

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**SIÇANLARDA D-GALAKTOZAMİN İLE
OLUŞTURULAN HEPATİTTE CAFFEİC ACİD
PHENETHYL ESTER'İN KORUYUCU ETKİSİ**

Dr. Abdulkadir Baştürk

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Mehmet İŞLER

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
tarafından 1360-TU-06 proje numarası ile desteklenmiştir.**

ISPARTA

2008

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince ve tez çalıőmamda bana her türlü desteklerini esirgemeyen tez danıőmanım Prof. Dr. Mehmet İŞLER başta olmak üzere değerli hocalarım Prof. Dr. M. Numan TAMER, Prof. Dr. M. Tuğrul SEZER, Prof. Dr. Ülkü SARITAŐ, Prof. Dr. Yıldırım SONGÜR, Doç. Dr. M. Cem Koçkar, Doç. Dr. ő. Ercan TUNÇ, Doç. Dr. H. őenol COŐKUN, Yrd. Doç. Dr. Güçhan ALANOĞLU, Doç. Dr. Mehmet őAHİN, Yrd. Doç. Dr. Z. Dilek AYDIN, Yrd. Doç. Dr. Altuğ őENOL, Uzm. Dr. Murat DEMİR, Yrd. Doç. Dr. Banu Kale KÖROĞLU'na, laboratuvar çalıőmamda emeği geçen Dr. Yunus UGAN, Dr. Erkan CÜRE, Dr. Kasım DEMİR, Dr. Ali Rıza BAYKAL'a, projemizi destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimine, eőime ve mutluluk kaynağım olan kızıma en derin sevgi ve őükranlarımı sunarım.

Dr. Abdulkadir BAŞTÜRK

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Akut karaciğer yetmezliği	2
2.1.1. Akut Karaciğer Yetmezliği Nedenleri	2
2.1.2. Akut Karaciğer Yetmezliği Patogenez	4
2.2. D-Galaktozamin Hepatiti	5
2.3. Serbest Oksijen Radikalleri ve Oksidatif Stres	7
2.4. Reaktif Oksijen Ürünleri	8
2.5. Serbest Oksijen Radikal Kaynakları	10
2.6. DNA, lipidler ve proteinlerin oksidatif hasarlanması	11
2.7. Enzimatik ve Nonenzimatik Antioksidan Sistemler	12
2.7.1. Nonenzimatik Antioksidanlar	12
2.7.2. Enzimatik Antioksidanlar	14
2.7.2.1. Glutasyon Peroksidaz	14
2.7.2.2. Katalaz	15
2.7.2.3. Süperoksit Dismutaz	15
2.8. CAPE'nin Yapısı ve Özellikleri	16
2.9. CAPE'nin Antioksidan Etkisi	17
3. MATERYAL ve METOD	19
3.1. MATERYAL	19
3.1.1. Deney Hayvanları	19

3.1.2. Kullanılan Malzeme ve Aletler	19
3.2. METOD	20
3.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneyin Yapılması	20
3.2.2. Doku ve kan örneklerinin alınması	20
3.2.3. Örneklerin Homojenizasyonu ve Deney için hazırlanması	21
3.2.3.1. Homojenizasyonda Kullanılan Reaktifler	21
3.2.3.2 Homojenizasyonda Yapılan İşlemler ve Numunelerin Hazırlanması	21
3.2.4. Dokularda Biyokimyasal Analizler	22
3.2.5. Histopatolojik Analiz Yöntemleri	22
3.2.6. İstatistiksel Analiz	22
4. BULGULAR	24
4.1. Karaciğer fonksiyon testleri	24
4.2. Karaciğer dokusunda glutatyon düzeyleri	26
4.3. Karaciğer dokusunda antioksidan enzim düzeyleri	26
4.4. Karaciğer Dokusunda MDA Düzeyleri	28
4.5. Karaciğer Dokusunda MPO Düzeyleri	29
4.6. Karaciğer dokusunda TNF- α düzeyleri	29
4.7. Karaciğer Dokusunda IL-10 Düzeyleri	30
4.8. Histolojik Değerlendirme	31
5. TARTIŞMA	32
6. SONUÇ	36
7. ÖZET	37
8. SUMMARY	38
9. KAYNAKLAR	39

KISALTMALAR

CAPE	Caffeic acid phenethyl ester
GAL	D-Galaktozamin
ALP	Alkalen fosfataz
AST	Aspartat aminotransferaz
ALT	Alanin aminotransferaz
SOR	Serbest oksijen radikali
AKY	Akut Karaciğer Yetmezliği
TNF-α	Tümör nekrozis faktör alfa
MPO	Myeloperoksidaz
MDA	Malondialdehit
SOD	Süperoksit dismutaz
CAT	Katalaz
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
GSSG	Okside glutasyon
GSH	Redükte glutasyon
UDP	Uridin difosfat
UTP	Uridin trifosfat
OH\cdot	Hidroksil iyonu
O$_2$$\cdot^-$	Süperoksit anyonu
H$_2$O$_2$	Hidrojen peroksit
NO	Nitrik oksit
HOCl	Hipokloröz asit
LOOH	Lipid hidroperoksit
LOO\cdot	Peroksil radikalleri
ATP	Adenozin trifosfat
i.p.	İntraperitoneal
SF	Serum fizyolojik

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Akut hepatit viruslar, toksik ajanlar, ilaçlar, alkol, çeşitli metabolik ve otoimmün hastalıklar gibi değişik nedenlere bağlı olarak meydana gelebilir ve bazen fulminan gidiş göstererek ölümlere neden olabilir. Hepatit B (HBV) ve C (HCV) virusları en önemli viral hepatit etkenleri olup tüm dünyada yaygın bir sağlık problemidir (1).

Selektif bir hepatotoksin olan D Galaktozamin (GAL) karaciğerde galaktoz yolunda metabolize olan bir amino şekerdir. GAL hücre içinde üridin tüketimine yol açarak hepatositlerin RNA metabolizmasını bozar ve sonuçta hepatosit nekrozuna yol açar (2, 3). GAL'ın sitotoksik etkisinde, endojen lipidlerin peroksidasyonunun major faktör olduğu gösterilmiştir (4). GAL ile yapılan deneysel hepatit, morfolojik ve fonksiyonel olarak insanlarda görülen viral hepatitlere çok benzerdir (2).

Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), yapıca flavonoidlere benzeyen bal arısı propolisinin aktif bir bileşenidir. Mikromolar konsantrasyon aralığında linoleik asit ve araşidonik asitin 5-lipooksijenaz tarafından oluşturulan oksijenizasyonunu inhibe etmektedir (5). Yapılan birçok çalışmada CAPE'nin antiinflamatuvar, sitostatik, antiviral, antibakteriyel, antifungal ve antioksidan özellikleri olduğu gösterilmiştir (6,7).

Akut hepatitin sorunsuz olarak atlatılabilmesi için arayışlar sürmektedir. Bu çalışmada, GAL ile oluşturulan bir deneysel hepatit modelinde CAPE'nin preventatif etkinliğini araştırdık. CAPE'nin bu deneysel modelde, antioksidan özellikleri ve apoptozu modüle etmesi nedeniyle başarılı olabileceğini düşündük.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akut Karaciğer Yetmezliği

Akut karaciğer yetmezliği (AKY) daha önce belirgin bir karaciğer hastalığı olmayanlarda ortaya çıkan bir klinik sendromdur. AKY semptomlar ortaya çıktıktan sonra 4 hafta içerisinde hepatik ensefalopati (HE) ve hepatik sentez fonksiyonunda azalma ile karakterizedir (8) AKY'nin tipik laboratuvar bulguları arasında bilirubin yüksekliği, uzamış protrombin zamanı (koagülopati), hipoglisemi ve bazen böbrek yetmezliği yer alır. Amerika Birleşik Devletleri'nde AKY'nin en sık nedenleri toksisite (%39), idiyosenkratik ilaç reaksiyonları (%13), hepatit A ve hepatit B enfeksiyonları (%12) olarak tespit edilmiştir. Olguların %17'sinde etyoloji tespit edilememiştir (9). AKY'nin mortalitesi çok yüksektir, özellikle organ nakli yapılmayanlarda değişik kaynaklara göre %80-%97 arasında değişmektedir (10,11).

AKY'nin sınıflamasında birkaç değişik model kullanılmaktadır. O'Grady'nin yaptığı sınıflamaya göre ilk 7 gün içinde, 8–28 günler arasında ve 28. günden sonra ensefalopatinin ortaya çıkış zamanına göre sırasıyla hiperakut, akut ve subakut karaciğer yetmezliği şeklinde tanımlanır (8).

2.1.1. Akut Karaciğer Yetmezliği Nedenleri

AKY nedenleri yaşanan coğrafyaya göre önemli oranda değişkenlik gösterir. AKY'nin pek çoğundan virüsler ve ilaçlar sorumludur. Bununla birlikte anlamlı sayıda hastada ise etyolojik bir neden bulunamaz. Amerika ve İngiltere'de en sık AKY nedeni parasetamol toksisitesidir (12).

AKY viral hepatitlerin sık olmayan bir komplikasyonudur, etyolojiye bağlı olarak %0,2-%4 oranında görülür (13). Diğer virüslere göre hepatit A'da AKY riski en azdır, ancak hepatit A enfeksiyonunun ortaya çıkış yaşı arttıkça risk artmaktadır. Akut hepatit B enfeksiyonunda ve kronik HBV enfeksiyonunun alevlenme

durumlarında AKY açısından risk en fazladır. Delta virüsüne bağlı AKY insidansı hızla azalmaktadır. AKY'nin nedeni olarak hepatit C enfeksiyonu nadiren saptanır. Hepatit E Asya ve Afrika'da daha sık görülür ve gebelikte özellikle 3. trimestirde %20'ye ulaşan oranlarda AKY'ne neden olur. Nadir AKY nedenleri arasında herpes simpleks 1 ve 2, herpes virüs-6, varisella zoster, Epstein Barr virüs ve sitomegalovirüs yer alır.

Her ne kadar çok az kanıt olsa da viral nedenli olduğu düşünülen seronegatif hepatit (sebebi bilinmeyen AKY) bazı batı toplumlarından bildirilmiştir. Sıklıkla orta yaşlı kadınlarda görülür ve sporadiktir. Tanı diğer sebeplerin ekarte edilmesi ile konur (13).

Aşırı doz parasetamol kullanımı İngiltere'de görülen AKY'lerin yaklaşık %40'undan sorumludur. Bu vakaların çoğunda suicidal amaçlı parasetamol kullanımı vardır; %8-30'u tedavi amacı ile (nonsuicidal) parasetamol kullanmışlardır. Düzenli alkol kullanımı, antiepileptik tedavi (enzim indüksiyonu yolu ile) ve malnütrisyon parasetamol toksisitesine duyarlılığı artıran faktörlerdir. Aşırı doz (>150 mg/kg) parasetamol kullanan hastaların sadece %2-5'inde AKY gelişir. Mortalite kullanılan parasetamol dozu ile ilişkilidir. En yüksek mortalite suicidal amacı ile kullanılan 48 gramın üzerindeki parasetamol dozlarında ortaya çıkar (13).

İdiosenkratik ilaç reaksiyonu genellikle ilacın ilk defa kullanımı sırasında ortaya çıkar. Tanı genellikle ilaç maruziyeti ile karaciğer hasarı arasındaki ilişkiye dayanarak konulur. İdiosenkratik reaksiyon sonrası AKY gelişme riski nonsteroidal ilaçlarla %0,001 iken izoniazid/rifampisin kombinasyonu ile %1 civarındadır (13).

Wilson hastalığı AKY ile prezente olabilir. Genellikle hayatın 2. dekadında ortaya çıkar ve klinik olarak Coomb's negatif hemolitik anemi ve pek çok vakada Kayser-Fleischer halkasının varlığı ile karakterizedir. Amanita phalloides (mantar) zehirlenmesi en sık orta Avrupa, güney Afrika ve Amerika'nın batı sahillerinde görülür. Mantarın yenmesinden yaklaşık 5 saat sonra kusma ile birlikte ciddi diyare başlar. Yaklaşık 4-5 gün sonra da karaciğer yetmezliği ortaya çıkar. Otoimmün kronik hepatit AKY ile prezente olabilir (13).

Budd-Chiari sendromu AKY ile prezente olabilir. Hepatomegalinin varlığı ile tanıdan şüphelenilir ve hepatic ven trombozunun gösterilmesi ile tanı doğrulanır.

Özellikle lenfoma olmak üzere malign infiltrasyonlar da tipik olarak hepatomegali ile birlikte. Özellikle yaşlı hastalarda iskemik hepatit AKY'nin giderek artan bir nedenidir (13).

2.1.2 Akut Karaciğer Yetmezliğinin Patogenezi

Viral hepatitlerin neden olduğu karaciğer hasarının patogenezi net olarak anlaşılamamıştır. Akut ve kronik viral hepatit süresince en azından replikasyonunun olduğu dönemlerde viral hepatit etkenleri direk sitopatik etkili değil gibidirler. Viral hepatitlerdeki karaciğer hasarının ortaya çıkış zamanı ve histolojik görünümüne göre karaciğer hasarının major nedeni karaciğer hücre membranından salınan viral antijenlere karşı etki gösteren özellikle sitotoksik T-hücreleri olmak üzere immün cevaptır. Doğal öldürücü hücre aktivitesi ve antikor bağımlı hücre sel sitotoksinite ve proinflamatuvar sitokinler akut viral hepatitlerde hücre hasarı ve inflamasyon oluşmasına katkıda bulunurlar (14).

Pek çok ilaç lipofilik olduklarından barsak fırçamsı kenarlarından emilirler. Biyotransformasyon işlemi lipofilik terapötik ajanların karaciğer tarafından daha hidrofilik hale getirilmesidir. Böylece bu ürünler idrara ve safraya atılabilir hale gelirler. Pek çok örnekte biyotransformasyon nonpolar bileşikler değişik aşamalarla polar bileşikler haline getirir. Bu işlemlerin başlangıcında sitokrom P-450 (CYPs)'nin aracılık ettiği oksidatif yollar yer alır (ör: hidroksilasyon). Bir sonraki aşama hidroksil gruplarına yüksek derecede polar grupların eklenmesi ile sonuçlanan sülfatları ve glukuronidleri oluşturmak üzere tipik esterleştirme işlemidir. Bu iki enzimatik aşama faz 1 (CYP oksidasyonu) ve faz 2 (esterleştirme) olarak bilinir. Glutatyon-S-transferaz, asetilleyici enzimler ve alkol dehidrogenaz diğer önemli metabolik yollardır. Ancak pek çok farmakolojik ajan için primer metabolik yol CYPs ve takiben esterleştirmedir (14). Genel olarak biyotransformasyon ile detoksifikasyon arasındaki denge bozulduğu zaman, biriken toksik metabolitler immünolojik ve/veya non-immünolojik mekanizmalarla hepatobiliyer patolojilere neden olurlar (15).

2.2. D-Galaktozamin Hepatiti

Selektif bir hepatotoksin olan GAL karaciğerde galaktoz yolunda metabolize olan bir amino şekerdir. Ratlara GAL verilmesi tekrarlanabilir karaciğer hücre hasarına yol açar (16,2). Karaciğer hücrelerinin bu ajana karşı verdiği reaksiyonun pek çok özelliği, galaktozamine bağlı hücre hasarının hücre ölümü fenomeninde altta yatan biyokimyasal olayları açıklayabilmek için kullanışlı bir deneysel model olabileceğini düşündürmektedir (17). Hücre ölümü ve nekrozu karaciğer parankimal hücrelerin akut hasara karşı verdikleri reaksiyonun baskın özelliğidir (16).

GAL'ın yaptığı karaciğer nekrozuyla ilgili birbirini takip eden 3 fizyopatolojik aşama olduğu düşünülmektedir (18). İlk olarak GAL'ın karaciğer hücreleri tarafından metabolize edilmesi sonucu hızlı bir şekilde hücre içinde UDP-GAL birikimi olur. Normalde UDP-heksozaminleri N-asetilli iken GAL'ın metabolizması sonucunda ortaya çıkan UDP-GAL'ın çoğunluğu N-asetillenmiş değildir. UDP-GAL'ın artışı üridin nükleotidlerinde ve UDP-heksozlarda azalmaya neden olur. İkinci aşamada bu metabolik anormallikler tam bilinmeyen mekanizmalarla karaciğer hücresinin plazma membranında değişikliklere neden olurlar. Üçüncü aşamada karaciğer hasarı hücre içi ile hücre dışı arasındaki elektrokimyasal gradyent farkından dolayı hücre içine kalsiyum girişinin artması ile ilişkilidir. Artmış kalsiyum içeriği sonunda hücre ölümüne neden olacak mekanizmalara aracılık eder, en azından bu mekanizmaları başlatır (19). 'Kalsiyum hipotezi' olarak da bilinen intraselüler kalsiyum konsantrasyonunun düzenlenmesindeki bozukluğun, hücre ölümüne yol açan final ortak yolu oluşturduğu pek çok çalışmada gösterilmiştir (20).

Literatürdeki bilgiler ışığında araştırmacılar GAL'ın ratlarda yaptığı toksisiteyi şöyle bir modelle açıklamışlardır. GAL direkt olarak mast hücrelerini aktive eder ve böylece mast hücrelerinden histamin salınmasına yol açar. Histamin de gastrointestinal traktın permeabilitesinde artışa neden olur (21). Gastrointestinal trakttan salınan bakteriyel ürünler Kupffer hücrelerini aktive ederek bu hücrelerden TNF- α gibi sitokinlerin salınmasına neden olur (22). GAL, TNF- α ile ilgili hücre ölümüne neden olan sinyallerin aktivasyonuna karşı karaciğer hücrelerinin duyarlılığını artırarak mesenger RNA (mRNA) ve protein sentezini inhibe eder (23,24). Hücreler apoptoz yolu ile en erken 6 saat sonra ölmeye başlarlar. Sonra

inflamatuvar hücreler karaciğer parankimine girerler ve daha sonra nekroz alanları ortaya çıkar. Literatürdeki veriler ışığında sonradan ortaya çıkan nekroz da apoptoze neden olan benzer mekanizmalar ile oluşmaktadır. Çünkü her iki mekanizma da Kupffer hücre aktivasyonuna ve TNF- α üretimine bağımlıdır (25).

GAL panlobüler fokal hepatositonekroza, polimorfonükleer hücrelerin infiltrasyonuna ve ilaca bağlı hepatitte olduğu gibi makrofajların artmasına yol açar (2, 26). Son yıllarda GAL'ın hangi mekanizma ile karaciğer hasarına neden olduğu araştırma konusudur. İlk yapılan biyokimyasal çalışmalar GAL'ın hepatositlerde üridin havuzunu azaltarak bunun sonucunda mRNA'yı ve protein sentezini inhibe etmek suretiyle karaciğer hasarına neden olduğunu göstermiştir (27, 28, 18).

TNF- α üretiminin pek çok modelde hepatositlerde apoptozisi uyardığı gösterilmiştir (29,30).

Önceki çalışmalarda GAL verilen farelere az miktarda endotoksin verilmesinin apoptoze ve nekroza yol açtığı gösterilmiştir. Ayrıca bu etkiler TNF antiserumu ile bloke edilmiştir (31). Ek olarak GAL, aktinomisin D veya amanitin ile RNA ve protein sentezinin inhibe edilmesinin hepatositleri in vivo ve in vitro olarak TNF- α 'nın toksik etkilerine karşı duyarlılaştırdığı gösterilmiştir (32). Buna göre Kupffer hücreleri GAL hepatotoksisitesine katkıda bulunduğu ve aktive Kupffer hücreleri TNF- α 'nın karaciğerdeki major kaynağı olduğu için (33), TNF- α 'nın ratlardaki GAL hepatotoksisitesinde rolü olduğu düşünülmektedir. Stachlewitz ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ratlarda TNF- α antiserumu ile GAL hepatotoksisitesini azaltarak bu fikri doğrulamışlardır (25). Ek olarak GAL'ın sitotoksik etkisinde, endojen lipidlerin peroksidasyonunun major faktör olduğu gösterilmiştir (27).

Sonuç olarak GAL ile yapılan deneysel hepatitin, morfolojik ve fonksiyonel olarak insanlarda görülen viral hepatitlere benzerliği dile getirilmiştir (26).

2.3. Serbest Oksijen Radikalleri ve Oksidatif Stres

Oksijenin zararlı etkilerinin nedenleri 1954 yılında Gershman'ın oksijen toksisitesinin serbest radikal teorisi yayınlanıncaya kadar iyi bilinmiyordu. Bu teori ile oksijen toksisitesinin özellikle redükte oksijen formları ile oluştuğu bildirilmiştir. (34). Daha sonra 1956 yılında yaşlanmada serbest radikallerin rol oynadığını gösteren çalışması ile Harman biyolojik sistemlerde serbest radikalleri açıklamıştır (35). Bu çalışma daha sonra serbest radikallerle ilgili yapılacak yoğun çalışmaların yolunu açmıştır. Serbest radikallerle ilgili ikinci önemli devir 1969 yılında McCord ve Fridovich'in süperoksit dismutaz (SOD) enzimini keşfetmeleridir (36). Mittal ve Murad'ın 1977 yılında hidroksil radikalının (OH) guanilat siklaz aktivasyonunu ve 'ikincil mesenger' siklik guanozin monofosfat (cGMP) üretimini artırdığını göstermeleri serbest radikallerle ilgili üçüncü önemli buluştur (37). Daha sonra, yaşayan organizmaların serbest radikallere adapte olduğu ve çeşitli fizyolojik fonksiyonlar için serbest radikallerin faydalı olduğu gösterilmiştir (38).

Serbest oksijen radikalleri ya da daha yaygın olarak kullanılan adıyla reaktif oksijen ürünleri (ROS, Reactive Oxygen Species) ve reaktif nitrojen ürünleri (RNS) normal hücrel metabolizmanın ürünleridir. ROS'un canlı sistemlerde hem faydalı hem de zararlı özellikleri ile birbirine zıt ikili rolleri vardır (39). ROS'un faydalı etkileri düşük/orta konsantrasyonlarda ortaya çıkar. İnfeksiyöz ajanlara karşı savunma, hipoksiye karşı hücrel cevap ve birçok hücrel sinyal sistemlerine aracılık fonksiyonu gibi fizyolojik durumlarda ROS'un bu faydalı etkileri görülür. Bir diğer düşük/orta konsantrasyondaki faydalı etkisi mitojenik cevabı uyarmaktır (38).

Serbest radikallerin potansiyel biyolojik hasara neden olan zararlı etkileri oksidatif stres olarak bilinir (40,41). Biyolojik sistemler üzerine bu zararlı etkileri bir yanda ROS aşırı üretimi diğer yanda enzimatik ve nonenzimatik antioksidan sistemlerin yetmezliği durumunda görülür. Başka bir deyişle oksidatif stres oksijeni kullanan metabolik reaksiyonlar sonucu oluşur ve canlı organizmada prooksidan/antioksidan reaksiyonlarındaki dengenin bozulduğunu gösterir. Aşırı ROS hücrel lipidlerde, proteinlerde ya da DNA'da onların normal fonksiyonlarını bozan hasarlar yapar. Bundan dolayı yaşlanmada olduğu gibi birçok hastalıkta

oksidatif stres saptanmıştır. Serbest radikallerin faydalı ve zararlı etkileri arasındaki hassas denge canlı organizmalar için çok önemli bir konudur ve bu denge ‘redoks düzenlemesi’ olarak bilinen mekanizmalarla sağlanır (38). ‘Redoks düzenlemesi’ işlemi canlı organizmaları çeşitli oksidatif streslerden korur ve in vivo redoks durumunu kontrol etmek suretiyle redoks homeostazının devamını sağlar (42).

2.4. Reaktif Oksijen Ürünleri (ROS)

Serbest radikaller atomik veya moleküler orbitallerinde bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron bulunduran molekül ya da moleküler parçalar olarak tanımlanabilir (43). Bu eşleşmemiş elektronlar serbest radikallere önemli derecede reaktivite kazandırır. Oksijenden köken alan radikaller canlı sistemler tarafından üretilen radikal ürünlerinin önemli bir kısmını oluşturur. (44). Moleküler oksijen (dioksijen) farklı bir elektronik konfigürasyona sahiptir ve kendisi bir radikaldir. Dioksijene bir elektron eklenmesi ile süperoksit anyon radikali oluşur ($O_2^{\cdot-}$) (44). Metabolik işlemler sırasında artan ya da fiziksel radyasyonun tetiklediği oksijen aktivasyonu primer ROS’u oluşturur. Primer ROS daha sonra direk ya da enzimlerin veya metallerin katalizlediği işlemlerle diğer moleküllerle etkileşime girerek ‘sekonder’ ROS’u üretir (45).

Süperoksit oluşumu en çok hücrenin mitokondrisinde gerçekleşir (46). Mitokondriyal elektron transport zinciri memeli hücrelerinde ATP’nin asıl kaynağıdır ve bundan dolayı yaşam için vazgeçilmezdir. Enerji üretimi sırasında az miktarda elektron prematür olarak oksijene sızarak çeşitli hastalıkların patofizyolojisinde rol oynayan oksijen serbest radikali süperoksiti meydana getirir (47). Submitokondriyal partiküller üzerinde yapılan ölçümler transport zincirindeki tüm elektronların %1–3’ünün oksijeni suya redükte etmek yerine süperoksit üretimi için sızdıklarını göstermiştir. Süperoksit elektron transport zincirinin kompleks 1 ve 3’ü tarafından üretilir ve bir kez anyonik forma geçince kolayca mitokondriyal membran içine girmek için çok güçlü bir şekilde yüklenir (38).

Hidroksil radikali ($\cdot OH$) hidroksil iyonunun nötral formudur. Hidroksil radikali yüksek reaktiviteye sahiptir ve bu yüzden çok tehlikeli bir radikaldir. Yarılanma

ömrü in vivo yaklaşık olarak 10^{-9} saniyedir (48). Bundan dolayı hemen tamamen in vivo olarak oluştuğu yerde etki gösterir. Hücrenin redoks durumu çoğunlukla bir demir (ve bakır) redoks çifti ile bağlantılıdır ve dar fizyolojik limitlerde tutulur. Demir regülasyonu sonucunda intraselüler serbest demir bulunmaz ancak in vivo stres durumlarının varlığında aşırı süperoksit demir içeren moleküllerden ‘serbest demir’ salınımına neden olur. Salınan Fe^{2+} yüksek derecede reaktif hidroksil radikalinin oluşumu ile sonuçlanan Fenton reaksiyonuna katılır ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \cdot OH + OH^-$). Böylece stres durumlarında $O_2^{\cdot -}$ [4Fe-4S] kümesi içeren enzimler için oksidan etki yapar ve Fe^{2+} i Fenton reaksiyonu için kullanılabilir yaparak H_2O_2 ‘den $\cdot OH$ üretimini kolaylaştırır (44). Süperoksit radikali Haber-Weis reaksiyonuna katılır ($O_2^{\cdot -} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + \cdot OH + OH^-$) ve bir Fenton reaksiyonu ile Fe^{3+} indirgenmesini birleştirerek Fe^{2+} ve oksijen üretimini sağlar ($Fe^{3+} + O_2^{\cdot -} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$) (49).

Oksijen kökenli diğer reaktif radikaller peroksil radikallerdir (ROO^{\cdot}). En basit peroksil radikali (HOO^{\cdot}) hidroperoksil radikali ya da perhidroksil radikali olarak isimlendirilir. Süperoksitin protonize formudur (50). Hidroperoksil radikali yağ asidi peroksidasyonunu iki paralel yol ile başlatır (51). Hidroperoksilin başlattığı yağ asidi peroksidasyonunun lipid hidroksiperoksit (LOOH) bağımlı yolu in vivo lipid peroksidasyonunun başlangıç mekanizması ile ilişkili olabilir. Ksantin oksidaz (XO) ve ksantin dehidrogenaz (XD) aynı enzimin birbirine dönüştürülebilir formlarıdır ve ksantin oksidoredüktaz (XOR) olarak bilinir (52). Pürin katabolizmasında XOR önce hipoksantinin ksantine sonra da ksantinin ürik aside oksidatif hidroksilasyonunu katalizler. Ürik asit potent bir antioksidan ve serbest radikal temizleyicisidir. Bundan dolayı XOR oksidatif strese karşı önemli bir hücrel savunma enzimidir. Her iki XO ve XD formları ile ama özellikle XO formu ile pek çok ROS sentez edilir (53). Bundan dolayı hem antioksidan (ürük asit) hem de pek çok serbest radikalinin sentezlenmesi XOR’u hücrel redoks potansiyelinin önemli bir koruyucusu ve düzenleyicisi yapıyor (38).

Peroksizomlar fizyolojik şartlarda H_2O_2 üretirler ancak $O_2^{\cdot -}$ üretmezler (47). Peroksizomlar hücre içinde oksijen tüketiminin major yeridir ve oksijeni kullanan pek çok metabolik fonksiyona katılırlar. Peroksizomda oksijen tüketimi H_2O_2 üretimine yol açar ve bu da daha sonra çeşitli moleküllerin oksidasyonunda kullanılır. Bu organel aynı zamanda katalaz enzimi de ihtiva eder. Katalaz enzimi

hidrojen peroksidi ayrıştırır ve bu toksik bileşiğin birikmesini engeller. Böylece peroksizom bu enzimlerin rölatif konsantrasyonlarını ya da aktivitelerini hassas bir dengede tutarak net bir ROS üretimini engeller. Bu organelin bu dengeyi nasıl koruduğu açık değildir. Peroksizomlar hasarlandığında ve hidrojen peroksidi etkisiz hale getiren enzimleri azaldığında hidrojen peroksit sitozole salınır ve önemli bir şekilde oksidatif strese katkıda bulunur (38).

Nötrofil gibi bir fagositik hücre bir uyarana maruz kalırsa yabancı partikülü tanıyabilir hale gelir ve respiratuar yanma olarak bilinen bir dizi reaksiyon geçirir (54). Nikotin adenin dinükleotid fosfat (NAD(P)H) oksidaz nötrofillerdeki en iyi karakterize edilmiş enzimdir. Bu enzimin ürünü olan süperoksit bakteriyel destrüksiyon için gerekli olan respiratuar yanmayı sağlar. Enzim kompleksinin gp91^{phox} ve p22^{phox} adında iki membran bağlanma komponenti vardır. Enzim kompleksinin enzimatik merkezi sitokrom b558 içerir. Aktivasyondan sonra sitozolik komponentler (p47^{phox} , p67^{phox} ve p40^{phox}) ve küçük G proteinleri (Rac ve Rap1A) aktif enzim kompleksini oluşturmak için membrana hareket ederler. Non fagositik NAD(P)H oksidazlar tarafından üretilen süperoksit nötrofillerde üretilen süperoksitin %1-10'u kadarını oluşturur ve bu oluşan süperoksitin intraselüler sinyal yollarında fonksiyon gördükleri düşünülür (38).

2.5. Serbest Oksijen Radikal Kaynakları

Serbest oksijen radikallerinin iki önemli kaynağı vardır:

A) Eksojen kaynaklar

- Alkol, uyuşturucu gibi bağımlılık yapan maddeler
- İyonize ve non iyonize radyasyon
- Ksenobiyotikler: hava kirliliği, solventler, hiperoksi, aromatik hidrokarbonlar, pestisitler, anestezik maddeler, sigara dumanı vs.
- Stres; streste katekolamin düzeyi artar ve artan katekolamin oksidasyonu ile radikal üretimi artmaktadır.
- Yiyeceklerde bulunan çeşitli katkı maddeleri

- Sisplatin, doksorubisin, metotreksat, bleomisin, siklosporin gibi antineoplastik ilaçlar

- Metal iyonları

B) Endojen kaynaklar

- Enzimler ve proteinler; XO, triptofan dioksijenaz, hemoglobin vs.

- Tetrahidroproteinler, katekolaminler, hidrokinonlar, tioller, gibi küçük moleküllerin otooksidasyonu

- Makrofaj ve diğer fagositik hücrelerin aktivasyonu ile meydana gelen solunumsal patlama

- Endoplazmik retikulum ve nükleus membran elektron transport sistemleri (sitokrom p-450)

- Mitokondriumda bulunan elektron transport sistemi

- Peroksizomlarda var olan enzimler

- İskemi, travma, intoksikasyon gibi durumların sonucu oluşan oksidatif stres

- NADPH oksidaz, lipooksijenaz, prostaglandin sentetaz içeren plazma membranı enzimleri ve lipid peroksidasyonu

- Yaşlanma

2.6. DNA, lipidler ve proteinlerin oksidatif hasarlanması

Yüksek konsantrasyonlarda ROS hücre yapılarının, nükleik asitlerin, lipidlerin ve proteinlerin hasarlanmasına yol açan önemli bir uyarıcı olabilir (39). Hidroksil radikali DNA molekülünün tüm komponentleri ile reaksiyona girerek hem pürin hem de pirimidin bazlarında hasar yapar ayrıca deoksiriboz iskeletine de zarar verir (43). En geniş ölçüde çalışılan DNA lezyonu 8-OH-G oluşumudur. Bu oksidatif hasarlanma olayları sonucu oluşan kalıcı genetik materyal değişiklikleri mutagenез, karsinogenез ve yaşlanmanın ilk aşamasını oluşturur (38).

Metallerin uyardığı ROS üretimi sadece DNA'ya saldırmaz ayrıca fosfolipidlerin kalıntısı olan poliansatüre yağ asitleri gibi diğer hücresel komponentlere de zarar verir. Bu poliansatüre yağ asitleri oksidasyonlara aşırı derecede hassastırlar (55). Peroksil radikalleri bir kez oluşunca bir siklizasyon reaksiyonu ile endoperoksitlere (malondialdehitin prekürsörleri) yeniden

düzenlenirler ve sonuçta peroksidasyon son ürünü olan malondialdehit (MDA) oluşur (56,57). Lipid peroksidasyonunun malondialdehit dışındaki diğer major aldehit ürünü 4-hidroksi-2-nonenal (HNE)'dir. MDA bakteriyel ve memeli hücrelerinde mutojeniktir ve ratlarda karsinojeniktir. Hidroksinonenal zayıf mutojeniktir ama lipid peroksidasyonunun major toksik ürünü gibi durmaktadır (38).

Amino asitler, basit peptidler ve proteinler iyonize radyasyona maruz bırakılarak hidroksil radikalleri ya da hidroksil/süperoksit iyon radikalleri oluşturulmuştur. Yapılan bu çalışmalarla ROS'un uyardığı protein oksidasyon mekanizmaları açıklanmıştır (58). Proteinlerin tüm amino asitlerinin yan zincirleri, özellikle sistein ve metyonin amino asitleri ROS'un neden olduğu oksidasyona duyarlıdır (58). Sistein kalıntılarının oksidasyonu başta glutatyon (GSH) olmak üzere düşük molekül ağırlıklı tiollerle protein tiol grupları arasında reversible miks disülfidlerin oluşumuna yol açar. Pek çok mekanizmalarla üretilen karbonil gruplarının konsantrasyonu ROS ile ilişkili protein oksidasyonunun iyi bir göstergesidir (59).

2.7. Enzimatik ve Nonenzimatik Antioksidan Sistemler

2.7.1. Nonenzimatik Antioksidanlar

E Vitamini: Vitamin E, lipid fazda çözünen zincir-kırıcı etkisi olan bir antioksidandır. Dokularda Vitamin E aktivitesinin yaklaşık %90'undan sorumlu en aktif ve en yaygın formu α - tokoferol'dur. Yapısındaki fenolik hidroksil grubuna ait aromatik halka, vitaminin kimyasal olarak aktif kısmını oluşturur ve antioksidan özelliği bu gruptan kaynaklanır. Lipid peroksidasyonuna karşı ilk sıradaki savunma mekanizmasıdır (60,61). Membranların lipid kısmında ve ekstraselüler sıvılarda bulunur. Hücre membranlarında O_2^- , OH^- gibi radikalleri inaktive eder ve lipid peroksit zincirini kırarak lipid peroksidasyonu reaksiyonlarını durdurur (62).

C vitamini: Ekstraselüler sıvılarda bulunur. Süperoksit ve hidroksil radikalinin doğrudan temizleyicisidir (62).

Transferrin: Dolaşımdaki serbest demiri bağlayarak antioksidan özellik gösterir (63).

Bilirubin: Serbest radikalleri tutar, O_2^- ve OH^\cdot toplar (64).

Albümin: Geçiş metalleri bağlar, lipid LOOH ve hipoklorit ($HOCl$) toplayıcısıdır (64).

Ürik asit: Normal plazma konsantrasyonlarında O_2^- , OH^\cdot ve peroksil radikallerini temizlemektedir (64).

Seruloplazmin: SOD benzeri bir etki gösterdiği düşünülmektedir. Demirin +2 değerlikli halden +3 değerlikli hale yükseltgenmesini sağlayarak Fenton reaksiyonunu inhibe eder. Bu sayede serbest radikal oluşmasını engeller (65).

Piruvat: Güçlü antioksidandır ve H_2O_2 bağlayıcı özelliği vardır (66).

Taurin: Ksenobiotiklere bağlanır. Hipoklorit ile tepkimeye girer ve etkisini azaltır. LPO ve nötrofil infiltrasyonunu inhibe eder. Antioksidan etkisinin olduğu gösterilmiştir (67).

β -Karoten: Vitamin A'nın prekürsörüdür. Hücre membranlarında bulunur. Serbest radikal temizleyicisidir. Peroksitlere karşı doğrudan etki ederek onları inaktif hale getirir (68).

Glutasyon: Glutamat, sistein ve glisin aminoasitlerinden genetik bilgiye sahip olmadan karaciğerde tripeptid yapıda sentezlenmektedir. Glutasyon, oksidatif stresin ölçümünde kullanılan çok güçlü bir antioksidandır. Redükte glutasyon (GSH) / okside glutasyon (GSSG) oranı, oksidatif durumlarda azalmaktadır. Proteinlerdeki $-SH$ gruplarını redükte halde tutarak oksidasyondan korur. Serbest radikaller ve peroksitlerle tepkimeye giren glutasyon; hücreleri oksidatif hasara karşı korur (69)

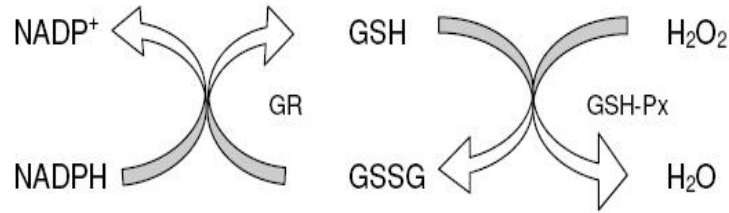
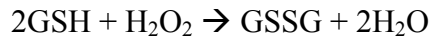
Melatonin: Primer olarak pineal bezde sentezlenen, özellikle gece salgılanan ve triptofandan sentez edilen bir hormondur. Lipofilik özelliği yüksek olup membranları kolaylıkla geçer. Organizmada yapılan ve tahrip edici özelliği çok yüksek olan hidroksil radikali temizler (70).

Sistein: Potent bir antioksidandır. Glutasyon sentezi için prekürsördür (71).

2.7.2. Enzimatik Antioksidanlar

2.7.2.1. Glutasyon Peroksidaz

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) yapısında bir metal olan selenyum bulunur. Bu nedenle metalloenzim grubunda değerlendirilir. İn vitro ortamda GSH'yı GSSG'ye çevrilir. Bu tepkimede H₂O₂'yi yüksek özgülük ile katalizleyerek detoksifiye eder (Şekil 1). GSH'un GSSG haline dönüştüğü reaksiyonda GSH-Px enzimi H₂O₂'i suya indirger. Daha sonra glutasyon redüktaz enziminin katalizlediği reaksiyon ile NADPH harcanarak okside glutasyon tekrar redükte hale dönüştürülebilir (70). Hidrojen peroksidin düşük konsantrasyonda olması durumunda GSH-Px katalaza göre (CAT) daha etkilidir (71). Tepkime aşağıda verilmiştir:

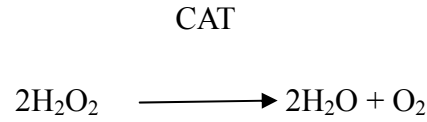


Şekil 1: Glutasyonun okside ve redükte formları arasında dönüşümü (GSH=Redükte glutasyon, GSSG=Okside glutasyon, GSH-Px=Glutasyon peroksidaz, GR=Glutasyon redüktaz, H₂O₂=Hidrojen peroksit).

2.7.2.2. Katalaz

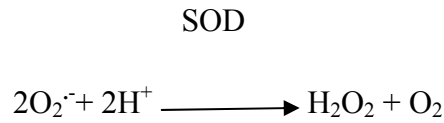
CAT enzimi esas olarak peroksizomlarda lokalize olan ve yapısında 4 “hem” grubu bulunan bir hemoproteindir (60). Özellikle hidrojen peroksidin yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu ortamlarda etkilidir (72). Dokularda enzimin aktivitesi büyük farklılık gösterir. Karaciğer ve böbrekte en yüksek aktivite, destek dokuda ise en düşük aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (73). Ortamda oluşan H₂O₂'yi okside edici enzimlerin etkisiyle direkt olarak suya dönüştürür. CAT enzim aktivitesi, ortamda H₂O₂ konsantrasyonunun çok arttığı durumlarda belirgin olarak artmaktadır. Ortamdaki H₂O₂ konsantrasyonu düşük olduğu durumlarda hidrojen

peroksidi substrat olarak kullanan diğer antioksidan enzimler (GSH-Px gibi) devreye girerek hidrojen peroksidi ortamdan uzaklaştırırlar (74). CAT ve GSH-Px enzimleri, etkilerinin benzer olmasına rağmen hücre içindeki yerleşim yerleri ve etki yerleri bakımından farklılık göstermektedirler. CAT enzimi peroksizomlarda daha etkili iken (75), GSH-Px enzimi başlıca sitozol ve mitokondride daha etkilidir (71). CAT enziminin katalizlediği reaksiyon aşağıda gösterilmiştir:



2.7.2.3. Süperoksit Dismutaz

Süperoksit Dismutaz (SOD), süperoksit anyonunun hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürülmesini katalizleyerek organizmayı toksik reaktif oksijen metabolitlerine karşı koruyan bir metalloenzimdir (76).

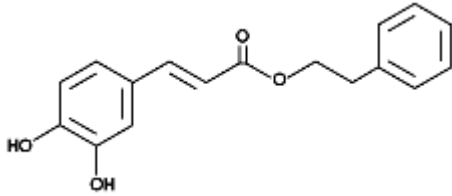


Spontane olarak bu tepkime oluşabilmektedir, SOD enzimi bu tepkimeyi katalize ettiğinde hız normale göre 4 kat artar (47). Radikallere karşı hücreyi koruyan savunma mekanizmaları arasında SOD enzimi ilk görevi üstlenir. SOD enzimi ile katalizlenen tepkime sonucu oluşan ürünlerin birikmesi CAT enzimi tarafından bertaraf edilmektedir. Fizyolojik şartlarda metabolik aşamalarda O_2^- radikalinin oluşumu oldukça fazladır. O_2^- radikalinin hücre içi konsantrasyonunu düşük seviyelerde tutarak O_2^- seviyelerinin kontrolünü sağlayıp hücreleri O_2^- radikallerinin etkilerinden korur (71).

2.8. CAPE'nin Yapısı ve Özellikleri

CAPE [Phenethyl 3-(3-4 dihydroxyphenyl) acrylate] immün sistemi düzenleyici ve immünohistimülasyon etkisi bilinen bal arısının ürettiği yapıcı

flavonoidlere benzeyen, propolis maddesinin aktif bir bileşenidir (77). CAPE'nin hepatotoksisiteden koruyucu, antioksidan, antiinflamatuvar, antiviral, immünomodülatör, nöroprotektif ve sitostatik etkileri olduğu bilinmektedir (78,7). Diğer propolis bileşenlerine göre araşidonik asit kaskadını güçlü şekilde modüle ettiğinden antiinflamatuvar etkisi daha belirgindir (77). CAPE'nin iki halkasal yapısı vardır (79). Bu halkasal yapılardan bir tanesi, CAPE molekülünün neredeyse tüm kimyasal özelliklerini gösteren fonksiyonel iki OH grubu taşır (şekil 2). Bu hidroksil grupları, elektronları aktif bir şekilde alıp verir ve bu sayede oksitleyici ve redükleyici özellik gösterir. Aromatik ve alifatik yapıda çok uzun karbon grupları taşınması nedeni ile lipofilik özelliğe sahiptir (5,80). Ornitin karboksilaz, 5- α redüktaz, proteaz, siklooksijenaz, lipooksijenaz, HIV-1 integras gibi enzimlerin potansiyel inhibitörüdür (5,81,82,83). Nükleer transkripsiyon faktörü olan Nükleer Faktör Kappa-B'nin aktive olmasını özgül ve güçlü bir şekilde engeller (84).



Şekil 2: Kafeik asit fenetil ester (CAPE)'in kimyasal yapısı (79).

2.9. CAPE'nin Antioksidan Etkisi

Genellikle 10 μ mol/L konsantrasyonda in vitro koşullarda nötrofiller veya ksantin dehidrogenaz/ksantin oksidaz sistemi tarafından meydana getirilen reaktif oksijen türlerinin hepsini bloke ettiği gösterilmiştir (5). Ayrıca CAPE linoleik asit ve araşidonik asitin 5'-lipooksijenaz enzimi tarafından oluşturulan oksijenasyonunu inhibe eder (77).

Yılmaz ve ark. streptozosin ile ratlarda deneysel diyabet oluşturmuşlar ve ratların karaciğer dokusunda MDA seviyeleri, SOD ve CAT enzim aktivitelerini incelemişlerdir. Streptozosinin oluşturduğu hasar üzerine CAPE'nin koruyucu

etkisini araştırmışlardır (85). Diyabetik yapılan ratların karaciğer dokusunda MDA seviyesinin ve SOD, CAT enzim aktivitesinin kontrol grubuna göre artmış olduğunu bulmuşlardır. Streptozosin+CAPE grubunda MDA seviyelerinin ve SOD, CAT enzim aktivitelerinin kontrol grubuyla benzer olduğunu saptamışlardır. Yazarlar CAPE'nin diyabetik yapılan ratların karaciğer dokusunda oluşan oksidatif hasarı önlediğini savunmuşlardır (85).

Gökalp ve ark. izoniazid ile ratların eritrositlerinde oksidatif hasar oluşturarak CAPE'nin bu hasarı önlemedeki etkinliğini araştırmışlardır. Ratların eritrositlerinde MDA seviyeleri, GSH-Px, SOD ve CAT enzim aktivitelerini incelemişlerdir. İzoniazid grubunda eritrositlerde MDA seviyesinin kontrol grubuna göre yükselmiş olduğunu bulmuşlardır. İzoniazid+CAPE grubunda ise MDA seviyesinin kontrol grubuyla benzer olduğunu grmuşlerdir. Yazarlar SOD enzim aktivitesini izoniazid grubunda anlamlı artmış bulmuşlardır. İzoniazid+CAPE grubunda ise SOD enzim aktivitesinde artış olmamasını, CAPE'nin ksantin oksidaz enzimi inhibisyonu yolu ile SOR'ları temizlemesine bağlı olabileceğini bildirmişlerdir. GSH-Px ve CAT enzim aktivitelerinin izoniazid grubunda azalmış olarak tespit edilmesinin artmış oksidatif stresi desteklediğini savunmuşlardır. İzoniazid+CAPE grubunda GSH-Px seviyesinin izoniazid grubundan yüksek tespit edilmesinin CAPE'nin antioksidan enzim sistemi üzerine düzenleyici etkisine bağlı olabileceğini belirtmişlerdir. Yazarlar izoniazid ile ratların eritrositlerinde oluşan oksidatif hasarı CAPE'nin önleyebileceğini savunmuşlardır (86).

Propolis bileşenlerinden biri olan galanginin ve CAPE'nin antioksidan etkinliğinin karşılaştırıldığı bir çalışmada; her iki bileşenin de ortamdaki $O_2^{\cdot-}$ radikallerini ve ksantin oksidaz sistemi tarafından oluşturulan reaktif oksijen türlerini temizledikleri gösterilmiştir. Ayrıca CAPE'nin $O_2^{\cdot-}$ radikallerini ve ksantin oksidaz sistemi tarafından oluşturulan reaktif oksijen türlerini temizleyici etkisinin galanginden daha belirgin olduğu da bildirilmiştir. Ayrıca CAPE'nin ortamdaki MDA seviyesini galanginden daha belirgin azalttığı bildirilmiştir (80).

3. MATERYAL ve METOD

Çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Merkezi, Biyokimya ve Patoloji Laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Çalışmamız Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan onay alınarak etik kurul kurallarına uygun olarak yapıldı.

3.1. Materyal

3.1.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada; 32 adet Wistar-Albino cinsi, 8-12 haftalık, ağırlıkları 162–235 g arasında olan erkek rat kullanıldı. Çalışmadaki ratların hepsi deney süresince standart nem, ışık (12 saat gün ışığı/12 saat karanlık) ve oda ısısı koşullarında (20-22 °C) bulunduruldu. Ratlar 4'erli gruplar halinde ayrı kafeslere konarak yeterli miktarda içme suyu ve standart rat yemi verildi.

3.1.2. Kullanılan Malzeme ve Aletler

Tablo 1. Kullanılan malzeme ve aletler

1	Soğutmalı santrifüj	(Eppendorf MR 5415, Almanya)
2	Derin dondurucu	(Facis, Fransa)
3	Hassas terazi	(Scaltec, İsviçre)
4	Vorteks (karıştırıcı)	(Nüve NM 100, Türkiye)
5	Otomatik pipetler	(Gilson, Fransa), (Eppendorf MR 5415, Almanya)
6	UV spektrofotometre	(Shimadzu UV 1601, Japonya)
7	Homojenizatör	(Ultra Turrax T25, Almanya)
8	MDA	Immundiagnostic AG, Stubenwald-Allee 8a, D-64625 Bensheim Germany, KC: 1900-070709
9	MPO	Immundiagnostic AG, Stubenwald-Allee 8a, D-64625 Bensheim Germany, K6631/K6631A ST
10	TNF- α	BioSource International Inc. 542 Flynn Road, Camarillo, California, 93012 USA (Immunoassay Kit), KRC3011
11	IL-10	BioSource International Inc. 542 Flynn Road, Camarillo, California, 93012 USA (Immunoassay Kit), KRC0101
12	CAPE	Sigma Chemicals. Co., St Louis, MO, USA
13	D-Galaktozamin	Sigma Chemicals. Co., St Louis, MO, USA

3.2. Metod

3.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneyin Yapılması

Toplam 32 rat rasgele 4 gruba ayrıldı.

Grup I (Kontrol, n=8): 3 gün boyunca günde bir kez serum fizyolojik (SF) intraperitoneal (i.p.) yoldan verildi. 3. gün SF enjeksiyonundan 1 saat sonra SF i.p. yoldan tekrar verildi.

Grup II (CAPE, n=8): 3 gün boyunca günde bir kez 10 µmol/kg CAPE i.p. yoldan verildi. 3. gün CAPE enjeksiyonundan 1 saat sonra SF i.p. yoldan verildi.

Grup III (GAL, n=8): 3 gün boyunca günde bir kez SF i.p. yoldan verildi. 3. gün SF enjeksiyonundan 1 saat sonra 1g/kg Galaktozamin i.p yoldan verildi.

Grup IV (CAPE+GAL, n=8): 3 gün boyunca günde bir kez 10 µmol/kg CAPE i.p. yoldan verildi. 3. gün CAPE enjeksiyonundan 1 saat sonra 1g/kg Galaktozamin i.p verildi.

İlaç ve SF uygulamaları sabah saat 09:00-10:00 arasında yapıldı. Deney başlangıcında, 2. ve 4. günlerde ratların ağırlıkları tartıldı. İlaç uygulamaları ratların ağırlıklarına göre yapıldı. CAPE %10'luk etanol ile, GAL serum fizyolojik ile çözüldü. CAPE 10 µmol/1mL konsantrasyonunda çözüldü. GAL 1gr/1mL konsantrasyonunda çözüldü. SF 1ml/kg uygulandı. Tüm grupların enjeksiyonu i.p. yoldan aynı gün başlandı ve 3 gün boyunca yapılarak aynı gün sonlandırıldı. Üçüncü gün uygulanan enjeksiyonlardan 24 saat sonra, sıçanlar intraperitoneal ketamin 80 mg/kg + xylazine 10 mg/kg ile anesteziye edilerek dekapite edildi.

3.2.2. Doku ve kan örneklerinin alınması

Sakrifikasyon yapılan günün sabahı sıçanlar i.p. ketamin (Alfamin, Alfasan IBV) 80 mg/kg + ksilazin (Alfamin, Alfasan IBV) 10 mg/kg ile anestezide edilerek orta hat insizyonu ile batinları açıldı. İnförior vena cava'dan kan örnekleri alındı. Alınan kan örnekleri aynı gün 1000Xg'de 20 dakika santrifüj edildi. Ayrılan serum örneklerinden aynı gün serum AST, ALT, ALP, total bilirubin ölçümleri Abbott Aeroset cihazı ile uygun ticari ELISA kitleri ile çalışıldı. Histolojik ve biyokimyasal incelemeler için karaciğerden doku örnekleri alındı. Histopatolojik inceleme için karaciğerin sağ lobu %10'luk formaldehid içinde muhafaza edildi. Biyokimyasal çalışmalar için ise karaciğerin sol lobu alınarak doku örnekleri -80°C'lik derin dondurucuda muhafaza edildi.

3.2.3. Örneklerin Homojenizasyonu ve Deney için hazırlanması

3.2.3.1. Homojenizasyonda Kullanılan Reaktifler

Karaciğer dokularının homojenizasyonunda ve biyokimyasal çalışmalarda pH: 7,5, 0,2 mM Tris-HCL tamponu kullanıldı (60).

3.2.3.2 Homojenizasyonda Yapılan İşlemler ve Numunelerin Hazırlanması

-80°C'de saklanan dokulardan 0.5 g alındı. Buna 250 µL 500 ppm BHT eklendikten sonra uygun oranda 7.4 pH Fosfat Tamponu ilave edilerek solüsyon Ultra-Turrax T25 (IKA-Labortechnik, Staufen, Almanya) homojenizöründe 10,000 rpm'de buzlu ortamda homojenize edildi. Homojenatlar 10,000 x g'de 30 dk boyunca +4°C'de santrifüj edilerek süpernatantları ayrıldı. Bu süpernatantlar porsiyonlara ayrılarak -70 derecede saklandı. Her test parametresi için yeni nümune çözülerek glutasyon, MDA, MPO, GSH-Px, SOD, CAT, TNF-α ve İL-10 düzeyleri ölçüldü ve protein tayini yapıldı.

3.2.4. Dokularda Biyokimyasal Analizler

Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarında karaciğer dokusunda myeloperoksidaz, TNF-alfa ve IL-10 aktiviteleri ELİZA ile çalışıldı. SOD, GSH-Px ve CAT enzimlerinin aktivite ölçümü ve protein tayini spektrofotometrik yöntemle yapıldı. Glutatyon, Ellman reaktifi kullanılarak spektrofotometrik olarak çalışıldı.

Protein tayini Lowry metoduna göre yapıldı (87). MDA düzeyinin tayini için HPLC (High Performance Liquid Chromatografi) yöntemi kullanıldı (88). SOD enzim aktivitesi Sun ve arkadaşlarının metoduna göre (89), CAT enzim aktivitesi Aebi metoduna göre (90), GSH-Px enzim aktivitesi Paglia metoduna göre çalışıldı (91).

3.2.5. Histopatolojik Analiz Yöntemleri

Sakrifiye edilen ratlardan alınan karaciğer örnekleri % 10'luk formaldehit kullanılarak fikse edildi. Parafin bloklar oluşturuldu. Oluşturulan parafin bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alınarak lam üzerinde preparatlar hazırlandı. Histopatolojik inceleme için hazırlanan preparatlar hematoksilin ve eozin (H&E) ile boyanarak ışık mikroskopunda (x100, x200 ve x400 büyütmede) incelendi.

Hepatosellüler hasar derecesi İshak ve ark.'nın (92) tanımladığı skorlama sistemi kullanılarak yapıldı. Bu skorlama sistemine göre hepatosellüler hasar aşağıda verilen skalaya göre derecelendirilip toplam skor elde edildi.

Periportal veya periseptal interface hepatit	Skor
Yok	0
Hafif (fokal, birkaç portal alan, <%50)	1
Hafif/Orta (fokal, çoğu portal alan, >%50)	2
Orta (septa veya alanların çevresinin %50'sinden azında devamlı)	3
Ciddi (septa veya alanların çevresinin %50'sinden fazlasında devamlı)	4

Birleşen nekroz	Skor
Yok	0
Fokal birleşen nekroz	1
Bazı alanlarda zon 3 nekrozu (lobüllerin %50'sinden azında)	2
Bazı alanlarda zon 3 nekrozu (lobüllerin %50'sinden fazlasında)	3
Zon 3 nekrozu + nadir portal santral köprüleşme (≤ 2)	4
Zon 3 nekrozu + çok sayıda portal santral köprüleşme (>2)	5
Panasiner veya multiasiner nekroz	6

Fokal litik lezyon, apoptoz ve fokal inflamasyon	Skor
Yok	0
Onluk büyütme alanında ≤ 1 odak	1
Onluk büyütme alanında 2-4 odak	2
Onluk büyütme alanında 5-10 odak	3
Onluk büyütme alanında >10 odak	4

Portal inflamasyon	Skor
Yok	0
Portal alanların tümünde veya bazılarında hafif	1
Portal alanların tümünde veya bazılarında orta	2
Portal alanların tümünde orta/belirgin	3
Portal alanların tümünde belirgin	4

3.2.6. İstatistiksel Analiz

Çalışmanın analizi bilgisayar ortamında SPSS 11.0 istatistik programında yapıldı. Analizde; ölçüm verileri aritmetik ortalama \pm standart hata şeklinde gösterildi. Gruplar arası farklılaşmanın öneminin tespiti için tek yönlü ANOVA analizi kullanıldı. Varyans analizinde anlamlı farklılaşma saptanmışsa Post Hoc Tukey testi ile ikili karşılaştırmalar yapıldı.

Deney grupları arasındaki histopatolojik skorların farklılığını 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

4.1. Karaciğer fonksiyon testleri

Serum AST aktivitesi GAL grubunda Kontrol ve CAPE gruplarına göre anlamlı derecede yüksek saptandı ($p=0,01$). Serum AST aktivitesi CAPE+GAL grubunda Kontrol ve CAPE gruplarına göre anlamlı derecede yüksek saptandı ($p<0,01$). CAPE-GAL grubundaki AST aktivitesi GAL grubundakinden farklı değildi.

Serum ALT aktivitesi GAL grubunda Kontrol ve CAPE gruplarına göre anlamlı derecede yüksek saptandı ($p<0,01$). Serum ALT aktivitesi CAPE+GAL grubunda Kontrol ve CAPE gruplarına göre anlamlı derecede yüksek saptandı ($p<0,01$). Serum ALT aktivitesi CAPE+GAL grubunda GAL grubuna göre anlamlı derecede düşük saptandı ($p<0,05$).

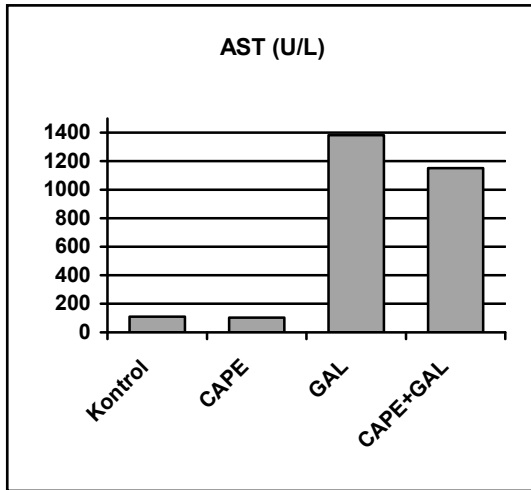
Serum ALP aktivitesi GAL grubunda Kontrol ve CAPE gruplarına göre anlamlı derecede yüksek saptandı ($p<0,05$). Serum ALP aktivitesi CAPE+GAL grubunda Kontrol ve CAPE gruplarına göre anlamlı derecede yüksek saptandı ($p<0,05$). CAPE-GAL grubundaki ALP aktivitesi GAL grubundan farklı değildi.

Tablo 2’de hayvan gruplarındaki serum AST, ALT ve ALP aktiviteleri gösterilmiştir. Şekil 3’de AST aktiviteleri, Şekil 4’de ALT aktiviteleri, Şekil 5’de ALP aktiviteleri grafik şeklinde gösterilmiştir.

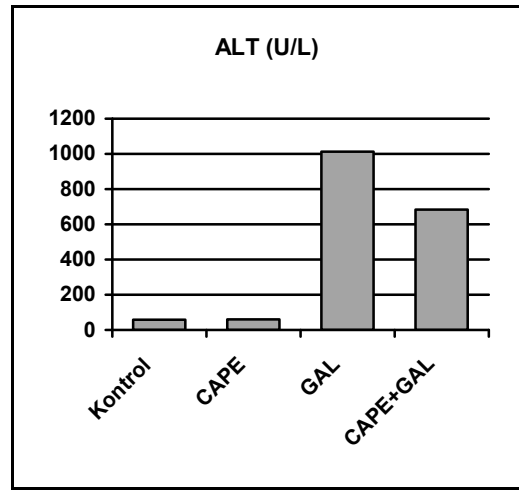
Tablo 2. Karaciğer fonksiyon testleri

Gruplar	AST(U/L)	ALT(U/L)	ALP(U/L)
Grup 1 (Kontrol)	111 ± 4	58 ± 3	214 ± 21
Grup 2 (CAPE)	103 ± 4	60 ± 3	156 ± 14
Grup 3 (GAL)	1384 ± 186	1012 ± 86	395 ± 59
Grup 4 (CAPE+GAL)	1152 ± 269	683 ± 129	447 ± 49
P (ANOVA)	<0.001	<0.001	<0.001
P (Post hoc Tukey test)	1-3: <0.001 1-4: =0.001 2-3: <0.001 2-4: =0.001	1-3: <0.001 1-4: <0.001 2-3: <0.001 2-4: <0.001 3-4: <0.05	1-3: <0.05 1-4: =0.01 2-3: =0.001 2-4: <0.001

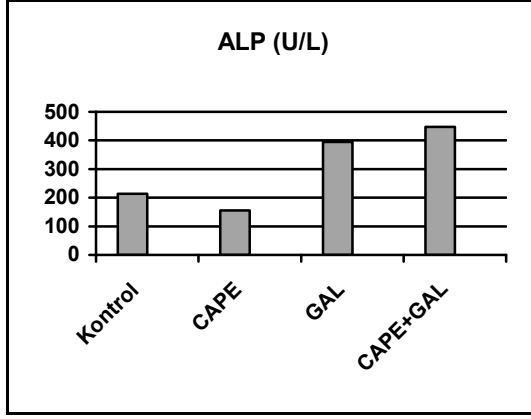
Veriler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.



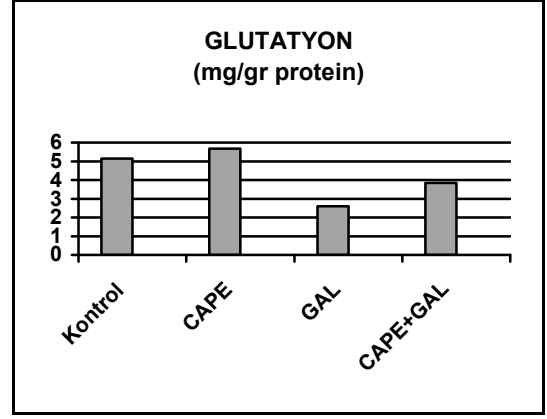
Şekil 3. Serum AST aktivitesinin gruplara göre dağılımı



Şekil 4. Serum ALT aktivitesinin gruplara göre dağılımı



Şekil 5. Serum ALP aktivitelerinin gruplara göre dağılımı



Şekil 6. KC dokusunda glutasyon düzeylerinin gruplara göre dağılımı

4.2. Karaciğer dokusunda glutasyon düzeyleri

Karaciğer dokusunda glutasyon düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık görülmedi. Bununla birlikte her ne kadar anlamlı olmasa da CAPE grubunda Kontrol grubuna göre glutasyon düzeyleri daha yüksek saptandı. GAL grubunda ise Kontrol ve CAPE gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan düşüklük saptandı. CAPE+GAL grubunda glutasyon düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı olmasa da GAL grubuna göre yüksek, Kontrol ve CAPE gruplarına göre ise düşük saptandı. Karaciğer dokusundaki glutasyon düzeyleri Tablo 3’de, grafik olarak Şekil 6’da gösterilmiştir.

4.3. Karaciğer dokusunda antioksidan enzim düzeyleri

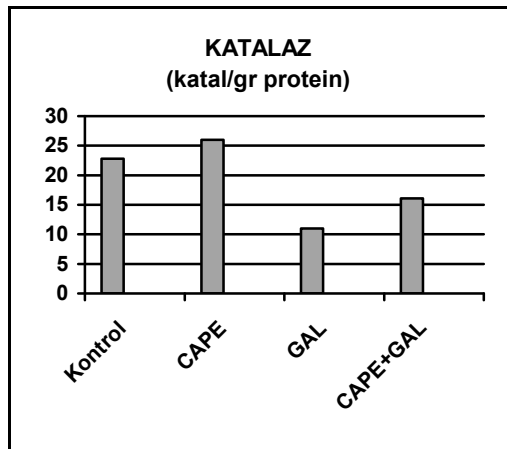
Karaciğer dokusunda CAT ve GSH-Px enzim düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi. SOD enzim düzeyi GAL grubunda CAPE grubuna göre anlamlı olarak düşük saptandı. SOD enzim düzeyi açısından diğer gruplar arasında anlamlı farklılık yoktu. Bununla birlikte CAPE grubunda CAT, SOD, GSH-Px enzim düzeylerinde Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan yükseklik saptandı. GAL grubunda ise CAT, SOD, GSH-Px enzim düzeylerinde Kontrol ve CAPE gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olmayan azalma saptandı. Ek olarak CAPE+GAL grubunda CAT ve SOD düzeyleri GAL

grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da yüksek saptandı. CAPE+GAL ve GAL grupları arasında GSH-Px enzimi açısından ise belirgin bir farklılık yoktu. Karaciğer dokusunda antioksidan enzim düzeyleri Tablo 3’de, grafik olarak CAT Şekil 7’de, SOD Şekil 8’de ve GSH-Px Şekil 9’da gösterilmiştir.

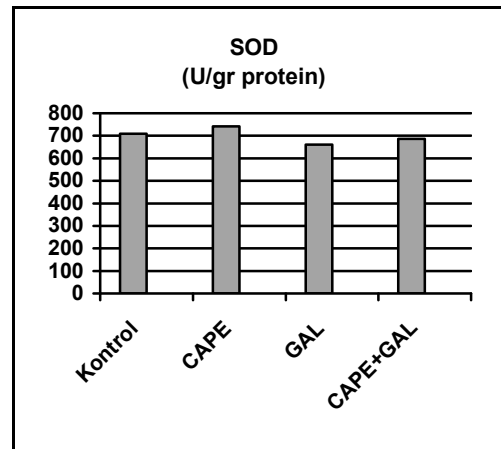
Tablo 3. Karaciğer dokusunda MDA ve antioksidan enzim düzeyleri

	MDA (mmol/g-prot)	Glutasyon (mg/g-prot)	Katalaz (k/g-prot)	SOD (U/g-prot)	GSH-Px (U/g-prot)
1. Kontrol	0.74±0.03	5.14±1.35	22.82±5.05	709.18±25.84	130.75±11.20
2. CAPE	0.77±0.02	5.68±0.72	26.09±6.16	742.43±20.46	151.94±6.70
3. GAL	1.37±0.04	2.60±0.62	11.09±2.60	661.00±14.52	127.34±8.03
4. CAPE+GAL	1.00±0.05	3.84±0.64	16.13±4.49	687.68±17.33	128.35±7.88
P (ANOVA)	<0.001	ns	ns	<0.05	ns
P (Post hoc Tukey test)	1-3: <0.001 1-4: =0.001 2-3: <0.001 2-4: <0.01 3-4: <0.001			2-3: <0.05	

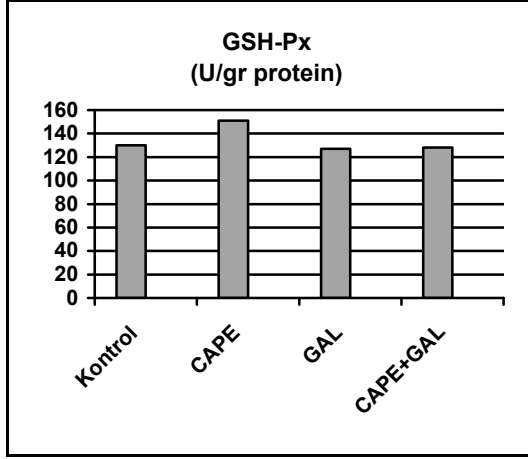
Veriler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.



Şekil 7. KC dokusunda CAT düzeylerinin gruplara göre dağılımı



Şekil 8. dokusunda SOD düzeylerinin gruplara göre dağılımı

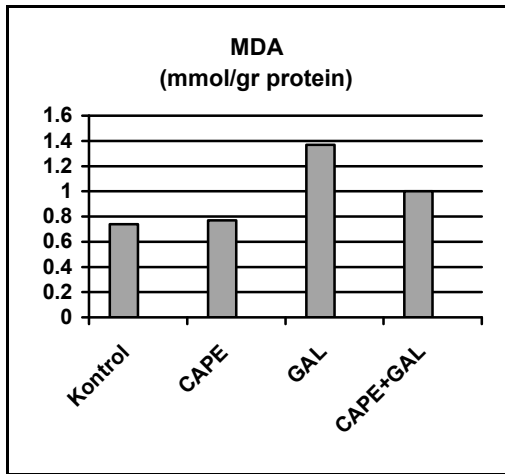


Şekil 9. KC dokusunda GSH-Px düzeylerinin gruplara göre dağılımı

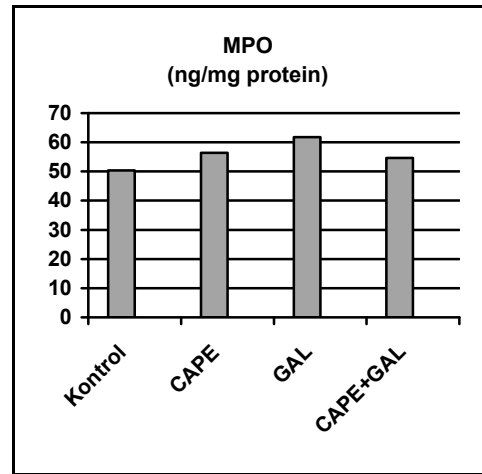
4.4. Karaciğer dokusunda MDA düzeyleri

Karaciğer dokusunda MDA düzeyleri GAL grubunda Kontrol ve CAPE gruplarına göre anlamlı derecede yüksek olarak saptandı ($p<0,01$). Karaciğer dokusunda MDA düzeyleri CAPE+GAL grubunda Kontrol ve CAPE gruplarına göre anlamlı derecede yüksek olarak saptandı ($p<0,01$). Karaciğer dokusunda MDA düzeyleri CAPE+GAL grubunda GAL grubuna göre anlamlı derecede düşük olarak saptandı ($p<0,01$).

Karaciğer dokusundaki MDA düzeyleri Tablo 3’de, grafik olarak Şekil 10’da gösterilmiştir.



Şekil 10. KC dokusunda MDA düzeylerinin gruplara göre dağılımı



Şekil 11. KC dokusunda MPO düzeylerinin gruplara göre dağılımı

4.5. Karaciğer dokusunda MPO düzeyleri

Karaciğer dokusunda MPO düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı. Bununla birlikte her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı olmasa da MPO düzeyleri GAL grubunda Kontrol grubuna göre yüksek saptandı. CAPE+GAL grubunda ise GAL grubuna göre düşük Kontrol grubuna göre yüksek saptandı. MPO düzeyleri Tablo 4’de, grafik olarak Şekil 11’de gösterilmiştir.

Tablo 4. Karaciğerde dokusunda MPO düzeyleri

Gruplar	MPO (ng/mg protein)
Grup 1 (Kontrol)	50,34 ± 2,86
Grup 2 (CAPE)	56,35 ± 9,35
Grup 3 (GAL)	61,78 ± 6,55
Grup 4 (CAPE+GAL)	54,64 ± 7,70

Veriler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.

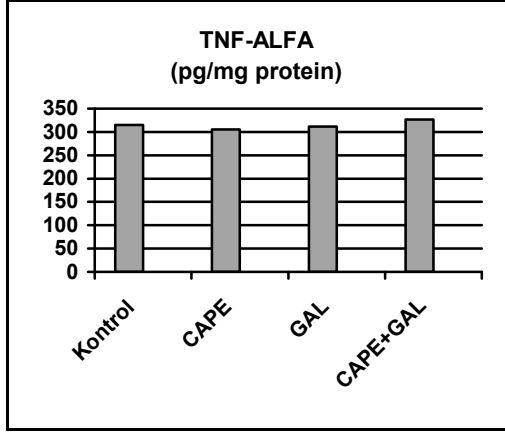
4.6. Karaciğer dokusunda TNF- α düzeyleri

Karaciğer dokusunda TNF- α düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı. TNF- α düzeyleri Tablo 5’de, grafik olarak Şekil 12’de gösterilmiştir.

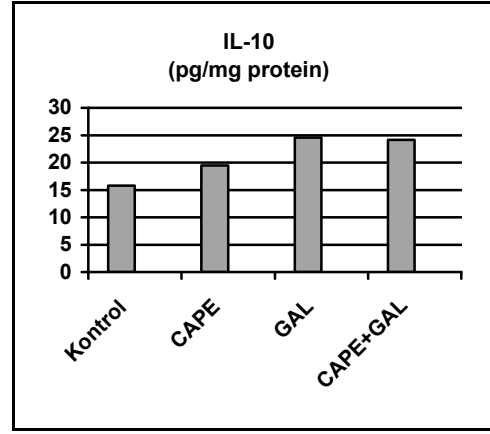
Tablo 5. Karaciğer dokusunda TNF- α vır IL-10 düzeyleri

Gruplar	TNF- α (pg/mgprotein)	IL-10 (pg/mgprotein)
Grup 1 (Kontrol)	314,94 ± 3,93	15,78 ± 1,39
Grup 2 (CAPE)	305,69 ± 5,80	19,50 ± 1,78
Grup 3 (GAL)	311,57 ± 13,75	24,59 ± 2,32
Grup 4 (CAPE+GAL)	326,38 ± 3,87	24,18 ± 1,57
P (ANOVA)	ns	<0.01
P (<i>Post hoc</i> Tukey test)		1-3: <0.01 1-4: <0.05

Veriler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.



Şekil 12. KC dokusunda TNF- α düzeylerinin gruplara göre dağılımı



Şekil 13. KC dokusunda IL-10 düzeylerinin gruplara göre dağılımı

4.7. Karaciğer dokusunda IL-10 düzeyleri

Karaciğer dokusunda IL-10 düzeyleri GAL grubunda Kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olarak saptandı ($p < 0,01$). Karaciğer dokusunda IL-10 düzeyleri CAPE+GAL grubunda Kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olarak saptandı ($p < 0,05$). IL-10 düzeyleri Tablo 5’de, grafik olarak Şekil 13’de gösterilmiştir.

4.8. Histolojik Değerlendirme

Sıçan gruplarında karaciğerin histolojik olarak değerlendirilmesinde, GAL alan gruplarda almayanlara göre nekroinflamatuvar skor anlamlı derecede yüksek saptandı ($p < 0,01$). Kontrol grupları arasında ve GAL alan gruplar arasında anlamlı düzeyde farklılık görülmedi. Sıçanların gruplara göre histolojik sonuçları Tablo 6’da gösterilmiştir.

Tablo 6. Sıçanların gruplara göre histolojik değerleri

Gruplar	Karaciğer histolojisi Median (min-max)
Grup 1 (Kontrol)	0 (0-0)
Grup 2 (CAPE)	0 (0-2)
Grup 3 (GAL)	4 (3-6)
Grup 4 (CAPE+GAL)	4 (2-5)
P (Kruskal-Wallis Test)	P<0.001
P (Mann-Whitney Test)	1-3: <0.001 1-4: <0.001 2-3:< 0.001 2-4:<0.001

Veriler, median (min-max) olarak verilmiştir.

5. TARTIŞMA

Akut hepatit viruslar, toksik ajanlar, ilaçlar, alkol, çeşitli metabolik ve otoimmün hastalıklar gibi değişik nedenlere bağlı olarak meydana gelebilir ve bazen fulminan gidiş göstererek ölümlere neden olabilir. Hepatit B ve C virusları en önemli viral hepatit etkenleri olup tüm dünyada yaygın bir sağlık problemidir (1).

GAL'ın deney hayvanlarında neden olduğu karaciğer lezyonunun morfolojik ve patofizyolojik özelliklerinin, insan viral hepatitinekinden birçok açıdan benzediği bildirilmiştir (26). GAL hücrel üridin trifosfat konsantrasyonunu azaltmak suretiyle RNA ve protein sentezini inhibe ederek karaciğer hücre nekrozuna neden olmaktadır (2). GAL'ın sitotoksik etkisinde, endojen lipidlerin peroksidasyonunun major faktör olduğu gösterilmiştir (4). GAL'ın neden olduğu oksidatif hasarlanma, genellikle lipid peroksidasyonunun uyarıcısı ve hücre membranının yıkımının kaynağı olan hidroksil radikali (OH[•]) oluşumu ile ilişkili bulunmuştur (93). Sıçanlardaki GAL hepatitinde; SOD, CAT ve GSH-Px gibi antiperoksidatif enzim düzeylerinin azalmış olduğu da bildirilmiştir (94).

GAL direkt olarak mast hücrelerini aktive eder ve böylece mast hücrelerinden histamin salınmasına yol açar. Histamin de gastrointestinal traktın permeabilitesinde artışa neden olur (21). Gastrointestinal traktan salınan bakteriyel ürünler Kupffer hücrelerini aktive ederek bu hücrelerden in vivo GAL toksisitesinde çok önemli olan TNF- α gibi sitokinlerin salınmasına neden olur (22). GAL TNF- α ile ilgili hücre ölümüne neden olan sinyallerin aktivasyonuna karşı karaciğer hücrelerinin duyarlılığını artırarak mesenger RNA (mRNA) ve protein sentezini inhibe eder (23,24). Hücreler apoptoz yolu ile en erken 6 saat sonra ölmeye başlarlar. Sonra inflamatuvar hücreler karaciğer parankimine girerler ve daha sonra nekroz alanları ortaya çıkar. Literatürdeki veriler ışığında sonradan ortaya çıkan nekroz da apoptozise neden olan benzer mekanizmalar ile oluşmaktadır. Çünkü her iki mekanizma da Kupffer hücre aktivasyonuna ve TNF- α üretimine bağımlıdır (25).

CAPE, yapıca flavonoidlere benzeyen bal arısı propolisinin aktif bir bileşenidir. Yaklaşık olarak 10 μ mol/L konsantrasyonda in vitro şartlarda nötrofiller veya ksantin/ksantin oksidaz sistemi tarafından oluşturulan reaktif oksijen türlerini tamamen bloke ettiği bildirilmiştir (5). Yapılan birçok çalışmada CAPE'nin

antiinflamatuvar, sitostatik, antiviral, antibakteriyel, antifungal ve antioksidan özellikleri olduğu gösterilmiştir (6,7).

GAL'ın tetiklediği hepatit modelinde antioksidan özellikleri bilinen CAPE'nin koruyucu etkisi literatürde daha önce çalışılmamıştır. Ancak diğer deneysel hepatit modellerinde ve başka organların oksidatif stres durumlarında CAPE'nin koruyucu etkisi yaygın olarak araştırma konusu olmuştur.

Akut hepatitin sorunsuz olarak atlatılabilmesi için arayışlar sürmektedir. Bu çalışmada, insan virüs hepatitine histolojik olarak çok benzeyen GAL ile oluşturulan bir deneysel hepatit modelinde CAPE'nin etkinliğini araştırdık. CAPE'nin bu deneysel modelde, antioksidan özellikleri ve apoptozu modüle etmesi nedeniyle başarılı olabileceğini düşündük.

Çalışmamızda GAL alan gruplarda almayanlara göre histolojik olarak anlamlı derecede nekroz saptanması ve GAL grubunda Kontrol ve CAPE gruplarına göre AST ve ALT aktivitelerinde anlamlı derecede yükseklik saptanması GAL grubunda hepatotoksisite geliştiğini göstermektedir. CAPE+GAL grubu ile GAL grubu arasında histolojik açıdan anlamlı derecede farklılık olmaması CAPE'nin GAL'ın indüklediği hepatotoksisiteyi histolojik olarak azaltmadığını göstermektedir.

Pekmez ve ark. sigara dumanına maruz bırakılan ratlarda AST ve ALT aktivitelerindeki yüksekliğin CAPE ile anlamlı olarak azaldığını gösterilmişlerdir (95). Bizim çalışmamızda da CAPE+GAL grubunda ALT aktivitelerinin Kontrol ve CAPE gruplarına göre yüksek iken GAL grubuna göre anlamlı derecede düşük saptanması karaciğer fonksiyon testleri açısından CAPE'nin GAL hepatitinden kısmen koruyucu etkisinin olduğunu göstermektedir.

Daha önce bahsedildiği gibi oksidatif stres durumlarında nonenzimatik antioksidan GSH ve enzimatik antioksidanlar olan SOD, CAT ve GSH-Px düzeyleri azalırken lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA ve MPO düzeyleri artmaktadır.

Jajanus indicus bitkisinden elde edilen bir proteininin GAL hepatitinden koruyuculuğunun araştırıldığı bir çalışmada farelere 800 mg/kg dozunda 3 gün boyunca GAL verilmiş ve GAL verilen grupta SOD, CAT, GSH düzeylerinin kontrol grubuna göre azaldığı tespit edilmiştir. Bu bulgularla GAL'ın oksidatif hasarlanma

yaparak antioksidan savunmayı baskıladığı belirtilmiştir. Aynı çalışmada fare karaciğer dokusunda lipid peroksidasyonunun son ürünlerini saptamak için *thiobarbituric acid reactive substances* (TBARS) oluşumuna bakmışlar ve GAL grubunda TBARS'ı kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır. Bu çalışmada %99'unu MDA'nın oluşturduğu TBARS'ın bahsedilen protein ile azaldığı tespit edilmiştir (96). Ates ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada 3 gün boyunca soğuk stresine ($7\pm 1^{\circ}\text{C}$) maruz bırakılan ratların karaciğer dokusunda SOD, CAT, GSH-Px ve GSH düzeylerinde azalma ve MDA düzeylerinde artış saptamışlardır. Bahsedilen çalışmada soğuk stresi ile oluşan antioksidan enzimlerindeki azalmayı artmış ROS'a sekonder aşırı tüketime bağlamışlardır. Ayrıca CAPE tedavisi ile soğuk stresine bağlı antioksidan enzim düzeylerindeki azalmanın ve MDA düzeylerindeki artışın engellendiği bildirilmiştir. Bu çalışmada araştırmacılar CAPE'nin GSH sentetazı artırarak GSH'yı regüle etmiş olabileceğini düşünmüşlerdir (97).

Ratlarla yapılan bir başka çalışmada sisplatin (16 mg/gün) ile indüklenen karaciğer hasarında karaciğer dokusunda SOD, CAT, GSH-Px ve GSH düzeylerinin azaldığı MPO düzeylerinin arttığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada sisplatinin indüklediği hepatotoksisitede 6 gün boyunca her gün tek doz CAPE tedavisinden 12 saat sonra bakılan antioksidan enzim düzeylerinde anlamlı yükselmeler olduğu ve MPO düzeylerinde de anlamlı derecede azalma olduğu gösterilmiştir (98). Yılmaz ve ark. 7mg/kg tek doz sisplatin ile indüklenen hepatotoksisitede CAPE'nin koruyuculuğunu değerlendirdikleri çalışmada sisplatinin SOD enziminde azalmaya neden olduğunu saptamışlardır. Aynı çalışmada son CAPE tedavisinden 12 saat sonra CAT ve SOD enzim aktivitelerinde artış olduğunu göstermişler ve bu artışı CAPE'nin bu enzimlerin transkripsiyonel ve/veya translasyonel yollarını etkileyerek sağladığını speküle etmişlerdir (99).

Öktem ve ark. ratlara 4 hafta boyunca haftada 2 kez lityum (25 mg/kg) vererek oluşturdukları nefrotoksisitede böbrek dokusunda SOD, CAT, GSH-Px enzim aktivitelerini kontrol grubuna göre düşük bulmuşlar ve günde bir kez 4 hafta boyunca hergün verilen CAPE tedavisi ile azalmış olan bu antioksidan enzim düzeylerinde anlamlı artış saptamışlardır. Bu sonuçlarla Oktem ve ark. CAPE'nin lityumun indüklediği nefrotoksisitede tübüler hasar ve oksidatif strese karşı koruyucu olduğunu bildirmişlerdir (100).

Anti oksidan özelliği daha önceden bilinen Ganoderma Lucidum'un farelerde GAL hepatitinden koruyuculuğunun araştırıldığı bir çalışmada 750 mg/kg GAL verilen grupta karaciğer GSH ve SOD düzeyleri anlamlı olarak azalırken MDA düzeyleri artmıştır. Antioksidan Ganoderma Lucidum ile tüm bu değişen parametrelerin kontrol grubu ile benzer düzeylere geldiği görölmüştür (101). Antiinflamatuvar etkileri bilinen ve karbon tetraklorür hepatotoksisisine karşı koruyuculuğu daha önce kanıtlanmış olan Pinitolün GAL (650 mg/kg) hepatotoksisitesindeki koruyuculuğunun araştırıldığı bir çalışmada GAL enjeksiyonundan 12 saat sonra değerlendirildiğinde Pinitolün GAL hepatotoksisitesine bağlı karaciğer dokusundaki GSH ve CAT depleyosunu ve MDA artışını engellediği, bildirilmiştir (102). GAL (800 mg/kg) ile oluşturulan hepatotoksisite modelinde Lygodium flexuosumun hepatotoksisite oluşturulmadan önce ve sonra verilmesinin GAL ile azalan GSH düzeylerinde artış ve GAL ile artan MDA düzeylerinde azalma sağladığı gösterilmiştir (103). Diğer bir çalışmada diabetik ratların beyin dokusundaki GSH depleyosununun CAPE ile engellendiği bildirilmiştir (104). Rat deneylerinde lityum, metotreksat gibi çeşitli ajanlarla oksidatif stres oluşturulan gruplara kıyasla CAPE'nin koruyucu ilaç olarak verildiği gruplarda MDA seviyesinin anlamlı olarak düşük bulunduğu bildirilmiştir (105,106). Türkyılmaz ve ark. glikodeoksikolik asit ile yaptıkları akut nekrotizan pankreatit modelinde, CAPE tedavisinden 42 saat sonra akut nekrotizan pankreatite sekonder artan pankreas MPO ve MDA düzeylerinin azaldığını göstermişlerdir. (107). Benzer şekilde Fadillioglu ve ark. CAPE tedavisinin doksorubusinin indüklediği kardiyak hasarda MPO aktivitesini azalttığını saptamışlardır (108).

Bizim alışmamızda karaciğer dokusunda MDA düzeylerinin GAL grubunda Kontrol ve CAPE gruplarına göre anlamlı derecede yüksek olması ve SOD düzeyinin GAL grubunda CAPE gurubuna göre anlamlı derecede düşük olması GAL gurubunda oksidatif stresin arttığını göstermektedir. Karaciğer dokusunda MDA düzeylerinin CAPE+GAL grubunda Kontrol ve CAPE gruplarına göre anlamlı derecede yüksek iken GAL grubuna göre anlamlı derecede düşük olması ise GAL'ın karaciğerde yol açtığı oksidatif hasara karşı CAPE'nin kısmen koruyucu olduğunu göstermektedir.

Ek olarak her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı olmasa da GAL gurubunda GSH, CAT, SOD ve GSH-Px düzeylerinin kontrol gurubuna göre düşük olması ve

MPO düzeylerinin kontrol gurubuna göre yüksek olması GAL gurubunda oksidatif stresin arttığını göstermektedir. CAPE-GAL gurubunda ise yine istatistiksel olarak anlamlı olmasa da GAL gurubuna göre GSH, CAT ve SOD düzeylerinin yüksek ve MPO düzeylerinin düşük olması CAPE tedavisinin GAL'ın karaciğerde yol açtığı oksidatif hasara karşı kısmen koruyucu etkisinin olabileceğini düşündürmektedir.

TNF- α , aktive olmuş makrofajlar tarafından salgılanan, proinflamatuvar, pirojen, akut faz reaktanı bir sitokindir. Endotoksin, inflamatuvar olaylar, immün kompleksler, fiziksel hasar ve toksinler salınımını uyarmaktadır. Hepatotoksik ilaçların neden olduğu hepatosellüler hasar ve hücre nekrozunda TNF- α 'nın etkili olduğuna dair pek çok deneysel kanıt vardır. Proinflamatuvar sitokinlerin, özellikle TNF- α 'nın, akut fulminan hepatitte hücre yıkımında rol aldığı düşünülmektedir (109).

Bazı otörler, anti-TNF- α antikorumun GAL + Lipopolisakkarid (LPS)'in indüklediği fulminan karaciğer yetmezliğinde koruyucu etkisinin olduğunu ve mortaliteyi azalttığını göstermişlerdir (110). Pleotropik proinflamatuvar bir sitokin olan TNF- α , doku hasarına cevap olarak hızlı bir şekilde üretilir (111). Artmış TNF- α düzeyi histolojik hepatik nekroz ve artmış serum aminotransferaz aktiviteleri ile direkt olarak korele bulunmuştur (112).

Yoshida ve ark. glycyrrhizin'in LPS/GAL hepatitinden koruyuculuğunu araştırdıkları çalışmalarında, BALB/c farelerine 25 ng LPS ve 20 mg GAL verdikten 2 saat sonra serum TNF- α , IL-6, IL-10 ve IL-12 düzeylerinin maksimum seviyeye ulaştığını tespit etmişlerdir. 8 saat sonra ise TNF- α düzeyinin kontrol grubu ile anlamlı fark oluşturmayacak kadar düştüğünü tespit etmişlerdir (113). Bicyclolün koruyuculuğunun araştırıldığı bir çalışmada farelere 15 mikrog/kg LPS ve 800mg/kg GAL verilerek hepatit yapılmış, serum TNF- α 60. dakikada anlamlı derecede artmış (yaklaşık 100 pg/ml), 90. dakikada pik yapmış (yaklaşık 400 pg/ml), 6. saatte düzeyi düşmüştür (yaklaşık 50 pg/ml) (114).

Pinitolün GAL (650 mg/kg) hepatotoksitesinde koruyuculuğunun araştırıldığı ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada sadece GAL verilen grupta GAL verildikten 24 saat sonra serum TNF- α düzeyi Kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştır (102). Benzer şekilde yeşil çayın GAL hepatitinden koruyuculuğunun araştırıldığı ratlarda yapılan bir çalışmada 500 mg/kg GAL verilen grupta karaciğer dokusunda *reverse transkriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR) yöntemi ile çalışılan TNF- α

mRNA ekspresyonunun GAL verildikten 24 saat sonra arttığı gösterilmiştir (115). Ratlarda GAL'ın (800 mg/kg) indüklediği hepatite karşı L-alanin, L-glutamin, L-serin, L-glutamik asitin koruyuculuğunun araştırıldığı bir çalışmada GAL verilen grupta serum TNF- α GAL verildikten sonra 8. saatte yüksek saptanmış ve 24. saatte bu yükseklik devam etmiştir (116).

Sermon ve ark. sitokinlerin etkisini araştırdıkları deneysel alkolik hepatit modelinde hem alkol ile sensitize edilen grupta hem de GAL (1g/kg) verilen fare grubunda serum TNF- α seviyesini GAL enjeksiyonundan 24 saat sonra saptanabilir düzeyde bulamamışlardır. Bununla birlikte etanol öntedavisi + GAL grubunda karaciğerde dokusunda TNF- α mRNA ekspresyonunda artış tespit edilmiştir. Araştırmacılar çok az düzeylerde de olsa, GAL ile sensitize edildikten sonra hücre hasarına neden olabilecek intrahepatik TNF- α 'nın salınmış olabileceğini ama bu kadar düşük seviyelerinin şu an kullanımda olan yöntemlerle tespit edilememiş olabileceğini speküle etmişlerdir (117).

Liu ve ark, bir nükleer import inhibitörünün stafilokokkal enterotoksin B'nin indüklediği toksisiteye karşı koruyuculuğunu araştırdıkları çalışmada, BALB/c farelerine 20 mg GAL vermişler ve 0.5, 1.5, 4 ve 6. saatlerde plazma sitokinlerini çalışmışlardır. Bu çalışmada SEB ve GAL enjeksiyonu 90. dakikada pik yapan hızlı bir plazma TNF alfa artışına neden olmuştur. Zıt olarak sadece GAL verildiğinde herhangi bir etki saptanmamıştır. Bu sonuca dayanarak bu inflamatuvar yanıtın kaynağının SEB'e bağlı olduğu yorumunu yapmışlardır (118).

Bir TLR-3 agonisti olan *Polyinosinic-polycytidylic acid* [poly(I:C)]'in GAL ile sensitize edilen farelerde etkilerini araştıran bir çalışmada poly(I:C) ile poly(I:C) + GAL'ın TNF- α üretimleri karşılaştırılmış ve anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Bu sonucun GAL'ın serum TNF- α konsantrasyonu üzerine etkisinin olmadığı fikrini güçlendirdiğini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada TNF- α ya da onun reseptörünün yokluğunda GAL ile sensitize edilen farelerde poly(I:C)'nin karaciğer hasarı oluşturmadığını göstermişlerdir. Sonuç olarak GAL ile sensitize edilen farelere poly(I:C) verilmesi ile oluşan letal hepatit oluşumunun tamamen TNF ile ilişkili olduğunu düşünmüşlerdir (119).

Biz çalışmamızda karaciğer dokusunda TNF- α düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık saptamadık. Literatürdeki veriler değerlendirildiğinde

sadece GAL ile yapılan hepatotoksisitede her ne kadar 2 kaynakta (102, 116) 24. saatte serum TNF- α düzeyleri Kontrol grubuna göre yüksek saptanmışsa da literatürde karaciğer dokusunda GAL enjeksiyonundan 24 saat sonra TNF- α ölçümleri bildirilmemiştir. Özellikle LPS/GAL modeli hepatitlerde (114,113) açıkça görüldüğü gibi serum TNF- α seviyesi ilk 1-2 saatte pik yapıp 6-8 saatlerde kontrol gruplarıyla benzer değerlere inmektedir. Bizim çalışmamızda da sadece GAL kullanılmakla beraber erken saatlerde artmış olan karaciğer dokusundaki TNF- α düzeyi 24. saatte gerilemiş olabilir. Bir diğer ihtimal de literatürde bazı çalışmaların toksik madde ve toksik madde + GAL grupları arasında TNF- α düzeyinin farklılık göstermemesi ile destekledikleri gibi GAL hepatitinde TNF- α 'nın etkisi olmayabilir (118,119).

İL-10 primer olarak T hücreleri ve aktive makrofajlardan salınan multifonksiyonel esansiyel antiinflamatuvar bir sitokindir. İlk olarak T hücreleri, monositler ve makrofajların aktivasyonunu ve efektör fonksiyonlarını baskılayabilme özellikleri ile tanınmıştır (120). İL-10'un asetaminofen toksisitesine karşı NO ve İNOS yapımını kontrol ederek koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (121).

Asetaminofen toksisitesinde artmış proinflamatuvar sitokinlerin toksisiteye katkıda bulunabileceği ve bunların İL-10 gibi antiinflamatuvar sitokinler tarafından regüle edildiği düşünülmüştür (122). LPS (16 μ g/kg)/GAL (400 mg/kg) hepatit modelinin kullanıldığı bir rat çalışmasında Na/H exchanger inhibitörü olan FR183998'in proinflamatuvar sitokinleri azaltarak ve antiinflamatuvar olan İL-10'u artırarak karaciğer hücrelerini hasardan koruduğunu ve bu etkinin en azından bir kısmının İL-10 artışına bağlı olduğunu düşünmüşlerdir (123). Benzer olarak nötrofil elastaz inhibitörünün LPS/GAL hepatit modelinde koruyuculuğunu araştıran bir çalışmada nötrofil elastaz inhibitörünün koruyuculuğu gösterilmiş ve bu etkinin bir kısmının nötrofil elastaz inhibitörünün İL-10'u artırıcı etkisine bağlı olabileceğini bildirmişlerdir(124).

Sermon ve arkadaşlarının yaptığı deneysel alkolik hepatit modelinde de yalnız GAL verilen grupta İL-10 seviyelerini 24. saatte kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek tespit etmişlerdir (117).

CAPE'nin beyin dokusunda streptozosin ile oluşturulan diyabete sekonder gelişen inflamasyon ve oksidatif stresi azalttığı gösterildiği bir çalışmada ise hem

diyabet grubunda hem de diyabet + CAPE tedavi grubunda İL-10 mRNA ekspresyonu tespit edilebilir seviyelerde bulunmamıştır (85). CAPE'nin sepsisin indüklediği akciğer hasarındaki koruyuculuğunun araştırıldığı bir çalışmada CAPE'nin İL 10 düzeyini etkilemediği gösterilmiştir (125).

Bizim çalışmamızda karaciğer dokusunda İL-10 düzeylerinin GAL ve CAPE+GAL gruplarında Kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olarak saptanması GAL'ın indüklediği hepatotoksitede proinflamatuvar sitokinlere reaksiyon olarak İL-10'un arttığını düşündürmektedir. CAPE+GAL grubu ile GAL grubu arasında karaciğer dokusunda İL-10 düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık olmaması CAPE'nin İL 10 düzeyini etkilemediğini göstermektedir.

6. SONUÇ

Tek doz 1 gr/kg GAL ratların karaciğer dokusunda biyokimyasal ve histopatolojik olarak hepatosellüler hasara yol açmaktadır. GAL enjeksiyonu, LPO'nun son ürünü ve oksidatif stresin iyi bir göstergesi olan MDA seviyesini yükseltmektedir. CAPE, GAL hepatitindeki MDA ve ALT yükselmelerini kısmen önlemekle birlikte, histolojik olarak koruyucu etkisi saptanmamıştır.

7. ÖZET

AMAÇ: Bu çalışmada, sıçanlarda D-galaktozamin (GAL) ile oluşturulan karaciğer hepatotoksisitesinde caffeic acid phenethyl ester (CAPE)'in koruyucu etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOD: Çalışmamıza 32 erkek Wistar-albino rat alınarak, her grupta 8 rat olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. 3 gün boyunca Kontrol ve GAL gruplarına serum fizyolojik, CAPE ve CAPE+GAL gruplarına 10 µmol/kg/gün CAPE intraperitoneal (i.p.) olarak verildi. Üçüncü CAPE enjeksiyonundan 1 saat sonra GAL ve CAPE+GAL gruplarına 1gr/kg dozunda GAL i.p. olarak verildi. 24 saat sonra ratların yaşamlarına son verilerek laparotomi yapıldı ve karaciğerleri çıkarıldı. Karaciğer dokusu histolojik olarak değerlendirildi, doku düzeyinde malondialdehit (MDA), glutatyon, TNF-α ve İL-10 düzeyleri ile süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve myeloperoksidaz (MPO) aktiviteleri ölçüldü. Ayrıca inferior vena cava'dan alınan kan örneklerinden elde edilen serumda AST, ALT ve ALP aktivitelerine bakıldı.

BULGULAR: 1gr/kg dozunda i.p. olarak verilen GAL ile tüm sıçanlarda histolojik ve biyokimyasal olarak akut karaciğer hasarı gözlemlendi. Akut karaciğer hasarının biyokimyasal parametreleri ve karaciğer dokusunda MDA düzeyleri GAL grubunda anlamlı olarak yüksek saptandı. ALT ve MDA düzeyleri CAPE+GAL grubunda GAL grubuna göre anlamlı derecede daha düşük saptandı (sırasıyla $p<0,05$ ve $p<0,01$). Glutatyon, SOD, CAT ve GSH-Px enzim düzeylerinde GAL grubu ile CAPE+GAL grubu arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı. Histolojik olarak GAL ve CAPE+GAL gruplarındaki hasarlanma skorları farklı değildi.

SONUÇ: GAL ile oluşturulan hepatit modelinde, daha önceki çalışmalarda antioksidan özelliği bildirilen CAPE'nin biyokimyasal parametreleri kısmen iyileştirmesine karşın histolojik düzeyde koruyucu etkisinin olmadığı görülmektedir.

Anahtar kelimeler: Kafeik asit fenetil ester (CAPE), Hepatotoksisite, Oksidatif stres, D-galaktozamin

8. SUMMARY

AIM: Investigation of the possible protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on the D-galactosamine (GAL) induced hepatotoxicity.

MATERIALS AND METHODS: Thirty two male Wistar rats were randomly divided into four groups. All 4 groups contained 8 rats in each group. Control and GAL groups were received serum saline; and CAPE+GAL and CAPE groups were received 10 $\mu\text{mol/kg/day}$ CAPE intraperitoneally (i.p.) for three days. In third day, one hour after CAPE or saline injections, CAPE+GAL and GAL groups were received 1g/kg i.p. GAL. Twenty-four hours later all animals were sacrificed, laparotomy was performed and liver tissues were taken. Liver tissue samples were histologically evaluated. Malonyldialdehyde (MDA), glutation, TNF- α and IL-10 levels were measured in liver tissue. Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) and myeloperoxidase (MPO) enzyme activities were also analyzed in liver tissue. AST, ALT and ALP activities were analyzed in serum which obtained from vena cava inferior.

RESULTS: Dose of 1gr/kg i.p. GAL caused to acute hepatic damage histologically and biochemically in all rats. Biochemical parameters of acut hepatic damage and MDA levels of liver tissue were significantly increased in GAL group. ALT and MDA levels were detected significantly more lower in CAPE+GAL group than GAL group (respectively; $p < 0,05$ ve $p < 0,01$). Glutation, SOD, CAT and GSH-Px enzyme levels were not significantly different between GAL and CAPE+GAL groups. CAPE and CAPE+GAL groups were not significantly different histologically.

CONCLUSION: It was shown that although CAPE has ameliorating effects according to biochemical markers, it has no protective effect histologically on GAL induced hepatitis.

Key words: Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), Hepatotoxicity, Oxidative stress, D-galactosamine

8-KAYNAKLAR

1. Guicciardi ME and G J Gores. Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut* 2005;54;1024-1033
2. Keppler D, Lesch R, Reutter W, Decker K. Experimental hepatitis induced by D-galactosamine. *Exp Mol Pathol* 1968;9: 279-290.
3. Newsome PN, Plevris JN, Nelson LJ, Hayes PC. Animal models of fulminant hepatic failure: a critical evaluation. *Liver Transplantation*, Vol 6, No 1 (January), 2000: pp 21-31
4. Sakaguchi S, Yokota K. Role of Ca²⁺ on endotoxin-sensitivity by galactosamine challenge: lipid peroxide formation and hepatotoxicity in zymosan-primed mice. *Pharmacol Toxicol.* 1995 Aug;77(2):81-6.
5. Sud'ina GF, Mirzoeva OK, Pushkareva MA, Korshunova GA, Sumbatyan NV, Varfolomeev SD. Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. *FEBS Lett.* 1993 Aug 23;329(1-2):21-4.
6. Pascual C., Gonzalez R. and Torricella R. G. Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. *Journal of Ethnopharmacology*, Volume 41, Issues 1-2, January 1994, Pages 9-13
7. Dobrowolski JW, Vohora SB, Sharma K, Shah SA, Naqvi SA, Dandiya PC. Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *J Ethnopharmacol.* 1991 Oct;35(1):77-82.
8. O'Grady JG, Schalm SW, Williams R. Acute liver failure: redefining the syndromes. *Lancet* 1993;342:273-5.
9. Ostapowicz G, Fontana RJ, Schiodt FV, Larson A, Davern TJ, Han SH et al. Results of prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Ann Intern Med* 2002;137:947-54.
10. Mas A, Rodes J. Fulminant hepatic failure. *Lancet* 1997;349:1081-5.
11. Rakela J, Lange SM, Ludwig J, Baldus WP. Fulminant hepatitis: Mayo Clinic experience with 34 cases. *Mayo Clin Proc* 1985;60:289-292.
12. Bernal B. Changing patterns of causation and the use of transplantation in the United Kingdom. *Semin Liver Dis* 2003;23:227-37.
13. O'Grady J. Acute liver failure. *Postgrad. Med. J.* 2005;81;148-154.
14. Hoofnagle JH, Lindsay KL, Acute Viral Hepatitis; Lee WM., Schiodt FV. Toxic and Drug-induced Liver Disease, Cecil Textbook of Medicine edited by Lee Goldman, Dennis Ausiello. 22 nd Edition. 2004; 906-917
15. Nathan M. Bass, MD, PhD. Çeviri: Dr. Nur Arslan, Dr. Benal Büyükgebiz. İlaça Bağlı Karaciğer Hastalığı, *Current Gastroenteroloji.* 2007; 664

16. John L. Farber, MD, Gretchen Gill and Yoichi Konishi, MD Prevention of Galactosamine-Induced Liver Cell Necrosis by Uridine Am J Pathol 1973; 72:53-62,
17. Samir K. El-Mofty, DDS, Michael C. Scrutton, PhD, Ada Serroni, BS, Claudio Nicolini, PhD and John L. Farber, MD Early, Reversible Plasma Membrane Injury in Galactosamine-Induced Liver Cell Death Am J Pathol 1975; 79:579-596,
18. Decker, K. and Keppler, D. Galactosamine induced liver injury. Prog. Liver Dis. 1972; 4: 183–199.
19. Tsutsui S, Itagaki S, Kawamura S, Harada K, Karaki H, Doi K, Yoshikawa Y. D-galactosamine induced hepatocyte apoptosis is inhibited in vivo and in cell culture by a calcium calmodulin antagonist, chlorpromazine, and a calcium channel blocker, verapamil. Exp Anim. 2003 Jan;52(1):43-52.
20. Thomas, C.E. and Reed, D.J. Current status of calcium in hepatocellular injury. Hepatology 1989; 10: 375–384.
21. Liehr H, Grun M, Seeling H. On the pathogenesis of galactosamine hepatitis. Virchows Arch B Cell Pathol. 1978;26:331-335.
22. Kasravi FB, Wang L, Wang X, Molin G, Bengmark S, Jeppsson B. Bacterial translocation in acute liver injury induced by D-galactosamine. Hepatology 1996;23:97-103.
23. Keppler D, Decker K. Studies on the mechanism of galactosamine hepatitis: accumulation of galactosamine-1-phosphate and its inhibition of UDP-glucose pyrophosphorylase. Eur J Biochem. 1969;10:219-225.
24. Leist M, Gantner F, Bohlinger I, Germann PG, Tiegs G, Wendel A. Murine hepatocyte apoptosis induced in vitro and in vivo by TNF- α requires transcriptional arrest. J Immunol 1994;153:1778-1788.
25. Stachlewitz RF, Seabra V, Bradford B, Bradham CA, Rusyn I, Germolec D, Thurman RG. Glycine and Uridine Prevent D-Galactosamine Hepatotoxicity in the Rat: Role of Kupffer Cells. Hepatology 1999;29:737-745.
26. Jonker AM, Dijkhuis FWJ, Kroese FGM, Hardonk MJ, Grond J. Immunopathology of acute galactosamine hepatitis in rats. Hepatology 1990;11:622-627.
27. Zimmerman HJ. Hepatotoxicity: The Adverse Effects of Drugs and Other Chemicals on the Liver. New York: Appleton-Century-Crofts, 1978
28. Decker K, Keppler D. Galactosamine hepatitis: key role of the nucleotide deficiency period in the pathogenesis of cell injury and cell death. Rev Physiol Biochem Pharmacol 1974;71:78-106.
29. Ledda-Columbano GM, Coni P, Curto M, Giacomoni L, Faa G, Oliverio S, Piacentini M, et al. Induction of two different modes of cell death, apoptosis and necrosis, in rat liver after a single dose of thioacetamide. Am J Pathol 1991;139:1099-1109.
30. Pritchard DJ, Butler WH. Apoptosis—the mechanism of cell death in dimethylnitrosamine-induced hepatotoxicity. J Pathol 1989;158:253-260.

31. Leist M, Ganter F, Bohlinger I, Tiegs G, Germann PG, Wendel A. Tumor necrosis factor-induced hepatocyte apoptosis precedes liver failure in experimental murine shock models. *Am J Pathol* 1995;146:1220-1234.
32. Leist M, Gantner F, Naumann H, Bluethmann H, Vogt K, Brigelius-Flohe R, Nicotera P, et al. Tumor necrosis factor-induced apoptosis during poisoning of mice with hepatotoxins. *Gastroenterology* 1997;112:924-935.
33. Decker K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem* 1990;192:245-261.
34. Gerschman, R., Gilbert, D. L., Nye, S. W., Dwyer, P., & Fenn, W.O. Oxygen poisoning and x-irradiation—A mechanism in common. *Science* 1954; 119, 623–626.
35. Harman, D. Aging—A theory based on free-radical and radiation-chemistry. *J. Gerontol.* 1956; 11, 298–300.
36. McCord, J. M., & Fridovich, I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J. Biol. Chem.* 1969; 244, 6049–6055.
37. Mittal CK, Murad F. Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Oct;74(10):4360-4.
38. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84.
39. Valko M, Rhodes C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 2006; 160, 1–40.
40. Kovacic, P., & Jacintho, J. D. Mechanisms of carcinogenesis: Focus on oxidative stress and electron transfer. *Curr. Med. Chem.* 2001;8, 773–796.
41. Ridnour, L. A., Isenberg, J. S., Espey, M. G., Thomas, D. D., Roberts, D. D., & Wink, D. A. Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005; 102, 13147–13152.
42. Dröge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 2002; 82, 47–95.
43. Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine* (3rd ed.). Oxford University Press.
44. Miller, D.M., Buettner, G. R., & Aust, S. D. Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions. *Free Radic. Biol. Med.* 1990; 8, 95–108.
45. Valko, M., Morris, H., & Cronin, M. T. D. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 2005;12, 1161–1208.
46. Cadenas, E., & Sies, H. The lag phase. *Free. Radic. Res.* 1998; 28, 601–609.
47. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes C. J., & Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem.* 2004; 266, 37–56.

48. Pastor N., Weinstein H., Jamison E., & Brenowitz M. A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. *J. Mol. Biol.* 2000; 304, 55–68.
49. Liochev, S. I., & Fridovich, I. The Haber–Weiss cycle—70 years later: An alternative view. *Redox Rep.* 2002 7, 55–57.
50. De Grey AD. HO₂*: the forgotten radical. *DNA Cell Biol.* 2002 Apr;21(4):251-7.
51. Aikens, J., & Dix, T. A. Perhydroxyl radical (HOO•) Initiated lipid-peroxidation The role of fatty-acid hydroperoxides. *J. Biol. Chem.* 1991; 266, 15091–15098.
52. Borges, F., Fernandes, E., & Roleira, F. Progress towards the discovery of xanthine oxidase inhibitors. *Curr. Med. Chem.* 2002; 9, 195–217.
53. Vorbach, C., Harrison, R., & Capecchi, M. R. Xanthine oxidoreductase is central to the evolution and function of the innate immune system. *Trends Immunol.* 2003; 24, 512–517.
54. DeCoursey, T. E., & Ligeti, E. Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *Cell. Mol. Life Sci.* 2005; 62, 2173–2193.
55. Siems, W. G., Grune, T., & Esterbauer, H. 4-Hydroxynonenal formation during ischemia and reperfusion of rat small-intestine. *Life Sci.* 1995; 57, 785–789.
56. Fedtke, N., Boucheron, J. A., Walker, V. E., & Swenberg, J. A. Vinyl chloride-induced DNA adducts. 2. Formation and persistence of 7-2'-oxoethylguanine and n2,3-ethenoguanine in rat-tissue DNA. *Carcinogenesis* 1990;11, 1287–1292.
57. Mao, H., Schnetz-Boutaud, N. C., Weisenseel, J. P., Marnett, L. J., & Stone, M. P. Duplex DNA catalyzes the chemical rearrangement of a malondialdehyde deoxyguanosine adduct. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999; 96, 6615–6620.
58. Stadtman, E. R. Role of oxidant species in aging. *Curr. Med. Chem.* 2004; 11, 1105–1112.
59. Dalle-Donne, I., Scaloni, A., Giustarini, D., Cavarra, E., Tell, G., Lungarella, G., et al. Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: The contribution of redox proteomics. *Mass Spectrom. Rev.* 2005; 24, 55–99.
60. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkiler. *Mimoza Yayınları, Konya.* 1995; 1-132.
61. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 7915-7922.
62. Miquel J, Ramirez-Bosca A, Ramirez-Bosca JV, Alperi JD. Menopause: A review on the role of oxygen stress and favorable effects of dietary antioxidants. *Arch Gerontol Geriatr* 2006; 42: 289-306.
63. Halliwell B. Tell me about free radicals, doctor: a review. *J R Soc Med* 1989; 82: 747-752.
64. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem* 2004; 37: 112-119.

65. Misso NL, Brooks-Wildhaber J, Ray S, Vally H, Thompson PJ. Plasma concentrations of dietary and nondietary antioxidants are low in severe asthma. *Eur Respir J* 2005; 26: 257-264
66. Fedeli D, Falcioni G, Olek RA, Massi M, Cifani C, Polidori C, Gabbianelli R. Protective effect of ethyl pyruvate on msP rat leukocytes damaged by alcohol intake. *J Appl Toxicol.* 2007 Nov-Dec;27(6):561-70.
67. Wright CE, Tallan HH, Lin YY. Taurine, biological update. *Annu. Rev. Biochem* 1986; 55: 427-453
68. Cooke MS, Olinski R, Evans MD. Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? *Clin Chim Acta* 2006; 365: 30-49.
69. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology* 2003; 189: 41-54
70. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer RF, Limson J, Weintraub ST, Qi WB. Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin transformation. *Free Rad Biol Med* 2000; 29: 1177-85.
71. Gilbert DL, Colton CA. *Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Interdisciplinary Approach.* Kluwer Academic Publishers, 2002.
72. Halliwell B. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase: solutions to the problem of lung with oxygen. *New Phyto* 1974; 73: 1075-1086.
73. Von Sonntag C. *Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2006
74. Dat J, Vandenberghe S, Vranova E, Van Montagu M, Inze D, Van Breusegem F. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57: 779-795.
75. Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS* 2007; 115: 81-103.
76. Seven A, Candan G. Antioksidant defense systems. *Cerrahpasa J Med.* 1996; 27: 41-50.
77. Borrelli F, Maffia P, Pinto L, Ianaro A, Russo A, Capasso F, Ialenti A. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia* 2002;73: 53-63.
78. Castaldo S, Capasso F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia* 2002;73: 1-6.
79. Wang X, Bowman PD, Kervin SM, Stavchansky S. Stability of caffeic acid phenethyl ester and its fluorinated derivative in rat plasma. *Biomed Chromatogr* 2007; 21: 343-350.
80. Russo A, Longo R, Vanella A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia* 2002; 73: 21-29.
81. Jaiswal AK, Venugopal R, Mucha J, Carothers AM, Grunberger D. Caffeic acid phenethyl ester stimulates human antioxidant response element-mediated expression of the NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) gene. *Cancer Res* 1997; 57: 440-446.

82. Huang MT, Ma W, Yen P, Xie JG, Han J, Frenkel K, Grunberger D, Conney AH. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion in mouse skin and the synthesis of DNA, RNA and protein in HeLa cells. *Carcinogenesis* 1996;17: 761-765
83. Son S, Lobkowsky EB, Lewis BA. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): synthesis and X-ray crystallographic analysis. *Chem Pharm Bull* 2001; 49: 236-238.
84. Natarajan K, Singh S, Burke TR Jr, Grunberger D, Aggarwal BB. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Aug 20;93(17):9090-5.
85. Yilmaz HR, Uz E, Yucel N, Altuntas I, Ozcelik N. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat liver. *J Biochem Mol Toxicol* 2004; 18: 234-238.
86. Gokalp O, Uz E, Cicek E, Yilmaz HR, Ozer MK, Altunbas A, Ozcelik N. Ameliorating role of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) against isoniazid-induced oxidative damage in red blood cells. *Mol Cell Biochem* 2006; 290: 55-59.
87. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
88. 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 Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2005 Nov 15;827(1):76-82.
89. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-500.
90. Aebi H. Catalase In: Bergmeyer U, ed. *Methods of enzymatic analysis*. New York and London: Academic Press, 1974; 673-677.
91. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-169.
92. Ishak K, A. Baptista, L. Bianchi. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *Journal of Hepatology*, 1995; 22; 696-9
93. Barry H & Gutteridge JMC, In: Barry H (Ed) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Clarendon Press, Oxford 1989; 254-255.
94. Neihörster M, Inoue M, Wendel A. A link between extracellular reactive oxygen and endotoxin-induced release of tumour necrosis factor alpha in vivo. *Biochem Pharmacol*. 1992 Mar 3;43(5):1151-4.
95. Pekmez H, Kus I, Colakoglu N, Ogeturk M, Ozyurt H, Turkoglu AO, Sarsilmaz M. The protective effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) against liver damage induced by cigarette smoke inhalation in rats. *Cell Biochem Funct*. 2007 Jul-Aug;25(4):395-400.
96. Manna P, Sinha M, Sil PC. Galactosamine-induced hepatotoxic effect and hepatoprotective role of a protein isolated from the herb *Cajanus indicus* L in vivo. *J Biochem Mol Toxicol*. 2007;21(1):13-23.

97. Ates B, Dogru MI, Gul M, Erdogan A, Dogru AK, Yilmaz I, Yurekli M, Esrefoglu M. Protective role of caffeic acid phenethyl ester in the liver of rats exposed to cold stress. *Fundam Clin Pharmacol*. 2006 Jun;20(3):283-9.
98. Iraz M, Ozerol E, Gulec M, Tasdemir S, Idiz N, Fadillioglu E, Naziroglu M, Akyol O. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) administration on cisplatin-induced oxidative damage to liver in rat. *Cell Biochem Funct*. 2006 Jul-Aug;24(4):357-61.
99. Yilmaz HR, Sogut S, Ozyurt B, Ozugurlu F, Sahin S, Isik B, Uz E, Ozyurt H. The activities of liver adenosine deaminase, xanthine oxidase, catalase, superoxide dismutase enzymes and the levels of malondialdehyde and nitric oxide after cisplatin toxicity in rats: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Toxicol Ind Health*. 2005 May;21(3-4):67-73.
100. Oktem F, Ozguner F, Sulak O, Olgar S, Akturk O, Yilmaz HR, Altuntas I. Lithium-induced renal toxicity in rats: protection by a novel antioxidant caffeic acid phenethyl ester. *Mol Cell Biochem*. 2005 Sep;277(1-2):109-15
101. Shi Y, Sun J, He H, Guo H, Zhang S. Hepatoprotective effects of *Ganoderma lucidum* peptides against D-galactosamine-induced liver injury in mice. *J Ethnopharmacol*. 2008 May 22;117(3):415-9. Epub 2008 Feb 23.
102. Zhou Y, Park CM, Cho CW, Song YS. Protective effect of pinitol against D-galactosamine-induced hepatotoxicity in rats fed on a high-fat diet. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2008 Jul;72(7):1657-66.
103. Wills PJ, Asha VV. Protective effect of *Lygodium flexuosum* (L.) Sw. (Lygodiaceae) against D-galactosamine induced liver injury in rats. *J Ethnopharmacol*. 2006 Nov 3;108(1):116-23. Epub 2006 May 22.
104. Celik S, Erdogan S. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects brain against oxidative stress and inflammation induced by diabetes in rats. *Mol Cell Biochem*. 2008 May;312(1-2):39-46.
105. Sahin O, Sulak O, Yavuz Y, Uz E, Eren I, Ramazan Yilmaz H, Malas MA, Altuntas I, Songur A. Lithium-induced lung toxicity in rats: the effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE). *Pathology* 2006; 38: 58-62.
106. Uzar E, Sahin O, Koyuncuoglu HR, Uz E, Bas O, Kilbas S, Yilmaz HR, Yurekli VA, Kucuker H, Songur A. The activity of adenosine deaminase and the level of nitric oxide in spinal cord of methotrexate administered rats: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Toxicology* 2006; 218: 125-133.
107. Turkyilmaz S, Alhan E, Ercin C, Kural Vanizor B, Kaklikkaya N, Ates B, Erdogan S, Topaloglu S. Effects of caffeic acid phenethyl ester on pancreatitis in rats. *J Surg Res*. 2008 Mar;145(1):19-24.
108. Fadillioglu E, Oztas E, Erdogan H, Yagmurca M, Sogut S, Ucar M, Irmak MK. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester on doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *J Appl Toxicol*. 2004 Jan-Feb;24(1):47-52.
109. Felver ME, Mezey E, McGuire M, Mitchell MC, Herlong HF, Veech GA, Veech RL. Plasma tumor necrosis factor alpha predicts decreased long-term survival in severe alcoholic hepatitis. *Alcohol Clin Exp Res*. 1990; 14(2): 255-9

- 110.Morikawa A, Sugiyama T, Kato Y, Koide N, Jiang GZ, Takahashi K, et al. Apoptotic cell death in the response of Dgalactosamine- sensitized mice to lipopolysaccharide as an experimental endotoxic shock model. *Infect Immun*. 1996; 64: 734–738.
- 111.Brouckaert P, Fiers W. Tumor necrosis factor and the systemic inflammatory response syndrome. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1996;216:167–187.
- 112.Brucoleri A, Gallucci R, Germolec DR, Blackshear P, Simeonova P, Thurman RG, et al. Induction of early-immediate genes by tumor necrosis factor alpha contribute to liver repair following chemical-induced hepatotoxicity. *Hepatology*. 1997; 25: 133–141.
- 113.Yoshida T, Abe K, Ikeda T, Matsushita T, Wake K, Sato T, Sato T, Inoue H. Inhibitory effect of glycyrrhizin on lipopolysaccharide and d-galactosamine-induced mouse liver injury. *Eur J Pharmacol*. 2007 Dec 8;576(1-3):136-42.
- 114.Wang H, Li Y. Protective effect of bicyclol on acute hepatic failure induced by lipopolysaccharide and D-galactosamine in mice. *Eur J Pharmacol*. 2006 Mar 18;534(1-3):194-201. Epub 2006 Feb 20.
- 115.Abe K, Ijiri M, Suzuki T, Taguchi K, Koyama Y, Isemura M. Green tea with a high catechin content suppresses inflammatory cytokine expression in the galactosamine-injured rat liver. *Biomed Res*. 2005 Oct;26(5):187-92.
- 116.Komano T, Yokoyama Funakoshi R, Egashira Y, Sanada H. Mechanism of the suppression against D: -galactosamine-induced hepatic injury by dietary amino acids in rats. *Amino Acids*. 2008 Jul 20. [Epub ahead of print]
- 117.Sermon F, Le Moine O, Gustot T, Quertinmont E, Louis H, Nagy N, Degraef C, Devière J. Chronic alcohol exposure sensitizes mice to galactosamine-induced liver injury through enhanced keratinocyte chemoattractant and defective IL-10 production. *J Hepatol*. 2003 Jul;39(1):68-76.
- 118.Liu D, Liu XY, Robinson D, Burnett C, Jackson C, Seele L, Veach RA, Downs S, Collins RD, Ballard DW, Hawiger J. Suppression of Staphylococcal Enterotoxin B-induced Toxicity by a Nuclear Import Inhibitor. *J Biol Chem*. 2004 Apr 30;279(18):19239-46.
- 119.Dejager L, Libert C. Tumor necrosis factor alpha mediates the lethal hepatotoxic effects of poly(I:C) in D-galactosamine-sensitized mice. *Cytokine*. 2008 Apr;42(1):55-61. Epub 2008 Mar 10.
- 120.Kenneth G.-J. Ooi, Grazyna Galatowicz, Virginia L. Calder, and Susan L. Lightman Cytokines and Chemokines in Uveitis – Is there a Correlation with Clinical Phenotype? *Clin. Med. Res.*, Dec 2006; 4: 294 - 309.
- 121.Bourdi M, Masubuchi Y, Reilly TP, Amouzadeh HR, Martin JL, George JW, Shah AG, Pohl LR. Protection against acetaminophen-induced liver injury and lethality by interleukin 10: role of inducible nitric oxide synthase. *Hepatology*. 2002 Feb;35(2):289-98.
- 122.James LP, Mayeux PR, Hinson JA Acetaminophen-induced hepatotoxicity.*Drug Metab Dispos*. 2003 Dec;31(12):1499-506.

123. Tanaka H, Uchida Y, Kaibori M, Hijikawa T, Ishizaki M, Yamada M, Matsui K, Ozaki T, Tokuhara K, Kamiyama Y, Nishizawa M, Ito S, Okumura T. Na⁺/H⁺ exchanger inhibitor, FR183998, has protective effect in lethal acute liver failure and prevents iNOS induction in rats. *J Hepatol.* 2008 Feb;48(2):289-99.
124. Uchida Y, Kaibori M, Hijikawa T, Ishizaki M, Ozaki T, Tanaka H, Matsui K, Tokuhara K, Kwon AH, Kamiyama Y, Okumura T. Protective effect of neutrophil elastase inhibitor (FR136706) in lethal acute liver failure induced by D-galactosamine and lipopolysaccharide in rats. *J Surg Res.* 2008 Mar;145(1):57-65.
125. Fidan H, Sahin O, Yavuz Y, Kilbas A, Cetinkaya Z, Ela Y, Ozen OA, Altuntas I. Caffeic acid phenethyl ester reduces mortality and sepsis-induced lung injury in rats. *Crit Care Med.* 2007 Dec;35(12):2822-9.