanlar. *Klinik Gelişim* 1998;11:342-6.
82. Gonzales R, Auclair C, Voisin E, Gautero H, Dhermy D, Boivin P. Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in red blood cells from patients with malignant diseases. *Cancer Res.* 1984;44:4137-9.
83. Takahashi K, Cohen HJ. Selenium-dependent glutathione peroxidase protein and activity: immunological investigations on cellular and plasma enzymes. *Blood.* 1986; 68:640-5.
84. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993;90:7915-22.
85. Kılınç K. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi.* 2002;33:110-8.
86. Tlili N, Walid E, Saadaoui E, Khaldi A, Triki S, Nasri N, The caper (*Capparis L.*): Ethnopharmacology, phytochemical and pharmacological properties, 2010; epub ahead of print.
87. Rivera D, Inocencio C, Obon C, Alcaraz F. Review of food and medicinal uses of *Capparis L.* subgenus *Capparis* (*Capparidaceae*). *Econ Bot.* 2003;57:515-34.
88. Janick J, Paull RE. The encyclopedia of fruits and nuts. Edited by Janick J, Purdue University, USA, and Paull RE., University of Hawaii at Manoa, USA; 2006;3:228-31.

89. Nagata KM. Hawaiian medicinal plants. *Econ Bot.* 1971;25:245-54.
90. Eddauks M, Lemhadri A, Mihel JB. Hypolipidemic activity of aqueous extract of *capparis spinosa* L. in normal and diabetic rats. *J Ethnopharmacol.* 2005;98:345-50.
91. Bağcı C, Şimşek S, Çakmak EA, Uyanık BS, Solak M, Yitigoglu MR, et al. Keberenin (*capparis ovata* desf.) farelerde karaciğer enzimleri ile bazı kan parametreleri üzerine etkisi. *Genel Tıp Dergisi.* 1999;9:123-5.
92. Tesoriere L, Butera D, Gentile C. Bioactive components of Caper (*Capparis spinosa* L.) from Sicily and antioxidant effects in a red meat simulated gastric digestion. *J Agric Food Chem.* 2007;55:8465-871.
93. Germanò MP, De Pasquale R, D'Angelo V, Catania S, Silvari V, Costa C. Evaluation of extracts and isolated fraction from *Capparis spinosa* L. buds as an antioxidant source. *J Agric Food Chem.* 2002;50:1168-71.
94. Akgul A, Ozcan M. Some compositional characteristics of capers (*Capparis* spp) seed and oil. *Grasas Aceites.* 1999;50:49–52.
95. Proestos C, Boziaris IS. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chemistry.* 2006;664-71.
96. Yadav P, Sarkar S, Bhatnagar D. Action of *capparis decidua* against alloxan induced oxidative stress and diabetes in rat tissues. *Pharmacol Res.* 1997;36:221-8.
97. Kamalakkannan N, Stanely MP. Rutin improves the antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic rat tissues. *Mol Cell Biochem.* 2006;2293:211-9.
98. Eddouks M, Lemhadri A, Michel JB. Caraway and caper: potential anti-hyperglycaemic plants in diabetic rats. *J Ethnopharmacol.* 2004;94:143-8.
99. Kanaujia A, Duggar R, Pannakal ST, Yadav SS, Katiyar CK, Bansal V, et al. Insulinomimetic activity of two new gallotannins from the fruits of *Capparis moonii*. *Bioorg Med Chem.* 2010;11:3940-5.
100. Goyal M, Nagori BP, Sasmal D. Sedative and anticonvulsant effects of an alcoholic extract of *Capparis decidua*. *J Nat Med.* 2009;63:375-9.
101. Yue-lan C, Xin L, Min Z. *Capparis spinosa* protects against oxidative stress in systemic sclerosis dermal fibroblasts. *Arch Dermatol Res.* 2010;302:349-55.
102. Purohit A, Vyas KB. Effect of *Capparis decidua* plant extract in prevention of plaque formation in thoracic aorta of cholesterol fed rabbits. 76th Congress of the European Atherosclerosis Society. 2007;11:298.
103. Cao YL, Li X, Zheng M. Effect of *Capparis spinosa* on fibroblast proliferation and type II collagen production in progressive systematic sclerosis. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2008;33:560-3.
104. Goyal R, Grewal RB. The influence of teent (*Capparis decidua*) on human plasma triglycerides, total lipids and phospholipids. *Nutr Health.* 2003;17:71-6.
105. Gaiind KN, Juneja TR, Bhandarkar PN. Volatile principle from seeds of *Capparis decidua*. Kinetics of in vitro antibacterial activity against *Vibrio cholerae* ogava, inaba, and eltor. *Ind J Pharm.* 1972;34:86-8.
106. Chopade VV, Tankar AN, Ganjiwale RO, Yeole PG. Antimicrobial activity of *Capparis zeylanica* Linn roots. *Inter J Green Pharm.* 2009;2:28-30

107. Shytayeh A, Ghdeib A. Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes. *Mycoses*. 1999;42:665-72.
108. Sama W, Ajaiyeoba EO. Phytochemical and antimicrobial studies of *Capparis thoningii* and *Capparis tomentosa*. *Pharmacognosy Magazine*. 2006;2:119-22.
109. Arena A, Bisignano G, Pavone B, Tomaino A, Bonina FP, Saija A, et al. Antiviral and immuno modulatory effect of a lyophilized extract of *Capparis spinosa* L. buds. *Phytother Res*. 2008;22:313-7.
110. Jacobson RL, Schlein Y. Lectins and toxins in the pant diet of *Phlebotomus papatasi* (Diptera Psychodidae) can kill *Leishmania major* promastigotes in the sandfly and in culture. *Ann Trop Med Parasito*. 1999;193:351-6.
111. Ali-Shtayeh MS, Abu Ghdeib SI. Antifungala activity of plant extracts against dermatophytes. *Mycoses*. 1999;42:665-72.
112. Lu G, Wu D, Fu R. Studies on the synthesis and antibacterial activities of polymeric quaternary ammonium salts from dimethylaminoethyl methacrylate. *React Funct Polym*. 2007;67:355-66.
113. Halkier BA. Glucosinolates. In: Ikan R, editor. *Naturally Occurring Glycosides: Chemistry, Distribution, and Biological Properties*. New York: John Wiley & Sons; 1999;p.:193-223.
114. Gadgoli C, Mishra S. Antihepatotoxic activity of p-methoxy benzoic acid from *capparis spinosa*. *J Ethnopharmacol*. 1999;66:187-192.
115. Baijal R, Patel N, Kolhapure SA. Evaluation of efficacy and safety of Liv.52 DS tablets in acute viral hepatitis: A prospective, double-blind, randomized, placebo-controlled, phase III clinical trial. *Medicine Update*. 2004;12:41-53.
116. Ageel AM, Parmar NS, Mossa JS, Al-Yahya MA, Al-Said MS, Tariq M. Anti-inflammatory activity of some Saudi Arabian medicinal plants. *Agents Actions*. 1986;17:383-4.
117. Al-Said MS, Abdelsattar EA, Khalifa SI, el-Feraly FS. Isolation and Identification of an anti-inflammatory principle from *Capparis spinosa*. *Pharmazie*. 1988;43:640-1.
118. Arslan R, Bektas N. Antinociceptive effect of methanol extract of *Capparis ovata* in mice. *Pharm Biol*. 2010;48:1185-90
119. Ghule BV, Murugananthan G, Yeole PG. Analgesic and antipyretic effects of *Capparis zeylanica* leaves. *Fitoterapia*. 2007;78:365-9.
120. Wu J-H, Chang F-R, Hayashi K, Shiraki H, Liaw C-C, Nakanishi Y, et al. Antitumor agents. Part 218: Cappamensin A, a new in vitro anticancer principle, from *Capparis sikkimensis*. *Bioorg Med Chem Lett*. 2003;13:2223-5.
121. Lam S-K, Ng T-B. A protein with antiproliferative, antifungal and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from caper (*Capparis spinosa*) seeds. *Phytomedicine*. 2009;16:444-5.
122. Chang JM, Chen WC, Hong D, Lin JK. The inhibition of DMBA-induced carcinogenesis by neoxanthin in hamster buccal pouch. *Nutr Cancer*. 1995;24:325-33.
123. Matsuyama K, Villareal MO, ElOmri A, Han J, Kchouk ME, Isoda H. Effect of Tunisian *Capparis spinosa* L. extract on melanogenesis in B16 murine melanoma cells. *J Nat Med*. 2009;63:468-72.
124. Ghule BV, Murugananthan G, Nakhat PD. Immunostimulant effects of *Capparis zeylanica* Linn. Leaves. *J Ethnopharmacol*. 2006;108:311-5.

125. Luecha P, Umehara K, Miyase T, Noguchi H. Antiestrogenic constituents of the Thai medicinal plants *Capparis flavicans* and *Vitex glabrata*. *J Nat Prod*. 2009;72:1954-9.
126. Trombetta D, Occhiuto F, Perri D. Antiallergic and antihistaminic effect of two extracts of *Capparis spinosa* L. flowering buds. *Phytother Res*. 2005;19:29-33.
127. Angelini G, Vena GA, Filotico R, Foti C, Grandolfo M. Allergic contact dermatitis from *Capparis spinosa* L. applied as wet compresses. *Contact dermatitis*. 1991;24:382-3.
128. Eddouks M, Lemhadri A, Michel JB. Hypolipidemic activity of aqueous extract of *Capparis spinosa* in normal and diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005;345-50.
129. Bağcı C, Şimşek S. *Capparis ovatanın* farelerde karaciğer enzimleri ile bazı kan parametreleri üzerine etkisi: Genel Tıp Dergisi. 1999;9:123-5.
130. Mateos R, Lecumberri E, Ramos S, Goya L, Bravo L. Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress, application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *J Chromatog B*. 2005;827:76-82.
131. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265-75.
132. Starzl TE, Marchiro TL, Porter KA. Factors determining short and long-term survival after orthotopic liver homotransplantations in the dog. *Surgery*. 1965;58:131-55.
133. Hong IH, Ji H, Hwa SY, Jeong WI, Jeong DH, Do SH, et al. The Protective Effect of ENA Actimineral Resource A on CCl₄-Induced Liver Injury in Rats. *Mar Biotechnol (NY)*. 2010;701-2.
134. Haleagrahara N, Jackie T, Chakravarthi S, Rao M, Kulur A. Protective effect of *Etlingera elatior* (torch ginger) extract on lead acetate--induced hepatotoxicity in rats. *J Toxicol Sci*. 2010;35:663-71.
135. Sun B, Wakame K, Sato E, Nishioka H, Aruoma OI, Fujii H. The effect of active hexose correlated compound in modulating cytosine arabinoside-induced hair loss, and 6-mercaptopurine- and methotrexate-induced liver injury in rodents. *Cancer Epidemiol*. 2009;33:293-9.
136. Amin A, Hamza AA. Hepatoprotective effects of *Hibiscus*, *Rosmarinus* and *Salvia* on azathioprine-induced toxicity in rats. *Life Sci*. 2005;77(3):266-78.
137. Shaye OA, Yadegari M, Abreu MT, Poordad F, Simon K, Martin P, et al. Hepatotoxicity of 6-mercaptopurine (6-MP) and Azathioprine (AZA) in adult IBD patients. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;102:2488-9.
138. Giverhaug T, Bergan S, Loennechen T, Rugstad HE, Aarbakke J. Analysis of methylated 6-mercaptopurine metabolites in human red blood cells: comparison of two methods. *Ther. Drug Monit*. 1997;19:663-8.
139. Gisbert JP, Luna M, Gonzalez-Lama Y, Pousa ID, Velasco M, Moreno-Otero R, Mate J. Liver injury in inflammatory bowel disease: long-term follow-up study of 786 patients. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13:1106-14.

140. Elise Petit, Sophie Langouet, Hanane Akhdar, Christophe Nicolas-Nicolaz, André Guillouzo and Fabrice Morel. Differential toxic effects of azathioprine, 6-mercaptopurine and 6-thioguanine on human hepatocytes. *Toxicology in Vitro*. 2008; 22:632-42.
141. Kanemitsu H, Yamauchi H, Komatsu M, Yamamoto S, Okazaki S, Nakayama H. Time-course changes in neural cell apoptosis in the rat fetal brain from dams treated with 6-mercaptopurine (6-MP). *Histol Histopathol*. 2009;24:317-24.
142. Innocenti F, Danesi R, Bocci G, Fogli S, Di Paolo A, Del Tacca M. Metabolism of 6-mercaptopurine in the erythrocytes, liver, and kidney of rats during multiple-dose regimens. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1999;43:133-140.
143. Furukawa S, Usuda K, Abe M, Hayashi S, Ogawa I. Effect of 6-mercaptopurine on rat placenta. *J Vet Med Sci*. 2008;70:551-6.
144. Kaplowitz N. Interaction of azathioprine and glutathione in the liver of the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 1977;200:479-86.
145. Päivi Halonen, Jorma Mattila, Anne Mäkipernaa, Kjeld Schmiegelow Erythrocyte concentrations of metabolites or cumulative doses of 6-mercaptopurine and methotrexate do not predict liver changes in children treated for acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2006;46:762-6.
146. Lennard L, Rees CA, Lilleyman JS, Maddocks JL. Childhood leukaemia: a relationship between intracellular 6-mercaptopurine metabolites and neutropenia. *Br. J. Clin. Pharmacol*. 1983;16:359-63.
147. De Boer NK, van Bodegraven AA, Jharap B, de Graaf P, Mulder CJ. Drug Insight: pharmacology and toxicity of thiopurine therapy in patients with IBD. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2007;4:686-94.