

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI**

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Gülbin ÜNSAL

**ASETAMİNOFEN İLE OLUŞTURULAN TOKSİK
HEPATİTTE RHEİN'İN ETKİLERİ**

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Cumhur Tarık YAYLA

EDİRNE-2013

TEŐEKKÖR

Uzmanlık eğitimim süresince ve tezimin hazırlanması sırasında değerli katkılarını esirgemeyen Gastroenteroloji Bilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Gülbin ÜNSAL'a, bilgi ve deneyimleriyle eğitim sürecime katkıda bulunan bütün hocalarıma, Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Nurettin AYDOĞDU'ya, Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ufuk USTA'ya, Biyoistatistik Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Necdet SÖT'e, tezimin hazırlanması sürecinde yardım ve desteklerini esirgemeyen Dr. Öznur YAYLA'ya, Veteriner Dr. Ziya ÇUKUR'a, Merkez Biyokimya Laboratuvar çalışanlarına, asistan ve teknisyen arkadaşlarıma saygılarımla ayrı ayrı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
ASETAMİNOFEN	3
OKSİDATİF STRES	7
ANTIOKSİDANLAR	12
OKSİDATİF STRES VE ANTIOKSİDAN AKTİVİTENİN ÖLÇÜLMESİ	14
RHEİN	14
GEREÇ VE YÖNTEMLER	18
BULGULAR	23
TARTIŞMA	31
SONUÇLAR	37
ÖZET	39
SUMMARY	41
KAYNAKLAR	43
EKLER	

SİMGE VE KISALTMALAR

A	: Absorbans
ALP	:Alkalen Fosfataz
ALT	:Alanin Aminotransferaz
AST	:Aspartat Aminotransferaz
D.BİL	: Direkt bilirubin
e⁻	: Elektron
GGT	:Gama Glutamil Transpeptidaz
GSH	: Glutasyon
MDA	: Malondialdehit
NAC	: N-asetilsistein
NaCMS	: Sodyum karboksi metilsellüloz
NAPQI	: N-asetil-p-benzoquinone imine
Rhein	: 4,5 dihydroxyanthraquinone-2-carboxylic acid
RNA	: Ribonükleik asit
T.BİL	: Total bilirubin
TBARS	: Tiyobarbitürik asit reaktif substans

GİRİŞ VE AMAÇ

Karaciğerde genetik, otoimmün, sistemik hastalıklar ve hepatotropik virüsler gibi bilinen etkenler dışında ilaç, endüstriyel veya bitkisel toksinlerle oluşan hasar, hepatotoksisite olarak tanımlanır. Bitkisel hepatotoksisite nedenleri arasında çoğu zaman fatal seyreden mantar zehirlenmeleri başta gelmektedir. Karaciğerde metabolize olan karaciğer veya böbrekten atılan bir çok ilaç ve toksik etken bu organlarda değişik derecelerde doku hasarına yol açar (1-3).

Günümüzde akut ve kronik karaciğer hastalığı veya kolestaza yol açan 900'den fazla ilaç tanımlanmaktadır. Toksikitede klinik tablo asemptomatik transaminaz yüksekliğinden akut fulminant yetmezliğe kadar değişmekte olup kronik hepatit, siroz ve hepatobiliyer tümör gelişimi görülebilmektedir (1-3). Histopatolojik olarak hepatosit ve diğer hücrelerde inflamasyon, dejenerasyon (balonlaşma, steatoz), hücre ölümü (nekroz, apoptozis), fibrozis, sirozis, kolestaz ve granülom oluşumu saptanmaktadır (2,4).

İlaca bağlı hepatotoksisite idiosenkratik ve intrinsek tip olmak üzere ikiye ayrılır. İntrensek tip doz bağımlıdır (3). Doz bağımlı hepatotoksik ilaçlar arasında bazı analjezik, antitüberküloz ve antineoplastik ilaçlar sayılabilir. Tüm dünyada yaygın olarak antipiretik ve analjezik olarak kullanılan asetaminofen (parasetamol) doz bağımlı hepatotoksik ilaçların başında gelmektedir (3,5,6). Asetaminofen'in tedavi dozu 325-1000 mg/gün olup 4gr'ı aşmamalıdır. Akut doz aşımında hepatotoksik etkiler ortaya çıkmakta bazen fatal seyretmektedir (7). Hepatotoksisite ilacın toksik metaboliti olan N-asetil-p-benzoquinone imine (NAPQI)'nın neden olduğu oksidatif stres ve kovalent bağlanma nedeniyle olmaktadır (2,3).

Normalde metabolizma sırasında oluşan serbest radikaller (oksijen, hidrojen, hidroksil) hücresel yapılara zarar verdiğiinden süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSHPx) ve katalaz gibi intrinsek antioksidanlarla ortadan kaldırılır. Çevresel ve bireysel olumsuz etkenler ve hastalıklarda artmış serbest radikallerin temizlenmesinde intrinsek antioksidan sistem yetersiz kalır. Serbest radikal artışı protein tiol oksidasyonu ve lipid peroksidasyonuna yol açar. Biriken radikaller hücre zarı, deoksiribonükleik asit (DNA) ve diğer yapıtaşlarını bozar. Asetaminofen ile oluşturulmuş olan toksik hepatitte lipid peroksidasyonun arttığı ve antioksidan olan glutatyon (GSH)'un azaldığı bildirilmektedir (8-13).

Lipid peroksidasyonu bir serbest radikal kaynağıdır. Oksijen ile karşılaşan lipidlerin peroksidasyonu doku harabiyetine yol açar. Bu olumsuz etki çoğul doymamış yağ asitlerinden, peroksit oluşması sırasında üretilen serbest radikallerin artışı ile başlar. Üç veya daha fazla çift bağ taşıyan yağ asitleri tarafından üretilerek artan malondialdehit (MDA), doku ve kanda lipid peroksidasyonunun bir parametresi olarak kullanılır (14).

Oksidatif streste toksik ürünlerle konjuge olarak detoksifikasyonu sağlayan endojen ve eksojen yapılar antioksidan olarak tanımlanır. Glutatyon glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan tripeptit yapısında önemli bir endojen antioksidandır. Molekülün antioksidan etkisi sisteinin sülfidril grubu ile gerçekleşir (9,15).

Canlılarda artan lipid peroksidasyonunu denetlemek ve azaltmak için çeşitli ekzojen antioksidanlar kullanılmaktadır (14). Rhein (4,5 dihydroxyanthraquinone-2-carboxylic acid), rhubarb (*Rheum officinale*) adlı bitkiden elde edilen diacetylanthraquinone'un aktif metabolitidir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda karaciğer ve böbrek patolojilerinde olumlu etkileri bildirilmektedir. Rhein doz bağımlı olarak süperoksit anyon üretimini ve kemotaksisini inhibe eder. Antioksidan etkisini, tek elektron azaltan flavoenzim substratı olarak göstermektedir (16).

Bu tez çalışmasında, asetaminofen ile ratlarda oluşturulan akut toksik hepatit tablosunun yol açtığı oksidatif hasarda; Rhein kullanımının olası olumlu etkilerini değerlendirmek amacıyla karaciğer dokusunda MDA ve GSH düzeylerinin yanısıra, kanda aminotransferazlar (ALT, AST), bilirubin, gamaglutamiltransferaz (GGT), alkalin fosfataz (ALP) düzeyleri araştırıldı.

GENEL BİLGİLER

ASETAMİNOFEN

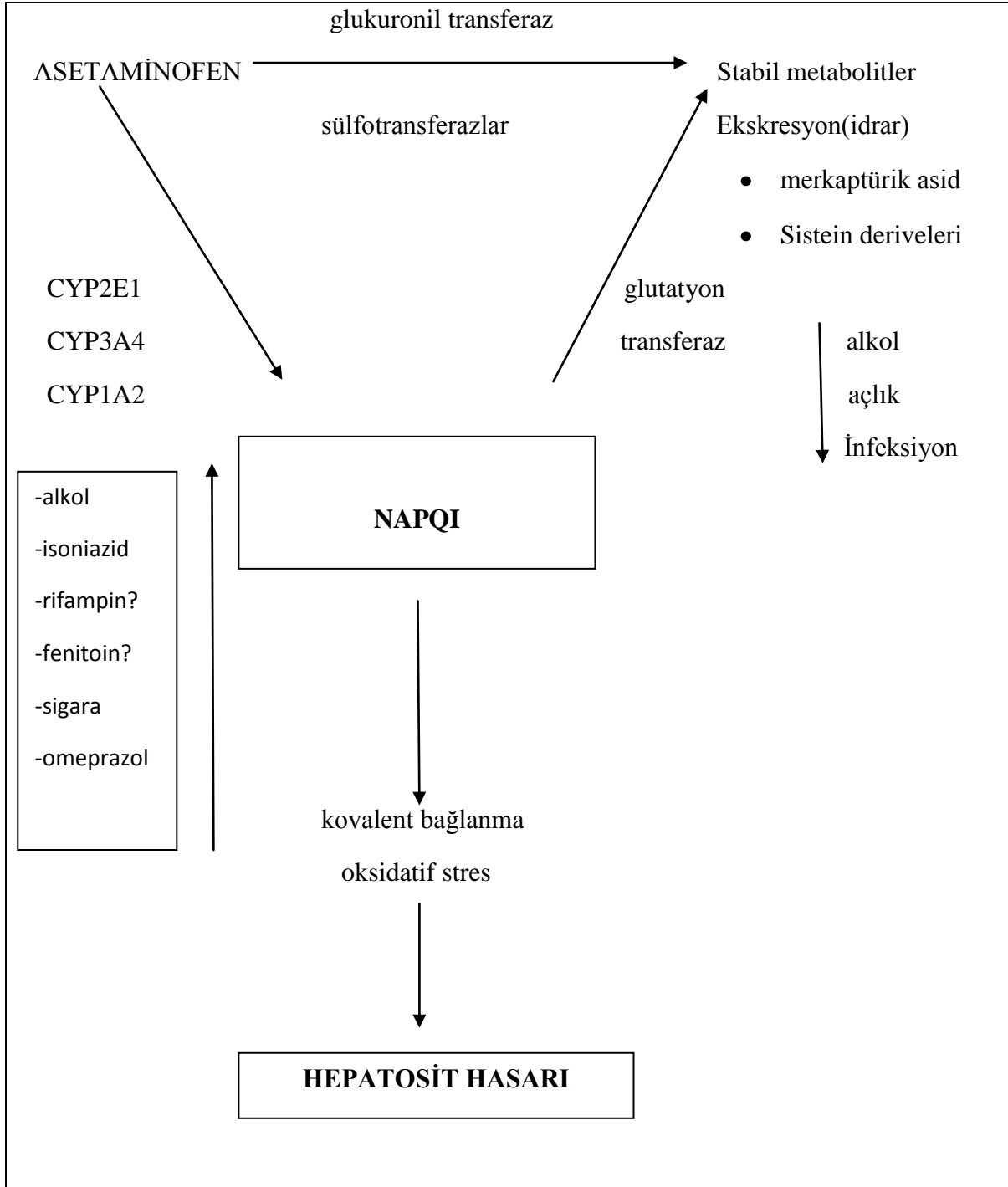
Cahn ve Hepp 1886 yılında antifebrin ismi ile bilinen, ateş düşürücü özelliğini tesadüfen buldukları temel bileşiği asetanilid olan ilacı tıbbın kullanımına sunmuştur. Zaman ilerledikçe, asetanilid'in toksik olduğu anlaşılmıştır. 1887 yılında asetanilid'in geliştirilmiş kimyasal bir türevi olan fenasetin tedaviye girmiş ve analjezik olarak kullanılmıştır. Fenasetin de böbrek hasarına yol açtığı için kullanımdan kaldırılmıştır. Asetaminofen (parasetamol; N-acetil-p-aminofenol) 1893 yılında von Mering tarafından ilk kez kullanılmış ve fenasetin ile asetanilid'in aktif metaboliti olduğu tespit edildiği 1949 yılından sonra kullanımı yaygınlaşmıştır (7,17).

Farmakokinetik ve Metabolizma

Asetaminofen oral olarak alındıktan sonra 30-60 dakika içinde doruk plazma konsantrasyonlarına ulaşır ve tedavi edici dozlarda plazma yarılanma ömrü yaklaşık 2 saattir. Asetaminofen vücut sıvılarının çoğuna oldukça homojen dağılır (7,18,19).

Plazma proteinlerine bağlanması değişken olup diğer nonsteroid antiinflamatuvar (NSAİ) ilaçlardan daha azdır; akut toksikasyon sırasında karşılaşılan konsantrasyonlarda yalnızca %20-50'si bağlanır. Asetaminofen'in %90-100'ü, karaciğerde glukuronik asit (yaklaşık %60'ı), sülfirik asit (yaklaşık %35'i) ya da sistein (yaklaşık %3'ü) ile konjuge olarak tedavi edici dozajın birinci gününde idrardan atılır; küçük miktarlarda deasetile ve hidroksile metabolitleri de saptanmıştır. İlacın glukoronidasyon kapasitesi çocuklarda erişkinlerden daha azdır (7). Asetaminofen'in küçük bir bölümü sitokrom P450 izoenzimleri (CYP) aracılığı ile N-hidroksilasyon reaksiyonuna girerek oldukça reaktif olan NAPQI

meydana getirir. Normalde NAPQI glutatyonun sülfhidril gruplarıyla reaksiyona girer ve bundan dolayı zararsız kabul edilir. Yüksek dozlarda asetaminofen alındıktan sonra, meydana gelen NAPQI metaboliti karaciğerde glutatyonu bitirecek kadar fazla miktarda oluşur ve ilacın toksik etkilerine büyük miktarda katkıda bulunmaktadır (7,20-22). Şekil 1’de asetaminofen hepatotoksitesi gösterilmiştir (2).



Şekil 1. Asetaminofen hepatotoksitesi(2)

CYP2E1: Sitokrom p 450 2 E 1 izoenzimi, **CYP3A4;** Sitokrom p 450 3 A 4 izoenzimi, **CYP1A2;** Sitokrom p450 1 A 2 izoenzimi, **NAPQI;** N-asetil-p-benzo-quinone imine.

Asetaminofen aspirinin yanısıra günümüzde ağrı kesici ve ateş düşürücü olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle çocuklarda ve aspirin duyarlılığı veya peptik ülseri olanlarda günlük 325-1000 mg (rektal 650 mg) olmak üzere günlük 4 gr dozunda uygulanmaktadır (7,23). En çok kullanılan günlük ortalama doz 1000 mg olup kronik alkolik ve karaciğer hastalığı olanlarda günlük 2000 mg'ı aşmamalıdır. Bu dozlarda gastrointestinal yan etkilerinin aspirin ve aspirin olmayan NSAİ'lerden daha az olduğu sanılmaktadır. Asetaminofen önerilen tedavi edici dozlarda çoğunlukla iyi tolere edilir. Önemli bir yan etkisi bilinmemektedir. Bazen ciltte döküntü gibi alerjik reaksiyonlar ortaya çıkabilir (7).

Asetaminofen ile akut doz aşımının en kritik etkisi ölümcül hepatik nekrozdur. Hipoglisemik koma ve renal tübüler nekroz da oluşabilir. Asetaminofen ile doz aşımının karaciğer hasarına ve ölüme sebep olma mekanizması, toksik NAPQI metabolitine dönüşmesini kapsamaktadır. Sülfat ve glukuronid konjugasyon yolları doyunluğa ulaşır ve artan miktarlar NAPQI'yı meydana getirmek üzere CYP aracılı N-hidroksilasyona gider. GSH ile konjuge edilen NAPQI hızlıca elimine edilir ve ardından tekrar metabolize edilerek merkaptürik aside dönüşür ve sonra idrarla atılır. Asetaminofen doz aşımı durumunda, karaciğer GSH düzeyleri tükenir. Oluşan NAPQI, hücre makromoleküllerine kovalent bağlanarak, enzimatik sistemlerin fonksiyonunu bozar ve metabolik düzensizliğe sebep olur (7,22,24). Asetaminofen bağımlı hepatotoksisite içinde en çok oksidatif stres ile kovalent bağlanma (2,3) üzerinde durulmakla beraber nitrik oksit oluşumu, mitokondriyal disfonksiyon, apoptozis, lipid peroksidasyonu, kalsiyum homeostazının bozulması, reaktif oksijen ürünlerinin oluşmasında etkisinin olduğu düşünülmektedir (25).

Asetaminofen Hepatotoksisitesi

Yetişkinlerde tek bir 10-15 gr (150-250 mg/kg) asetaminofen dozundan sonra karaciğer toksisitesi ortaya çıkabilir. 20-25 gr ve üzerindeki dozlar ölümcül olma ihtimali yüksektir (7). CYP indüksiyonu olan durumların (ağır alkol tüketimi gibi) veya glutatyon tükenmesinin (açlık ya da malnutrisyon gibi), nadir olmakla birlikte, tedavi edici aralıktaki dozlarda hepatik hasara duyarlılığı arttırdığı gösterilmiştir (26-29).

Akut asetaminofen toksisitesi dört klinik aşamadan oluşur. İlk basamak; 24 saat içinde gerçekleşir, semptomlar bulantı, karın ağrısı, anoreksi gibi mide rahatsızlıklarına benzer ve toksikasyonun ciddiyet potansiyelini gizler. İkinci basamak; 24-72 saat içinde gerçekleşir, ilk aşamadaki semptomlar düzelmiş yerlerini sağ üst kadran ağrısı almıştır. Plazma

transaminazları yükselir, bilirubin artar, protrombin zamanı uzar. Böbrek fonksiyon bozulma oluşabilir. Üçüncü aşama; tipik olarak 72-96 saat sonra karaciğer enzim anormallikleri zirveye ulaşır. Hepatik ensefalopati başlangıcı veya koagülopati oluşabilir. Karaciğer biyopsisinde sentrolobüler nekroz saptanır. Ölüm gerçekleşebilir. Dördüncü basamak; ölümlü sonuçlanmayan vakalarda, hepatik lezyonlar haftalar veya aylar süren bir periyot içinde iyileşmektedir (29-33).

Asetaminofen Toksisitesinde Tedavi

Asetaminofen doz aşımı tıbbi acildir. İlaç alındıktan 4 saat sonra plazma asetaminofen konsantrasyonu 300 µg/ml'yi ve ya 15 saat sonra 45 µg/ml'yi geçtiği durumlarda hastaların yaklaşık %90'ında ciddi hepatik hasar meydana gelir. Asetaminofen miktarı alındıktan 4 saat sonra 120 µg/ml'nin ya da 12 saat sonra 30 µg/ml'nin altındaysa, minimal hepatik hasar öngörülebilir (7).

Rumarck-Matthew nomogramı ilaç alındıktan sonra geçen süre ile plazma asetaminofen düzeylerinin öngörülen hepatik hasar şiddeti ile ilişkisini gösteren bir test olduğu ifade edilmektedir (7,34,35). Zehirlenen hastaların özellikli tedavi gerektirmeyen yaklaşık %10 kadarında ağır hepatik hasar gelişir; bunların yaklaşık %20'si destek tedavisine rağmen hepatik yetmezlikten kaybedilir. Şayet ilaç alındıktan sonraki 4 saat içinde aktif kömür verilirse, asetaminofen emilimini %50-90 oranında düşürür ve gastrik dekontaminasyon için tercih edilen yoldur. Gastrik lavaj genellikle tavsiye edilmemektedir. Hepatik hasar riski taşıyanlarda N-asetilsistein (NAC) endikedir. Asetaminofen zehirlenmesinden şüphe edilen vakalarda NAC tedavisine kan düzeylerinin sonucu gelmeden önce başlanılmalıdır, şayet sonuçlar hepatotoksisite riskinin az olduğunu gösterirse tedavi sonlandırılmalıdır (7).

NAC, mukolitik bir ilaçtır. Karaciğer de sülfidril vericisi olan GSH'ın yerine kullanılır. Asetaminofen metabolizması sonucu oluşan ve reaktif olan ara ürünlere hızlıca bağlanarak onları etkisizleştirir. NAPQI'nın asetaminofene indirgenmesini hızlandırır. Zehirlenmenin erken dönemlerinde verilirse (yaklaşık 10 saat içinde) asetaminofen aracılıklı karaciğer hasarını önlemede etkilidir. Zehirlenmeden birgün sonra verilse bile serbest radikallerin temizlenmesi ve sitokinlerin oluşumu üzerine etki göstererek, oksijen sunumunu ve kan akımını düzelterek karaciğer hasarının azaltılması bakımından yararlı etki gösterebilir. NAC'ın sülfidril bağlayıcı ajan ve glutatyon prekürsörü olması, onun oksidatif strese veya serbest radikale sebep olan zehirlenmelerin tedavisinde deneysel amaçlı kullanılmasına yol açmıştır. Zehirlenmeye sebep olan asetaminofen miktarının bilinmediği hallerde veya serum

asetaminofen konsantrasyonunun hemen ölçülemediği durumlarda ampirik olarak da kullanılabilir (36).

NAC oral olarak 140 mg/kg yükleme dozu verilir, peşinden 4 saat arayla 70 mg/kg'lık 17 doz uygulanır. NAC intravenöz verilecekse 150 mg/kg intravenöz yükleme dozu %5 dekstroz 100 ml içinde 15 dakikalık intravenöz infüzyonla verilir (20 kg'ın altındaki hastalar için), peşinden 4 saat süreyle %5 dekstroz 250 ml içinde 50 mg/kg intravenöz infüzyon verilir, sonra 16 saat süreyle % 5 dekstroz 500 ml içinde 100 mg/kg intravenöz infüzyon uygulanır. NAC aktif kömür varlığında bile bol miktarda emilir ve NAC-kömür etkileşimi endişesinden ötürü ne NAC'ın ne de aktif kömürün emilimi gecikir. Cilt döküntüsü, bulantı, kusma, ishal, anafilaksi olması NAC'a karşı gelişen istenmeyen reaksiyonlardır. Ulusal zehir danışma merkezleri asetaminofen doz aşımı hastalarının tedavisine yardımcı olmak için aranabilir. NAC tedavisine ilaveten, agresif destek tedavisi gereklidir (7).

Şayet gelişirse böbrek ve karaciğer yetmezliği tedavisi verilmeli, hasta küntleşirse entubasyon yapılması gerekmektedir. Plazma glukozu yakından izlenmelidir çünkü hepatik yetmezliğe bağlı olarak hipoglisemi gelişebilir (7). Asetaminofen toksisitesine bağlı fulminan hepatik yetmezlikde kan gazında arteriyel Ph 7,3'den az olması veya evre 3-4 ensefalopati olması, protrombin zamanının 100 saniyeden uzun olması, serum kreatin değerinin 3,4 mg/dl'den fazla olması karaciğer transplantasyonu endikasyonudur. Bu kriterlere King's College Kriterleri denir (37-39).

Hücrelerin normal metabolizması sırasında ortaya olumsuz etkili bazı atıklar çıkmaktadır ki bunlar oksijen radikalleri veya serbest radikaller olarak adlandırılır. Bu sırada antioksidan sistem olarak tanımlanan ve bu atıkları ortadan kaldıran sistem aktive olarak zararlı etkileri önler. Çevresel ve bireysel çeşitli olumsuzluklarda serbest radikaller çok fazla artar. Antioksidan aktivite başlangıçta artarsada ortamdaki tüm oksijen radikallerinin temizlenmesine yetemez. Bu nedenle konu oksidatif stres ve antioksidan sistem olarak ayrı ayrı incelenir. Pratikte dokuda ve vücut sıvılarında oksidatif stresin arttığını lipid peroksidasyon ürünü olan MDA düzeyinde ki artış ile antioksidasyonu ise GSH ile belirlenir (11,12,15,29,40-46).

OKSİDATİF STRES

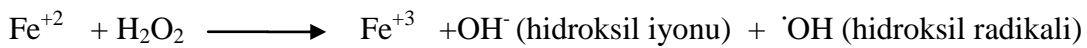
Gelişmekte olan teknoloji, ultraviyole ışınlar, çevre kirliliği, sigara gibi birçok etken devamlı olarak çeşitli zararlı maddelerle karşı karşıya gelmemize sebep olmaktadır. Bu etkiler kendini serbest radikal oluşumu ile göstermektedir (40). Serbest radikal, bir ya da daha çok sayıda eşleşmemiş elektron içeren bir atom ya da moleküldür. Diğer kimyasal ileri derecede

reaktif hale getirir (41). İnsanın biyolojik sistemlerinde en önemli serbest radikaller oksijen kaynaklı oluşan radikallerdir ve bunlara reaktif oksijen türleri denilmektedir (42,43). Serbest oksijen radikalleri vücutta sürekli oluşturulmakta ve bir antioksidan savunma sistemi de onları sürekli ortadan kaldırmaktadır. Bu dengenin bozulması, serbest oksijen radikallerinin artmasına ve hücre hasarına yol açmaktadır. Bu duruma oksidatif stres denmektedir (44-46). Serbest radikaller, üzerine konulan siyah bir nokta ile gösterilir. Normalde hücrelerde en fazla serbest radikallerin oluşup çevreye yayıldığı merkez, mitokondriyal elektron transport zincirindeki sızıntıdır (11).

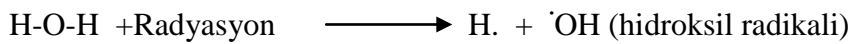
Serbest oksijen radikalleri; hidroksil (OH^\cdot), hidroperoksil (HO_2^\cdot), süperoksit ($\text{O}_2^{\cdot-}$), nitrik oksit (NO^\cdot) ve nitrojen dioksit (NO_2^\cdot), alkoksil (RO^\cdot) ve peroksil (ROO^\cdot) radikalleridir. Hipoklorid asit (HOCl), singlet oksijen ($^1\text{O}_2$), hidrojen peroksit (H_2O_2), peroksinitrit (ONOO^\cdot), ozon (O_3) ve lipid hidroperoksit (LOOH)' de radikal olmayan ancak reaksiyona girme kabiliyeti oldukça yüksek olan oksijen merkezli bileşiklerdir (12,13). Reaktif oksijen türlerinden su oluşumu Şekil 3'te gösterilmiştir (47).

Süperoksit Radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$): Tüm aerobik (oksijenli) hücrelerde O_2 'nin bir elektron eklenerek indirgenmesi sonucu, serbest süperoksit radikal anyonu oluşur. Kendisi direkt hasar vermez. Gerçekte önemi hidrojen peroksit kaynağı olması (spontan veya süperoksit dismutaz enzimi vasıtasıyla) ve geçiş metalleri iyonlarının (Cu^{+2} , Fe^{+3} , Mn^{+2} , Mo^{+5}) indirgeyicisi olmasıdır. Ayrıca NO ile birleşerek peroksinitrit (ONOO^\cdot)'i oluşturur (11,48-50).
 O_2 (moleküler oksijen) + e^- (elektron) \longrightarrow $\text{O}_2^{\cdot-}$ (süperoksit)

Hidroksil Radikali (OH^\cdot): H_2O_2 'nin geçiş metalleri iyonları eşliğinde indirgenmesiyle ya da suyun iyonize radyasyona maruz kalması sonucu oluşur. Hidroksil radikali (OH^\cdot) olduğu yerde büyük hasara sebep olabilen, yarı ömrü oldukça kısa olan son derece reaktif bir radikaldir (11,45,48,51,52).



(Fenton reaksiyonu olarak adlandırılır).

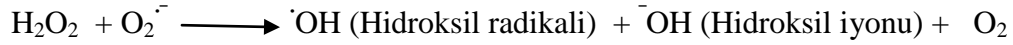


Hidrojen peroksit (H_2O_2): Moleküler O_2 'nin 2 e^- (elektron) ya da süperoksitin 1 e^- alması sonucu oluşan peroksitin; 2 Hidrojen atomu ile birleşmesi sonucu Hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşur (11).

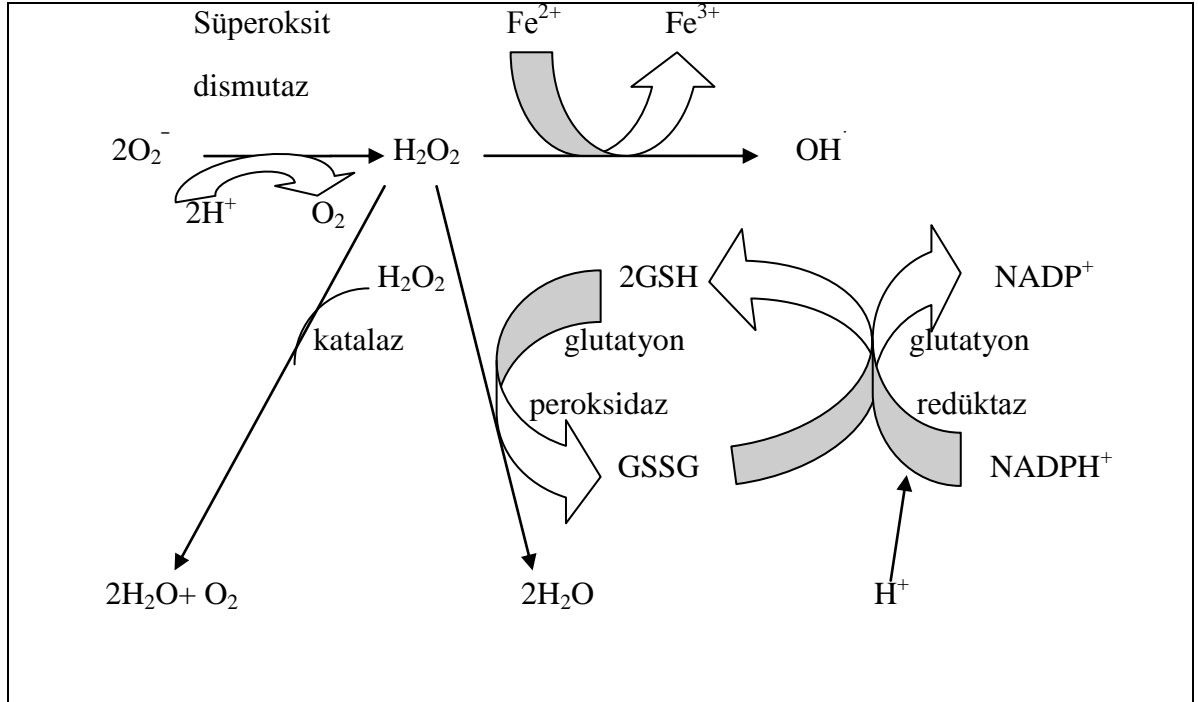




Süperoksid dismutaz enziminin katalizlediği bir reaksiyonla süperoksidten hidrojen peroksid sentez edilir. H_2O_2 , membranlardan kolayca diffüze olabilen, uzun ömürlü bir oksidandır. Hidrojen peroksid, serbest radikal olmadığı halde, reaktif O_2 türleri içine dahil edilir. Çünkü süperoksid ile tepkimeye girerek hidroksil radikalini (OH^{\cdot}) oluşturur (11,48,49,52-55). Şekil 2’de fagositik hücrelerdeki antioksidan sistem gösterilmiştir (47).

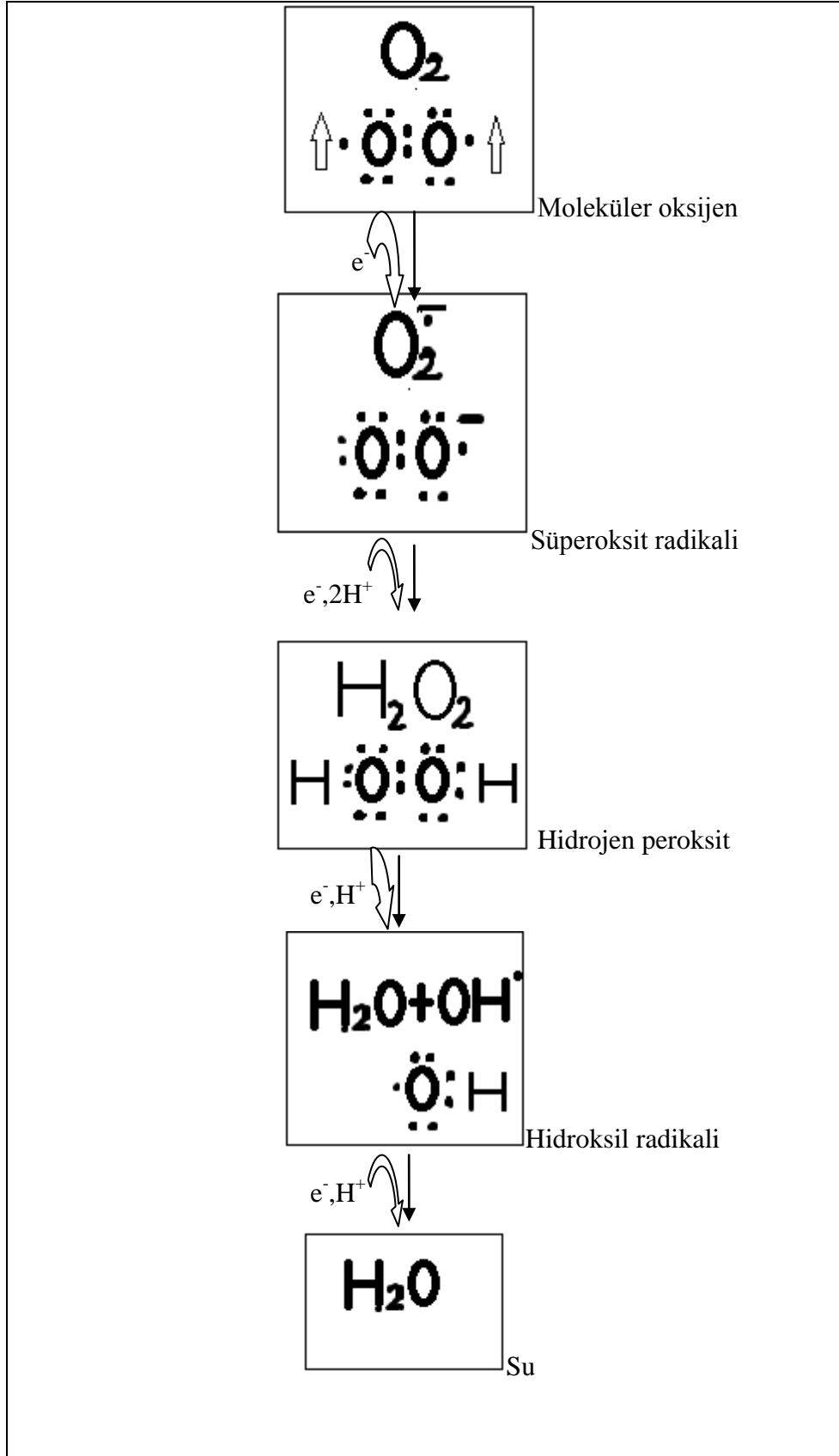


(Haber –weiss reaksiyonu olarak adlandırılır)



Şekil 2. Fagositik hücrelerde antioksidan sistem (47)

$\text{O}_2^{\cdot-}$: Süperoksid Radikali, H_2O_2 : Hidrojen peroksid, OH^{\cdot} : Hidroksil radikali, GSH : Glutasyon, GSSG : Glutasyon disülfid, NADPH^+ : Nikotinamid adenin dinükleotit.



Şekil 3. Reaktif oksijen türlerinden su oluşumu (47)

Hücre içinde serbest radikal artışı en çok lipid yapısındaki yapıtaşlarına sonra sırasıyla protein, DNA ve karbonhidrat içeren yapıları etkiler(11,49).

Serbest Radikallerin Lipidler Üzerine Etkileri

Serbest radikallere en duyarlı olan hücre bileşiği lipidlerdir. Hücre membranındaki kolesterol ve doymamış yağ asitleri serbest radikallerle kolayca etkileşime girerek peroksidasyon ürünlerini oluşturur. Poliansatüre yağ asidinin oksidasyonuna lipid peroksidasyonu denir ve oluşan membran hasarı geri dönüşümsüzdür. Hidrofobik yapıdaki lipid radikalleri membrana bağlı yapılarda tepkimeler oluşturur. Bunun sonucunda membran permeabilitesi ve viskozitesi etkilenir. Lipid peroksidasyonu sonucu meydana gelen malondialdehid (MDA), membran komponentlerinin birbirleriyle çapraz bağlanmasına ve polimerizasyon oluşturmaya neden olur. Bu deformasyon, intrinsek membran özellikleri olan iyon transportu, enzim aktivitesi, hücre yüzey bileşiklerinin agregasyonunu değiştirir (11,12,30,49,56,57). Lipid peroksidasyon ürünlerinden olan malondialdehit tayini, tiyobarbitirik asit ile malondialdehitin tepkime vererek 532 nm dalga boyunda tayin edilebilen renkli bir bileşik oluşturması esasına dayanmaktadır. Tetrametoksipropan standart olarak kullanılır ve sonuçlar nmol/ml olarak tanımlanır. Bu metodla tiyobarbitürük asit ile tepkime veren maddeler ölçülür ve yayınlarda tiyobarbitürük asit reaktif substans (TBARS) olarak yer almaktadır (29).

Serbest Radikallerin Proteinler Üzerine Etkileri

Serbest radikaller ile doymamış bağ ve sülfür bulunduran moleküllerin etkileşimi daha fazla olur. Metionin, sistein, fenilalanin, triptofan, histidin, tirozin gibi aminoasitleri içeren proteinler serbest radikaller ile kolayca etkileşime girmektedirler. Böylece sülfür radikalleri ile karbon merkezli radikaller oluşur. Albumin ve immunglobulin gibi fazla disülfid bağı ihtiva eden proteinlerin üç boyutlu konfigürasyonu bozulmaktadır (11,31,49,54).

Serbest Radikallerin DNA Üzerine Etkileri

Serbest radikaller zincir kırılmalarına ve nükleik asit baz diziliminin değişmesine yol açarak mutasyona hatta hücre ölümüne yol açmaktadır (11,32,33,49,52,58).

Serbest Radikallerin Karbonhidrat Üzerine Etkileri

Monosakkaritlerin otooksidasyonu (kendi kendine yükseltgenme) sonucu hidrojen peroksid, peroksid, okzaldehydler oluşur. Bu yapılar sigara içimi ile ilgili kronik hastalıkların ve diyabetes mellitusun patogeneğinde rol oynamaktadır (11,49,52,54).

ANTIOKSİDANLAR

Tanım

Kimyasal bileşikler ve zararlı oksit türleri üretme kabiliyeti olan reaksiyonlar prooksidanlar olarak bilinir. Öte yandan, bu tür maddeleri ortadan kaldıran, bunları süpüren, oluşumlarını engelleyen ya da etkilerine karşı çıkan bileşik ve reaksiyonlara antioksidan denir(59).

Antioksidanlar, endojen kaynaklı veya eksojen kaynaklı olabilirler (11-13,47).

Endojen antioksidanlar: Enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Enzim olan endojen antioksidanlar şunlardır: 1) Süperoksit dismutaz (SOD) 2) Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) 3) Glutasyon S-Transferazlar (GST) 4) Katalaz (CAT) 5) Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi 6) Hidroperoksidaz. Enzim olmayan endojen antioksidanlar şunlardır: 1) Melatonin 2) Seruloplazmin 3) Transferrin 4) Miyoglobin 5) Hemoglobin 6) Ferritin 7) Bilirubin 8) Glutasyon 9) Sistein 10) Metiyonin 11) Ürat 12) Laktoferrin 13) Albümin.

Eksojen antioksidanlar: Vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanları olmak üzere sınıflandırılabilirler. Vitamin eksojen antioksidanlar şunlardır: 1) Vitamin E (α -tokoferol) 2) β -karoten 3) Askorbik asit (vitamin C) 4) Folik asit (folat)

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

Gıdalardaki eksojen antioksidanlar şunlardır: 1) Butylated hydroxytoluene (BHT) 2) Butylated hydroxyanisole.

Antioksidanlar etki tiplerine göre dört gruba ayrılırlar (11).;

- 1- Toplayıcı: Oksijen radikallerini tutar ya da onları daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürerek etki gösterirler. Trakeobronşial mukus, antioksidan enzimler, urat, mannitol, albumin bu grupta yer almaktadır.

- 2- Bastırıcı: Oksijen radikallerine hidrojen ekleyerek aktivitelerini azaltır ya da inaktif şekle dönüştürür. Flavonoidler, vitaminler, antosiyanoidler, trimetazidin bu grupta yer almaktadır.
- 3- Zincir kırıcı: Oksijen radikallerini bağlayarak peroksidasyon halkasını kırıp, etkisiz hale getirirler. Mineraller, hemoglobin, seruloplazmin bu grupta yer almaktadır.
- 4- Onarıcı: Peroksidasyon halkasını tamir ederek etki gösterirler.

Glutasyon

Glutasyon (GSH) karaciğerde sentezlenen glutamik asit, sistein ve glisin amino asitlerinden oluşan (γ -glutamil sisteinil glisin) bir tripeptiddir. Glutasyon serbest radikaller ve peroksidlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı koruyan önemli bir antioksidandır. Glutasyon molekülünün iş gören parçası sistein aminoasidinin sülfidril grubudur. Bazı toksik elektrofilik zenobiyotikler, nükleofilik GSH ile konjuge edilir:

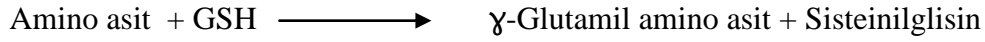


Bu tepkimede R, elektrofilik bir zenobiyotiktir. Bu reaksiyonları katalizleyen enzimlere glutasyon S transferaz adı verilmekte ve karaciğer sitozolünde fazla miktarlarda bulunmaktadır. Vücudumuzda çeşitli glutasyon S transferazlar bulunur ve farklı substrat özgülüğü gösterir. Elektroforez yöntemi ile birbirinden ayırt edilebilir. Toksik zenobiyotikler, glutasyon ile konjuge edilemez ise DNA, RNA ya da hücre proteinleriyle serbestçe kovalent olarak bağlanır ve bu da ciddi hücre tahribatına yol açabilir. Bundan dolayı, glutasyon, bazı ilaçlar veya karsinojenler gibi bazı toksik maddelere karşı önemli bir savunma mekanizmasını oluşturur. Karaciğer gibi bir dokuda glutasyon düzeyi azalacak olursa (sıçanlara GSH ile reaksiyona giren bazı maddelerin verilmesiyle elde edilebilen türde) bu dokunun, normalde glutasyon ile konjuge edilen çeşitli kimyasallarla yapılacak hasara karşı daha hassas hale geldiği görülebilir. Glutasyon atılmadan önce konjugatları daha ileri metabolize edilir. Glutasyona ait glisinil ve glutamil grupları özgün enzimler ile uzaklaştırılır, geri kalan sisteinil kısmının amino grubuna asetil-koA'dan alınan bir asetil grubu ilave edilir. Oluşan madde merkaptürik asittir. Merkaptürik asit L-asetilsisteinin bir konjüğü olup daha sonra idrarla atılır. Glutasyonun zenobiyotik metabolizmasındaki görevi dışında insan hücrelerinde başka önemli işlevleri de vardır.

1-Glutasyon peroksidaz tarafından katalizlenen reaksiyonla, toksik olan hidrojen peroksidin bozulmasına katılır.

2-Enzimlerin -SH gruplarının indirgenmiş halde tutulmasına yardımcı olan önemli bir hücre içi indirgeyicidir.

3-GSH'nın bir taşıyıcı olarak görev aldığı metabolik bir döngüden, böbrekte zarlardan bazı amino asitlerin taşınmasında görevlidir:



Bu reaksiyon, bazı amino asitlerin plazma zarından geçirilmesine olanak sağlar, amino asit, GSH ile yaptığı karmadan daha sonra hidroliz edilir ve GSH, sisteinilglisinden tekrar sentezlenir. Bu reaksiyonu γ -Glutamiltransferaz (GGT) katalizler. Bu enzim hepatositlerin endoplazmik retikulumunda ve böbrek tübül hücrelerinin plazma zarında bulunur. Bazı hepatobilyer hastalıklarda karaciğer hücreleri tarafından kana salgılandığı için enzimin tanısal değeri vardır (15).

OKSİDATİF STRES VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTENİN ÖLÇÜLMESİ

Oksidatif stres çalışmalarında, organizmada serbest radikal üretimi artışının belirlenmesi için çeşitli biyolojik materyalde lipid peroksidasyonunun çeşitli ürünlerinin konsantrasyonları sıklıkla ölçülmektedir. Bu ürünler arasında Malondialdehit (MDA) ölçümü lipid peroksidasyonunun derecesinin belirlenmesi için en sık başvurulan testtir (11,12,13,48,49).

Antioksidan aktivitenin ölçülmesi

Oksidatif stres çalışmalarında, organizmada antioksidan savunma sistemleri çeşitli biyolojik materyalde çeşitli antioksidanların aktiviteleri veya konsantrasyonları farklı yöntemlerle ölçülmektedir. Bunlar arasında redükte glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz, glutatyon S-transferaz, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz aktiviteleri, serumda β - karoten, Vitamin C (askorbik asit), Vitamin E (α -tokoferol), melatonin düzeyleri sayılabilir (11,12,13,48,49).

RHEİN

Rheum officinale ve Rheum palmatum Kuzey Çin, Kore ve Tibet'te doğal olarak yetişmekte olan çok yıllık otsu bitkilerdir. Toprak altı kısmı etli ve kuvvetli rizomlar ve rizomlardan çıkan köklerden oluşmaktadır. Toprak üstü kısımları baharda rizomlardan çıkan çok sayıda uzun saplı yapraklardan oluşur. Lamina şekli kordattan orbikulata kadar değişken, kenarları tam veya kabaca dentat (Rheum officinale) veya palmatilobatdır (Rheum

palmatum). Şekil 4’te Rheum officinale adlı bitki gösterilmiştir (60). Çiçekler yeşilimsi beyazdan koyu mora kadar değişen renklerde. Bitkinin kök ve rizomlarının kimyasal yapısında hidroksiantrazen türevleri (emodin, fiskiyan, aloe-emodin, rhein, krizofanol) ve heterozitleri (rheinozit A-D ve sennozit A-F), tanenler, stilbenler, fenilbutanonlar ve nişasta yer alır. Bitkinin kök ve rizomlarından hazırlanan ilaçlar yüksek dozlarda laksatif olarak kabızlıkta; düşük dozlarda ise diyarede etkilidir. Ağız mukozasının enfeksiyon ve inflamasyonlarının tedavisinde diş ağrılarında ve derideki yaraları iyileştirmek amacıyla haricen kullanıldığı belirtilmektedir. Rheum palmatum ve Rheum officinale’nin in vitro deneylerde antioksidan etkisini göstermek için metanollü ekstresi çeşitli konsantrasyonlarda, difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) ile reaksiyona sokulmuş ve antioksidan aktivite gösterdiği ifade edilmektedir. Ayrıca fenton reaksiyonu yoluyla üretilen pirogallol otooksidasyonu ve hidroksil radikalleri rizomlarda bulunan antrakinonlar tarafından inhibe edilmiştir. Sıçanlarda tiyoasetamit ile oluşturulan akut karaciğer yetmezliğinde rheum palmatum ekstresinin, önemli derecede koruyucu ve tedavi edici etkileri görüldüğü ifade edilmektedir (61). Rhein, kimyasal formülü 4,5-dihydroxyanthraquinone-2-carboxylic acid) olan bir kimyasaldır (16). Oral uygulamadan yarım saat sonra plazmada maksimum seviyeye eriştiğini ve 0,25-1,5 saat arasında yüksek değerlerde kaldığı ifade edilmektedir (61). Antibakteriyel, antiinflamatuvar ve antitümöral etkilere sahiptir. Belirgin bir biçimde, rhein doza bağlı olarak süperoksit anyon üretimini önler. Güçlü antioksidan etkileriyle birlikte, NADPH-sitokrom P-450 redüktaz, ubiquinone ve NADH-ubiquinone redüktaz gibi çok çeşitli tek elektron azaltan flavoenzimlerin substratı olarak iş görmektedir (16).



Şekil 4. Rheum officinale (60)

He ve ark. (62) unilateral üreteral obstrüksiyon (UUO) kaynaklı renal interstisyel fibroz üzerine rheinin etkilerini değerlendirdiği ve olası mekanizmalarını araştırdığı bir çalışmada UUO'su olan fareler, oral olarak rhein (150 mg/kg/d) verilmiş. Renal interstisyel hasar ve fibroz derecesi patolojik boyama ve Western blot ile değerlendirilmiş. Olası mekanizmalar Western blot, immünoflorasan boyama ve enzim-bağlı immünosorbent tahlil ile çalışılmış. Rhein terapisi gözle görülür biçimde interstisyel fibrotik lezyonları iyileştirmiş, α -düz kas aktin (α -SMA) ekspresyonunu azaltmış, fibronektin (FN) depolanmasını azaltmış. Rhein aynı zamanda obstrükte böbrekte transforme büyüme faktörü- β 1 (TGF- β 1) ve onun tip I reseptör ekspresyonunu baskılamış. İn vitro olarak, rhein TGF- β 1 kaynaklı α -SMA ve FN ekspresyonunu (normal sıçan böbrek interstisyel fibroblast hücreleri (NRK-49F)) azaltmış. Rhein'in güçlü bir renal interstisyel fibrozis inhibitörü olduğu ve teropatik mekanizması en azından kısmi olarak interstisyel fibroblast hücre aktivasyonunu engellemek olduğu ifade edilmektedir.

Sheng ve ark. (63) yapmış oldukları bir çalışmada 4-5 ay süresince yüksek-yağlı diyetle besledikleri C57BL/6J cinsi farelerde obezite, hiperinsülinemi, glikoz intoleransı, yükselmiş plazma ALT seviyeleri, mikro ve makroveziküler steatoz geliştirdiklerini ve normal-yağlı diyetle beslenen farelerle karşılaştırdıklarında, yüksek-yağlı diyetle beslenen farelerde önemli miktarda vücut ve yağ ağırlığının arttığını, serum total kolesterol, yüksek dansiteli lipoprotein, düşük dansiteli lipoprotein ve karaciğer trigliserit seviyelerinin yükseldiğini ve yağlı karaciğer gelişimine sebep olduğu ifade edilmektedir. Rhein'in etkilerini alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) ilişkili hepatik steatoz, insülin direnci ve T helper Th1/Th2 sitokin dengesizliği üzerinde yüksek-yağlı diet kaynaklı obeziteli farelerde yağlı diet kaynaklı obeziteli (DIO) denemişler. 40 gün boyunca oral olarak rhein 150mg/kg dozunda verilen DIO'lu farelerde yemek yemeyi etkilemeden, önemli miktarda enerji harcanmasını arttırdığı, vücut ağırlığını ve kısmi olarak vücut yağ içeriğini azalttığını, insülin direncini iyileştirdiği ifade edilmektedir. Rhein tedavisinin bu farelerde karaciğer trigliserid seviyelerini azalttığı, hepatik steatozu tersine çevirdiği ve ALT düzeylerini normalleştirdiği ifade edilmektedir. Bu fareleri rhein ile tedavi etmek, yemek alımını ve fekal lipidleri etkilemeden vücut ve yağ ağırlığı alımını iyileştirmiş ve dikkat çekici derecede enerji harcanmasını arttırmış ve serum total kolesterol, yüksek dansiteli lipoprotein, düşük dansiteli lipoprotein düzeylerini ve karaciğer trigliserit düzeylerini azalttığı ifade edilmektedir. Ayrıca, histolojik analize dayanarak, rhein yüksek-yağlı diyet kaynaklı hepatik steatozu tersine çevirdiği tespit edilmiş. Yüksek-yağlı diyet farelerinde, hepatik steatoz, yükselmiş serum insülini ve ALT seviyeleri, bozulmuş glikoz toleransı arasında güçlü bir ilişki bulunduğu

ifade edilmektedir. Diğer taraftan, rhein farelerde serum insülin seviyelerini azaltmış, glikoz toleransını düzeltmiş ve ALT seviyelerini normale çevirmiş olduğu ifade edilmektedir. Bu çalışma yüksek yağlı diyet kaynaklı obezitede NAFLD üzerine Rhein tedavisinin yararlılığını ilk kez gösterdiği ifade edilmektedir (azalmış vücut ve yağ ağırlığı, azalmış serum ve hepatik lipid düzeyleri, düzelmiş insülin direnci, normalize olmuş ALT düzeyleri ve tersine dönmüş hepatik steatoz). Bu yararlar karaciğer X reseptörü (LXR)-aracılı steroid regülatör element bağlayıcı protein (SREBP-1c) baskılanması ve artmış enerji harcanması ve Th1/Th2 dengesi cevabının karaciğerde sitokin sinyali değişmesi tarafıyla baskılanmış prositokin ekspresyonu yoluyla lipid down-regülasyonu ile olmaktadır. Rhein NAFLD gibi karmaşık metabolik hastalıklarda teröpatik potansiyel taşımakta olduğu ifade edilmektedir.

Zhao ve ark. (64) yapmış oldukları bir çalışmada Rhubarb'ın serbest antrakinonlarının sıçanlarda α -naftilisohtiosiyanat kaynaklı kolestatik karaciğer hasarına karşı etkisini araştırmışlar. α -naftilisohtiosiyanat sıçanlara 50 mg/kg dozunda intragastrik (ig) olarak verilmiş, kolestatik karaciğer hasarı 36 saat içinde gelişmiş, bu karakteristik ALT, AST, total bilirubin, direkt bilirubin, ALP, GGT ve total safra asidi seviyeleriyle gösterilmiş. Rhein, aloe-emodin, physion'un α -naftilisohtiosiyanat hasarlı sıçanlara intragastrik uygulanması ALT, AST, total bilirubin, direkt bilirubin, ALP, GGT ve total safra asidi serum düzeylerini önemli miktarda azalttığı ifade edilmektedir. Bütün hepatik biyokimyasal belirteçler ve kolestatik indeksde rhein en etkilisi olarak tespit edildiği ifade edilmektedir. Karşılaştırmada, emodin ve chrysophanol uygulanması hepatik enzimler olan ALT, AST'nin serum seviyelerini düşürmediğini ancak total bilirubin, direkt bilirubin, ALP, GGT ve total safra asidi serum düzeylerini düşürdüğünü, kolestatik karaciğer hasarında kısmi koruma sağladığı ifade edilmektedir. α -naftilisohtiosiyanat hasarlı sıçanların karaciğerinde intrahepatik kolestazis, hepatosit nekrozu, bilier epitel hücre nekrozu, safra tıkanıklığı ile karakterize kolanjiolitik hepatit görüldüğü ifade edilmektedir. Rhein'in mevcut intragastrik uygulaması bütün morfolojik bozuklukların ağırlığını azalttığı, özellikle de nötrofil infiltrasyonu ile sinüzoid kojesyonuna etki ettiği ifade edilmektedir. Rhein, aloe-emodin ve physione hepatosit ve kolanjiosit üstünde α -naftilisohtiosiyanat kaynaklı hasara karşı koruyucu etkiler gösterirken, emodin-chrysophanol kısmi koruma gösterdiği ifade edilmektedir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma, 2012 yılında Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı Gastroenteroloji Bilim Dalı protokolünde, Fizyoloji, Patoloji, Merkez Biyokimya ve Deney Hayvanları Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Çalışmada ortalama ağırlıkları 230 ± 20 gr arasında değişen, 8-12 haftalık 30 adet erkek Wistar Albino rat kullanıldı. Ratlar Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edildi.

Denekler ortalama kiloları benzer rastgele seçilerek her grup 10 rattan oluşmak üzere 3 grup oluşturuldu. Laboratuvar koşullarında standart olarak $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ ısıda ve 12 saat aydınlık/karanlık ışık periyodunda tutuldu. Beslenmede musluk suyu ve sıçan yemi kullanıldı. Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı (Ek 1 TÜHDYEK-2012/70). Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi komisyonu tarafından desteklendi (TÜBAP proje No: 2012/80) (Ek 2).

Çalışmada toksik hepatit modeli oluşturmada Katyare ve ark. (65)'nin geliştirdiği model kullanıldı. Rhein (Sigma, Almanya) çözeltisi hazırlanırken Zhao ve ark. (16)'nin geliştirdiği modelden faydalanıldı.

1.Grup (n=10) : Sağlıklı kontrol grubu olarak kabul edildi. 1 mL ılık salin ($45-50^{\circ}\text{C}$), periton içine enjeksiyon yoluyla verildi. Enjeksiyondan 1 saat sonra plasebo olarak gavaj yoluyla distile suda çözülmüş 1 mL %5'lik sodyum karboksi metilsellüloz (NaCMS) verildi.

2.Grup (n=10) : Toksik hepatit grubu olarak 1 gr/kg ılık asetaminofen çözeltisi 1 mL ip. verildi. Enjeksiyondan 1 saat sonra gavaj yoluyla distile suda çözülmüş 1 mL %5 NaCMS verildi.

3.Grup (n=10) : Tedavi grubu olarak 1 gr/kg ılık asetaminofen çözeltisi 1 mL ip. verildi. Enjeksiyondan 1 saat sonra gavaj yoluyla %5 NaCMS içinde çözülmüş 1 mL 40mg/kg Rhein verildi.

Asetaminofen çözeltisi enjeksiyonundan 24 saat sonra üç gruptaki bütün sıçanlar 10 mg/kg rompun ve 50 mg/kg kas içi ketamin anestezisi altında intrakardiyak kanları alındıktan hemen sonra sakrifiye edilen sıçanların açılan karın boşluklarından karaciğerleri alındı. Daha sonra buz kapları üzerindeki kurutma kâğıtlarının üstüne karaciğer çıkarılarak konuldu, bistüri yardımıyla longitudinal kesiyle üçe ayrıldı. Işık mikroskopisinde incelenmesi amacı ile karaciğerin bir parçası %10'luk formalin solüsyonuna konuldu, diğer karaciğer parçaları serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra kurutma kâğıdı ile kurutulup daha önceden kodlananalüminyum folyolara sarıldı, ağzı kilitli poşetlere konuldu ve MDA, GSH düzeyleri çalışılana kadar -80 °C' de saklandı.

Kan örnekleri +4 °C'de 3000xg'de 10 dakika soğutmalı santrifüjde santrifüj edildi, serum örnekleri ependorf tüplere alındı ve -80 °C' de saklandı.

Kullanılan Cihazlar

pH metre	: InoLab, Level 1, Almanya
Su banyosu	: Nickel Clifton Elektro LTD, İngiltere
Derin Dondurucu	: Thermo Elektron Corporation, USA
Spektrofotometre	: Spectronic Unicam Helios α , İngiltere
Manyetik karıştırıcı	: Remi equipments, Hindistan
Vorteks	: Heidolp, Almanya
Otoanalizör	: Advia 1800, Chemistry System, Almanya
Soğutmalı santrifüj	: MPW 350R, Polonya
Otomatik Pipetler	: Biohit Proline, Finlandiya, Mettler Toledo, İsviçre
Homojenizatör	: Polytron Kinematica AG, İsviçre
Hassas terazi	: Mettler Toledo, AB204-S, İsviçre

Kullanılan Kimyasal Maddeler

Asetaminofen	: Sigma, USA
Rhein	:Sigma, Almanya
%5NaCMS	: Sigma, USA
NaCl	: Merck, Almanya

DTNB	: Sigma, Almanya
Tiyobarbitürük asit	: Sigma, Almanya
EDTA	: Merck, Almanya
Butanol	: Merck, Almanya
Piridin	: Merck, Almanya
Etanol	: Riedel de Haen, Almanya
Sodyum dodesil sülfat	: Merck, Almanya
Na ₂ CO ₃	: Riedel de Haen, Almanya
Asetik asit	: Merck, Almanya
HCl	: Merck, Almanya
NaOH	: Merck, Almanya
KH ₂ PO ₄	: Merck, Almanya
KCl	: Merck, Almanya
Na ₂ HPO ₄	: Merck, Almanya

Biyokimyasal Çalışmalar

Trakya Üniversitesi Merkez Biyokimya Laboratuvarında, Advia 1800 (Chemistry System, Almanya) otoanalizör makinesi kullanılarak serumda; ALT, AST, T.BİL, D.BİL, ALP, GGT ölçümleri yapıldı.

Histolojik Çalışmalar

Işık mikroskopunda incelenmek üzere sagittal olarak kesilen ve %10 formalinde fikse edilmiş karaciğer parafin bloklara gömüldü. Bu işlemden sonra 4 mikrometre kalınlığında kesitler alınarak, hematoksilin-eozin (HE) boyası ile boyandıktan sonra ışık mikroskobu ile değerlendirilmiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada toksik gruptan 5 ratın karaciğerinin mikroskopik incelenmesinde önemli bir patolojiye rastlanılmadı. Bu nedenle çalışmanın patolojik değerlendirilmesinden vazgeçildi.

Karaciğer Dokusu Homojenizasyonu

Karaciğer dokuları -80 °C'den alındıktan sonra bistürü ile kesilerek tartıldı ve tüplere yerleştirildi. MDA ve GSH düzeyleri için 0.15 M KCl solüsyonu ile %10'luk (w:v) olacak şekilde hazırlandı ve tüpler buz üzerinde tutularak homojenizatör ile homojenize edildi. Homojenatlar 4000xg'de 10 dk +4 °C'de santrifüj edildi. Ardından üstte kalan süpernatanttan

0,2 ml kısmı alındı ve ayrılan süpernatantlar spektrofotometrik MDA, GSH düzeyleri ölçümlerinde kullanıldı.

Doku Malondialdehit Miktar Tayini

Çalışmamızda lipid peroksidasyon son ürünlerinden biri olan MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile asit ve sıcak ortamda tepkimeye girmesi sonucu oluşan pembe renk spektrofotometrik olarak ölçüldü (66).

Çözeltiler:

1. %0.8'lik tiyobarbitürik asit (TBA)
2. n-Butanol/Piridin (15:1)
3. %8.1'lik Sodyum dodesil sülfat (SDS)
4. %20'lik Asetik asit (NaOH ile pH 3.5'e ayarlandı)

Deneyin yapılışı: 0.2 ml 10 kat dilüe edilmiş karaciğer dokusu homojenatı; sırasıyla 0.2 ml %8.1'lik SDS, 1.5 ml %20'lik asetik asit, 1.5 ml %0.8'lik TBA ve 0.6 ml distile su eklendi. Oluşan karışım 95 °C'deki su banyosunda 1 saat tutuldu. Daha sonra musluk suyu ile soğutulup üzerine 1 ml distile su ve 5 ml butanol/piridin (15:1) ilave edilerek vorteksle 1 dakika karıştırıldı. Organik faz 4000xg'de 10 dakika santrifüj edilerek ayrıldı. Homojenat içermeyen ayıraç körüne karşı absorbanslar 532 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu.

Sonuçların hesaplanması

$$C \text{ (nmol/ml)} = \frac{10^9 \times A \times V_t}{10^3 \times L \times E \times V_s}$$

10⁹: Molün nanomole çevrilmesi

A: Absorbans

V_t: Total reaksiyon hacmi

10³: Litrenin mililitreye çevrilmesi

L: Küvet çapı

E: Tüketim katsayısı (1.56 10⁵ M⁻¹ cm⁻¹)

V_s: Total reaksiyon içindeki numune hacmi

Net sonuçlar MDA nmol/g yaş doku olarak ifade edildi.

Karaciğer Dokusu Glutasyon Düzeyinin Ölçümü

Karaciğer doku homojenatlarındaki serbest haldeki sülfidril gruplarının Ellman ayıracı ile meydana getirdiği rengin spektrofotometrik olarak tespit edilmesi, glutasyon düzeyinin belirtilmesi için kullanıldı (67).

Çözeltiler:

1. 1 mM Elman ayıracı: 4mg 5.5-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) (DNTB), 10 ml %1'lik sodyum sitrat çözeltisinde çözüldü.
2. Proteinsizleştirme çözeltisi: 120 g NaCl, 6.68 g metafosforik asit ve 0.8 g sodyum-EDTA tartıldı ve 400 ml distile suda çözüldü.
3. 0.3 M Disodyum fosfat (Na_2HPO_4)

Deneyin yapılışı: 0.5 ml karaciğer dokusu homojenatı üzerine 1.5 ml 0.15 M KCl ve 3 ml proteinsizleştirme çözeltisi ilave edildi. Oluşan karışım 3000xg'de 20 dakika santrifüj edildikten sonra 0.5 ml süpernatant alınarak üzerine 2 ml M Na_2HPO_4 ve 0.5 ml Ellman ayıracı ilave edildi. Homojenat içermeyen ayıraç körüne karşı absorbanlar 412 nm'de okundu. GSH düzeyleri ekstinksiyon katsayısı ($\Sigma=1.36 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak hesaplandı. Net sonuçlar GSH $\mu\text{mol /g}$ doku olarak ifade edildi.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak ifade edildi. Gruplar arasındaki farklılıklar, değişkenlerin normal dağılım özelliği göstermemelerinden dolayı Kruskal Wallis test ile değerlendirildi. Gruplar arasında farklılık olduğu tespit edilen parametrelerde çoklu karşılaştırma testi olarak Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanıldı. Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi için $p<0.016$ değeri istatistiksel anlamlılık sınır değeri olarak kabul edildi. İstatistiksel analizler T.Ü. Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalınca yapılmış olup, analizlerde anabilim dalının SPSS 20.0 lisanslı (Lisans No: 10240642) paket programı kullanıldı.

BULGULAR

Asetaminofen ile oluşturulan akut toksik hepatit modelinde Rhein'in olası olumlu etkisi, asetaminofenle toksik, rheinle tedavi ve kontrol grubu olmak üzere 10'ar rattan oluşan 3 grupta araştırıldı. Deneklerin karaciğer dokularında oksidatif stresi değerlendiren MDA (nmol/gr), antioksidan savunmayı gösteren GSH ($\mu\text{mol/gr}$)'nin yanısıra ALT, AST, ALP ve GGT düzeyleri (U/L), total bilirubin, direkt bilirubin (mg/dl) düzeyleri ölçülerek karşılaştırıldı. Gruplara ait değerler Tablo 1-3'te verilmiştir.

Asetaminofenle toksik hepatit oluşturulan grupta ortalama ALT 424 ± 34 U/L ($P1<0,001$), AST 953 ± 90 U/L ($P1<0,001$) olarak saptandı. Kontrol grubunda ortalama ALT $52\pm4,51$ U/L, AST $89\pm4,21$ U/L olup aradaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıydı. Asetaminofen ile toksik hepatit geliştirilen grupta ortalama serum ALP 201 ± 21 U/L ($P1<0,001$), GGT $3,90\pm3,14$ U/L ($P1<0,01$), T.BİL $0,17\pm0,048$ mg/dl ($P1<0,001$), D.BİL $0,07\pm0,048$ mg/dl ($P1<0,01$) düzeyleride kontrol grubu ALP $68\pm5,58$ U/L, GGT $0,50\pm0,52$ U/L, T.BİL $0,03\pm0,048$ mg/dl, D.BİL 0 ± 0 mg/dl düzeylerine göre yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Asetaminofen ile toksik hepatit geliştirilen grupta ortalama ALT 424 ± 34 U/L, AST 953 ± 90 U/L, ALP 201 ± 21 U/L, GGT $3,90\pm3,14$ U/L, T.BİL $0,17\pm0,048$ mg/dl, D.BİL $0,07\pm0,048$ mg/dl tespit edilmiş olup tedavi amacıyla Rhein verilen tedavi grubunda ortalama ALT 232 ± 42 U/L ($P3<0,001$), AST 495 ± 66 U/L ($P3<0,001$), ALP 164 ± 28 U/L ($P3<0,01$), GGT $2,70\pm3,46$ U/L, T.BİL $0,06\pm0,052$ mg/dl ($P3<0,01$), D.BİL 0 ± 0 mg/dl ($P3<0,01$) saptandı. Bunun yanı sıra Rhein grubunda GGT düzeyleri hariç ALT, AST, ALP, T.BİL, D.BİL düzeyleri toksik gruba göre azalmış ve istatistiksel anlamlı bulundu.

Rhein ile tedavi edilen grupta ortalama ALT 232 ± 42 U/L ($P_2 < 0,001$), AST 495 ± 66 U/L ($P_2 < 0,001$), ALP 164 ± 28 U/L ($P_2 < 0,001$) düzeyleri tespit edilmiş olup kontrol grubu ALT $52\pm 4,51$ U/L, AST $89\pm 4,21$ U/L, ALP $68\pm 5,58$ U/L düzeylerine göre yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Tedavi grubu GGT $2,70\pm 3,46$ U/L, T.BİL $0,06\pm 0,052$ mg/dl, D.BİL 0 ± 0 mg/dl düzeyleri ile kontrol grubunun GGT $2,70\pm 3,46$ U/L, T.BİL $0,06\pm 0,052$ mg/dl, D.BİL 0 ± 0 mg/dl, düzeyleri arasında fark görülmedi.

Karaciğer dokusunda oksidatif stresi gösteren MDA düzeyi toksik hepatit grubunda $0,051\pm 0,007$ nmol/gr, tedavi grubunda $0,060\pm 0,026$ nmol/gr, kontrol grubu $0,03\pm 0,010$ nmol/gr olarak saptandı. Toksik grupta MDA düzeyi yüksek olmakla birlikte kontrol grubu ile arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı. Tedavi grubunda MDA düzeyleri kontrol grubundan anlamlı olarak yüksekti ($P_2 < 0,01$). Toksik ve tedavi grubu değerleri arasında istatistiksel anlamlı bir fark bulunmadı.

Karaciğer dokusunda antioksidan savunmayı gösteren GSH düzeyleri toksik hepatit grubunda $0,048\pm 0,007$ μ mol/gr, tedavi grubunda $0,049\pm 0,004$ μ mol/gr, kontrol grubunda $0,01\pm 0,005$ μ mol/gr olarak saptandı. GSH düzeyi toksik hepatit grubunda kontrol grubuna göre yüksek bulunmuş olup istatistiksel olarak anlamlı tespit edilmiştir ($P_1 < 0,001$). Tedavi grubu GSH düzeyi kontrol grubuna göre yüksek bulunmuş olup istatistiksel anlamlı bulundu ($P_2 < 0,001$). Tedavi grubu ile toksik hepatit grubu GSH düzeyi bakımından istatistiksel anlamlı fark saptanmadı.

Şekil 5’de kontrol grubu, toksik hepatit grubu ve tedavi grubu serum MDA düzeyleri nmol/gr cinsinden verilmiş olup her 3 grubun ortalama MDA değerleri sırasıyla $0,034$ - $0,051$ - $0,050$ nmol/gr, en düşük MDA değerleri $0,03$ - $0,04$ - $0,04$ nmol/gr, en yüksek MDA değerleri $0,06$ - $0,07$ - $0,13$ nmol/gr tespit edilmiş olup toksik hepatit grubu ile kontrol grubu arasında MDA değerleri bakımından istatistiksel anlamlı bir fark bulunmadı. Tedavi grubu ile toksik hepatit grubu arasındaki MDA değerleri bakımından istatistiksel anlamlı bir fark bulunmadı.

Şekil 6’da kontrol grubu, toksik hepatit grubu ve tedavi grubu serum ALT düzeyleri U/L cinsinden verilmiş olup her 3 grubun ortalama ALT değerleri sırasıyla 52 - 417 - 226 U/L, en düşük ALT değerleri 44 - 386 - 174 U/L, en yüksek ALT değerleri 59 - 503 - 314 U/L tespit edilmiş olup toksik hepatit grubu ile tedavi grubu ALT değerleri kontrol grubundan yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Tedavi grubu ALT değerleri toksik hepatit ALT değerlerinden düşük ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Şekil 7’de kontrol grubu, toksik hepatit grubu ve tedavi grubu serum AST düzeyleri U/L cinsinden verilmiş olup her 3 grubun ortalama AST değerleri sırasıyla 90-961-491 U/L, en düşük AST değerleri 81-814-414 U/L, en yüksek AST değerleri 94-1084-600 U/L tespit edilmiş olup toksik hepatit grubu ile tedavi grubu AST değerleri kontrol grubundan yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Tedavi grubu AST değerleri toksik hepatit AST değerlerinden düşük ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Şekil 8’de kontrol grubu, toksik hepatit grubu ve tedavi grubu serum ALP düzeyleri U/L cinsinden verilmiş olup sırasıyla her 3 grubun ortalama ALP değerleri 67-196-161 U/L, en düşük ALP değerleri 63-179-109 U/L, en yüksek ALP değerleri 78-245-204 U/L tespit edilmiş olup toksik hepatit grubu ile tedavi grubu ALP değerleri kontrol grubundan yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Tedavi grubu ALP değerleri toksik hepatit ALP değerlerinden düşük ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Şekil 9’da kontrol grubu, toksik hepatit grubu ve tedavi grubu serum GGT düzeyleri U/L cinsinden verilmiş olup sırasıyla her 3 grubun ortalama GGT değerleri 0,5-3-1 U/L, en düşük GGT değerleri 0-0-0 U/L, en yüksek GGT değerleri 1-11-10 U/L tespit edilmiş olup toksik hepatit grubu GGT değerleri kontrol grubundan yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Tedavi grubu ile toksik hepatit grubu arasında GGT değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı.

Şekil 10’da kontrol grubu, toksik hepatit grubu ve tedavi grubu serum T.BİL düzeyleri mg/dl cinsinden verilmiş olup sırasıyla her 3 grubun ortalama T.BİL değerleri 0-0,2-0,1 mg/dl, en düşük T.BİL değerleri 0-0-0 mg/dl, en yüksek T.BİL değerleri 0-0-0 mg/dl tespit edilmiş olup toksik hepatit grubu T.BİL değerleri kontrol grubundan yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Tedavi grubu T.BİL düzeyleri toksik hepatit grubuna göre düşük ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Şekil 11’de kontrol grubu, toksik hepatit grubu ve tedavi grubu serum D.BİL düzeyleri mg/dl cinsinden verilmiş olup sırasıyla her 3 grubun ortalama D.BİL değerleri 0-0,1-0 mg/dl, en düşük D.BİL değerleri 0-0-0 mg/dl, en yüksek D.BİL değerleri 0-0-0 mg/dl tespit edilmiş olup toksik hepatit grubu D.BİL değerleri kontrol grubundan yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Tedavi grubu D.BİL düzeyleri toksik hepatit grubuna düşük ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Yapmış olduğumuz çalışmada toksik gruptan 5 ratın karaciğerinin mikroskopik incelenmesinde önemli bir patolojiye rastlanılmadı. Bu nedenle çalışmanın patolojik değerlendirilmesinden vazgeçildi.

Tablo 1. Kontrol grubu ile toksik hepatit grubu arasındaki karaciğer doku ağırlığı, karaciğer doku malondialdehit düzeyi, karaciğer doku glutasyon düzeyi ve kan biyokimyasal değerlerinin karşılaştırılması

	Kontrol grubu Ort±SS	Toksik hepatit grubu Ort±SS	P1
DA	0,18±0,01	0,18±0,01	-
Doku MDA	0,03±0,01	0,05±0,007	0,017
Doku GSH	0,01±0,005	0,04±0,007	<0,001*
ALT	52±4,51	424±34	<0,001*
AST	89±4,21	953±90	<0,001*
ALP	68±5,58	201±21	<0,001*
GGT	0,50±0,52	3,90±3,14	0,002*
T.BİL.	0,03±0,04	0,17±0,048	<0,001*
D.BİL.	0,00±0,00	0,07±0,048	0,001*

DA: Doku ağırlığı; Doku MDA: Doku malondialdehit; Doku GSH: Doku glutasyon; ALT: Alanin aminotransferaz; AST: Aspartat aminotransferaz; ALP: Alkalen fosfat; GGT: Gamaglutamiltransferaz; T.BİL.: Total bilirubin; D.BİL.: Direkt bilirubin; SS: Standart Sapma; Ort: Ortalama. Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi, P1* <0,016 istatistiksel olarak anlamlı.

Tablo 2. Kontrol grubu ile tedavi grubu arasındaki karaciğer doku ağırlığı, karaciğer doku malondialdehit düzeyi, karaciğer doku glutasyon düzeyi ve kan biyokimyasal değerlerinin karşılaştırılması

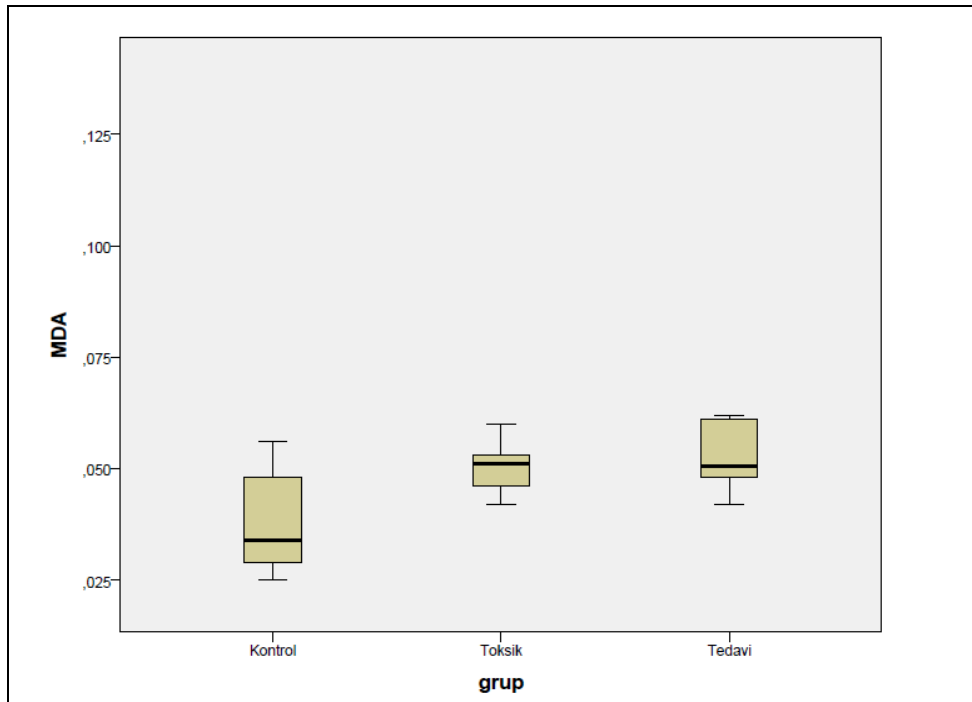
	Kontrol grubu Ort±SS	Tedavi grubu Ort±SS	P2
DA	0,18±0,01	0,18±0,01	-
Doku MDA	0,03±0,01	0,06±0,02	0,006**
Doku GSH	0,01±0,005	0,04±0,004	<0,001**
ALT	52±4,51	232±42	<0,001**
AST	89±4,21	495±66	<0,001**
ALP	68±5,58	164±28	<0,001**
GGT	0,50±0,52	2,70±3,46	0,106
T.BİL.	0,03±0,04	0,06±0,05	0,189
D.BİL.	0,00±0,00	0,00±0,00	1

DA: Doku ağırlığı; Doku MDA: Doku malondialdehit; Doku GSH: Doku glutasyon; ALT: Alanin aminotransferaz; AST: Aspartat aminotransferaz; ALP: Alkalen fosfat; GGT: Gamaglutamiltransferaz; T.BİL.: Total bilirubin; D.BİL.: Direkt bilirubin; SS: Standart Sapma; Ort: Ortalama. Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi, P2** <0,016 istatistiksel olarak anlamlı.

Tablo 3. Toksik hepatit grubu ile tedavi grubu arasındaki karaciğer doku ağırlığı, karaciğer doku malondialdehit düzeyi, karaciğer doku glutasyon düzeyi ve kan biyokimyasal değerlerinin karşılaştırılması

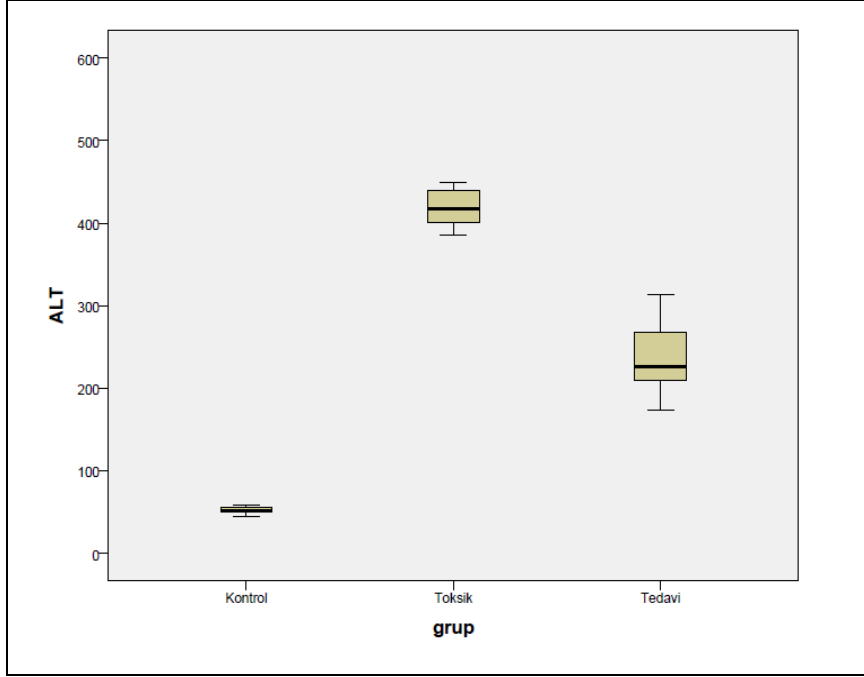
	Toksik hepatit grubu Ort±SS	Tedavi grubu Ort±SS	P3
DA	0,18±0,01	0,18±0,01	-
Doku MDA	0,05±0,007	0,06±0,02	0,569
Doku GSH	0,04±0,007	0,04±0,004	0,676
ALT	424±34	232±42	<0,001 ***
AST	953±90	495±66	<0,001 ***
ALP	201±21	164±28	0,010 ***
GGT	3,90±3,14	2,70±3,46	0,192
T.BİL.	0,17±0,048	0,06±0,05	0,001 ***
D.BİL.	0,07±0,048	0,00±0,00	0,001 ***

DA: Doku ağırlığı; **Doku MDA:** Doku malondialdehit; **Doku GSH:** Doku glutasyon; **ALT:** Alanin aminotransferaz; **AST:** Aspartat aminotransferaz; **ALP:** Alkalen fosfataz; **GGT:** Gamaglutamiltransferaz; **T.BİL.:** Total bilirubin; **D.BİL.:** Direkt bilirubin; **SS:** Standart Sapma; **Ort:** Ortalama. Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi, P3***<0,016 istatistiksel olarak anlamlı



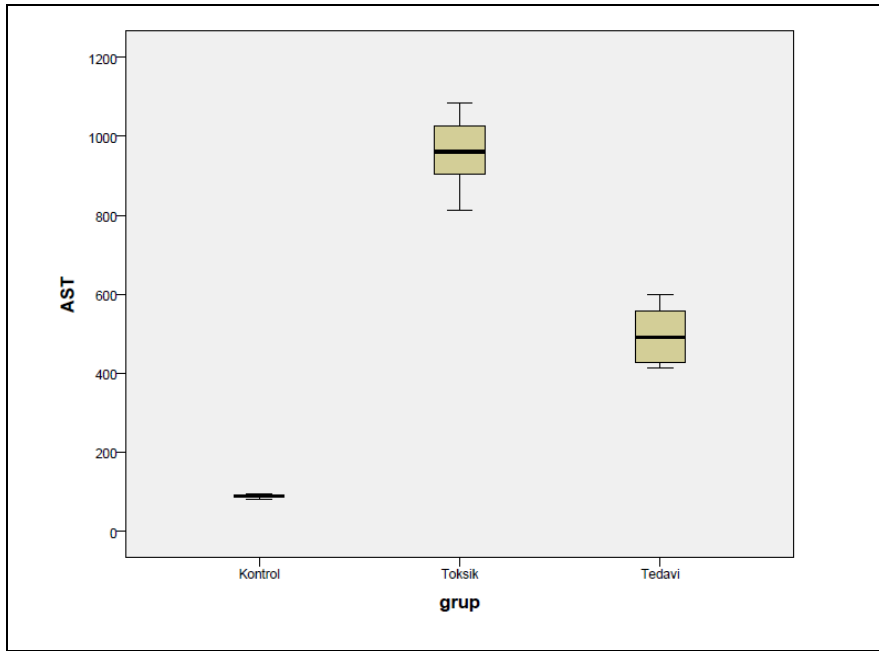
MDA: Malondialdehit.

Şekil 5. Grupların karaciğer doku, malondialdehit düzeylerinin grafiksel gösterimi



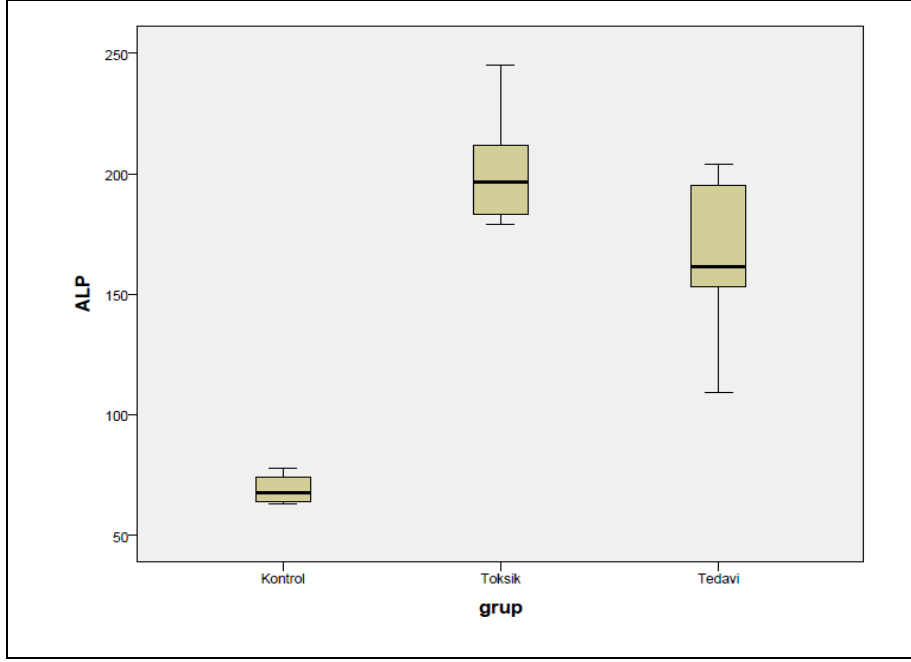
ALT: Alanin amino transferaz

Şekil 6. Grupların serum ALT düzeylerinin grafiksel gösterimi



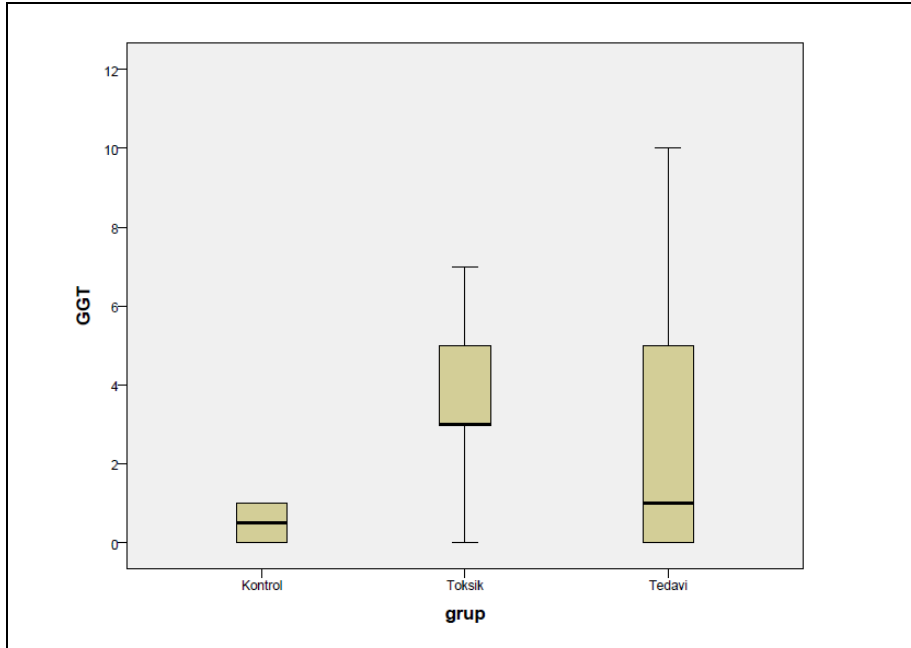
AST: Aspartat aminotransferaz

Şekil 7. Grupların serum AST düzeylerinin grafiksel gösterimi



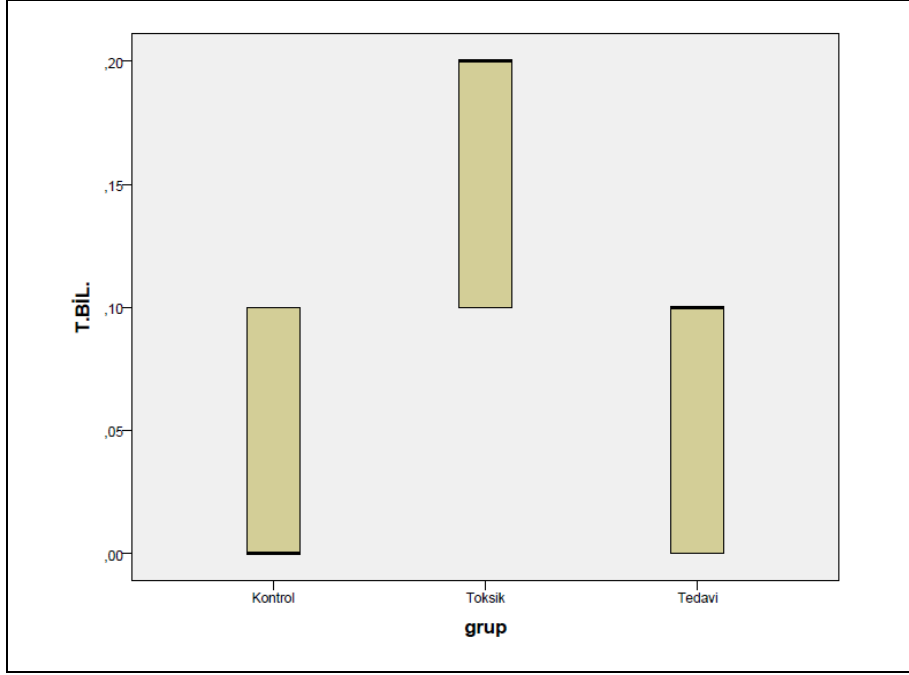
ALP:Alkale fosfataz.

Şekil 8. Grupların serum ALP düzeylerinin grafiksel gösterimi



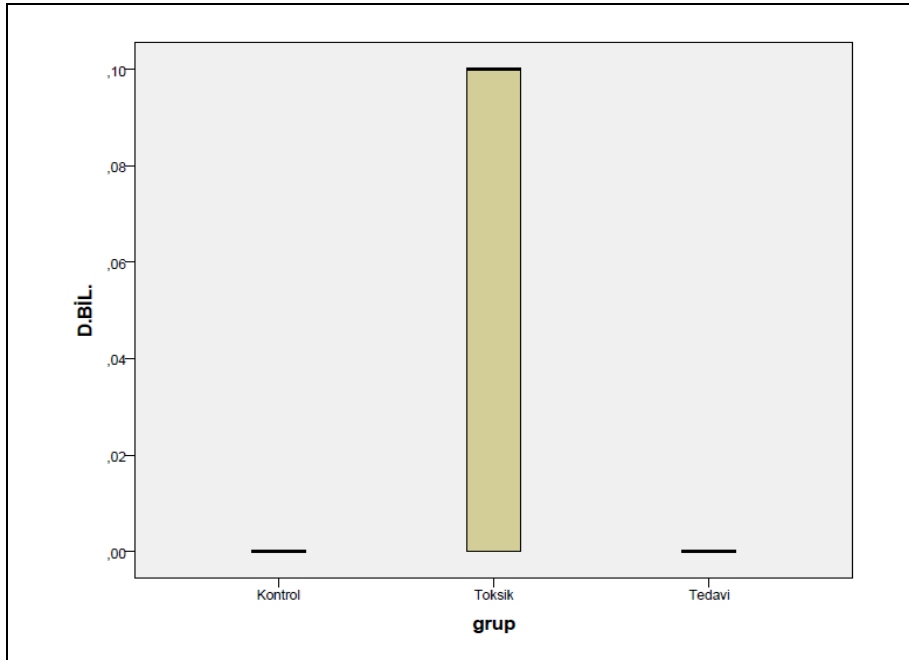
GGT: Gamaglutamil transferaz

Şekil 9. Grupların serum GGT düzeylerinin grafiksel gösterimi



T.BİL: Total bilirubin

Şekil 10. Grupların serum T.BİL. düzeylerinin grafiksel gösterimi



D.BİL: Direkt bilirubin

Şekil 11. Grupların serum D.BİL. düzeylerinin grafiksel gösterimi

TARTIŞMA

Karaciğer gastrointestinal kanal ile sistemik dolaşım arasında yer alan, birçok görevinin yanısıra zararlı maddeleri detoksifiye ve metabolize eden bir organdır. İlaçlar, bazı kimyasallar ve bitkilerle gelişen karaciğer hasarı hepatotoksisite veya toksik hepatit olarak tanımlanır. İlaça bağlı hepatotoksisite doza bağlı veya idiyosenkratik-allerjik olabilir. İlacın dozuna bağlı ve önceden tahmin edilebilir tipine intrinsek hepatotoksisite denmektedir. Hemen çoğu ilaç doza bağlı olarak karaciğeri olumsuz olarak etkiliyorsa da bunlar arasında başta asetaminofen gelmektedir (3).

Asetaminofenin akut doz aşımı değişik düzeylerde karaciğer hasarına yol açar (7). Amerika Birleşik Devletleri'nde asetaminofen toksisitesi akut karaciğer yetmezliğinin en sık nedenidir (3,68,69). Akut tabloda tedavide erken dönemde kusturma, mide lavajı gibi yöntemler uygulanıyorsa da rutin olarak etkinliği tartışılan glutatyon prekürsörü NAC kullanılmaktadır (3,24). Bu konuda tedavi için başta glikokortikoidler, ursodeoksikolik asit olmak üzere antioksidan olarak tanımlanan birçok bitki, vitamin ve molekül deneysel olarak araştırılmaktadır (3). Bu çalışmada sıçanlarda asetaminofenle oluşturulan deneysel hepatotoksisite modelinde bitkisel kökenli antioksidan rheinin etkisi araştırıldı.

İlk kez 1989 tarihinde karaciğer hasarı tanımı serum aspartat aminotransferaz, alkalen fosfataz ve total bilirubinin birlikte artışı (bunlardan birinin normalin üst sınırını 2 kat aşması şartıyla) veya serum alanin aminotransferaz veya konjuge bilirubin seviyesinde normalin üst sınırının 2 katından daha fazla artışı olarak tanımlanmıştır. 2001 tarihinden sonra ise alanin aminotransferaz değerleri normal üst sınırının 3 katından, total bilirubin normal üst sınırının iki katından daha yüksek olması klinik olarak önemli karaciğer test anormalliği seviyesi

olarak belirlenmiştir. Serum enzimleri; ALT (alanin aminotransferaz), AST (aspartat aminotransferaz), ALP (alkalen fosfataz), karaciğer hasarının göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Hem total hem de konjuge bilirubin seviyeleri genel karaciğer fonksiyonunun ölçüsü olarak alınmıştır (3). Bundan dolayı çalışmamızda karaciğer hasar göstergesi olarak ALT, AST, ALP, GGT, Total bilirubin, Direkt bilirubin kullanıldı.

Asetaminofen ile oluşturulan akut toksik hepatit modelinde Rhein'in olası olumlu etkisini araştırmak amacıyla 10'ar rattan oluşan asetaminofenle toksik, Rhein'li tedavi grubu ve kontrol grubu olmak üzere üç grup araştırıldı. Deneklerin karaciğer dokularında oksidatif stresi değerlendiren MDA, antioksidan savunmayı gösteren GSH düzeylerine bakıldı. Tüm ratların karaciğer MDA (nmol/gr) ve GSH ($\mu\text{mol/gr}$) değerlerinin yanısıra ALT, AST, ALP ve GGT düzeyleri (U/L), total bilirubin, direkt bilirubin (mg/dl) düzeyleri de ölçülerek karşılaştırıldı.

Asetaminofenin 500-1000 mg/kg dozu hepatotoksisite oluşturmaktadır (25,65,70-73). Lin ve ark.(73) 500 mg/kg/ip asetaminofen ile ratlarda yapmış oldukları bir çalışmada 24 saat sonra ALT ve AST değerlerini yüksek bulmuşlardır. Waters ve ark. (25) ve Yen ve ark. (74) yaptıkları çalışmalarda 800-835 mg/kg/ip asetaminofen ile hepatotoksisite geliştirerek 24 saat sonra ALT ve AST değerlerini yüksek bulmuşlardır. Deneysel akut toksik hepatit oluşturmak için çalışmamızda yüksek doz asetaminofen (1000 mg/kg/i.p) verildi. 24 saat sonra kan örnekleri alınarak biyokimyasal ölçümler yapıldı. Asetaminofenle toksik hepatit oluşturulan grupta ortalama ALT 424 ± 34 U/L ($P1<0,001$), AST 953 ± 90 U/L ($P1<0,001$) olarak saptandı. Kontrol grubunda ortalama ALT $52\pm 4,51$ U/L, AST $89\pm 4,21$ U/L olup aradaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıydı. Asetaminofen ile toksik hepatit geliştirilen grupta ortalama serum ALP 201 ± 21 U/L ($P1<0,001$), GGT $3,90\pm 3,14$ U/L ($P1<0,01$), T.BİL $0,17\pm 0,048$ mg/dl ($P1<0,001$), D.BİL $0,07\pm 0,048$ mg/dl ($P1<0,01$) düzeyleride kontrol grubu ALP $68\pm 5,58$ U/L, GGT $0,50\pm 0,52$ U/L, T.BİL $0,03\pm 0,048$ mg/dl, D.BİL 0 ± 0 mg/dl düzeylerine göre yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Chiu ve ark. (70) asetaminofen (1000 mg/kg/ip.) ile ratlarda oluşturdukları hepatotoksisite de AST ve T.BİL. değerlerini 6-24 saat sonra yüksek tespit etmişlerdir. Çalışmada ayrıca ratlara biliverdin veya hemin vererek T.BİL. düzeylerinin olumlu etkilendiğini belirtmişlerdir.

Tedavi grubunda kontrole göre ALT, AST, ALP düzeyleri yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Gardner ve ark. (72) ratlarda asetaminofen ile indüklenmiş

hepatotoksisitede nitrik oksidin rolünü araştırdıklarını bir çalışmada 3 gün aminoguanidin n tedavisi ile ALT, AST düzeylerinde önemli bir farklılık bulmamışlardır.

Tedavi grubunda toksik hepatit grubuna göre ALT, AST, ALP, T.BİL., D.BİL. düzeyleri düşük ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Zhao ve ark.(16)'nın asetaminofene bağlı hepatik ve renal toksisitede rhein'in koruyucu etkisini araştırdıkları çalışmada 48 saat sonra sakrifiye edilen ratların ALT, AST, T.BİL, re, kreatin değerlerinde düşme olduğu belirtilmektedir. Zhao ve ark.(64) α -naftilisothiosiyanaata bağlı kolestatik modelinde rhubarb adlı bitkinin içindeki antrakinonların etkilerini incelemişlerdir. Kolestatik karaciğer hasarından 36 saat sonra sıçanlara rhein, aloe-emodin, physion vermişler ve ALT, AST, T.BİL, D.BİL, ALP, GGT, total safra asidi düzeylerinin önemli miktarda azaldığını tespit etmişlerdir. Kullanılan maddeler arasında kolestatik indeksi ve biyokimyasal belirteçleri en iyi azaltanın rhein olduğunu ifade etmişlerdir. Buna göre bizim bulgularımızın literatürlere ile uyum içinde olduğu söylenebilir.

Rhein verilen tedavi grubunda ALT, AST, ALP, T.BİL, D.BİL. düzeyleri toksik gruba göre düşük saptandı. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Ancak GGT düzeylerinde bir farklılık bulunmadı. Literatürde asetaminofen hepatotoksisitesi ve rhein kullanımında GGT düzeyleri ile ilgili bir çalışmaya rastlanılmamaktadır.

Asetaminofen verilerek toksik hepatit oluşturulan gruptaki ALT değeri 424 ± 34 U/L, AST değeri 953 ± 90 U/L bulundu. Rheinli tedavi grubunda ortalama ALT değeri 232 ± 42 U/L, AST değeri 495 ± 66 U/L olarak değerlendirildi. Toksik hepatit grubu ile tedavi grubu arasındaki ALT, AST düzeylerindeki farklılık istatistiksel olarak anlamlıydı. Jahromi ve ark.(75)'nin ratlarda asetaminofen kaynaklı karaciğer hasarına karşı ghrelinin koruyucu etkisini araştırdıkları bir çalışmada 18.saatte ALT, AST değerleri karşılaştırılmıştır. Toksik hepatit grubunda ALT $350,16 \pm 33,36$ U/L ve AST $724,66 \pm 68,59$ U/L, kontrol grubunda ALT $51,16 \pm 3,56$ U/L ve AST $137,66 \pm 8,2$ U/L olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre bizim bulgularımızın literatür ile uyum içinde olduğu anlaşılmaktadır.

Toksik hepatit grubu ile tedavi grubundaki ALT, AST, ALP değerleri kontrol grubuna göre yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Jin ve ark.(76)'nın hepatotoksik asetaminofen dozu (1000 mg/kg) ile ratların kalbinde gen ekspresyonunu araştırdıkları çalışmada 24 saat sonra alınan kan örneklerinde total protein, albumin, BUN, kreatin, ALT, AST, ALP, GGT, Total kolesterol düzeyleride incelenmiştir. Toksik hepatit grubunda kontrol grubuna göre BUN, ALT, AST değerlerini yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır. ALP değerlerinde ise anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Yaptığımız çalışmada bulunan

ALT, AST değerleri çoğu literatürle uyum içindedir. ALP düzeylerinin yüksekliği hepatosit hasarı ile birlikte safra epitelininde etkilendiğini düşündürmektedir.

Hastalık, toksikasyon gibi değişik etkenlerle oluşan doku hasarında oksidatif stresin arttığını lipid peroksidasyon ürünü olan MDA ile değerlendirilir. Bu çalışmada toksik gruptaki karaciğer MDA düzeyleri kontrol grubundaki her bir MDA düzeyinden az yükseklik gösterse de istatistiksel olarak her iki grup arasında anlamlı farklılık tespit edilemedi. Bir çok çalışmada asetaminofen aracılıklı karaciğer hasarında oluşan oksidatif stresin karaciğer dokusu MDA düzeyini arttırdığı bildirilmektedir (8,25,73,77). Arafa (77) asetaminofen ile oluşturulan toksik hepatitte karnitin eksikliğinin bir risk faktörü olabileceğini araştırdıkları çalışmalarında asetaminofen (1000 mg/kg/ip)'den 48 saat sonra karaciğer MDA düzeylerini kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulmuştur. Bizde MDA düzeylerinde anlamlı yükseklik görülmemesi başka olumsuz bir durumun olmaması ve deneyin süresi ile ilgili olabilir. Buna göre asetaminofen toksikasyonunda MDA'nın artışının 24 saatten daha uzun bir sürede oluşabileceği düşünülebilir.

Bazı çalışmalarda ise asetaminofen toksisitesinin karaciğer MDA düzeyini arttırmadığı belirtilmektedir. Garrido ve ark. (78)'ları karaciğer hücre kültürlerine asetaminofen katılmasının lipid oksidasyonuna etkili olmadığını ileri sürmüşlerdir (78). Benzer olarak Powell ve ark. (79) rat karaciğerinde asetaminofene bağlı oksidatif streste lipid oksidasyonunun gerçekleşmediğini ve MDA'nın artmadığını ifade etmektedirler (79). Ayrıca bir çalışmada ortamdaki nitrik oksidin antioksidan etki ile lipid peroksidasyon tepkimelerini engelleyebileceği ileri sürülmüştür (80). Nitrik oksid, lipid peroksidasyonunu hem önleyebilir hem de artırabilir. Önleyici özelliğini lipid peroksil radikallerini yakalaması ve peroksidaz enzimlerini engellemesi ile yapmaktadır. Şayet ortamda süperoksid varsa nitrik oksit peroksinitriti oluşturarak lipid peroksidasyonunu artırabilmektedir (81). Literatürde belirtilen bu etkenler göz önüne alındığında, çalışmamızda toksik gruptaki MDA düzeylerinin kontrole göre anlamsız yüksekliği açıklanabilir.

Hücre ve doku hasarlarında antioksidan savunma, enzimatik olmayan bir antioksidanla glutatyonla değerlendirilir (82,83). GSH yani redükte glutatyon (indirgenmiş glutatyon)'un en önemli görevlerinden biri hidrojen peroksidi suya dönüştürmektir (84). Bazı proteinlerde yer alan sülfhidril gruplarını indirgenmiş (redükte) halde tutarak protein ve enzimlerin okside olmasını engeller (85). GSH düzeyinin azalmasının serbest radikal oluşumuna (85) ve mitokondriyal fonksiyonlarda bozulmaya yol açtığı rapor edilmiştir (86). Mevcut literatür bilgileri asetaminofen aracılıklı karaciğer hasarında azalmış glutatyon miktarının karaciğer

hasarını başlattığı ifade edilmektedir (86-89). Bu çalışmada karaciğer GSH düzeyleri toksik hepatit grubunda kontrol grubuna göre yüksek bulunmuş olup istatistiksel olarak anlamlı tespit edilmiştir. Bu sonuç antioksidan aktivitenin arttığını düşündürmektedir.

Deneysel bir çalışmada asetaminofenden 4 saat sonra total karaciğer GSH miktarında anlamlı bir azalma olduğu, 24 saatin sonunda ise anlamlı bir değişimin tespit edilmediği bildirilmektedir (90). Bir başka çalışmada ise sıçanlara asetaminofen uygulandıktan sonra karaciğer GSH seviyelerinin tekrar normale dönüşünün, asetaminofen dozuna bağlı olarak farklı zamanlarda olduğu belirtilmektedir (91). Çalışmamızda asetaminofen verildikten 24 saat sonra toksik grubun GSH düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı yüksek bulundu ($p<0,001$). Bu yüksekliğin nedeninin hasara karşı artmış karaciğer savunması olduğu düşünülmektedir.

Yapılan çalışmada asetaminofenle oluşturulmuş toksik hepatit grubu ile antioksidan olarak Rhein verilen tedavi grubu arasında karaciğer dokusu GSH miktarı bakımından istatistiksel anlamlı bir fark gözlenmedi. Görülebildiği kadarıyla literatürde asetaminofen aracılıklı karaciğer hasarında Rhein'in, karaciğer dokusu GSH düzeyi üzerine etkisini araştıran tek bir çalışma bulunmaktadır (16). Bu çalışmada asetaminofen toksikasyonundan 1 saat sonra 10-20-40 mg/kg rheim verilmiş olup 48 saat sonra kanda ALT, AST, ALP, GGT, T.BİL, D.BİL. ve karaciğer dokusunda lipid peroksidasyon göstergesi olan MDA, antioksidan sistem savunucusu GSH düzeyleri bakılmıştır. 40 mg/kg rheim dozunun toksik gruba göre karaciğer GSH düzeylerini artırdığı kontrol grubunun GSH değerine yakın bir değer yakaladığı ifade edilmektedir (16). Tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu serbest süperoksit radikal anyonu oluşur. Kendisi direkt zarar vermez, asıl önemi hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır (11). Rhein doza bağlı olarak süperoksit anyon üretimini önlemekte ve ayrıca NADPH sitokrom p 450 redüktaz, ubiquinone ve NADH-ubiquinone redüktaz gibi çok çeşitli tek elektron azaltan flavoenzimlerin substratı olarak da görev aldığı ifade edilmektedir. Bundan dolayı lipid ve proteinlerin oksidasyonunu azaltabileceği söylenmektedir (16). Zi ve ark. (92)'nin yaptığı deneysel çalışmada Rhein'in karbon tetraklorid kaynaklı karaciğer fibrozisini engellediği ve oksidatif stresin arttığını gösteren karaciğer dokusu MDA ve ALT düzeylerini düşürdüğünü göstermiştir.

Literatürde asetaminofen aracılıklı karaciğer hasarının mikroskopik değerlendirmesinde balon dejenerasyon, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve fokal nekroz gözlemlendiği belirtilmektedir (16,74,93). Bir çalışmada Rhein'in oluşan bu morfolojik

değişiklikleri azalttığını bildirilmektedir (16). Yapmış olduğumuz çalışmada toksik gruptan 5 ratın karaciğerinin mikroskopik incelenmesinde önemli bir patolojiye rastlanılmadı. Bu nedenle çalışmanın patolojik değerlendirilmesinden vazgeçildi. Bu durum asetaminofen hepatotoksitesinde karaciğer nekrozunun en sık 3 ile 5 gün arasında görülmesi ile açıklanabilir (94-98). Toksik grup ile tedavi grubu MDA ve GSH düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı bir fark olmadan Rhein tedavisi ile transaminaz düzeylerinin istatistiksel anlamlı azalması ($p<0,001$), kovalent bağlanma veya glutatyonun azalmasını açık bir biçimde etkilemeden birtakım antioksidanların karaciğer hasarını önlediğini gösteren yayınlar ile açıklanabilir (99-101).

Bu çalışmada sıçanlarda 1000 mg/kg/ip asetaminofen ile oluşturulan hepatotoksitede karaciğer dokusunda beklenen MDA artışını ve glutatyon azalması gözlenmemiştir. Antioksidan tanımlı Rhein (40 mg/kg/ip) tedavisi ile hafif artmış olan MDA düzeyleri değişmemekle birlikte transaminaz düzeylerinde azalma gözlenmiştir. İleride yapılması planlanan deneysel hepatotoksitesite ve antioksidan tedavi çalışmalarında değerlendirilmelerin 24-48 ve 72 saatlik farklı gruplarda ve histopatoloji ile doğrulanarak yapılması yararlı olacaktır.

SONUÇLAR

Çalışmada ratlarda asetaminofen ile oluşturulan akut toksik hepatitte karaciğer enzimleri ve oksidatif strese Rhein tedavisinin olası olumlu etkisinin araştırılması planlandı. Antioksidan etkili olduğu belirtilen Rhein'in lipid peroksidasyonu üzerine etkisini karaciğer dokusunda MDA ile antioksidan kapasitesi ise GSH ölçümü ile değerlendirildi. Bunun yanısıra serumda hepatotoksisiteyi yansıtan ALT, AST, ALP, GGT, T.BİL, D.BİL düzeyleri incelenerek aşağıdaki sonuçlara varılmıştır.

1. Asetaminofen ile oluşturulan toksik hepatit grubunda serum ALT, AST, ALP, GGT, Bilirubin düzeyleri, kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak yüksek bulundu.
2. Rhein uygulanan tedavi grubunda serum ALT, AST, ALP, Bilirubin düzeyleri, toksik hepatit grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak düşük bulundu.
3. Toksik hepatit grubunda karaciğer doku MDA düzeyi, kontrol grubuna göre yüksekti ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.
4. Toksik hepatit grubu ile rheinli tedavi grupları arasında karaciğer doku MDA düzeyi bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.
5. Karaciğer doku GSH düzeyi, toksik hepatit grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı yüksek bulundu.
6. Tedavi grubu ile toksik hepatit grubu arasında karaciğer GSH düzeyi bakımından istatistiksel anlamlı bir fark tespit edilmedi.

Sonuç olarak mevcut çalışmamızda ratlarda 1 gr/kg/ip asetaminofen ile oluşturulan hepatotoksistide karaciğer dokusunda beklenen MDA artışını ve glutatyon azalması gözlenememiştir. Antioksidan tanımlı Rhein (40 mg/kg/ip) tedavisi ile hafif artmış olan MDA düzeyleri değişmemekle birlikte ALT, AST düzeylerinde azalma gözlenmiştir. İleride

yapılması planlanan deneysel hepatotoksisite ve antioksidan tedavi çalışmalarında değerlendirilmelerin 24-48 ve 72 saatlik farklı gruplarda ve histopatoloji ile doğrulanarak yapılması yararlı olacaktır.

ÖZET

Asetaminofen hepatotoksisitesinde fizyolojik yolların ve antioksidan savunma sisteminin yetmezliği sonucu toksik metabolit N-asetil-p-benzoquinone imine'nin karaciğer hasarını başlattığı, artan toksik oksijen radikallerinin hücre organellerini bozarak lipid peroksidasyonuna neden olduğu ileri sürülmektedir. Hücrede malondialdehit gibi zararlı oksijen radikalleri birikmekte, glutatyon, glutatyon peroksidaz, katalaz ve süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzim aktivitesi önce artmakta sonra yetersiz kalmaktadır. Asetaminofen hepatotoksisitesinde rutinde antioksidan etkili olduğu ileri sürülen N-asetilsistein kullanılmakla birlikte benzer etkinliği düşünülen Rhein gibi yeni ajanlar araştırılmaktadır.

Bu çalışmada; 8-12 haftalık 10 ratdan oluşan 3 grup oluşturuldu. 1. Grup sağlıklı kontrol olarak kabul edildi. İntraperitoneal 1 mL salinden 1 saat sonra plasebo olarak 1 mL %5'lik sodyum karboksi metilsellüloz gavajla verildi. Toksik hepatit grubu olarak tanımlanan 2. Gruba 1 gr/kg asetaminofen 1 mL intraperitoneal verildikten 1 saat sonra gavajla 1 mL %5 sodyum karboksi metilsellüloz verildi. Rheinle tedavisi verilen 3. Gruba 1 gr/kg ılık asetaminofen çözeltisi 1 mL intraperitoneal verildikten 1 saat sonra gavaj yoluyla %5 sodyum karboksi metilsellüloz içinde çözülmüş 1 mL 40mg/kg Rhein verildi. Bütün gruplar 24 saat sonunda sakrifiye edilerek karaciğer ve kan örnekleri alındı.

Çalışmada toksik hepatit grubu ile Rheinli tedavi grubu alanin aminotransferaz, aspartat aminotransferaz, alkalen fosfataz düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı tespit edilmiştir. Rheinli tedavi grubu gama glutamiltranspeptidaz düzeyleri hariç alanin aminotransferaz, aspartat aminotransferaz, alkalen fosfataz, total bilirubin, direkt bilirubin düzeyleri toksik hepatit grubuna göre istatistiksel olarak

anlamli düşük bulundu. Çalışmada oksidatif stres ürünü olan malondialdehit: toksik hepatit grubunda kontrol grubuna göre az artmış ancak istatistiksel olarak anlamli bulunmadı. Artan oksidatif streste azalması beklenen glutasyon düzeyleri toksik hepatit grubunda yüksek bulundu. Bu yksekligin nedeninin hasara karşı artmış karaciğer savunması olduğu düşünülmektedir.

Bu bulgular bize; karaciğer dokusunda beklenen malondialdehit artışını ve glutasyon azalmasının tespit edilemediğini, antioksidan tanımlı Rhein (40 mg/kg/intraperitoneal) tedavisi ile hafif artmış olan malondialdehit düzeyleri değişmemekle birlikte transaminaz düzeylerinde azalma gözlendiğini göstermiştir. İleride yapılması planlanan deneysel hepatotoksisite ve antioksidan tedavi çalışmalarında değerlendirilmelerin 24-48 ve 72 saatlik farklı gruplarda ve histopatoloji ile doğrulanarak yapılması yararlı olacaktır.

Anahtar kelimeler: Rhein, rat, oksidatif stres, asetaminofen, toksik hepatit

EFFECTS OF RHEIN ON ACETAMINOPHEN-INDUCED HEPATOTOXICITY

SUMMARY

In acetaminophen-induced hepatotoxicity, it is believed that N-asetil-p-benzoquinone imine, a toxic metabolite, causes hepatic damage as a result of failure of physiological pathways and anti-oxidant defense system. Also, it is hypothesised that increased toxic oxygen radicals leads lipid peroxidation by corrupting cell organelles. In cell, noxious oxygen radicals such as malondialdehyde are accumulated and, anti-oxidant enzyme activities such as glutathione, glutathione peroxidase, catalase and superoxide dismutase first increase then fall short. In acetaminophen-induced hepatotoxicity, routinely, N-acetylcystein which have asserted anti-oxidant effects is used. Also, new agents such as rhein which have similar anti-oxidant effects are searched.

In this study, 3 groups were formed; each group had 10 rats which are 8-12 weeks old. Group 1 was claimed as healthy control group. One hour after intraperitoneally administered 1 mL saline, placebo, 1 mL of 5% sodium carboxymethylcellulose, was given by gavage. Group 2 was claimed as toxic hepatitis group. One hour after 1 mL of 1 gr/kg acetaminophen solution intraperitoneally, 1 mL of 5% sodium carboxymethylcellulose was given by gavage. Group 3 was recieving Rhein. One hour after 1 mL of 1 gr/kg acetaminophen solution intraperitoneally, 1 mL of Rhein which was dissolved into %5 sodium carboxymethylcellulose was given by gavage. All rats were sacrificed after 24 hours and, liver and blood samples were collected.

Alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and alkaline phosphatase levels of toxic hepatitis and rhein-treated groups were higher than control group and it was statistically significant. In rhein-treated group, except gamma-glutamyl transpeptidase levels, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase, total bilirubin and direct bilirubin levels were lower than toxic hepatitis group and it was statistically significant. In the study, malondialdehyde, the product of oxidative stress, was a little higher in toxic hepatitis group than control group. However, that was not statistically significant. In increased oxidative stress, glutathione level is expected to fall but it was elevated in toxic hepatitis group. It is thought that reason to this elevation might be due to increased hepatic defense against liver damage.

These findings suggested that expected elevation in malondialdehyde level and reduction in glutathione level cannot be identified. Also, a little elevated malondialdehyde level which was caused by anti-oxidant-defined rhein treatment (40 mg/kg/intraperitoneally) did not change. However, it is showed that reduction in transaminase level was observed. The further experimental hepatotoxicity and anti-oxidant treatment studies are needed. In these further studies, to get more accurate results, the evaluations need to be done in 24, 48 and 72 h groups and the findings need to be verified by histopathological studies.

Keywords: rhein, rat, oxidative stress, acetaminophen, toxic hepatitis.

KAYNAKLAR

1. Friedman SL, McQuald KR, Grendell JH (çeviri: B. Sivri, Ö. Gönen). Current gastroenteroloji tanı ve tedavi. Ankara: Güneş Kitabevi; 2007. s.664-79.
2. Çakaloğlu Y. İlaça bağlı hepatobiliyer hastalıklar. Ökten A, Mungan Z, Çakaloğlu Y (Editörler). Gastroenterohepatoloji'de. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2001.487-513.
3. Ersöz G. Toksik hepatit. İltar T, Özütemiz Ö, Bor S, Aydın A, Tekeşin O, Ersöz G ve ark. (Editörler). Gastroenteroloji'de. İzmir: İzmir Güven Kitabevi; 2011:1022-31.
4. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL (çeviri: U. Çevikbaş). Robbins temel patoloji. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2003:591-633.
5. Ruepp S, Tonge R, Shaw j, Wallis N, Pognan F. Genomics and proteomics analysis of acetaminophen toxicity in mouse liver. Toxicological Sciences 2002;65:135-50.
6. Laskin DL, Gardner CR, Price VF, Jollow DJ. Modulation of macrophage functioning abrogates the acute hepatotoxicity. Hepatology 1995;21:1045-50.
7. Brunton LL, Lazo JS, Parker KL (çeviri: Ö. Süzer). Goodman&Gilman Tedavinin Farmakolojik Temeli. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2009:671-715.
8. Muriel P, Garciapina T, Perez AV, Murella M. Silymarin protects against paracetamol induced lipid peroxidation and liver damage. J Appl Toxicol 1992;12:439-42.
9. Acharya M, Cam-Lau CA. Comparison of the protective actions of N-acetylcysteine, hypotaurine and taurine against acetaminophen induced hepatotoxicity in the rat. Journal of biomedical science 2010;17(Suppl 1)s:35.
10. Allameh A, Vansoun EY, Zarghi A. Role of glutathione conjugation in protection of weanling rat liver against acetaminophen induced hepatotoxicity. Mechanisms of ageing and development 1997;95:71-9.

11. Adam B, Yiğitoğlu MR. Tıbbi Biyokimya. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2012:549-58.
12. Uysal M. Serbest radikaller, lipid peroksitleri ve organizmada prooksidan-antioksidan dengiyi etkileyen koşullar. Klinik Gelişim 1998;11:336-41.
13. Çaylak E. Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. Tıp Araştırmaları Dergisi 2011;9(1):73-83.
14. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW (çeviri: N. Dikmen, T. Özgünen). Harper biyokimya. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2004:160-71.
15. Murray RK. Zenobiyotiklerin metabolizması (çeviri: E.Ulukaya). Dikmen N, Özgünen T (Editörler). Harper biyokimya'da. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2004.s.780-6.
16. Zhao YL, Zhou GD, Yang HB, Wang JB, Shan LM, Li RS et al. Rhein protects against acetaminophen induced hepatic and renal toxicity. Food and Chemical Toxicology 2011;49:1705-10.
17. Mattia C, Coluzzi F. What anesthesiologists should know about paracetamol (acetaminophen). Minerva Anesthesiol 2009;75:644-53.
18. Bessems JG, Vermeulen NP. Paracetamol (acetaminophen) induced toxicity: molecular and biochemical mechanisms, analogues and protective approaches. Crit Rev Toxicol 2001;31:55-138.
19. Katzung BG. Basic and Clinical Pharmacology 10th Ed. New York: McGraw Hill Companies Inc 2007;591-2.
20. William ML. İlaç ve toksinlere bağlı karaciğer hastalıkları (çeviri: A. Sonsuz). Ünal S, Kalyoncu U (Editörler). Cecil Medicine Türkçe'de. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri; 2011.s.1116-22.
21. Jules LD, Kurt JI. Toksik ve ilaca bağlı hepatitler (çeviri: S. Ünal, T. Karakan). Sağlık Y (Editör). Harrison İç Hastalıkları Prensiplerinde. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2004.s.1737-1742.
22. Oliver L. Acetaminophen (6.ed) In: Judith ET, Gabor DK, J.Stapczynski S. Eds Emergency Medicine: a comprehensive study guide. 6 th ed.2004.New York: McGraw-Hill; 171.s.1088-94.
23. Farrell GC. The hepatic side effects of drugs. Med J Aust 1986;145:600-4.
24. Olson KR, Anderson BI, Benowitz N, BlancePD, Clark RF, Kearney TE, Osterloh JD (çeviri: V. Savcı). Zehirlenmeler&İlaç Aşırı Dozu. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2012:121-23.
25. Waters E, Wang JH, Redmond HP, Wu QD, Kay E, Hayes DB. Role of taurine in preventing acetaminophen-induced hepatic injury in the rat. Am j physiol gastrointest liver physiol 2001;280:1274-79.

26. Whitcomb DC, Block GD. Association of acetaminophen hepatotoxicity with fasting and ethanol use. JAMA 1994;272(23):1845-50.
27. Price VF, Miller MG, Jollow DJ. Mechanisms of fasting-induced potentiation of acetaminophen hepatotoxicity in the rat. Biochem pharmacol 1987;36:427-33.
28. Kozer E, Koren G. Management of paracetamol overdose: current controversies. Drug Saf 2001;24:503-12.
29. Eken A. Rat kan ve doku örneklerinde oksidatif stres parametreleri. Yücel O, (Ed). Küçük deney hayvanlarından rat. Ankara: Derman tıbbi yayıncılık; 2012.s.69-73.
30. Mukai FH, Goldstein BD: Mutagenicity of malondialdehyde: a decomposition product of polyunsaturated fatty acids, Science 1976;191: 868.
31. Baykal Y, Kocabalkan F. Serbest radikaller ve hücre hasarı. Sendrom 2000;12(9):31-9.
32. Collins AR. Oxidative DNA damage, antioxidants and cancer. BioEssays 1999; 21:238-46.
33. Ögüt S, Atay E. Yaşlılık ve oksidatif stres. S.D.Ü. Tıp Fak Dergisi 2012;19(2):68-74.
34. From Wikipedia, the free encyclopedia Paracetamol toxicity. http://en.wikipedia.org/wiki/Paracetamol_toxicity.
35. James LP, Letzig L, Simpson PM, Capparelli E, Roberts DW, Hinson JA et al. Pharmacokinetics of acetaminophen-protein adducts in adults with acetaminophen overdose and acute liver failure. Drug Metabolism&Disposition 2009;37:1779-84.
36. Olson KR, Anderson BI, Benowitz N, Blance PD, Clark RF, Kearney TE et al. (çeviri: V. Savcı). Zehirlenmeler&İlaç Aşırı Dozu) İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2012;406-9.
37. Schilling A, Corey R, Leonard M, Eghtesad B. Acetaminophen: Old drug, new warnings. Cleve Clin J Med. 2010;77(1):19-27.
38. O'Grady JG, Alexander GJ, Hayllar KM, Williams R. Early indicators of prognosis in fulminant hepatic failure. Gastroenterology 1989;97:439-45.
39. Gotthardt D, Riediger C, Karl Heinz W. Fulminan hepatic failure: etiology and indications for liver transplantation. Nephrol Dial Transplant 2007;22:5-8.
40. Kökoğlu E, Alturfan AA. Vitaminler ve vitamin benzeri biyomoleküller. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2010;77-85.
41. Mayes PA. Yağda çözünür vitaminlerin yapısı ve işlevi (çeviri: M. Üstdal). Dikmen N, Özgünen T (Editörler). Harper biyokimya'da. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2004. s.642-52.
42. Atmaca E, Aksoy A. Oksidatif DNA hasarı ve kromotografik yöntemlerle tespit edilmesi. YYU Veteriner Fakültesi Dergisi 2009;20(2):79-83.

43. Gülbahar Ö. Protein oksidasyonunun mekanizması, önemi ve yaşlılıkla ilişkisi. *Turkish journal of geriatrics* 2007;10(1):43-48.
44. Şenses VS, Özyazgan S, Akkan AG. Serbest oksijen radikalleri-1: Vücuttaki antioksidan sistemler. *Türkiye Aile Hekimliği Dergisi* 1999;3(1-2):5-11.
45. Halliwell B. Reactive oxygen species in living system: source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med* 199;91(suppl 3C):14-22.
46. Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence. *Lancet* 1994;344:721-4.
47. Altınışik M. Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar 2009. <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01b.pdf>
48. Şengil AZ, Gürbilek M, Uysal H. Serbest radikaller. *S Ü Tıp Fak Der.* 1992;8(4):673-81.
49. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya: Mimoza yayınları, 1995: 1-73.
50. Deby C, Goutier R. New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiens of superoxide dismutase. *Biochemical Pharmacology* 1990;39(3):399-405.
51. Kılınç K. Oksijen radikalleri: üretilmeleri, fonksiyonları ve toksik etkileri. *Biyokimya Dergisi* 1985;10(2):59-87.
52. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews* 1994;74(1):139-62.
53. Fridovich I. Superoxide anion radical, superoxide dismutases and related matters. *JBC* 1997;272(30):18515-17.
54. Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc.* 1988;63:381-89.
55. Derviş E. Oral antioksidanlar. *Dermatoz* 2011;2(1):263-67.
56. Kavas GÖ. Reaktif oksijen metabolitlerine fizyopatolojik yaklaşım. *Ankara Tıp Mecmuası* 1994;47:579-92.
57. Özelçi-Kavas G. Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri, *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi* 1989;9:1.
58. Chen SS, Huang WJ, Chang LS, Wei YH. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in leukocyte DNA of spermatic vein as a biomarker of oxidative stress in patients with varicocele. *J Urol.* 2004;172(4 Pt 1):1418-21.
59. Murray RK. Al ve Ak kan hücreleri (çeviri: T. Özgürtaş). Dikmen N, Özgünen T (Editörler). *Harper biyokimya'da.* İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2004. s.763-79.

60. From Wikipedia, the free encyclopedia Rheum officinale. http://en.wikipedia.org/wiki/Rheum_officinale
61. Özgen U. Rheum officinale Rheum palmatum Ravent. Demirezer LÖ, Ersöz T, Saraçoğlu İ, Şener B (Editörler). Tedavide kullanılan bitkiler’de. Ankara: MN Medikal&Nobel Tıp Kitap Sarayı; 2007. s.231-38.
62. He D, Lee L, Yang J, Wang X. Preventive effects and mechanisms of Rhein on renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *Biol. Pharm. Bull.* 2011;34(8):1219-26.
63. Sheng X, Wang M, Lu M, Xi B, Sheng H, Zang YQ. Rhein ameliorates fatty liver disease through negative energy balance, hepatic lipogenic regulation and immunomodulation in diet-induced obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011;300:886–93.
64. Zhao YL, Wang JB, Zhou GD, Shan LM, Xiao XH. Investigations of free anthraquinones from rhubarb against α -naphthylisothiocyanate-induced cholestatic liver injury in rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2009;104:463–9.
65. Katyare SS, Satav JG. Impaired mitochondrial oxidative energy metabolism following paracetamol induced hepatotoxicity in the rat. *Br J Pharmacol* 1989;96:51-8.
66. Devi GS, Prasad MH, Saraswathi I, Raghu D, Rao DN, Reddy PP. Free radicals antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different types of leukemias. *Clin Chim Acta* 2000;293:53-62.
67. Zakowski JJ, Tappel AL. A semiautomated system for measurement of glutathione in the assay of glutathione peroxidase. *Anal Biochem* 1978;89(2):430-6.
68. Ostapowicz G, Fontana RJ, Schiødt FV, Larson A, Davern TJ, Han SH et al. United States Acute Liver Failure Study Group. Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Ann Intern Med.* 2002;137:947-54.
69. İltar T, Özütemiz Ö, Bor S, Aydın A, Tekeşin O, Ersöz G ve ark. *Klinik Gastroenteroloji ve Atlas* cilt 1. İzmir: İzmir Güven Kitabevi; 2011:883-97.
70. Chiu H, Brittingham JA, Laskin DL. Differential induction of heme oxygenase-1 in macrophages and hepatocytes during acetaminophen induced hepatotoxicity in the rat: effects of hemin and biliverdin. *Toxicology and applied pharmacology* 2002;181:106-15.
71. Kamanaka Y, Kawabata A, Matsuya H, Taga C, Sekiguchi F, Kawao N. Effect of a potent iNOS inhibitor (ONO-1714) on acetaminophen-induced hepatotoxicity in the rat. *Life Sciences* 2003;74:793–802.
72. Gardner CR, Heck DE, Yang CS, Thomas PE, Zhang XJ, DeGeorge GL et al. Role of nitric oxide in acetaminophen induced hepatotoxicity in the rat. *Hepatology* 1998;27:748-54.

73. Lin CC, Hsu YF, Lin TC, Hsu HY. Antioxidant and hepatoprotective effects of punicalagin and punicalin on acetaminophen-induced liver damage in rats. *Phytotherapy research* 2001;15:206–12.
74. Yen FL, Wu TH, Lin LT, Cham TM, Lin CC. Nanoparticles formulation of cuscuta chinensis prevents acetaminophen induced hepatotoxicity in rats. *Food and chemical toxicology* 2008;46:1771-77.
75. Jahromi MG, Nabavizadeh F, Vahedian J, Nahrevanian H, Dehpour AR, Mehrjardi AZ. Protective effect of ghrelin on acetaminophen-induced liver injury in rat. *Peptides* 2010;31:2114-7.
76. Jin SM, Kil HR, Park K, Noh CII. Gene expression in rat hearts following oral administration of a single hepatotoxic dose of acetaminophen. *Yonsei Med J* 2012;53(1):172-80.
77. Arafa HM. Carnitine deficiency: a possible risk factor in paracetamol hepatotoxicity. *Arch Toxicol* 2009;83(2):139-50.
78. Garrido A, Arancibia C, Campos R, Valenzuela A. Acetaminophen does not induce oxidative stress in isolated rat hepatocytes: Its probable antioxidant effect is potentiated by the flavonoid silybin. *Pharmacol Toxicol* 1991;69(1):9-12.
79. Powell CL, Kosyk O, Ross PK, Schoonhoven R, Boysen G, Swenberg JA, Heinloth AN, Boorman GA, Cunningham ML, Paules RS, Rusyn I. Phenotypic anchoring of acetaminophen-induced oxidative stress with gene expression profiles in rat liver. *Toxicol Sci* 2006;93(1):213-22.
80. O'Donnell VB, Chumley PH, Hogg N, Bloodsworth A, Darley-Usmar VM, Freeman BA. Nitric oxide inhibition of lipid peroxidation: Kinetics of reaction with lipid peroxyl radicals and comparison with alpha-tocopherol. *Biochemistry* 1997;36(49):15216-23.
81. Hogg N, Kalyanaraman B. Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 1999;1411(2-3):378-84.
82. Dündar Y, Aslan R. Hücre moleküler statüsünün anlaşılması ve fizyolojik önem açısından radikaller-antioksidanlar. *İnsizyon* 1999;2(2):134-42.
83. Yalçın AS. Antioksidanlar: Klinik Gelişim 1998;11:342-46.
84. Adam B, Yiğitoğlu MR. Tıbbi Biyokimya. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2012:5-50
85. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation. *Toxicol* 2003;189:41-54.
86. Chun LJ, Tong MJ, Busuttill RW. Acetaminophen hepatotoxicity and acute liver failure. *J Clin Gastroenterol* 2009;43:342-49.
87. Hinson JA, Roberts DW, James LP. Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. *Handb Exp Pharmacol* 2010;(196):369-405.

88. Donnelly PJ, Walker RM, Racz WJ. Inhibition of mitochondrial respiration in vivo is an early event in acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Arch Toxicol* 1994;68:110-18.
89. Placke ME, Ginsberg GL, Wyand DS. Ultrastructural changes during acute acetaminophen-induced hepatotoxicity in the mouse: a time and dose study. *Toxicol Pathol* 1987;15:431-38.
90. Meotti FC, Rosa JM, Bracardo PS, Balz D, Waltrick AP, Bagio A et al. Protective effect of crude extract from *wedelia paludosa* on the hepatotoxicity induced by paracetamol in mice. *J of Pharmacy and Pharmacology* 2006;58:137-42.
91. Buttar HS, Chow AY, Downie RH. Glutathione alterations in rat liver after acute and subacute oral administration of paracetamol. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1977;4(1): 1-6.
92. Zi GM, Sheng LX, Rong XH, Chuan MZ, Wei S, Feng YX. Rhein inhibits liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *Acta pharmacol sin* 2002;23(8):739-44.
93. Terneus MV, Brown JM, Carpenter AB, Valentovic MA. Comparison of S-adenosyl-L-methionine (SAME) and N-acetylcysteine (NAC) protective effects on hepatic damage when administered after acetaminophen overdose. *Toxicology* 2008;244(1):25-34.
94. Anker AL, Smilkstein MJ. Acetaminophen concepts and controversies. *Emerg Med Clin North Am* 1994;12:335-49.
95. Germanie LD, Tucker JR. Toxicity Acetaminophen 2008. <http://emedicine.medscape.com/article/>.
96. Krenzelok EP, Leikin JB. Approach to the poisoned patient. *Dis. Mon.* 1996;42:509-608.
97. Farrell SE. Emergency Medicine, Toxicity Acetaminophen, emedicine medical referance 2009. <http://emedicine.medscape.com/article/820200-overview>.
98. Saccomano S, DeLuca DA, Too Toxic. *Nursing Critical Care*. 2008;3(1):36-43. http://www.nursingcenter.com/lnc/journalarticle?Article_ID=760892
99. Cohen SD, Hoivik DJ, Khairallah EA. Acetaminophen-induced hepatotoxicity in: *Toxicology of the liver*. Philadelphia: Taylor & Francis 1998;159-86.
100. Jaeschke H. Glutathione disulfide formation and oxidant stress during acetaminophen induced hepatotoxicity in mice in vivo: the protective effect of allopurinol. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;255:935-41.
101. Sakaida I, Kayano K, Wasaki S, Nagatomi A, Matsumura Y, Okita K. Protection against acetaminophen-induced liver injury in vivo by an iron chelator, deferoxamine. *Scand J Gastroenterol* 1995;30:61-7.

EKLER

Ek 1

T.C.


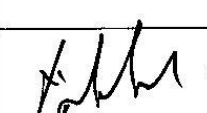
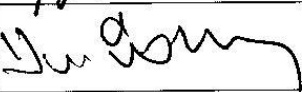
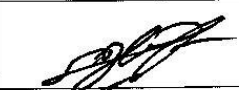
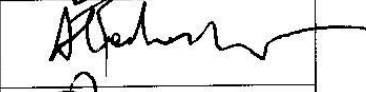
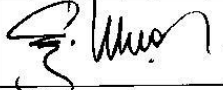
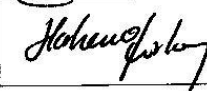
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

EDİRNE

Oturum Sayısı: 07
KARAR NO: 2012.07.01

Karar Tarihi: 26.09.2012

Yürütücülüğünü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Prof.Dr.Gülbin ÜNSAL'ın yaptığı Araş. Gör. Dr. Cumhuriyet YAYLA'nın Tıpta Uzmanlık tezi olarak planlanan TÜHDYEK-2012/70 protokol nolu "Asetaminofen ile Oluşturulan Toksik Hepatitte Rhein'in Etkileri" başlıklı çalışma hakkında görüşüldü; araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; çalışmadaki değişiklik önerisinin uygun olduğuna ve çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Ünvanı/Adı/Soyadı	Araştırma ile İlişki	Toplantı Katılımı	İmza
Yrd.Doç.Dr. Burhan AKSU Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç. Dr. Hayati ARDA Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Vet.Hek. Ziya ÇUKUR Veteriner Hekim	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Hüseyin KOÇ Sivil Toplum Örgütü Üyesi Sivil Üye	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr. Beytullah ÖZKAN Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr. Y. Atakan SEZER Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Doç. Dr. Enis ULUÇAM Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr.Hakan GÜRKAN Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Osman GÜLTEKİN Sivil Üye	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	

