

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**KİTOSAN VE BLUEBERRY’NİN ASETAMİNOFEN ARACILI KARACİĞER
TOKSİSİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

DOKTORA TEZİ

EDA ÖZÇELİK

DANIŞMAN

Prof. Dr. SEMA USLU

Ekim-2012

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TİBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**KİTOSAN ve BLUEBERRY’NİN ASETAMİNOFEN ARACILI KARACİĞER
TOKSİSİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

DOKTORA TEZİ

EDA ÖZÇELİK

DANIŞMAN

Prof. Dr. SEMA USLU

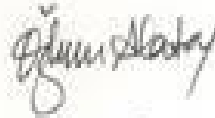
Ekim-2012

KABUL VE ONAY SAYFASI

EDA ÖZÇELİK'in Doktora Tezi olarak hazırladığı "Kitosan ve Blueberry'nin Asetaminofen Aracılı Karaciğer Toksikitesi Üzerine Etkileri" başlıklı çalışması jüriimiz tarafından Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Tarih: 08/10/2012

ÜYE: Prof.Dr.Özkan ALATAŞ



ÜYE: Prof.Dr. Sema USLU (Tez Danışmanı)



ÜYE: Prof.Dr.Ömer ÇOLAK



ÜYE: Prof.Dr.Nüfer ERKASAP



ÜYE: Prof.Dr.H.Mehmet KUTLU



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
12.10.2012 tarih ve 922/4337 sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Kazım ÖZDAMAR

Enstitü Müdürü

ÖZET

Asetaminofen (APAP), Dünyada ve ülkemizde yaygın olarak kullanılan ağrı kesici ve ateş düşürücü bir ilaçtır. Asetaminofenin indüklediği karaciğer hasarı ve bu hasarın devamında gelişen karaciğer yetmezlikleri önde gelen ölüm nedenlerindedir. Bu çalışmadaki amacımız, APAP ile indüklenen hepatotoksisite de, antioksidan özellikteki Blueberry (BB) ve kitosanın (CS) hepatoprotektif rollerinin araştırılmasıdır.

Çalışmamızda, 63 erkek Spraque-Dawley türü sıçanlar her grupta 9 adet olacak şekilde, kontrol grubu, BB grubu, CS grubu, APAP grubu, APAP+BB grubu, APAP+CS grubu ve APAP+BB+CS grubu olmak üzere 7 gruba ayrılmıştır. Maddelerimiz 250 mg/kg/gün APAP, 60 mg/kg/gün BB ve 200 mg/kg/gün CS olmak üzere 14 gün süresince gavaj yoluyla uygulanmıştır. Tüm maddeler başladıktan sonra 15. günde sıçanların kan ve doku örnekleri alındı. Serum örneklerinde AST, ALT, ALP, LDH, seruloplazmin oksidaz enzim aktiviteleri ile total sialik asit (TSA), lipit bağlı sialik asit (LSA) düzeyleri; karaciğerde arginaz enzim aktiviteleri ile ornitin, nitrik oksit (NO), TSA, LSA, redükte glutatyon (GSH) ve malondialdehit (MDA) düzeyleri ölçüldü. Karaciğer dokuları histolojik olarak değerlendirildi.

Asetaminofen uygulaması, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında karaciğer arginaz aktiviteleri ile ornitin ve MDA düzeylerini anlamlı olarak arttırırken, seruloplazmin oksidaz enzim aktiviteleri ile NO ve GSH düzeylerini anlamlı olarak azaltmıştır. APAP grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, TSA ve LSA düzeylerinde artış bulunmuştur. BB ve CS'in mono ve kombine uygulamaları arginaz enzim aktiviteleri ile ornitin ve MDA düzeylerini APAP grubuna göre anlamlı olarak azaltırken, NO ve GSH düzeyleri ile seruloplazmin oksidaz enzim aktivitelerini APAP grubuna göre anlamlı olarak arttırmıştır. Bulgularımız histolojik bulgularla desteklenmiştir.

Sonuçlarımız, BB ve CS'in, APAP'in indüklediği karaciğer hasarına karşı önemli koruyucu etkilerinin olduğunu ve bu mekanizmanın intraselüler antioksidan kapasiteyi arttırmasıyla ilgili olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak; BB ve CS, APAP'in indüklediği toksisiteye karşı potansiyel güvenli ve etkili ajanlar olarak değerlendirilebilir.

Anahtar kelimeler: Arginaz, Asetaminofen, Blueberry, Kitosan, Sialik asit

SUMMARY

In the world and in our country, acetaminophen (APAP) is a widely used analgesic and antipyretic drug. Acetaminophen induced liver damage and that damage developing liver failure is one of the leading causes of death in the continuation. This study was aimed to investigate the hepatoprotective effects of antioxidant substance Blueberry (BB) and chitosan (CS) with APAP- induced hepatotoxicity.

In this study, 63 male Spraque Dawley rats were divided into 7 groups each consist of 9 rats as follows: control group, BB group, CS group, APAP group, APAP + BB group, APAP + CS group and APAP + BB+ CS group. All administrations were achieved gavage, APAP as 250 mg/kg/day, BB as 60 mg/kg/day, and CS as 200 mg/kg/day for 14 days. After the beginning of the study, blood and tissue samples were taken from rats by 15. day. AST, ALT, ALP, LDH, ceruloplasmin oxidase enzyme activities and total sialic acid (TSA), lipid bound sialic acid (LSA) levels were measured in serum; arginase enzym activity, ornithine, nitric oxide (NO), TSA, LSA, reduced glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) levels were measured in liver. Liver tissues were evaluated histologically.

APAP treatment resulted in a significant increase in liver arginase activity, ornithine and MDA levels whereas a significant decrease in NO, GSH levels and ceruloplasmin oxidase activity when compared to controls. Following APAP treatment; a significant increase total TSA and LSA levels, when compared to controls. BB and CS mono and combination administrations caused a significant decrease in arginase activities with ornithine and MDA levels, whereas a significant increase in NO, GSH levels and ceruloplasmin oxidase activity when compared to APAP treated group. These findings were confirmed with histopathological results.

Our results showed that BB and CS may have important protective effects against APAP-induced liver damage and its mechanism is probably related to increase the ability of intracellular antioxidant capacity. As a result, BB and CS can be a potentially safe and potent hepatoprotective agents against APAP-induced toxicity.

Key Words: Arginase, Acetaminophen, Blueberry, Chitosan, Sialic acid

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	v
SUMMARY.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLO DİZİNİ.....	x
ŞEKİL DİZİNİ.....	xii
GRAFİK DİZİNİ.....	xiv
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Karaciğer.....	5
2.1.1. Karaciğerin Anatomisi.....	5
2.1.2. Karaciğerin Fonksiyonları.....	8
2.1.2.1. Karbonhidrat Metabolizması.....	8
2.1.2.2. Lipid Metabolizması.....	8
2.1.2.3. Protein Metabolizması.....	9
2.1.2.4. Safra Salgılanması.....	9
2.1.2.5. Detoksifikasyon.....	9
2.2. Hepatotoksisite.....	10
2.3. Asetaminofen.....	13
2.3.1. Farmakokinetik Özellikleri.....	13
2.3.2. Asetaminofen Metabolizması.....	14
2.3.3. Asetaminofen Toksisitesi.....	16
2.4. Fitokimyasallar.....	19

2.4.1. Blueberry.....	22
2.4.2. Blueberry'nin Etki Mekanizması.....	23
2.5. Kitosan.....	25
2.6. Arginaz.....	29
2.6.1. Arginaz Enzimi ve Üre Döngüsü.....	30
2.6.2. Arginaz Enziminin Kinetik Özellikleri.....	31
2.6.3. Arginaz Enziminin Klinik ve Biyokimyasal Önemi.....	32
2.7. Ornitin.....	33
2.8. Nitrik Oksit.....	36
2.8.1. Nitrik Oksit Sentezi ve Fonksiyonları.....	37
2.9. Sialik Asitler.....	40
2.9.1. Sialik Asitin Yapısı.....	40
2.9.2. Sialik Asitin Biyosentezi.....	41
2.9.3. Sialik Asitin Fonksiyonları.....	43
2.10. Seruloplazmin.....	45
2.10.1. Seruloplazminin Fonksiyonları ve Klinik Önemi.....	46
2.11. Lipit Peroksidasyonu.....	47
2.12. Glutasyon.....	48
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	51
3.1. GEREÇ.....	51
3.1.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Bakımı.....	51
3.1.2. Doz ve Deney Grupları.....	51
3.1.2.1. Maddelerin Hazırlanması.....	51
3.1.3. Deney Hayvanlarından Çalışılacak Örneklerin Alınması.....	53
3.2. YÖNTEMLER.....	53

3.2.1. Serum AST, ALT, ALP, LDH Enzim Aktivitelerinin Ölçümü.....	53
3.2.1.1. AST Ölçüm Prensibi.....	53
3.2.1.2. ALT Ölçüm Prensibi.....	54
3.2.1.3. ALP Ölçüm Prensibi.....	54
3.2.1.4. LDH Ölçüm Prensibi.....	54
3.2.2. Doku Arginaz Aktivitesinin Ölçümü.....	54
3.2.3. Doku Ornitin Düzeylerinin Ölçümü.....	59
3.2.4. Serum ve Doku TSA Düzeylerinin Ölçümü.....	62
3.2.5. Serum ve Doku LSA Düzeylerinin Ölçümü.....	66
3.2.6. Doku NO Düzeylerinin Ölçümü.....	69
3.2.7. Serum Seruloplazmin Oksidaz Aktivitesinin Ölçümü	73
3.2.8. Doku GSH Düzeylerinin Ölçümü.....	75
3.2.9. Doku MDA Düzeylerinin Ölçümü.....	78
3.2.10. Karaciğer Dokusu Protein Ölçümü.....	81
3.2.11. Karaciğer Dokusu Histolojik Preparatların Hazırlanması.....	83
3.3. İstatistiksel Analiz.....	84
4. BULGULAR.....	85
5. TARTIŞMA.....	127
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	152
7. KAYNAKLAR DİZİNİ.....	154
8. ÖZGEÇMİŞ.....	155

TABLO DİZİNİ

Tablo 3.1. Deney Grupları ve Deney Gruplarının Özellikleri.....	52
Tablo 3.2. Arginaz Deney Protokolü.....	57
Tablo 3.3. Ornitin Deney Protokolü.....	61
Tablo 3.4. TSA Deney Protokolü.....	64
Tablo 3.5. LSA Deney Protokolü.....	67
Tablo 3.6. NO Deney Protokolü.....	71
Tablo 3.7. Seruloplazmin Oksidaz Deney Protokolü.....	74
Tablo 3.8. GSH Deney Protokolü.....	77
Tablo 3.9. MDA Deney Protokolü.....	79
Tablo 4.1. Çalışma Başında ve Sonunda Rat Ağırlıkları.....	85
Tablo 4.2. Çalışma Gruplarının Serum AST Enzim Aktiviteleri.....	87
Tablo 4.3. Çalışma Gruplarının Serum ALT Enzim Aktiviteleri.....	89
Tablo 4.4. Çalışma Gruplarının Serum ALP Enzim Aktiviteleri.....	91
Tablo 4.5. Çalışma Gruplarının Serum LDH Enzim Aktiviteleri.....	93
Tablo 4.6. Çalışma Gruplarının Doku Arginaz Enzim Aktiviteleri.....	95
Tablo 4.7. Çalışma Gruplarının Doku Ornitin Düzeyleri.....	97
Tablo 4.8. Çalışma Gruplarının Doku NO Düzeyleri.....	99
Tablo 4.9. Çalışma Gruplarının Doku TSA Düzeyleri.....	101
Tablo 4.10. Çalışma Gruplarının Serum TSA Düzeyleri.....	103
Tablo 4.11. Çalışma Gruplarının Doku LSA Düzeyleri.....	105
Tablo 4.12. Çalışma Gruplarının Serum LSA Düzeyleri.....	107

Tablo 4.13. Çalışma Gruplarının Serum Seruloplazmin	109
Oksidaz Enzim Aktiviteleri	
Tablo 4.14. Çalışma Gruplarının Doku GSH Düzeyleri.....	111
Tablo 4.15. Çalışma Gruplarının Doku MDA Düzeyleri.....	113
Tablo 4.16. Çalışma Gruplarında MDA, GSH düzeyleri ve.....	115
Seruloplazmin Oksidaz Enzim Aktiviteleri Arasındaki Korelasyonlar	
Tablo 4.17. Çalışma Gruplarının Işık Mikroskobu	116
Görüntüleri Skorlama Sonuçları	

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1. Karaciğerin Yapısı.....	6
Şekil 2.2. Karaciğer Hücreleri.....	7
Şekil 2.3. Hepatotoksisite Mekanizmaları.....	12
Şekil 2.4. Asetaminofenin Kimyasal Yapısı.....	13
Şekil 2.5. Asetaminofen Metabolizması.....	15
Şekil 2.6. Asetaminofen Toksisite Fazları.....	16
Şekil 2.7. Asetaminofen Hepatotoksisitesi.....	18
Şekil 2.8. Fitokimyasalların Sınıflandırılması.....	21
Şekil 2.9. Kitosanın Kimyasal Yapısı.....	25
Şekil 2.10. Kitosanın Eldesi.....	27
Şekil 2.11. Kitosanın Yara İyileşmesi Üzerine Etkileri.....	28
Şekil 2.12. Argininden Ornitin ve Üre Oluşumu.....	29
Şekil 2.13. Üre Döngüsü.....	31
Şekil 2.14. Ornitinden Poliaminlerin Sentezi.....	34
Şekil 2.15. Ornitinden Prolin ve Glutamat Sentezi.....	35
Şekil 2.16. Nitrik Oksit Sentezi.....	37
Şekil 2.17. Sialik Asitin Yapısı.....	41
Şekil 2.18. Sialik Asit Biyosentezi.....	42
Şekil 2.19. Sialik Asitin Biyolojik Fonksiyonları.....	44
Şekil 2.20. Seruloplazmin Biyosentezi.....	45
Şekil 2.21. Lipit Peroksidasyonu.....	47
Şekil 2.22. Glutatyonun Kimyasal Yapısı.....	49
Şekil 2.23. Karaciğer Glutatyon Düzeylerinin Azalması.....	50

Şekil 4.1. Kontrol Grubuna ait Karaciğer Dokusu Örneklerinin	118
Işık Mikroskobu İnceleme Görüntüleri	
Şekil 4.2. Bluberry Grubuna ait Karaciğer Dokusu Örneklerinin.....	119
Işık Mikroskobu İnceleme Görüntüleri	
Şekil 4.3. Kitosan Grubuna ait Karaciğer Dokusu Örneklerinin	120
Işık Mikroskobu İnceleme Görüntüleri	
Şekil 4.4. Asetaminofen Grubuna ait Karaciğer Dokusu Örneklerinin	121
Işık Mikroskobu İnceleme Görüntüleri	
Şekil 4.5. Asetaminofen Grubuna ait Karaciğer Dokusu Örneklerinin	122
Işık Mikroskobu İnceleme Görüntüleri	
Şekil 4.6. Asetaminofen Grubuna ait Karaciğer Dokusu Örneklerinin	123
Işık Mikroskobu İnceleme Görüntüleri	
Şekil 4.7. Asetaminofen+Blueberry Grubuna ait Karaciğer Dokusu	124
Örneklerinin Işık Mikroskobu İnceleme Görüntüleri	
Şekil 4.8. Asetaminofen+Kitosan Grubuna ait Karaciğer Dokusu	125
Örneklerinin Işık Mikroskobu İnceleme Görüntüleri	
Şekil 4.9. Asetaminofen+Blueberry+Kitosan Grubuna ait Karaciğer	126
Dokusu Örneklerinin Işık Mikroskobu İnceleme Görüntüleri	

GRAFİK DİZİNİ

Grafik 3.1. Arginaz standart grafiği.....	59
Grafik 3.2. Ornitin standart grafiği.....	62
Grafik 3.3. TSA standart grafiği.....	65
Grafik 3.4. LSA standart grafiği.....	68
Grafik 3.5. NO standart grafiği.....	72
Grafik 3.6. GSH standart grafiği.....	77
Grafik 3.7. MDA standart grafiği.....	80
Grafik 3.8. Protein (BSA) standart grafiği.....	82
Grafik 4.1. Çalışma Gruplarının Serum AST Enzim Aktiviteleri.....	88
Grafik 4.2. Çalışma Gruplarının Serum ALT Enzim Aktiviteleri.....	90
Grafik 4.3. Çalışma Gruplarının Serum ALP Enzim Aktiviteleri.....	92
Grafik 4.4. Çalışma Gruplarının Serum LDH Enzim Aktiviteleri	94
Grafik 4.5. Çalışma Gruplarının Doku Arginaz Enzim Aktiviteleri.....	96
Grafik 4.6. Çalışma Gruplarının Doku Ornitin Düzeyleri.....	98
Grafik 4.7. Çalışma Gruplarının Doku NO Düzeyleri.....	100
Grafik 4.8. Çalışma Gruplarının Doku TSA Düzeyleri.....	102
Grafik 4.9. Çalışma Gruplarının Serum TSA Düzeyleri.....	104
Grafik 4.10. Çalışma Gruplarının Doku LSA Düzeyleri.....	106
Grafik 4.11. Çalışma Gruplarının Serum LSA Düzeyleri.....	108
Grafik 4.12. Çalışma Gruplarının Serum Seruloplazmin Oksidaz	110
Enzim Aktiviteleri	
Grafik 4.13. Çalışma Gruplarının Doku GSH Düzeyleri.....	112
Grafik 4.14. Çalışma Gruplarının Doku MDA Düzeyleri.....	114

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve Kısaltmalar</u>	<u>Acıklama</u>
ALP	Alkaleen fosfataz
ALT	Alanin aminotransferaz
AST	Aspartat aminotransferaz
APAP	Asetaminofen
ANOVA	Tek yönlü varyans analizi
AIF	Apoptoz indükleyici faktör
BB	Blueberry
BH ₄	Tetrahidrobiyopterin
BSA	Bovin serum albumin
CMP	Siklik monofosfat
CS	Kitosan
Cu ²⁺	Bakır
Cr ^{3+, +4}	Krom
CYP450	Sitokrom p450
DAM	Diasetil monoksim
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DTNB	5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit
FAD	Flavin adenin nükleotid
FMN	Flavin mononükleotid
Fe ^{2+, 3+}	Demir

cGMP	Siklik guanozin monofosfat
GSH	Redükte glutatyon
GPx	Glutatyon peroksidaz
GST	Glutatyon-S-transferaz
GSSG	Okside glutatyon
HCl	Hidroklorik asit
Hg ²⁺	Civa
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
4-HNE	4-Hidroksinonenal
IL-1	İnterlökin-1
IL-6	İnterlökin-6
JNK	c-Jun terminal kinaz
LDH	Laktat dehidrogenaz
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
LSA	Lipit bağlı sialik asit
ManNAc	N-asetil-mannozamin
MDA	Malondialdehit
Mn ²⁺	Manganez
NFκB	Nükleer faktör kappa B
NADP	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NaHCO ₃	Sodyum bikarbonat
NANA	N-Asetil-nöraminik asit
NaOH	Sodyum hidroksit
NAPQI	N-asetil-p-benzokinon-imin
NeAc-9-P	N-asetil nöraminik asit-9-fosfat

NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
eNOS	Endotelyal nitrik oksit sentaz
iNOS	İndülenebilir nitrik oksit sentaz
nNOS	Nöranal nitrik oksit sentaz
OAT	Ornitin aminotransferaz
ODC	Ornitin dekarboksilaz
O ₂ ⁻	Süperoksit
OH	Hidroksil radikali
PMN	Polimorfonükleer hücre
PSA	Protein bağlı sialik asit
RNA	Ribonükleik asit
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TBA	Tiyobarbitürik asit
TCA	Trikloro asetik asit
TDMU	Tiyosemikarbazid diasetil monoksim üre
TSA	Total sialik asit
TSC	Tiyosemikarbazid
UDP	Üridin difosfat
UDP-Glc-NAc	Üridin difosfat-N-asetil glikozamin
µL	Mikrolitre
mL	Mililitre
µg	Mikrogram
µmol	Mikromol
L	Litre

1.GİRİŞ VE AMAÇ

İlaçlara bağlı hepatotoksisite; karaciğerde non-spesifik değişikliklerden akut fulminan yetmezlik, siroz ve karaciğer kanserine kadar giden birçok klinik tabloya neden olmaktadır. Hayati fonksiyonlara sahip karaciğer, gastrointestinal sistemdeki konumu nedeniyle, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, protein sentezi, karbonhidrat ve lipid metabolizmasındaki fonksiyonları nedeniyle ilaç toksisitesi için hedef organdır (147).

Günümüzde tedavi amaçlı kullanılan birçok ilaç, ciddi ve geri dönüşümü olmayan sonuçlar ortaya çıkarmaktadır. Reçetesiz satılan ilaçlardan biri olan asetaminofen (APAP) bütün dünyada yaygın olarak kullanılan analjezik ve antipiretik bir ilaçtır (20). Asetaminofen, karaciğer hasarına neden olan en yaygın ajandır ve terapötik amaçlı kullanılan dozlarının bile karaciğerde hasarlanmaya yol açtığı bildirilmiştir. Asetaminofen, karaciğer, böbrek ve barsak olmak üzere üç organda metabolize edilmektedir fakat APAP metabolizması esas olarak karaciğerde gerçekleşmektedir. Asetaminofen metabolizması glukuronid konjugasyonu, sülfat konjugasyonu ve sitokrom P450'ye (CYP450) bağlı mikrozomal oksidasyon olmak üzere üç temel mekanizma ile karaciğerde gerçekleşmektedir (231). Asetaminofen metabolizmasının toksik metaboliti N-asetil-p-benzokinon-imin (NAPQI)'dir. Asetaminofenin, CYP450 enzimi ile oksidasyonu sonucu oluşan NAPQI, redükte glutatyon (GSH) ile hızla konjuge olarak zararsız metabolitler olan sistein ve merkaptürik asite dönüşür. Vücut için toksik olmayan bu metabolitler ve APAP'in konjule olmayan formları idrarla dışarı atılır (17,84).

Asetaminofenin toksik etkileri başta karaciğer olmak üzere böbrekte de ortaya çıkarken, kardiyovasküler sistem, solunum ve asit- baz dengesi üzerinde belirgin bir etkisi yoktur (17). Asetaminofen hepatotoksisitesine neden olan sebepler arasında oksidatif stres, kalsiyum dengesizliği, protein arilasyonu, NAPQI'in proteinlere ve lipitlere kovalan bağlanması sonucu meydana gelen değişikliklerdir (95).

Karaciğer GSH depoları, normalin %30'undan daha fazla düşünce NAPQI'in detoksifiye edilememesine bağlı olarak hepatik toksisite meydana gelir. Bu toksik metabolit yaşamsal öneme sahip hücresel proteinler ve hepatosit membranlarının lipit bariyerleri ile etkileşerek, lipit peroksidasyonu yoluyla karaciğerde nekroza neden olabilir (95).

Bilimsel teknolojiye gelişmeler, fenoller, flavon, flavonoid ve antosiyanin içeren doğal ürünlerin büyük bir bölümünün, hastalıkların önlenmesi ve tedavisindeki olası klinik özelliklerini anlamamıza olanak vermiş olup; bu besinlerin sağlığımızın korunması ve geliştirilmesindeki rolleri araştırmacılar tarafından ilgi odağı haline gelmiştir (54). Blueberry (BB), yapısında bulunan fenolik asitler, flavonoidler ve antosiyaninler açısından zengin, yüksek antioksidan kapasiteye sahip ve aynı zamanda iyi bir lif, kalsiyum, demir ve C vitamini kaynağıdır (127, 188). Blueberry'nin insan sağlığı ve beslenmesi üzerine yapılan çalışmalarda mükemmel doğal antioksidan kaynağı olduğu belirtilmiştir. Yapılan araştırmalarda oksijen radikallerinin giderilmesinde sadece organizmadan kaynaklanan savunma sistemlerinin yeterli olmadığı ve organizmada meydana gelen oksidatif hasarlara karşı dışardan alınan antioksidanların da oldukça etkili olabileceği belirtilmiştir. Blueberry yüksek antioksidan kapasitesi nedeniyle oksijen radikallerini absorbe edebilir (112, 158).

Blueberry nöroprotektif ve antiproliferatif aktiviteye sahiptir (180). Blueberry'nin yaşlanmayla ortaya çıkan nöronal ve davranışsal fonksiyonlardaki bozuklukları azalttığı, iskemik beyin hasarı üzerinde pozitif etkileri olduğu ve nöral dokunun korunmasının antioksidan ve antiinflamatuvar mekanizmalarla olduğu belirtilmiştir (225, 238, 237).

Doğada yaygın olarak bulunması ve toksik olmayan yapısından dolayı kitosan (CS) gıda, kozmetik, ziraat, tıp, kağıt ve tekstil olmak üzere birçok endüstri dalında kullanım alanına sahiptir. Kitosan, yapısında bulunan amin ve alkol grupları nedeniyle metal iyonlarıyla kompleks yapabilme ve metal şelatörü olarak davranabilme özelliğine sahiptir. Antibakteriyel ve mukoyapışkan özellikleri nedeniyle hücre zarında bulunan proteinler ile etkileşime girip proteinleri reorganizasyona uğratarak hücre zarından madde emilimini arttırarak yara iyileşmesine yardımcı olur (236).

Kitosanın polikatyonik yapısı nedeniyle lipidlerin emilimini engelleyerek etki gösterdiği, kolesterol ve trigliserid düzeylerini önemli ölçüde azalttığını belirten çalışmalar mevcuttur (226). Yüksek viskoziteye sahip olan CS son yıllarda kilo vermeye yardımcı maddeler arasında yer almaktadır. Kitosan toksik olmayan yapısından dolayı antimikrobiyal, antikanser, hemostatik ve karaciğer fonksiyonlarının düzenlenmesi gibi çeşitli fonksiyonlara sahiptir (46).

Arginaz enzimi, arginini ornitin ve üreye hidroliz eden üre döngüsünün anahtar enzimidir. Bir metalloenzim olan arginaz, kuaterner yapıya sahiptir. Arginaz enziminin kuaterner yapısının oluşması için manganez (Mn^{+2}) iyonları gereklidir. Mn^{+2} iyonları enzim inhibisyonuna karşı enzim yapısına dayanıklılık kazandır. Arginaz enzim aktivitesinin en yüksek olduğu organ karaciğerdir. Üre sentezinde önemli role sahip olan arginaz enzimi, üre sentezinin olmadığı dokularda da prolin, glutamat ve poliaminlerin sentezi için önemli olan ornitin üretimini sağlar. Biyosentetik bir prekürsör olan ornitin, üre döngüsünün merkezi bir parçasıdır ve bir çeşit geri dönüşümlü katalizördür (12).

Arginaz enzimi, birçok hastalığın gelişiminde önemli fonksiyonlara sahip olan nitrik oksit (NO)'in sentezinde düzenleyici rol oynamaktadır. Antitrombotik, antiproliferatif ve antioksidan özellikte biyolojik bir molekül olan NO, biyolojik membranlardan kolayca difüze olabilen hem otokrin hem de parakrin özellikte benzersiz haberci moleküldür (98). Nitrik oksit sentezi; nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), flavin adenin dinükleotid (FAD), flavin mononükleotid (FMN), hem ve tiyol grupları koenzim olarak kullanılarak L-argininin L-sitruline oksidasyonu ile gerçekleşir. (57).

Yapılan araştırmalarda NO'in, APAP ile indüklenen karaciğer hasarında önemli rolünün olduğu belirtilmiştir (69). Arginaz ve nitrik oksit sentaz (NOS) enzimleri birbirleri ile yarışma halindedir. Arginaz enzim aktivitesinin artması, NOS enzimini baskılayarak üretimi ornitin lehine çevirebilir. Bu durum poliamin sentezini artırırken, NO üretiminin azalmasına neden olur. Sonuç olarak ise NO düzeylerinin azalması birçok hastalığın gelişim sürecini hızlandıracaktır (23). Yapılan çalışmalarda, arginaz enzim aktivitesinin hepatoselüler hasarın akut fazında önemli olduğunu ve hepatik

lezyonların belirlenmesinde arginaz enzim aktivitelerinin belirlenmesinin klinik açıdan önemli olduğunu belirtmektedir (90)

Sialik asit, beyin glikolipidleri ve tükürük musinlerinin zayıf asidik ortamda hidrolizinden salgılanan biyolojik membranların önemli yapısal bileşenleridir. Serum ve dokularda bulunan glikolipid ve glikoproteinlerin terminal oligosakkarit zincirlerinin önemli bir komponenti olan sialik asit, kompleks karbonhidratların oluşumuna çok fazla yapısal farklılık katarak katkıda bulunurlar (145,178). Hücreler ve moleküller arasındaki elektrostatik çekim süreçlerinde rol alırlar. Sialik asit kan grubu bileşenlerinde antijenik belirleyicidir. Hormon ve sitokinler gibi birçok endojen maddenin reseptörleri için gerekli bir bileşendir. Bunlara ilaveten çok sayıda toksin, bakteri ve virüs gibi patojenlerin hücreleri sialik asit içeren reseptörlere bağlanır (203,207). Akut ve kronik karaciğer yetmezliği, siroz, karaciğer kanseri, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, inflamasyon ve kanser gibi birçok farklı durumda sialik asit düzeylerindeki artış belirlenmiştir (43).

Seruloplazmin tek bir polipeptid zincirinden oluşan, poliamin ve polifenol substratları için oksidaz aktivitesine sahip bir akut faz proteinidir. Yapısının %7-8'lik karbonhidrat içeriğini sialik asit oluşturur. Seruloplazmin ferooksidaz aktivitesine sahiptir. Organizmada antioksidan olarak görev yapan seruloplazmin, serbest oksijen radikallerinin oluşumunu ve lipid peroksidasyonunu engelleyerek, dokularda ve plazmada bulunan serbest radikallerin zararlarını engellemektedir (210). Yapılan araştırmalarda, seruloplazminin endotelial NOS'ın fonksiyonlarının düzenlenmesinde (212), koagülasyon, anjiogenez, biogenik aminlerin inaktivasyonu ve oksidatif stres üzerinde etkilerinin olduğu belirtilmiştir (9).

Bu tez çalışmasında amacımız, hepatotoksik bir ajan olarak kabul edilen APAP ile deneysel karaciğer hasarı modeli oluşturmak, son yıllarda araştırmacıların çok yoğun ilgisini çeken BB ve CS'ın karaciğer hasarı üzerindeki etkilerini biyokimyasal ve histolojik düzeyde araştırarak ortaya koymak ve bu süreçte BB ve CS'ın potansiyel koruyucu ajanlar olup olamayacaklarının, Arginaz-Ornitin-NO ve Sialik asit-Seruloplazmin Oksidaz mekanizmalarının değerlendirilerek araştırılması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

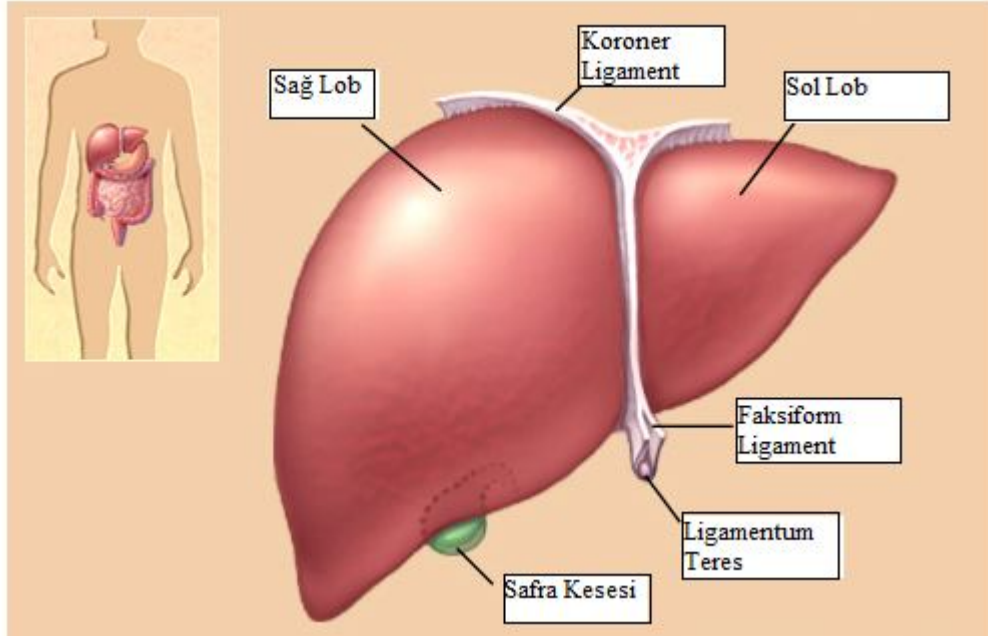
2.1. KARACİĞER

Karaciğer; hayati bir organ olma özelliği taşıyan, detoksifikasyon, protein sentezi, karbonhidrat ve lipid metabolizmasında görev alan ve üre, amonyak, bilirubin gibi son ürünlerin uzaklaştırılması gibi fonksiyonları olan vücuttaki en büyük ikinci organ ve salgı yapan en büyük organdır. Karaciğeri, anatomisi ve fonksiyonları olmak üzere 2 başlık altında tanımlayabiliriz (77).

2.1.1. Karaciğerin Anatomisi

Karaciğer, karın boşluğunun sağ üst bölümünde bulunan, vücut ağırlığının yaklaşık 1/15'ini oluşturan, hem ekzokrin hem de endokrin fonksiyonlara sahip bir organdır. Ortalama ağırlığı 1.2-1.8 kg arasında değişmektedir. Karaciğer, lipoproteinler, protrombin, albumin, globulinler, fibrinojen gibi proteinleri kana doğrudan doğruya vermesinden dolayı endokrin fonksiyona sahip iken, safra kanalları yoluyla safrayı duodenuma boşalttığından ekzokrin fonksiyona sahip bir organdır (77,99). Karaciğer geniş sağ lob ve küçük sol lob olmak üzere iki lobdan oluşur (Şekil 2.1) ve büyük bir bölümü göğüs kafesi ile korunmaktadır. Karaciğer en dışta seröz bir zar olan periton ve onun altında ise Glisson kapsülü adı verilen bir kapsül ile sarılmıştır. Glisson kapsülü karaciğer içerisine doğru uzantılar göndererek karaciğeri lob, segment ve lobüllere ayırır (1,118).

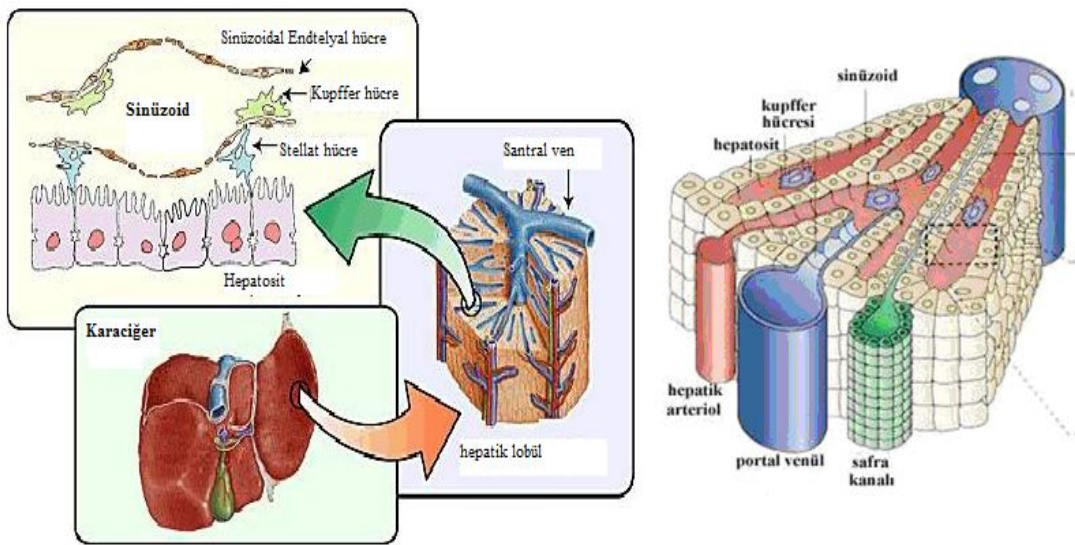
Karaciğere hepatik arter ve portal ven adı verilen iki önemli damar bağlıdır. Karaciğere gelen kanın %70-80'i portal venden, %20-30'u hepatik arterden gelir. Portal ven, gastrointestinal sistemin venöz dönüşünü karaciğere taşıyan kapalı bir sistem iken hepatik arter, merkezi dolaşımdan karaciğere bol oksijenli kanı taşıyan sistemdir (2).



Şekil 2.1. Karaciğerin yapısı (223)

Karaciğer; hepatositler, endotel hücreleri, kupffer hücreleri, stellat hücreleri ve safra kanalı epitelyum hücreleri olmak üzere yapısında beş tip hücre bulundurur. Hepatositler karaciğer hacminin % 80-88'ini oluşturan, yağ asitleri, fosfolipidler ve trigliseridlerin metabolizmasında görev yapan hücrelerdir. Hepatositler, lobül içerisinde santrale doğru yönelim gösteren tek sıralı dizilim halindedirler ve yan yana gelen hepatositler safra kanaliküllerini oluştururlar (Şekil 2.2). Hepatositlerin yaşam süreleri yaklaşık 150 gün veya daha fazladır. Karaciğer dokusunun çeşitli travmatik etkiler veya toksik maddelerin etkisiyle bölgesel işlev kaybı durumunda hepatositler ileri derecede rejenerasyon yeteneği gösterir ve çok kısa sürede kayıp dokunun yenilenmesi sağlanır. Hepatosit dizilimleri arasında kan akımı, portal venül ve hepatik arteriol ile bağlantılı olan sinüzoid adı verilen boşluklar bulunur. Karaciğer sinüzoidlerinin duvarında endotel hücreleri ve kupffer hücreleri olmak üzere iki tür hücre bulunur. Kupffer hücreleri monositlerden köken alan ve kuvvetli fagositoz yapan hücrelerdir (70,109).

Sitoplazmalarında ferritin formunda demir ve alyuvar parçacıkları bulunur. A vitamini ve yağ depolanmasında yer alan kupffer hücrelerinin, dalaktan kaçan yaşlanmış alyuvarların metabolize edilmesi, hemoglobinin sindirilmesi de görevleri arasında yer alır. Endotel hücreleri, karaciğerde aralıklı olarak bulunan, sitoplazma ve organelleri az olan hücrelerdir (70,109).



Şekil 2.2. Karaciğer hücreleri (217)

Stellat hücreleri, sinüzoidlerin duvarında bulunan, yüksek miktarda retinol içeren hücrelerdir. Aktif hale geldikleri zaman Disse aralığına kollajen salgılayarak fibrotik sürecin başlamasına neden olurlar. Stellat hücreleri fibrojen, ekstraselüler matriksin sentezi, eritropoietin sentezi, retinoid alımı, depolanması ve metabolizması, hücreler arası iletişim ve kemotaktik maddelerin salınması gibi çeşitli fonksiyonlara sahiptir (8,70). Safra kanalı epitel hücreleri, iki hepatositin bitişik olduğu her yerde, hücrelerin arasında tübüler bir aralık bulunur ve bu aralık safra kanalikülü olarak isimlendirilir (50).

2.1.2. Karaciğerin Fonksiyonları

Birçok kimyasal reaksiyonu gerçekleştirerek yaşamımızda önemli bir rol oynayan karaciğer, sindirim kanalından emilen besinlerin işlendiği ve diğer vücut kısımlarının yararlanması için bazılarının depolandığı bazılarının ise hemen dolaşıma verildiği bir organdır. Karaciğerin önemli görevlerini karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmaları, safra üretimi ve detoksifikasyon başlıkları altında toplayabiliriz (30,142).

2.1.2.1. Karbonhidrat Metabolizması

Karaciğerin birincil metabolik işlevi, özellikle glukoz ve amino asitler olmak üzere metabolitlerin çoğunun kandaki miktarını düzenlemektir. Besinlerle alınan ve vena porta yolu ile karaciğere ulaşan glukoz, karaciğerde glikojen şeklinde depolanır. Öğün aralarında karaciğer, kan glukozundaki eksilmeyi karşılamak için glikojen depolarını kullanabilir veya böbreklerin katılımıyla, laktat, gliserol ve amino asitler gibi karbonhidrat dışı metabolitleri glukozu çevirir. Kan glukoz miktarının yeterli bir düzeyde sürdürülmesi, glukozu zorunlu yakıt olarak kullanan beyin ve alyuvar gibi bazı dokular için hayati önem taşır (30,142).

2.1.2.2. Lipid Metabolizması

Karaciğer lipid metabolizmasında merkezi bir role sahiptir ve tüm lipid gruplarına dahil maddeleri yapısında taşır. Dokusundaki lipid oranı çeşitli etkenlere bağlı olarak değişmekle birlikte ortalama %5 düzeyindedir. Karaciğer de yağ asitlerinin sentez ve oksidasyonu, yağ asitlerinden trigliserid oluşumu, fosfolipid, lipoprotein ve kolesterol sentezi gibi metabolik olaylar gerçekleşmektedir (30,142).

2.1.2.3. Protein Metabolizması

Karaciğer, amino asitlerin deaminasyonu, üre oluşumu ile amonyağın vücut sıvılarından uzaklaştırılması ve plazma proteinlerinin oluşumu ile protein metabolizmasında fonksiyon görür (30,142).

2.1.2.4. Safra Salgılanması

Karaciğerin önemli fonksiyonlarından biri, yağların sindirim ve emiliminde görev alan, kandan yıkım ürünlerinin atılması gibi önemli fonksiyonlara sahip olan safrayı salgılamaktır. Safra karaciğerin ekzokrin salgısı olarak, hepatositlerde granülsüz endoplazmik retikulum'da sentezlenen en önemli üründür. Safra asitleri, elektrolitler, fosfolipidler, kolesterol ve bilirubin safra sıvısı içinde bulunur. Bu maddeler, distal intestinal epitelden emilim yoluyla hepatosit içine alınır ve hepatositler aracılığıyla safra kanaliküllerine taşınır. Safra asitleri sindirim sisteminde lipidlerin emülsiyon haline getirilmesinde önemli bir fonksiyon görerek bunların lipaz ile sindirilmesini sağlar (36,142).

2.1.2.5. Detoksifikasyon

Karaciğer, ilaçların, dışarıdan alınan veya endokrin sistemde üretilen hormonların veya kalsiyum gibi minerallerin fazlasının biyotransformasyon reaksiyonları ile organizma için zararlı maddeleri etkisizleştirerek atılmasını sağlar. Karaciğer, genişleyebilen bir organ olduğundan hepatik venler ve sinüsler içinde normalde var olan kan rezervuarına duruma göre ekstra kan ekleyebilmesiyle vasküler rezervuar fonksiyonuna sahiptir. Portal sistemde barsaklardan gelen mikroorganizmaları hepatik sinüslerde bulunan makrofajlar aracılığı ile filtrelemek, vitamin ve mineral depolanması ve koagülasyon faktörlerinin sentezi de görevleri arasında yer alır (82,142).

2.2. HEPATOTOKSİSİTE

Karaciğer anatomik yerleşimi, fizyolojik ve biyokimyasal rolü nedeni ile birçok toksik madde ve ilaçlara sıkça maruz kalan hedef organdır. Karaciğerin iç veya dış kaynaklı pek çok maddenin metabolizmasından sorumlu olması, karaciğere ilaç kaynaklı toksisite yönünden önem kazandırmaktadır (147). Hepatotoksisiteye neden olan ajanları ilaçlar, doğal toksik ajanlar, vitaminler ve kimyasal ajanlar olarak sayabiliriz. Hepatotoksisite; akut ve kronik hasar, siroz, tümör gibi çeşitli klinik durumlarla karşımıza çıkabilir. İlaça bağlı hepatotoksisite, hepatositlerde ve safra kanalı hücrelerinde kolestaza yol açar. Kolestaz, sırayla, toksik safra asitleri ve boşaltım ürünlerinin intrahepatik birikimine neden olur ve bu da karaciğer hasarını artırır. Karaciğerde büyük rejeneratif kapasite vardır fakat nekrotik ve apoptotik hücre ölümüyle kaybolan hepatositlerin rejenerasyonu ilaca bağlı hasarın belirlenmesini engelleyebilir. Böylece hepatositlerin aktif çoğalma tepkisi karaciğeri karsinojenler için hedef organ yapar. Kupffer ve sinüzoidal endotelial hücreleri, stellat hücreleri, lökositler, nötrofiller ve makrofajlar karaciğer hasarının patogeneğinde önemli rol oynar (93).

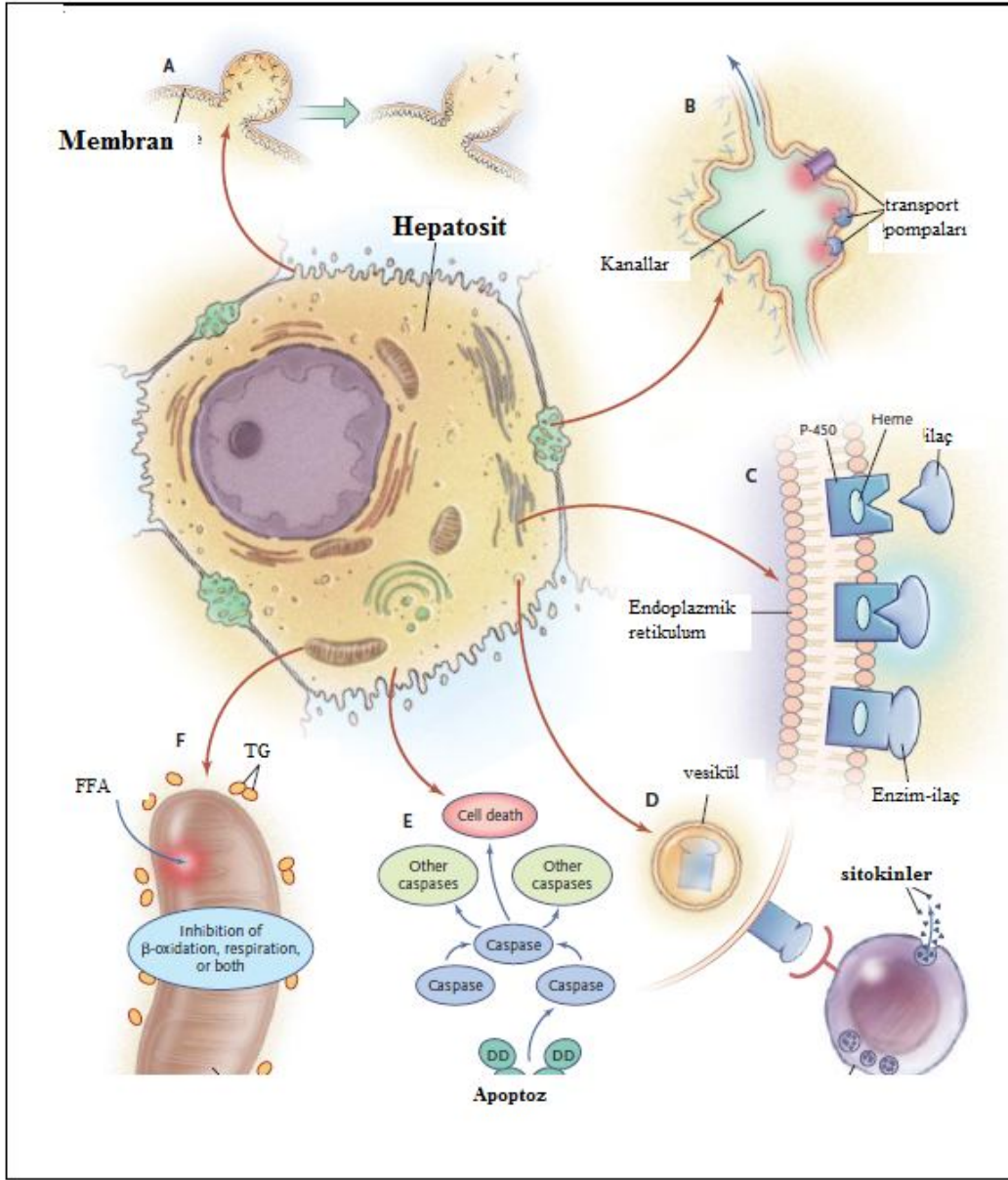
Hepatotoksisite, intrinsik ve idiyosenkrazik olmak üzere 2 farklı tipte reaksiyonla gerçekleşir. Bu reaksiyonlar karaciğerde oluşan hasardan tek sorumlu olabildikleri gibi, her iki reaksiyonun kombinasyon şeklinde işlediği durumlar da olabilir. İntrinsik reaksiyon ile gerçekleşen hepatotoksisite de, toksik metabolitler direkt etki ile hücrelerde ve organellerde yapısal bozukluklar yapabilir ya da indirek etki ile metabolik yollarla etkileşerek veya immun mekanizmalarla zarar verebilir. Oksijen ana ürünleri oluşumu ve hücre membran lipitlerinin peroksidasyonu ile de hasar gelişebilir. İdiyosenkrazik reaksiyon ile gelişen hepatotoksisite, önceden tahmin edilemez ve etkilerinin ortaya çıkması için belirli bir süre geçmesi gerekir. Bu tip toksik reaksiyon doza bağlı değildir ve deneysel çalışmalarla gösterilemez. İlaç alımı ile karaciğer hasarının ortaya çıkması arasında çok uzun zaman geçmesi ve diğer karaciğer hastalıklarına çok benzer klinik ve patolojik özellikler göstermesi tanı problemlerine yol açabilir (10,244).

Karaciğer hasarında 5 farklı yolak rol oynamaktadır. Karaciğer hasarındaki her mekanizma farklı organelleri hedeflemektedir fakat hepatositler 5 farklı yolakda da önemli rol oynamaktadır (Şekil 2.3). Karaciğer hasarı mekanizmalardan ilki hücre içi iyon dengesinin bozulmasıdır (Şekil 2.3A). İyon dengesinin bozulması sonucu ilaçlar kovalent bağ ile intraselüler proteinlere bağlanır. Hücre içi kalsiyum dengesi bozulur. Kalsiyum dengesinin bozulmasıyla hepatosit yüzeyinde aktin fibrilinin parçalanarak, hücre zarının ve hücrenin yıkımı gerçekleşir (123).

Karaciğer hasarındaki diğer bir mekanizma safra kanaliküler hasarıdır (Şekil 2.3B). Bu mekanizmada iki önemli olay gerçekleşir. Bunlardan ilki safra kanalikül membranındaki transport proteinin etkilenmesidir. Diğeri ise villus prosesinin kaybı ile safra sekresyonundan sorumlu bölgedeki aktin lifleri bozulmasıdır. Her iki olay ile bilirubin ve diğer organik bileşiklerin atılımı sınırlanır. Böylece safra sekresyonunu engellenerek kolestaz oluşur. Safra asitlerinin hücre içindeki birikimi de apoptozise neden olur (123,202).

Üçüncü mekanizma hepatoselüler reaksiyonlar sonucu immün sistemin etkilenmesidir (Şekil 2.3C, Şekil 2.3D). İlaçlar küçük moleküllerdir ve immün cevap oluşturamazlar. Ancak biyotransformasyon sonucu p450 enzim reaksiyonları sırasında oluşan ara metabolitler enzimlere bağlanıp antijen gibi algılanan bileşikler oluştururlar. Bu bileşiklerin hepatosit yüzeyine taşınması ile antikor oluşumu ve humoral immunitite uyarılır. Sitokin salınımı ve direkt T hücre cevabı ile sitolize de neden olurlar (123,168). Diğer bir önemli mekanizma apoptozisdir (Şekil 2.3E). Hücre zedelenmesi ile uyarılan immün sistem sitokinleri aktifleşip, hücre içi kaspazları tetikleyerek apoptozisi tetikler (123,163).

Karaciğer hasarında son ve önemli olan bir diğer mekanizma mitokondriyal disfonksiyondur (Şekil 2.3F). Yağ asitlerinin beta oksidasyonunun ve solunum zinciri enzimlerinin inhibisyonu doğrudan mitokondriyal DNA'yı etkiler. Serbest yağ asitleri metabolize olamayıp, laktat ve reaktif oksijen radikallerinin birikimine yol açar. Bu radikaller mitokondriyal DNA'yı zedeler. Hücrede aerobik metabolizmada sıkıntı başlar ve anaerobik metabolizma ile laktik asidoz ve trigliserid birikimi olur. Sonuçta hücre içi yağlanması gerçekleşir (100,123).



Şekil 2.3. Hepatotoksisite mekanizmaları (123)

A: Hücre içi iyon dengesinin bozulması. **B:** Safra kanaliküler hasarı.

C: Enzim-ilaç etkileşimi ile oluşan bileşiklerin hepatosit yüzeyine taşınması ile antikor oluşumu ve humoral immünite uyarılır. Direkt T hücre cevabı ile sitolize oluşur.

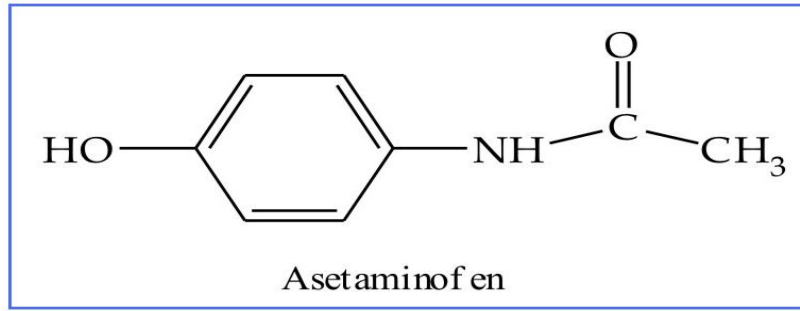
D: Biyotransformasyon sonucu p450 enzim reaksiyonları sırasında oluşan ara metabolitler enzimlere bağlanıp antijen gibi algılanan bileşikler oluştururlar.

E: Hücre ölümü sonucu apoptozun aktivasyonu

F: Mitochondrial disfonksiyon

2.3. ASETAMİNOFEN

Para-aminofenol türevi olan APAP, tüm dünyada sıklıkla kullanılan analjezik ve antipiretik ilaçlardandır. Parasetamol ve N-asetil-p-aminofenol isimleriyle de bilinen APAP, fenasetinin aktif metabolitidir. Molekül ağırlığı 151.2 g/mol olan APAP'ın kapalı formülü $C_8H_9NO_2$ dir. N-(4-hidroksifenil)-asetamid veya 4-hidroksiasetanilit yapısında olan APAP, beyaz ve kristal yapıdadır (Şekil 2.4). Fizyolojik pH'da anyonize formda bulunan APAP, etanol, methanol, sodyum hidroksit, aseton, etil asetat ve su da çözünen zayıf bir asittir (3,170).



Şekil 2.4. Asetaminofenin kimyasal yapısı (221)

2.3.1. Farmakokinetik Özellikler

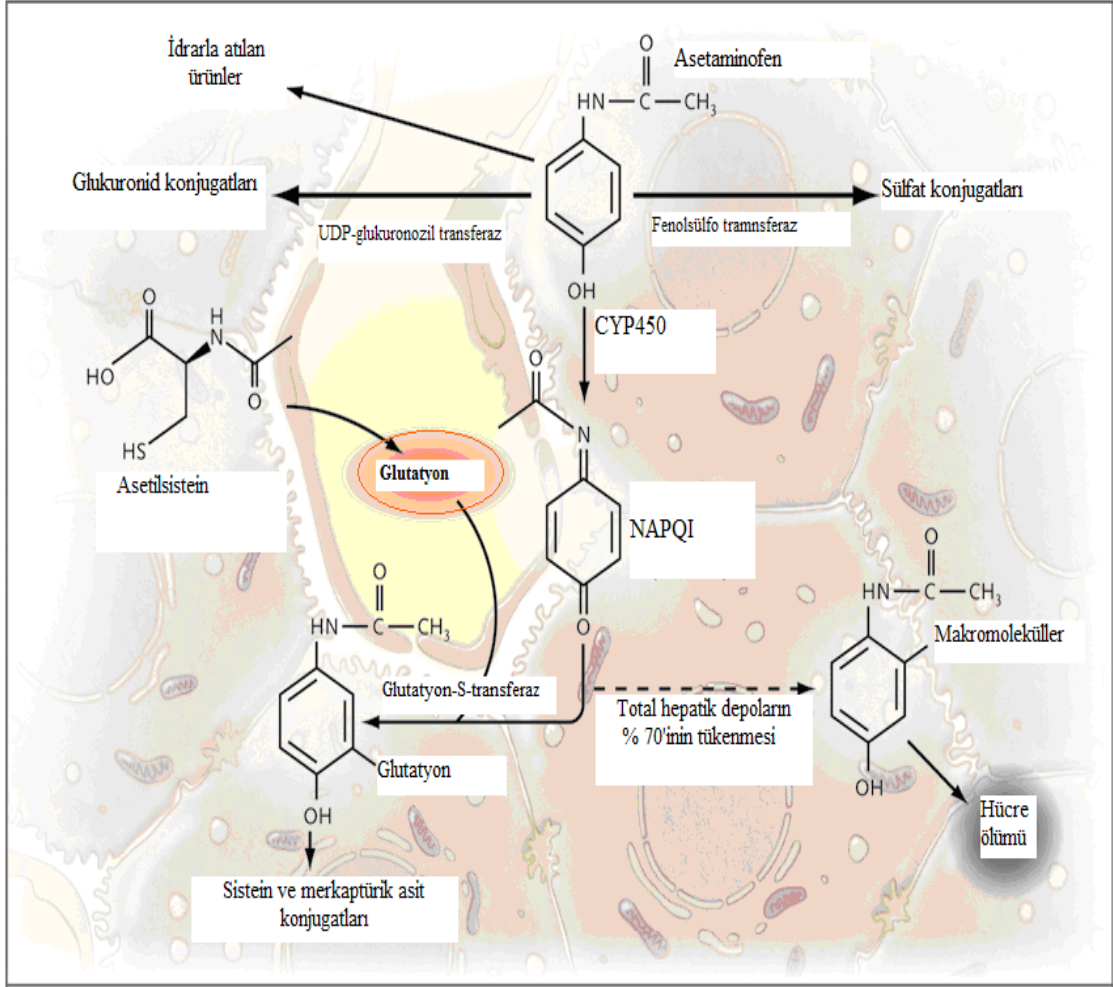
Dünyada ve ülkemizde reçetesiz satılan ilaçlar arasında yaygın kullanılan APAP, kandaki en yüksek konsantrasyonlarına vücuda alınmasından 30-60 dakika sonra ulaşır. Asetaminofen 50'den fazla preparatta tek başına etkin madde olarak, ayrıca 200'den fazla farmasötik preparat içerisinde de farklı maddelerle konjuge olarak kullanılır. Asetaminofenin plazmadaki yarı ömrü 2-3 saat arasında değişmektedir. Asetaminofenin % 80-85'lik kısmı dolaşımdaki plazma proteinlerine bağlıdır ve karaciğerdeki mikrozomal enzimler tarafından sülfat ve glukuronit bileşenlerine çevrilirken, % 5'lik kısmı ise değişmeden idrarla atılır (20).

Asetaminofenin emilimi açlık sırasında hızlı gerçekleşirken, hastalıkta ve narkotik analjezik gibi ilaçların kullanımında emilimi yavaşlamaktadır. Karaciğer, böbrek ve gastrointestinal kanalda en yüksek APAP derişimleri bulunmaktadır (20,105).

2.3.2. Asetaminofen Metabolizması

Asetaminofen karaciğer, böbrek ve barsak olmak üzere üç organda metabolize edilmektedir fakat APAP metabolizması esas olarak karaciğerde gerçekleşmektedir. APAP metabolizması glukuronid konjugasyonu, sülfat konjugasyonu ve sitokrom CYP450'ye bağlı mikrozomal oksidasyon olmak üzere üç temel mekanizma ile gerçekleşmektedir (231). Asetaminofen terapötik dozlarda uygulandığında, % 80-85'i glukuronid-sülfat konjugasyonu ile, % 10'u CYP450 enzim sistemi ile metabolize edilmekte olup, %5'i ise değişmeden idrarla atılarak uzaklaştırılmaktadır (18,72). Asetaminofen karaciğerde üridin difosfat glukuronozil transferaz (UDP-glukuronozil transferaz) enzimi tarafından glukronid konjugatına, fenol-sülfotransferaz enzimiyle sülfat konjugatına dönüştürülür. Glukuronid ve sülfat konjugatlarının bir kısmı safraya geçerken, bir kısmı da kan dolaşımına geçer (Şekil 2.5) (84).

Mikrozomal oksidasyon enzim sisteminin metaboliti karaciğere toksik bir ürün olan NAPQI'dir. Asetaminofenin, CYP450 enzimi ile oksidasyonu sonucu oluşan NAPQI, GSH ile hızla konjuge olarak zararsız metabolitler olan sistein ve merkaptürik asite dönüşür. Vücut için toksik olmayan bu metabolitler ve APAP'in konjuge olmayan formları idrarla dışarı atılır. Asetaminofen metabolizmasında CYP450 enzim sistemine bağlı 3 enzim rol oynamaktadır. Terapötik dozlarda CYP3A4, toksik dozlarda ise CYP2E1 ve CYP1A2 enzimleri çalışır. Asetaminofen oral yolla alındığında, vücuttaki depo GSH ile zararsız hale getirilir. Yüksek doz APAP alınımında, vücudun detoksifikasyon kapasitesinin sınırlı olması, CYP450 enzimlerinin indüksiyonu, glukuronidasyonun inhibisyonu ve GSH depolarının tükenmesi gibi nedenlerle toksik ürün NAPQI detoksifikasyona uğramaz. N-asetil-p-benzokinon-imin, karaciğer hepatosit hücrelerine kovalent bağlanarak hücre ölümüne ve karaciğer hasarına neden olur (17,59,84).



Şekil 2.5. Asetaminofen Metabolizması (84)

Asetaminofen metabolizması 3 mekanizma ile gerçekleşir.

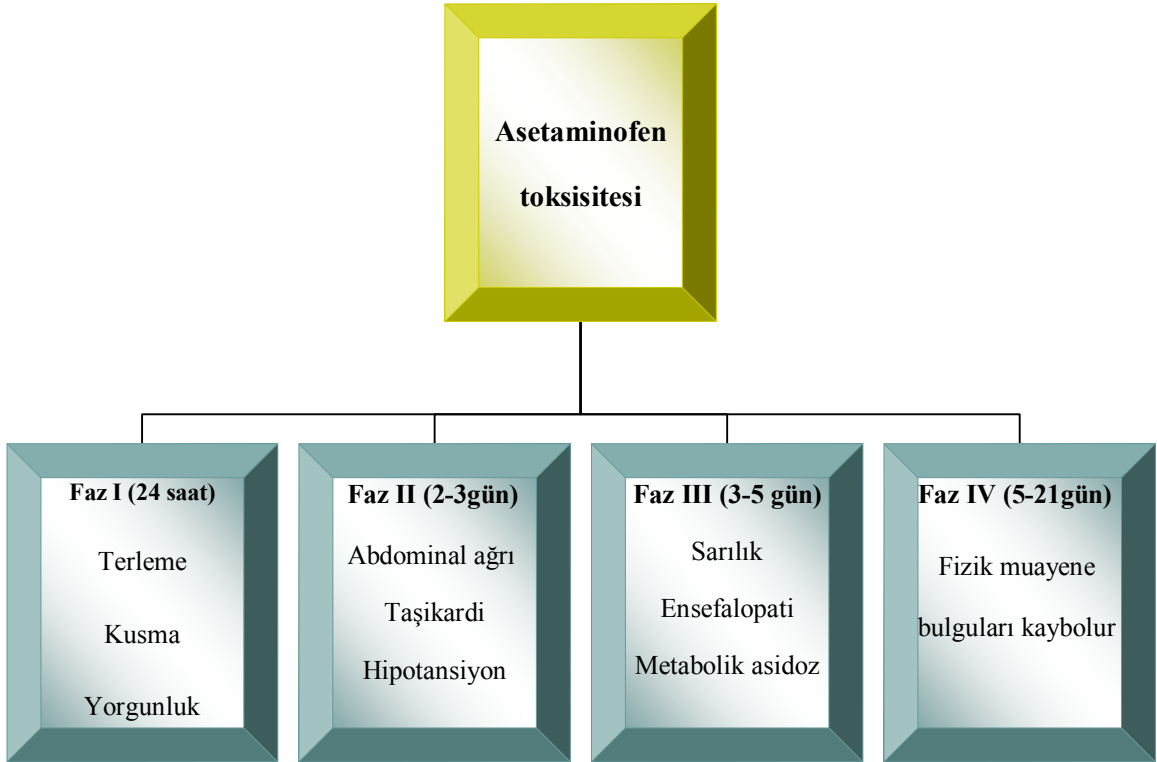
Asetaminofenin % 80-85'i glukuronid-sülfat konjugasyonu ile, % 10'u sitokrom P450 enzim sistemi ile metabolize edilmekte olup, %5'i ise değişmeden idrarla atılarak uzaklaştırılmaktadır.

Toksik bir metabolit olan NAPQI, glutatyon ile hızla detoksifikasyona uğrayarak sistein ve merkaptürik asit konjugatlarına dönüşür.

Şayet NAPQI yeterli detoksifikasyona uğramazsa karaciğer hepatosit hücrelerinin ölümüne ve karaciğer hasarına neden olur.

2.3.3. Asetaminofen Toksisitesi

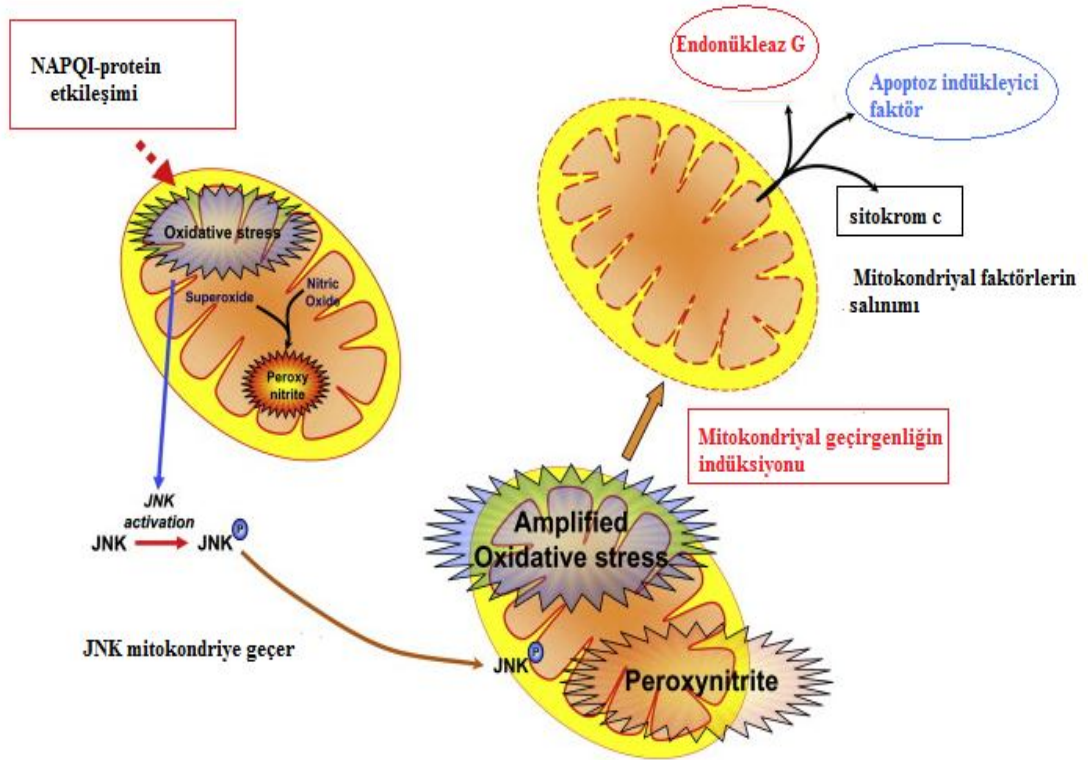
Asetaminofenin toksik etkileri başta karaciğer olmak üzere böbrekte de ortaya çıkarken, kardiyovasküler sistem, solunum ve asit- baz dengesi üzerinde belirgin bir etkisi yoktur. Serum APAP konsantrasyonlarının artması hepatotoksisiteye neden olur. Terapötik dozlarda alındığında bile karaciğer enzimlerinde ılımlı bir yükselme gözlenirken, yüksek dozlarda karaciğerde ciddi hasar ve nekroza yol açarak ölümcül olabilir. Asetaminofenin toksik dozları bir defada 10 gr ve üzeri veya 150 mg/kg olarak bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda daha düşük dozlarda APAP alınmasının veya 4 g/gün şeklinde kronik kullanılmasının hepatotoksisiteye yol açtığı belirtilmiştir (17,20). Asetaminofen toksisitesi klinik olarak 4 faza ayrılmıştır (Şekil 2.6). Faz 1 APAP uygulamasının ilk 24 saatlik bulgularını oluşturur. Bulantı, kusma, karın ağrısı gibi gastrointestinal şikayetlere terleme ve yorgunluk semptomları eşlik eder (72,105).



Şekil 2.6. Asetaminofen Toksisite Fazları

Asetaminofen toksisitesinin 48-72 saatlik zaman dilimlerinde ortaya çıkan bulgular faz 2 olarak gruplandırılmıştır. Bu dönemde karaciğer toksisitesinin ilk önemli bulguları ortaya çıkar. Sağ üst kadranda ağrı, taşikardi, hipotansiyon, aminotransferaz ve bilirubin düzeylerinde artış bu aşamada ortaya çıkar. Faz 3, APAP uygulamasının 72-120 saatlik zaman aralığında ortaya çıkan bulgulara göre gruplandırılmıştır. Bu dönemde sarılık, ensefalopati, metabolik asidoz ve komanın eşlik ettiği hepatik yetmezlik görülebilir. Karaciğer enzimleri en yüksek seviyelere çıkabilir. Bu dönemde ciddi karaciğer yetmezliği oluşabilir ve ölümlerle sonuçlanabilir. Asetaminofen toksisitesinin faz 4 aşamasında, hasta iyileşme sürecine girerek fizik muayene bulguları kaybolur (51,105). Asetaminofen toksisitesi karaciğer dokusunda nekroza yol açmaktadır. Kaspaz aktivasyonu veya apoptotik hepatositlerde önemli bir artış olmadığı sürece APAP toksisitesi oluşmaz. Toksikiteye yol açan APAP metabolizmasında nekrozun oluşturduğu hücresel olaylar aydınlatılması gereken konular arasındadır (165,198).

Asetaminofen hepatotoksitesine neden olan sebepler arasında oksidatif stres, kalsiyum dengesizliği, protein arilasyonu, NAPQI'in proteinlere ve lipitlere kovalan bağlanması sonucu meydana gelen değişikliklerdir (Şekil 2.7). Oksidatif stres, APAP hepatotoksitesinin indüksiyonunda önemli mekanizmalarındandır. APAP'nin CYP450 enzim sistemi tarafından NAPQI'e oksidasyonundaki artış reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini artırır. Hidrojen peroksit (H_2O_2) ve süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) APAP metabolizmasının aktivasyonu sonucu oluşan ürünlerdir. Yapılan çalışmalarda yüksek dozlarda APAP alımının katalaz ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzim aktivitelerini ve GSH/okside glutatyon (GSSG) düzeylerini azalttığı bildirilmiştir. N-asetil-p-benzokinon-iminin yüksek oksidatif kapasitesi nedeniyle oluşan tiyol oksidasyonunun karaciğer toksisitesinin ana nedeni olabileceği düşünülmektedir. GSH düzeylerinde azalma, GPx aktivitelerinde azalmaya neden olur. N-asetil-p-benzokinon-imin ile proteinlerin sülfidril gruplarının oksidasyonu ile protein-protein ve protein-GSH arasında disülfid köprüleri oluşmaktadır böylece NAPQI ve proteinler arasındaki bu kovalan bağlanma hücre fonksiyonlarında kayıp ve hücre ölümüne neden olmaktadır (94,95).



Şekil 2.7. Asetaminofen Hepatotoksitesi (94)

Asetaminofen metabolizmasının metaboliti olan NAPQI mitokondrial proteinlere bağlanarak mitokondrial oksidatif stresi başlatır. Mitokondrideki peroksinitrit aktive olarak, mitokondrideki C-jun-N-terminal kinaz (JNK)'ın sitozole geçişini uyarır. JNK aktivasyonu mitokondrial oksidatif stres ve peroksinitrit oluşumu artırır. Bu da mitokondrial geçirgenliğin indüksiyonuyla sonuçlanır. Sitokrom c, endonükleaz G ve apoptoz indükleyici faktör (AIF) gibi mitokondrial faktörler salgılanır.

Araştırmalarda APAP ile uyarılan hücre hasarına lipid peroksidasyonun sebep olduğu vurgulanmaktadır. Asetaminofen toksisitesi nedeniyle oluşan oksidatif stresle lipid peroksidasyonu eş zamanlı gelişebilmektedir. Asetaminofenin CYP450 ile metabolizasyonu, NAPQI ve $O_2^{\cdot-}$ oluşumuyla sonuçlanmaktadır. Süperoksit konsantrasyonlarında yükselme H_2O_2 oluşumundaki yükselmeye ve H_2O_2 düzeylerindeki artış da hidroksil radikali ($OH\cdot$) artışına neden olur. Bu oluşan $OH\cdot$ lipidlerle reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunu başlatır (95,121).

Yapılan çalışmalarda peroksinitrit gibi reaktif nitrojen türlerinin düzeylerinde APAP hepatotoksitesisi sonucu artış olduğu bildirilmiştir. Nitrik oksit ve $O_2^{\cdot-}$ çok hızlı etkileşerek peroksinitrit oluşumuna neden olmaktadır. Peroksinitrit toksik türler için mükemmel bir adaydır ve GSH/GPx tarafından detoksifiye yapılır. Aşırı doz APAP alındığında peroksinitrit detoksifikasyon mekanizması bozulur ve yüksek miktarlarda oluşan peroksinitrit proteinleri nitratlayarak lipid peroksidasyonuna neden olur (98, 121,191). Mitokondride peroksinitrit aktivasyonu sonucu, mitokondriden sitozole c-jun-N-terminal kinaz (JNK) translokasyonu olur. JNK aktivasyonu mitokondrial oksidatif stres ve peroksinitrit oluşumu artırır. Bu da mitokondriyal geçirgenliğin induksiyonuyla sonuçlanır. Sitokrom c, endonükleaz G, apoptoz indükleyici faktör (AIF) gibi mitokondriyal faktörler salgılanır. Endonükleaz G ve AIF nükleer DNA fragmentasyonunu başlatmak için nükleusa geçer (94).

Yapılan çalışmalarda APAP hepatotoksitesisinde makrofaj aktivasyonunun önemli mekanizmalardan biri olduğu vurgulanmaktadır. Kupffer hücreleri karaciğerdeki fagositik makrofajlardır. Kupffer hücreleri aktive olunca NO, hidrolitik enzimler, $O_2^{\cdot-}$, eikozanoidler gibi çeşitli sinyal moleküllerinin salınımını sağlar. Asetaminofen hepatotoksitesisinde, kupffer hücreleri interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6) ve tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α) salınımını uyarır. Sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalarda APAP hepatotoksitesisinde kupffer hücrelerinin önemi vurgulanmaktadır (121,191).

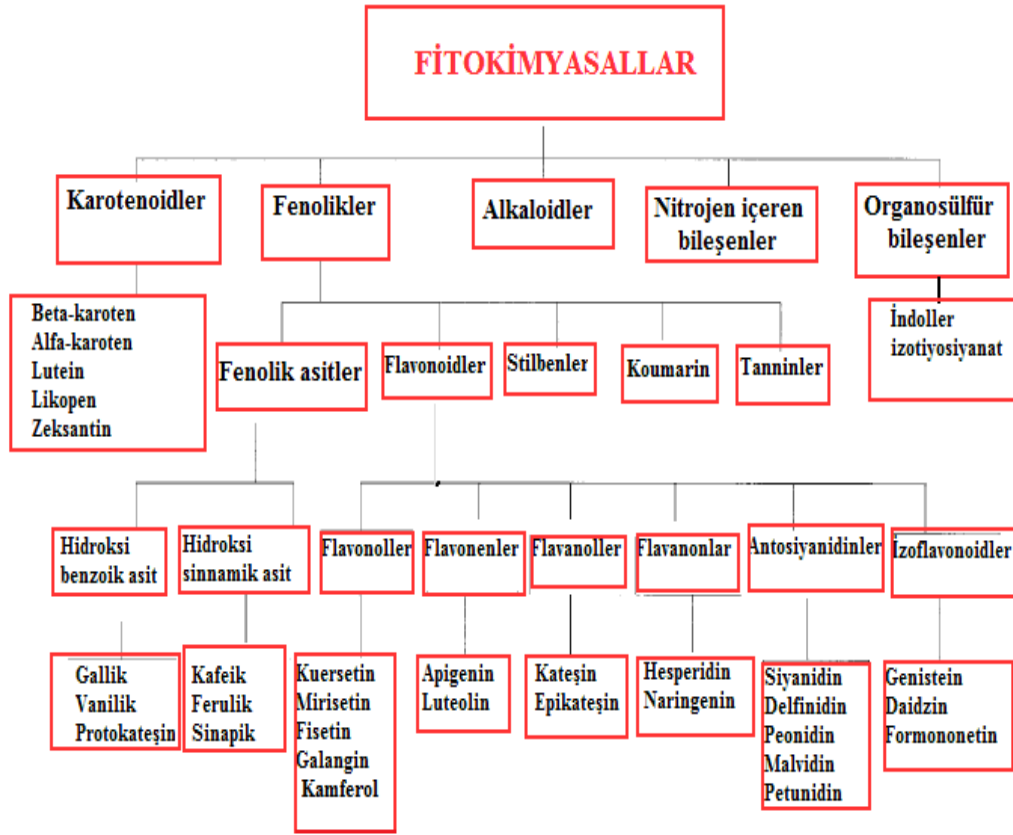
2.4. FİTOKİMYASALLAR

Yirminci yüzyılın son yıllarında besin endüstrisi çok hızlı bir gelişme kaydetmiştir. Antioksidan, hiper besleyici ve fitokimyasal gibi kavramlar, beslenme alanındaki klasik yaklaşım ve tartışmaların yön değiştirmesini sağlamıştır. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre insanlar zamanlarının ve ekonomik imkanlarının önemli bir kısmını sağlıksız beslenmelerinden kaynaklanan sorunları çözebilmek için harcamaktadırlar.

Bitkisel ağırlıklı beslenenlerin kendilerini daha zinde hissettikleri bildirilen raporda, sağlıklı ve zinde bir yaşam için taze sebze ve meyvelerden oluşan bir diyet önerilmektedir. Son yıllarda ise, bitkisel diyetlerin olası koruyucu etkilerinin, taşıdıkları antioksidan özellikli maddelerden oluştuğu ve antioksidanların hücreleri doğal oksidasyon reaksiyonlarının yıkımlayıcı etkilerine karşı koruduğu fark edilmiş, böylece araştırmalar bu bakış açısına yoğunlaşmıştır. Bugün ise, daha mikro planda bir yaklaşımla, bitkisel ürünlerde bulunan ve "fitokimyasallar" olarak tanımlanan maddeler üzerinde durulmaya başlanmıştır. Fitokimyasallar, bitkilerin kendilerine özgü renk, koku ve tatlarının oluşmasında etkili role sahip olan biyolojik aktif maddelerdir (60).

Fitokimyasallar, karotenoidler, fenolikler, alkaloidler, nitrojen içeren bileşenler ve organosülfür bileşenleri olmak üzere beş gruba ayrılmaktadır (Şekil 2.8). Bu gruplarda kendi içlerinde alt gruplara ayrılmaktadır. Araştırmacılar tarafından en çok çalışılanlar fenolikler ve karotenoidlerdir. Fenolikler yapılarında bir veya daha fazla aromatik halka ile birlikte hidroksil grup içeren bileşenlerdir. Fenolikler kendi içinde fenolik asitler, flavonoidler, stilbenler, koumarin ve taninler olmak üzere alt gruplara ayrılmaktadır. Diyetle alınan fenolik asitler kronik hastalık riskini azaltmaktadır. Fenolikler yönünden en zengin meyveler başta BB olmak üzere berry cinsi diğer meyveler, üzüm, elma, brokoli ve portakal olarak bildirilmiştir (126).

Flavonoidler ve diğer bitki fenoliklerinin süperoksit, lipid alkoksil, peroksil ve NO gibi radikal temizleme, demir ve bakır şelasyonu, α -tokoferol rejenerasyonu fonksiyonlarına ek olarak; vazodilatatör, immünstimülan, antiallerjik, östrojenik, antiviral etkileri de söz konusudur. Flavonoidler, glikozidler gibi canlı hücrelerde ortaya çıkarlar, sıcak asit ve enzimlerle sırasıyla aglikon ve şekere parçalanabilirler. Fenolik antioksidanlar, lipit radikallere, hızla H^+ vermesi şeklinde lipit oksidasyonu ile etkileşir. Görevi lipit peroksi ve alkoksil radikalini parçalamak ve böylece lipit peroksidasyon zincir reaksiyonunu sonlandırmaktır (60). İskelet yapılarının farklı olmasına göre flavon, flavonol, flavonon, biflavonoid, kalkon gibi alt gruplara ayrılırlar. Flavonoidler yapılarındaki A, B, C halkalarından dolayı fenil benzopiran yapısı gösterirler. Flavonoidler antioksidan özelliklerini gösterebilmek için serbest radikallerle reaksiyona girerek onları etkisiz hale getirirler (126).



Şekil 2.8. Fitokimyasalların Sınıflandırılması (126)

Fenolik asitler, hidroksi benzoik asit ve hidroksi sinamik asit olmak üzere iki major gruba ayrılır. Enzimsel aktivitelerin kontrolü, nitrozaminlerin oluşumunun engellenmesi ve kan lipit düzeyi dengesizliklerinin giderilmesinde aktif rolü vardır.

Karotenoidler, bir antioksidan gibi davranarak oksidatif kaynağı hasarı önemli düzeyde azalttığı, DNA sarmal kırılmalarını önlediği ve kanser önleyici etkinliği kabul edilmektedir. Organosülfür bileşenler, toksik etkili endojen ve eksojen kimyasal maddelerin kendileri ve metabolitlerinin vücuttan atılmasında rol alan, GST, NADPH ve quinon redüktaz gibi detoksifikasyon enzimlerinin aktivitesini arttırdıkları, ayrıca antioksidan savunmada yer aldıkları saptanmıştır. Polifenoller, izoflavonlar ve flavonoidler antioksidan etkinliği kanıtlanmış mikro besinlerdendir. Bu özellikleri nedeniyle sayılan fitokimyasallar oksidasyonun rutin tahribatına karşı düşük yoğunluklu

lipoprotein (LDL) oksidasyonunu inhibe ederek hücreleri korurlar. Aynı zamanda başta polifenoller olmak üzere, izoflavonlar ve flavonoidler gibi bazı fitokimyasal maddelerin steroidlerin metabolik profilini ve p450 substratlarını değişime uğraticı etki gösterdikleri belirlenmiştir (60,126).

Fitokimyasal maddelerin metabolik hastalıklara karşı vücudu nasıl koruduklarının tam olarak anlaşılabilmesi için bu hastalıkların oluşum ve gelişim aşamalarının yanı sıra fitokimyasal etki mekanizmalarının da çok iyi bilinmesi gerekmektedir.

2.4.1. BLUEBERRY

Blueberry (*vaccinum angustifolium*), dünya üzerindeki birçok bölgede yabani olarak yetişmekte olan, vücutta biyoaktif olarak kullanılan flavonoidlerden antosiyaninler, flavanoller ve fenolik asitler açısından zengin, yüksek antioksidan kapasiteye sahip son yılların en çok araştırma yapıldığı meyve türüdür. Blueberry'nin insan sağlığı ve beslenmesi üzerine yararları ile ilgili yapılan araştırmalarda 100 gr BB'de % 83 su, % 1 protein, % 0.5 yağ, % 15 karbonhidrat, %1.5 lif, kalsiyum, demir ve C vitamini bulunduğu saptanmıştır (127,188).

Fosfor içeriği son derece yüksek olan BB besleyici olmasına rağmen kalori ve sodyum içeriği düşüktür. Lifli yapısından dolayı bağırsak metabolizmasını düzenler. Birleşmiş Milletler Ziraat Departmanından alınan araştırma sonuçlarına göre BB'nin en yüksek antioksidan kapasite ve en yüksek polifenol düzeylerine sahip olduğu bildirilmiştir. Yüksek antioksidan kapasitesi oksijen radikallerini absorbe etme özelliğinden gelmektedir. Blueberry yapısında oksidatif stres üzerinde yararlı etkileri olan 20 farklı antosiyanin içermektedir (130,180,243).

Delfinidin 3- galaktozid, delfinidin-3-glukozid, siyanidin-3-galaktozid, siyanidin-3-glukozid, petunidin-3- galaktozid, petunidin-3-arabinozid, malvidin-3-galaktozid, malvidin-3-glukozid ve malvidin-3-arabinozid BB' de bulunan baskın antosiyaninlerdir. Bu dokuz antosiyaninin antioksidan özellikleri halka yapılarına bağlı

olan fenolik hidroksil gruplarından gelmektedir. Farklı hidroksilasyon ve glikozilasyon işlemleri antioksidan özelliklerini modüle edebilir. Blueberry’de bulunan önemli fenolik bileşenler elajik asit, gallik asit, kuersetin, mirisetin, pterostilben ve klorogenik asittir (243). Elajik asit, kansere karşı güçlü savaşıma yeteneği olan önemli fitokimyasallardandır. Blueberry’nin antikanser aktivite mekanizması ile ilgili çalışmalar daha başlangıç aşamasındadır ve bununla beraber yapılan çalışmalarda bu etkisinin yapısında bulunan fitokimyasallardan kaynaklandığı düşünülmekte ve özellikle elajik asit üzerindeki çalışmalara ilgi artmıştır (144,205).

Blueberry’nin tümör inhibisyon etkisinin yapısında bulunan fitokimyasallardan flavonoller, antosiyaninler ve elajik asitin aralarındaki sinerjik aktiviteden oluştuğu düşünülmektedir. Kanser üzerinde pozitif etkisi araştırmacılar tarafından tartışılan konulardandır. Yayınlanan çalışmalarda BB’nin ornitin dekarboksilazı üzerinde inhibisyon etkisi olan kinon redüktazı indükleyerek çeşitli kanser türlerine karşı antiproliferatif etki gösterdiği bildirilmiştir (144,179).

2.4.1. Blueberry’nin Etki Mekanizması

Blueberry, serbest radikal düzeylerinde bir azalma sağlayarak ve plazma antioksidan kapasitesini artırarak lenfositlerdeki DNA hasarlanmasını azaltabilmektedir. Endotel doku fonksiyonun gelişimi, serum antioksidan kapasitesinin artırılması, LDL’nin oksidasyona karşı korunması, plazmaya özgü protein oksidasyonunun ve damarlarda plak oluşumunun azalması BB tüketimi sonucu gözlenen etkiler arasında sayılmaktadır (154,214).

Günümüzde yapılan çalışmalar oksijen radikallerinin giderilmesinde sadece organizmadan kaynaklanan savunma sistemlerinin yeterli olmadığını göstermektedir. Özellikle yapılan araştırmalarda organizmada meydana gelen oksidatif hasarlara karşı dışardan alınan antioksidanların da oldukça etkili olabileceği saptanmıştır (112,158).

Blueberry açısından zengin diyetle beslenen kişilerde kronik hastalık risklerinin azaldığı, bu azalmanın BB'de bulunan polifenollerden kaynaklandığı belirtilmiştir. Polifenoller, serbest radikalleri baskılayarak oksidatif stresi azaltır. Blueberry, antiinflamatuvar ve antikanser mekanizmalarla kronik hastalıkları etkileyebilir. Endotelial hücreler ve kırmızı kan hücrelerinde H₂O₂ ile indüklenen reaktif oksijen türleri BB ile baskılanarak serbest radikallerin hasarı önlenir. Blueberry'nin yaşlanmayla ortaya çıkan nöronal ve davranışsal fonksiyonlardaki bozuklukları azalttığı, iskemik beyin hasarı üzerinde pozitif etkileri olduğu ve nöral dokunun korunmasının antioksidan ve antiinflamatuvar mekanizmalarla olduğu belirtilmiştir (194,238,237).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda BB'nin LDL ve lipozom oksidasyonunu azalttığı ve oksidatif stresin sebep olduğu kardiyovasküler hasarların ve kanser ölümlerinin önemli ölçüde azaltılabileceği vurgulanmaktadır (59,244). Diyabetik retinopati üzerinde yapılan klinik çalışmada BB ile beslenen diyabetik retinopatili kişilerde olumlu gelişmelerin olduğu bildirilmiş ve kişilerin retinal hemorajilerinde azalmalar gözlenmiştir (53).

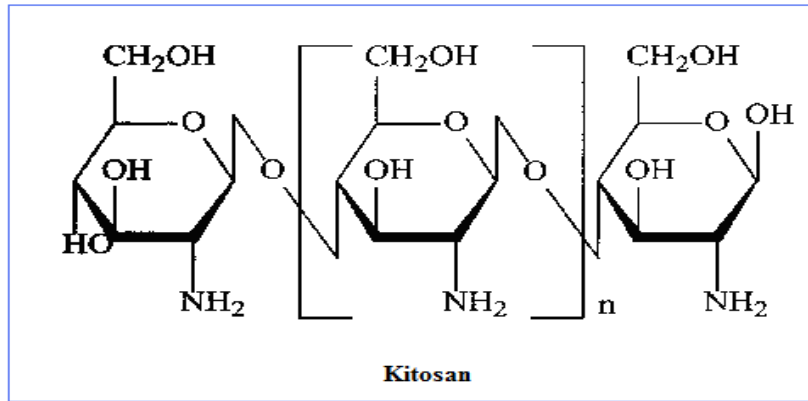
Blueberry'nin diyetle alınması hepatotoksisiteye karşı yararlı olabilir. Blueberry lökosit infiltrasyonunu durdurarak inflamatuvar prosesi yavaşlatır. Karaciğer patolojilerinde hücrel hasarın indüklenmesiyle oluşan doku inflamasyonu kritik rol oynar. Nötrofil kaynaklı ROS aşırı üretildiğinde vücudun endojen antioksidan savunma mekanizmalarını baskılayarak oksidatif strese neden olabilir. Protein transkripsiyon faktörü (Nükleer Faktör-κB / NF-κB) oksidatif stres ve inflamatuvar sitokinlerle aktive olur. Doğal bir antioksidan olan BB içeren diyetle NF-κB düzeylerinde düşme gözlenmiştir. Bu da karaciğer hasarının düzeyini azaltır (122).

Blueberry'nin antioksidan etkileri iki mekanizma ile açıklanmaya çalışılmıştır. İlk mekanizma, BB yapısında bulunan polifenollerin, yabancı maddelerin atılımını sağlayan ve serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu hasarı önleyen detoksifikasyon enzimlerinin aktivitesini arttırmasıdır. Diğer etkisini ise Glutatyon-S-transferaz (GST), UDP- glukuronoziltransferaz (UGT), NADPH-kuinon redüktaz (QR) enzimleri gibi faz II enzimleri üzerinde gösterir. BB ile beslenen farelerde karaciğer GST aktivitesinin

kontrole göre arttığı bildirilmiştir. Kanser hücrelerinde yapılan çalışmalarda BB'nin QR aktivitesini arttırdığı, yine başka bir çalışmada diyetine BB katılan farelerin karaciğer GST aktivitelerinin arttığı, DNA hasarını ve lipit peroksidasyonunu azalttığı bildirilmiştir. Blueberry ile yapılan çalışmalar oksidatif stres ve faz II enzimleri ile sınırlıdır ve son yıllarda araştırmalar BB'nin farklı etki mekanizmaları üzerinde yoğunlaşmıştır (24,164,189).

2.5. KİTOSAN

Doğal bir polimer olan ve β -(1,4)-2-asetamid-2-deoksi-D-glukoz ve β -(1,4)-2-amino-2-deoksi-D-glukoz birimlerinden oluşan CS, yapısındaki amin grupları nedeniyle diğer doğal polimerlerden farklı olarak polikasyon davranışı göstermektedir (Şekil 2.9). Buna bağlı olarak da anyonlar ve DNA da dahil olmak üzere polianyonlarla kompleks oluşturabilmektedir. Antibakteriyel ve mukoyapışkan özellikleri nedeniyle hücre zarında bulunan proteinler ile etkileşime girip proteinleri reorganizasyona uğratarak hücre zarından madde Emilimini artırarak yara iyileşmesine yardımcı olur (236).

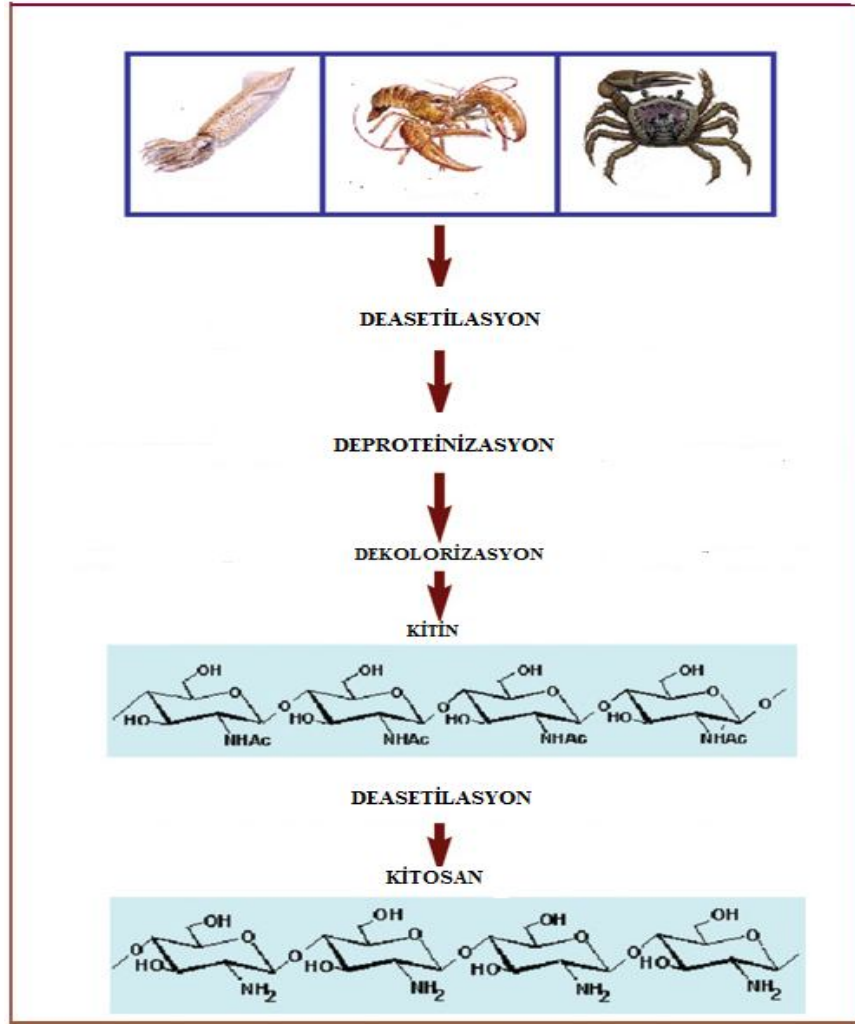


Şekil 2.9. Kitosanın Kimyasal Yapısı (219)

Kitosanın yapısındaki amino grupları, biyolojik ve fizikokimyasal özellikleri ile başta gıda, kozmetik, ziraat, tıp, kağıt ve tekstil olmak üzere birçok endüstri dalında kullanım alanı bulmuştur (236). Kitosanın yapısında bulunan 2. karbon atomuna bağlı amin grubu ile özellikle 3. karbon (C-3) üzerindeki hidroksil grubu, bakır (Cu^{2+}), kurşun (Pb^{2+}), krom (Cr^{3+} , Cr^{4+}), nikel (Ni^{2+}), Mn^{2+} , demir (Fe^{2+} , Fe^{3+}), vanadyum (V^{5+} , V^{4+}) ve civa (Hg^{2+}) gibi ağır metal iyonları ile kompleks yapmaktadır (83,209). Azot atomunun serbest elektron çifti ile metal iyonunun boş d-orbitalleri arasında etkileşim sonucu bir koordinasyon bağı oluşmaktadır. Metal iyonu bağlama mekanizması metal türüne, adsorban boyutlarına, çözeltinin pH'ı ve bileşimi ile sıcaklığa bağlı olarak çeşitlilik göstermektedir. Nötr çözeltilerde kompleks oluşturma mekanizması geçerli olabildiği gibi asitli çözeltilerde protonlanmış amin grupları ile çözeltiden iyon değiştirme veya elektrostatik etkileşim yoluyla metal iyonu adsorplanması da mümkündür. Genellikle bu mekanizmaların birkaçının bir arada etkili olduğu düşünülmektedir (80,116,166).

Kitosan, yengeç, karides, ıstakoz gibi eklembacaklıların kabuklarında, bazı bakteri ve mantarların hücre duvarlarında bulunan ve doğada yaygın olarak bulunan polimer olan kitinin deasetilasyonu ile elde edilen bir glikozamin polimerdir (Şekil 2.10). Glikozamin, CS'nin temel monomerik birimidir. İlk kez 1811 yılında Henri Bracannot, mantarlarda bulunan kitinin potasyum hidroksit içerisinde deasetilasyonunu sağlayarak asetil içeriği azaltılmış bir ürün olan CS'ı elde etmiştir (86,135).

Kitosanın antibakteriyel, antitümör, fungistatik özellikleri tanımlandığından beri biyomedikal alanda uygulamalara yoğunlaşmıştır. En önemli özelliği toksik olmamasıdır. Kitosanın yüksek yağlı diyetin indüklediği lipide miyi azaltarak hipolipidemik etki gösterdiğini açıklayan çalışmalar mevcuttur. Polikasyonik yapısı nedeniyle negatif yüklü lipidler ile etkileşime girerek emilimi engelleyerek etki gösterdiği düşünülmektedir ancak etki mekanizması ve etkinliği tam olarak kanıtlanmamıştır (133,175). Kitosan faz II detoksifikasyon enzimlerini arttırarak hücre içi GSH düzeylerini arttırmaktadır (229).

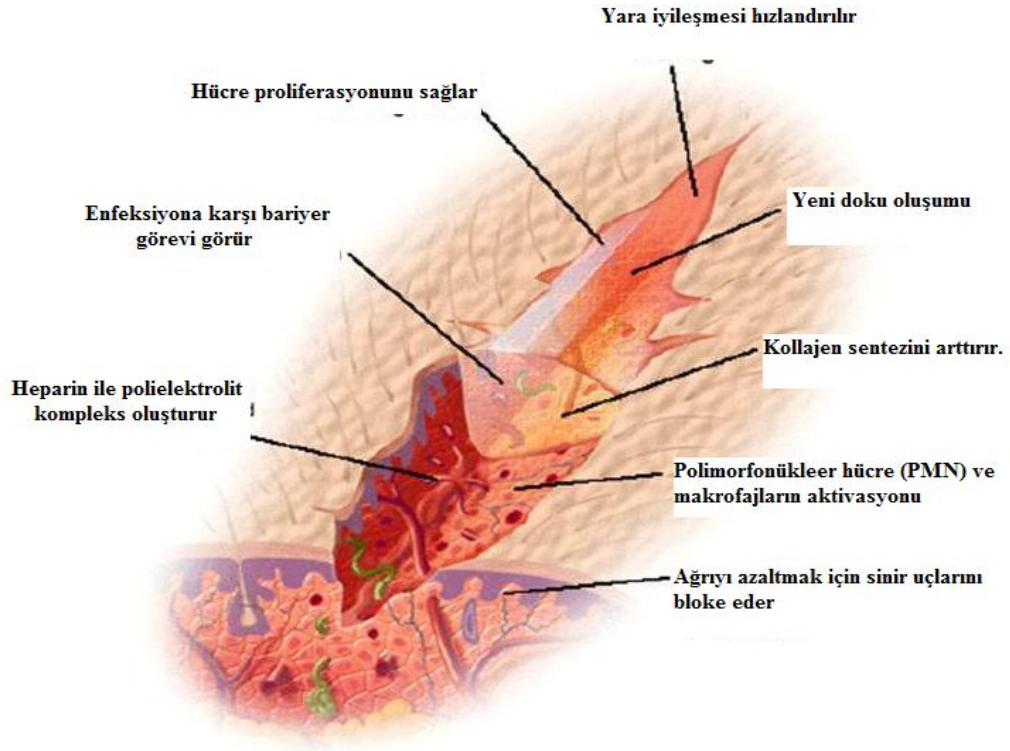


Şekil 2.10. Kitosanın Eldesi (219)

Eklembacaklıların kabuklarında, bakteri ve mantarların hücre duvarlarında bulunan kitinden 180°C de sodyum hidroksit ile deasetile edilerek, kitinin asetil içeriği azaltılır ve kitosan elde edilir.

Kitosan yara iyileşmesini hızlandırmada da oldukça etkin rol oynamaktadır. Başta diyabet hastaları olmak üzere vücuttaki yaraların iyileşme hızı hastalar için büyük önem taşımaktadır. Kitosan, uzun süreler yara iyileştirme özellikleri bakımından araştırılmış ve heparin ile polielektrolit kompleks oluşturma özelliği sayesinde yara tedavisine etkin rol oynadığı belirtilmiştir. Oluşan bu kompleks ve beraberinde hücre büyüme faktörünün de artmasıyla doku gelişimini desteklemektedir (42).

Polimorfonükleer hücre (PMN) ve makrofajların aktivasyonu, kollajen sentezinin stimülasyonu, sitokin üretimi ve fibroblast aktivasyonu gibi yara iyileşmesinde önemli olan mekanizmalardır. Kitosan bu aşamalarda önemli rol oynamaktadır (Şekil 2.11). Mikroorganizmalara karşı koruyucu etki gösteren CS, PMN migrasyonunda olumlu etkiler göstererek doku oluşumunu stimüle etmektedir (153,206). Hemostatik özelliğe sahip olan CS, eritrosit hücre membranı ile etkileşerek klasik pıhtılaşma mekanizmasından bağımsız bir yolakla etkisini gösterir (153,162).



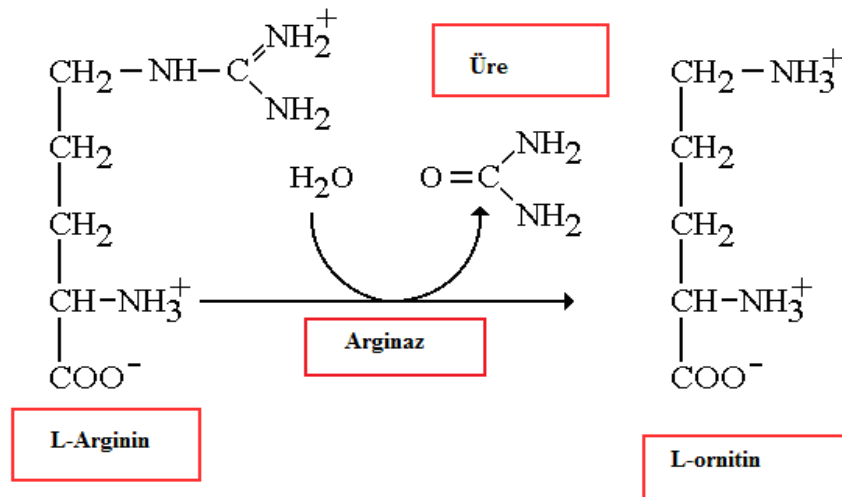
Şekil 2.11. Kitosanın yara iyileşmesi üzerindeki etkileri (153)

Son yıllarda CS'nin antioksidan etkisi üzerindeki araştırmalara yoğunlaşmıştır. Toksik özellikte olmayan CS'nin, çevre ve vücut üzerinde tamamen zararsız olmasından dolayı herhangi bir yan etkisi de bulunmamaktadır. Kitosanın polimer zincirlerindeki aktif hidroksil ve amino grupları ile oksidatif reaksiyonu katalizleyen metaller ile şelat oluşturarak antioksidan etki göstermektedir. Kitosanın deasetile yapılmaya derecesi ve

molekül ağırlığı serbest radikal tutucu etkilerini etkilemektedir. Kitosanın vücudun antioksidan savunma mekanizmasını güçlendirerek oksidatif hasarı ve lipid peroksidasyonunu inhibe ederek karaciğer hasarını engellemektedir (187,224).

2.6. ARGİNAZ

Arginaz (L-arginin amidinohidrolaz, EC 3.5.3.1.) enzimi nitrojen metabolizmasından sorumlu olan, üre döngüsünde görevli olan anahtar enzimdir. Arginaz aktivitesinin en yüksek olduğu organ karaciğerdir. Arginazın, sitozolik olan arginaz I ve mitokondriyal olan arginaz II olmak üzere iki izoenzimi vardır. Arginaz I izoenzimi büyük miktarda karaciğerde bulunan, amonyak detoksifikasyonundan sorumlu olan sitozolik bir enzimdir. L-argininden, L-ornitin ve üre sentezini katabolize eder (Şekil 2.12). Arginaz II izoenzimi, primer olarak ornitinden prolin, glutamat ve spermin, pütresin gibi poliaminlerin sentezinin öncüsüdür. Böbrek, beyin, ince barsak, meme dokusu ve makrofaj gibi ekstrahepatik dokularda bulunmakta ve mitokondriler içinde yerleşim göstermektedir (12,62).



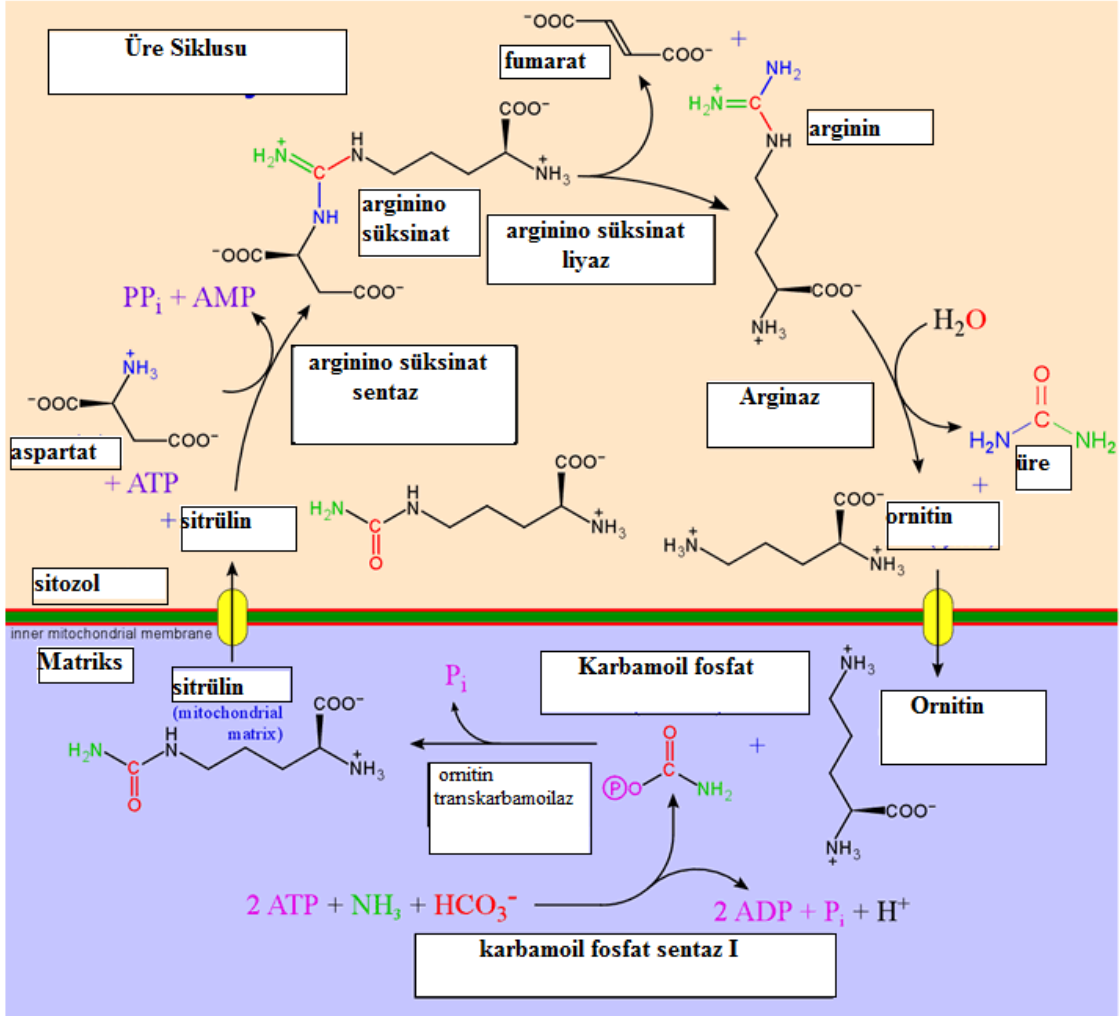
Şekil 2.12. Argininden ornitin ve üre oluşumu (12)

Arginaz II izoenzimi karaciğerde çok düşük düzeylerde bulunurken, arginaz I izoenzimi karaciğerde çok yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Farklı iki genden kodlanan arginaz I ve arginaz II izoenzimleri Mn^{+2} olan ihtiyaçları açısından farklılık göstermezken, hücre altı yerleşimleri, doku dağılımları, aktivitelerinin düzenlenmesi, immunolojik özellikleri ve ekspresyonları bakımından farklılık gösterir. Subüniteleri 35-40 kDa ağırlığında olan arginaz izoenzimleri yaklaşık olarak aynı büyüklükte dirler. Trimerik kuaterner yapı gösteren arginaz I ve arginaz II izoenzimleri kristal bir yapıya sahiptirler (61). Mn^{+2} çekirdeği katalitik aktivitede kritik rol oynar. Bir metalloenzim olan arginazın, aktif merkezinde iki tane Mn^{+2} çekirdeği bulunur. Mn^{+2} çekirdeği, arginazın tam katalitik aktivite göstermesi için önemlidir (19,61). Arginaz enzimi biyolojik sistemler için önemli metabolik yollarda kilit enzim olduğu için araştırmacıların ilgisini çekmektedir (12,79).

2.6.1. Arginaz Enzimi ve Üre Döngüsü

Toksik bir metabolit olan azotun karaciğerde enzimatik reaksiyonlarla üreye dönüştürülerek vücuttan atılması üre döngüsü (Şekil 2.13) olarak adlandırılır. Üre döngüsü karaciğer hücrelerinin mitokondri matrislerinde gerçekleşen mitokondri evresi ve sitozol evresi olmak üzere iki evreden oluşur. Mitokondri evresinde oksidatif deaminasyon sonucu amonyak oluşur. Amonyak karbomoil fosfat sentaz I enziminin yardımıyla karbomoil fosfat oluşturur. Ornitin transkarbomoilaz enziminin katalizlediği reaksiyonla karbomoil fosfat ve ornitin reaksiyona girerek sitriline çevrilir ve sitrulin sitoplazmaya taşınmasıyla mitokondri evresi sonlanır. Ornitin mitokondriye girişi ve sitrulinin mitokondriden çıkışı, mitokondri iç zarı taşıyıcı sistemleri kapsar (216).

Sitoplazma da sitrulin, aspartat amino asitinden azot alarak argininosüksinat sentaz enzimiyle reaksiyona girer ve arginosüksinat oluşur. Argininosüksinat liyaz enzimi tarafından katalizlenen reaksiyonla argininosüksinat, fumarat ve arginine parçalanır. Üre döngüsünün son tepkimesi karaciğer arginazı tarafından kataliz edilen argininin üre ve ornitin oluşturmak üzere parçalanmasıdır. Üre idrar yoluyla vücuttan atılırken, oluşan ornitin bir sonraki üre döngüsü için tekrar mitokondriye geçer (216).



Şekil 2.13. Üre Döngüsü (81)

2.6.2. Arginaz Enziminin Kinetik Özellikleri

Ökaryotik ve prokaryotik orjinli tüm arginazların özellikleri aynıdır. Fizyolojik aktivatörü Mn^{+2} olan arginazın Ni^{+2} , Co^{+2} , V^{+2} , Cd^{+2} ve Fe^{+2} gibi metal iyonlarında kofaktör olarak kullanılmaktadır. Maksimum aktivite gösterebilmek için metal iyonlarına ihtiyaç duyan arginaz, en yüksek aktiviteyi Mn^{+2} varlığında gösterir. Hg^{+2} ve Ag^{+2} gibi ağır metal iyonları enzimin aktivitesini azaltmaktadır. Arginaz enziminin aktivite gösterdiği pH aralığı 9.0-9.5'tur (12).

Metal iyonları varlığında aktiflenen arginaz enziminin ornitin ve lizin kompetitif inhibitör iken, valin, lösin, izolösin gibi dallı amino asitler unkompetitif inhibitörleridir. Arginaz enzimi katalizörlüğünde oluşan ürenin, ornitin gibi inhibitör etkisi yoktur. Karaciğerde yüksek miktarlarda bulunan arginaz I'in hem anyonik hem de katyonik formları tanımlanırken, böbrekte de arginaz II'nin katyonik ve anyonik formları belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda arginaz mekanizmasının biyokimyasal, enzimolojik ve yapısal özellikleri tanımlanmıştır (32).

Arginaz enzim mekanizmasında anahtar rol oynayan özellik, substrat özgüllüğüdür. Arginaz enzimi yan zincirinde bulunan aminoasit substrat özgüllüğünde rol oynar. Arginaz enziminin yan zincirinde guanidium grubunun olması, yan zincirin uygun uzunlukta olması ve hidrofobikliği substrat özgüllüğünde önemli rol oynar. Arginaz enzim aktivitesi için gerekli olan metal iyonları bu aktiviteyi hidroksil grubuna bağlanarak sağlar. Arginaz enziminin substratı olan guanidium, yapısında hidroksil iyonu içerir. Mn^{+2} guanidium üzerindeki hidroksil iyonunu aktive ederek arginaz enzim aktivasyonu sağlanır. Arginaz enziminin aktif bölgesinde bulunan aminoasit rezidüleri ya direkt olarak ya da Mn^{+2} üzerinde fonksiyon görerek kataliz için kritik rol oynamaktadır (32,33).

2.6.3. Arginaz Enziminin Klinik ve Biyokimyasal Önemi

Azot detoksifikasyonunda önemli olması, NOS aktivitesini indüklemesi, poliaminler, agmatin, prolin ve glutamat sentezi için arjininin kullanılabilirliğini düzenleme potansiyelinden dolayı düzenleyici enzim olarak arginaza olan ilgi artmaktadır.

Arginaz enzimi ve NOS yara iyileşmesi, inflamatuvar süreç, hücrelerde immün cevap regülasyonu, diyabet ve tümör biyolojisinde önemli rol oynamaktadır (15,63). Arginaz, hücrelerin büyümesi ve gelişmesi için önemli moleküller olan prolin ve poliaminlerin sentezi için ornitin sağlarlar (211). İmmun sistemde Arginaz I ve II'nin ekspresyonlarının artışı, immün sitokin cevabına yol açar. Arginaz I ve II'nin artışı, immün yetersizlik ile ilgili hastalıkların patofizyolojisinin anlaşılmasında önemli rol oynayabilir (15). Hipertansiyon, ateroskleroz, endotel disfonksiyon, diabet gibi

hastalıklarda arginaz aktivitesindeki up-regülasyonun NO sinyalinin bozulduğu hastalık süreçlerine katkıda bulunarak NOS aktivitesini etkiler (19).

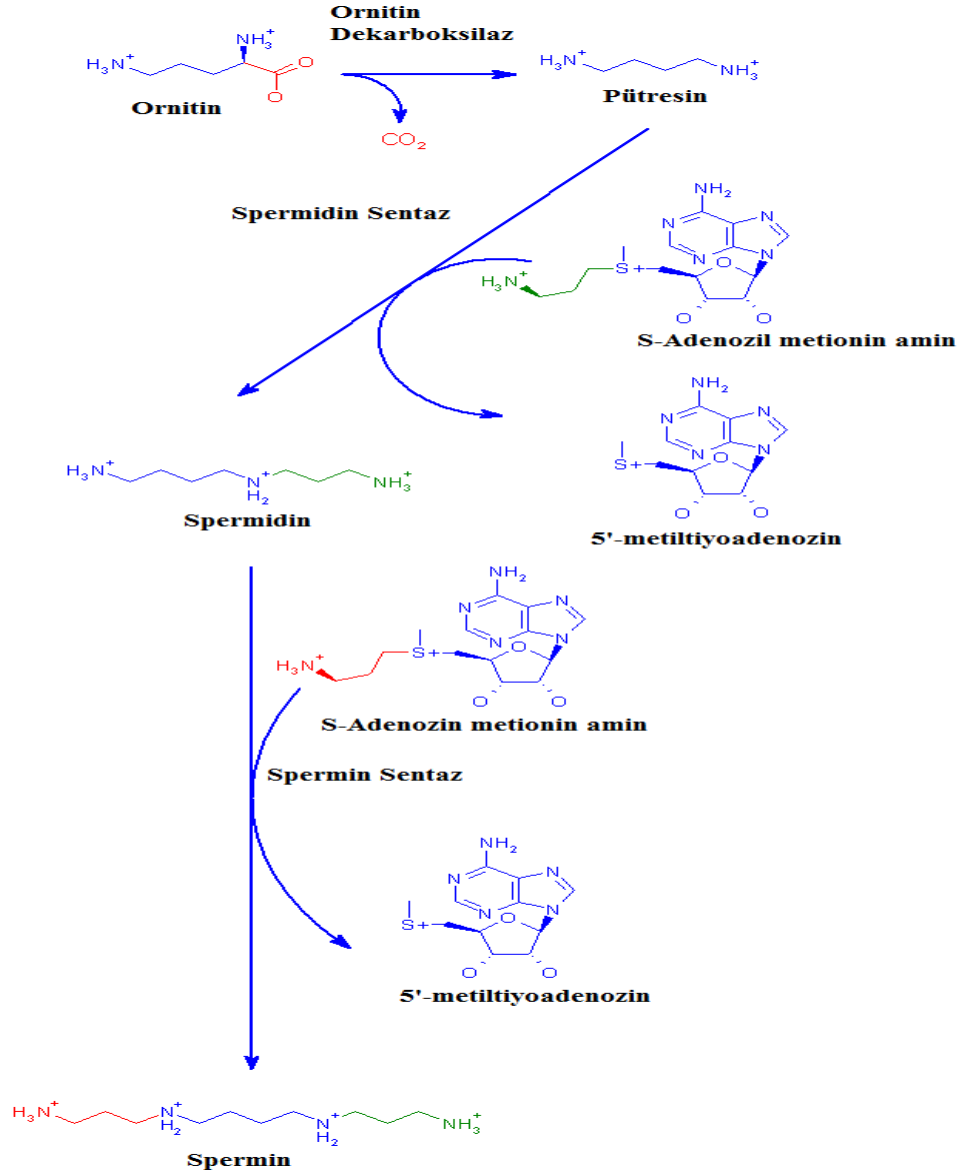
Arginaz enzimi, karaciğerde yüksek konsantrasyonlarda bulunan, karaciğere özgü bir enzimdir. Yapılan çalışmalar serum arginaz aktivitelerinin hepatoselüler hasarın belirlenmesinde güvenli ve önemli bir belirteç olabileceğini belirtmektedir (159). Ashamiss ve arkadaşlarının karaciğer nakli olan hastalar üzerinde yaptıkları bir çalışmada nakilden sonra serum arginaz enzim aktivitesinin karaciğer fonksiyonlarını belirlemede kesin ve önemli bir parametre olduğu belirtilmiştir (13). Hormonlar ve arginaz enzim aktiviteleri üzerinde yapılan çalışmalarda, kortikosteroidler, glukagon ve östrojen hormonlarının arginaz aktivitelerini indüklediği ve bu hormon seviyelerindeki değişimlerin enzim aktivitelerinde de değişim meydana getirdiğini belirtmektedir. Yine yapılan çalışmalarda kortikosteroidlerin karaciğer arginazını aktive ettiği, ancak hormonların böbrek arginazı üzerine bir etkisi olmadığı saptanmıştır (63,111).

Diyabet ve diyabetik retinopati üzerinde yapılan çalışmalarda arginaz II enzim aktivitesinin bu hastalıkların gelişiminde önemli rolünün olduğunu ve arginaz II enzim aktivitesinin inhibisyonunun terapötik amaçlı kullanılabileceği belirtilmiştir (139). Arginaz enzim aktivasyonunun NO sinyalizasyonu, kollajen sentezi, poliamin bağımlı vasküler düz kas proliferasyonunu kapsayan mekanizmalarla yaşa bağlı vasküler ve kardiyovasküler hastalıklarda önemli fonksiyonlara sahiptir (57,88). Araştırmacılar tarafından önemli bir şekilde araştırılan diğer bir konu da arginaz- kanser ilişkisidir. Çeşitli kanser türlerinde yapılan pek çok çalışmada arginazın kanserle yakından ilişkili olduğu ve serum ve doku arginaz aktivitelerinin kanserde arttığını belirtmektedir. Arginazın kanserin belirlenmesi ve takibi için önemli bir enzim olduğunu savunmaktadırlar (136,157).

2.7. ORNİTİN

Arginaz enziminin katalizlediği reaksiyonu sonucu oluşan ornitin, üre siklusunda yer alır. Ornitinden iki farklı enzim ile önemli ürünler oluşur. İlk reaksiyon

ornitin dekarboksilaz (ODC) enzimi tarafından katalizlenen reaksiyonla ornitinden pütresin, spermin ve spermidin gibi poliaminler sentezlenir (Şekil 2.14).

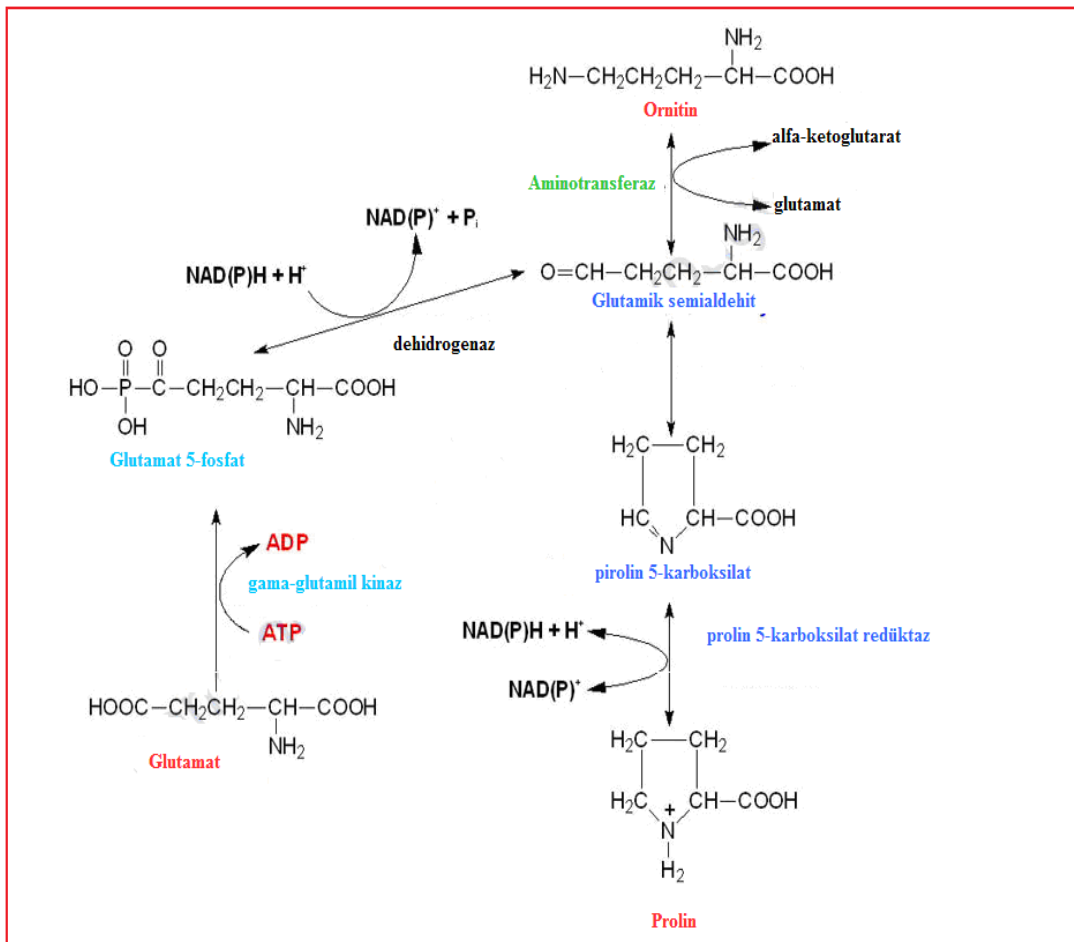


Şekil 2.14. Ornitinden poliaminlerin sentezi (218)

Poliamin biyosentezindeki ilk reaksiyon, ODC tarafından kataliz olunur. Ornitinden ODC aracılığı ile bir molekül CO₂ çıkması ile pütresin oluşur. Pütresin; spermidin sentaz ile spermidine, spermidin de spermin sentaz tarafından spermine

dönüştürülür ki bu esnada her iki reaksiyonda da dekarboksillenmiş S-adenozilmetyoninamin, 5'metiltiyoadenozine çevrilir (142). Poliaminler, DNA ve RNA sentezi ile DNA'nın stabilizasyonunda uyarıcı etki gösterirler. Çeşitli kanser türleri üzerinde yapılan çalışmalarda hücre içi poliamin sentezinin arttığı belirtilmiştir. Hücre büyümesi için gerekli olan pütresin, spermidin ve spermin, transkripsiyon, translasyon ve protein sentezinin başlamasında fonksiyon gören alifatik poliaminlerdir (15,19,63).

Ornitinin yer aldığı diğer bir reaksiyon da, ornitin aminotransferaz (OAT) enziminin katalizlediği reaksiyonla glutamat ve prolin sentezidir (Şekil 2.15).



Şekil 2.15. Ornitinden prolin ve glutamat sentezi (222)

Prolin biyosentezindeki ilk reaksiyon, OAT tarafından kataliz olunur. Ornitin; OAT aracılığı ile glutamik semialdehite, glutamik semialdehit de prolin 5-karboksilata dönüştürülür. Prolin 5-karboksilattan, prolin 5-karboksilat redüktaz enziminin katalizlediği reaksiyonla prolin oluşur. Prolin, kollajen ve kazein gibi bazı önemli proteinlerin yapısına katılır. Ornitinden oluşan diğer önemli bir ürün de amonyum iyonu transportu ve enerji metabolizmasında fonksiyon gören glutamattır. Glutamat, aminotransfeaz ve dehidrogenaz enzimlerinin katalizlediği reaksiyonlarla ornitinden oluşur (15,142).

Ornitin, aşırı azot üretiminin engellenmesi için üre döngüsünün merkezi bir parçasıdır ve bir çeşit geri dönüşümlü katalizördür. Protein yapısına katılmayan bir amino asit olan ornitin, akut inflamasyona cevap olarak ve hücre proliferasyonunu sağlamak üzere poliaminlere dönüşür. Tüm memeli hücrelerinde bulunan poliamin düzeyleri, hücre proliferasyonunun arttığı fizyolojik ve patolojik durumlarda artar (15,61).

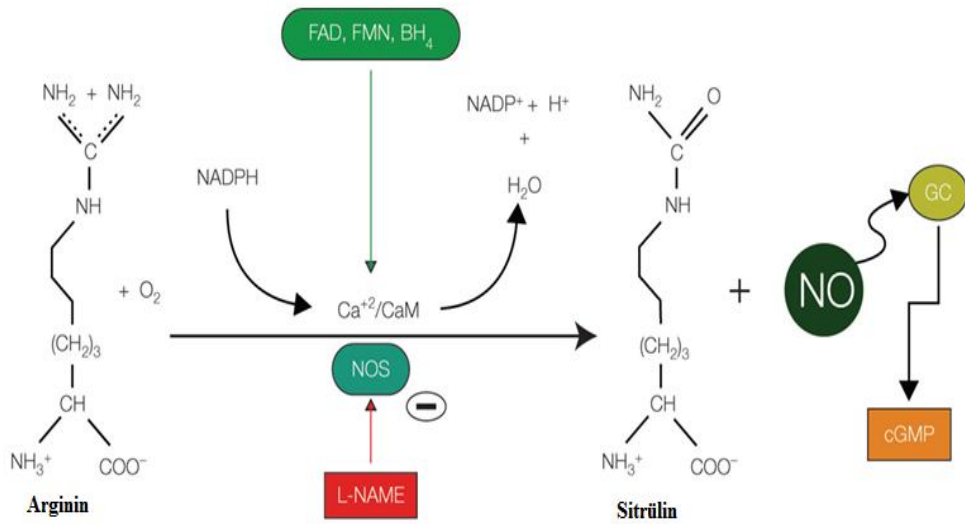
2.8. NİTRİK OKSİT

Nitrik oksit, biyolojik membranlardan kolayca difüze olabilen hem otokrin hem de parakrin özellikte benzersiz haberci moleküldür. Nitrik oksit, antitrombotik, antiproliferatif ve antioksidan özellikte biyolojik bir moleküldür. Oda ısısında ve basıncında renksiz bir gaz olan NO, yüksek konsantrasyonlarda oksijensiz ortamda suda erime gösterirken, düşük konsantrasyonlarda oksijen varlığında bile stabildir (98).

Nitrik oksit aktivitesi büyük oranda membran permeabilitesi ve difüzyonu ile oluşur. Difüzyon kapasitesi herhangi bir biyolojik molekülden daha yüksektir ve taşıdığı eşleşmemiş elektron sebebiyle serbest radikal özelliği gösterir. Özellikle serbest radikallerle ve hem demiri gibi metallerle de reaksiyona girer. Nitrik oksit, diğer moleküllere yüksek reaksiyon hızına sahiptir ve oksijen ve süperoksitle tepkime vermesinden ötürü yarı ömrü kısadır (52,106).

2.8.1. Nitrik Oksit Sentezi ve Fonksiyonları

Nitrik oksit, sitozolik bir enzim olan NOS enziminin katalizlediği reaksiyonla fizyolojik pH'da bazik bir amino asit olan L- argininden oluşur (Şekil 2.16). Bu mekanizmada arginin substrat, NO ve sitrülün ürünlerdir. Nitrik oksit sentaz çok kompleks bir enzimdir ve FAD, FMN, NADPH, BH₄ ve hem olmak üzere beş tane redoks kofaktörü kullanır. Nitrik oksit sentaz, plazma membranı, sitoplazma, nükleus, endoplazmik retikulum ve mitokondri hücrelerinde bulunabilir (66,98).



Şekil 2.16. Nitrik Oksit Sentezi (66)

NADPH; Nikotinamid adenin dinükleotid, BH₄; fosfat tetrahidrobiopterin, FMN ; flavin mononükleotid

FAD; flavin adenin dinükleotid, L-NAME; N-omega-nitro-L-arginin metil ester,

Ca²⁺/CaM; Kalsiyum/kalmodulin, cGMP; siklik guanozin monofosfat, GC;guanilat siklaz

Nitrik oksitin oksijen ve azot atomları iki farklı kaynaktan gelir. Azotu L-argininin guanidino azot atomlarından, oksijeni ise moleküler oksijenden gelmektedir. İki reaksiyonla gerçekleşen NO sentezinde ara ürün L-argininden NOS enziminin katalizlediği reaksiyonla oluşan hidroksiarginindir. İkinci reaksiyonda hidroksiarginin oksidasyona uğrar ve L-sitrülin ve NO olmak üzere iki ürün oluşur. NO'nin diğer bir oluşum mekanizmasında gliseril trinitrat gibi vazodilatörlerin metabolizması sırasında nitritten oluşmasıdır. NO 3-5 saniye gibi çok kısa bir yarı ömre sahip olduğu için hızla nitrit (NO₂) ve nitrata (NO₃) okside olur (27,98).

Nitrik oksit sentaz enziminin üç izoformu vardır. İlk olarak tanımlanan Tip 1 NOS, nöronal dokularda bulunduğu için nNOS olarak adlandırılır. Tip 2 NOS, makrofaj ve hepatositlerde bulunduğu ve ciddi koşullarda indüklenebilir olduğu için iNOS olarak tanımlanmıştır. Son olarak tanımlanan endotelial NOS (eNOS) veya Tip 3 NOS'dır. NOS'ın bu üç izoformu da 3 farklı gen kodlanır. eNOS, plazma membranında ve sitoplazmada primer olarak lokalize olurken, iNOS sadece sitoplazmada bulunur. nNOS hem mitokondri hem de sitoplazmada lokalize olmuştur. eNOS ve nNOS kalsiyum bağımlı iken, iNOS kalsiyumdan bağımsızdır. Normal koşullar altında çeşitli hücre ve dokularda eNOS ve nNOS düşük seviyelerde eksprese olur. Ca⁺² bağımlı eNOS ve nNOS etkisiyle, sürekli ve az miktarda NO sentezlenir. Normal koşullar altında eksprese olmayan iNOS, ciddi immunolojik stimülasyon sonucu yüksek düzeylerde eksprese edilir. NOS izoformlarının hepsi transkripsiyon ve translasyon mekanizmalarına bağlı ciddi uyaranlar altında indüklenir (4,27).

Nitrik oksit, vasküler ton, kan akışı, nörotransmisyon, sinyal transdüksiyonu, anti-mikrobyial savunma, hücrel redoks durumu ve hepatoselüler apoptozis olmak üzere çok geniş biyolojik aktivitede rol alır. Vazodilatör olarak tanımlanan NO, vasküler işlevlerin kontrolünde büyük öneme sahiptir ve vasküler hastalıkların başlangıcında, gelişiminde rol oynar. Nitrik oksit, cGMP sentezini artırarak trombosit agregasyon inhibitörü olarak davranır (25,28).

Nitrik oksit, nörojenik inflamatuvar reaksiyonlarda da önemli bir moleküldür ve migrenin patogeneğinde de yer aldığı belirtilmiştir. Nitrik oksit, ağrı iletimi için gerekli olan nörotransmisyonunda aracılık eder (25,235). Nitrik oksitin antitümör fonksiyonları tanımlanmıştır ve bu fonksiyonu apoptotik mekanizmalarla açıklanmaya çalışılmıştır. NO, mitokondrial Fe-S komplekslerini inhibe eder aynı zamanda sitrik asit döngüsü enzimlerinden Fe-S kümelerini içeren cis-akonitaz enzimini inhibe eder. Nitrik oksit metabolitleri olan nitrit, nitrat, nitrozamin, peroksinitrit, DNA hasarı, protein fonksiyon bozuklukları, nekrozis ve apoptozis gibi birçok biyolojik olarak önemli mekanizmada önemli role sahiptirler (67,110).

Karaciğer, endojen hormon metabolizmasında, ksenobiyotik detoksifikasyonunda ve immün proseslerde önemli rol oynayan ve çeşitli hastalıklarda NO tarafından etkilenen major organdır. Nitrik oksit, hepatik hücre sinyalizasyonunda hem inhibitör, hem de antagonist olarak rol oynar. Benzer şekilde pro ve anti-oksidan olarak fonksiyon görür ve karaciğerde apoptozisi hem indükleyebilir veya inhibe edebilir. Araştırmalarda endojen NO üretiminin hepatotoksikiteden sorumlu olduğu, NO sentezinin inhibisyonun hem zararlı hem de yararlı etkilerinin olabileceği vurgulanmıştır (125).

Nitrik oksit, insüline duyarlı dokularda glukoz düzeylerini ve yağ asidi oksidasyonunu düzenlemektedir. Karaciğer ve adipoz dokuda glukoz ve glikojen sektezini inhibe ederken, adipositlerde lipolizi geliştirir. NO'in hepatik glukoneogenezinin düzenlenmesinde rol aldığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Araştırmalarda glukozdan glikojen eldesinin NO ile inhibisyona uğraması glikojen sentaz aktivitesinin azalmasına bağlanmıştır. Nitrik oksitin, hepatositlerde glikolizi azaltması, glikolizin anahtar enzimlerinden olan glukokinaz ve gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz enzim aktivitesinin azalmasıyla ilişkilendirilmiştir. Rat hepatositlerinde yapılan bir çalışmada NO'in laktatın pirüvata dönüşümünü inhibe ettiği ve bu inhibisyonunu fosfoenolpirüvat karboksikinaz enzim aktivitesinin inhibisyonu ile gerçekleştiği belirtilmiştir. Nitrik oksit, akciğerde fizyolojik bir haberci olarak görev yapabilir. Azalmış NO salınımı, hipoksik pulmoner, vazokonstrüksiyon ve pulmoner hipertansiyonda önemlidir (52,98).

2.9. SİALİK ASİTLER

Sialik asitler, 70 yıl önce araştırmacılar tarafından beyin glikolipidleri ve tükürük musinlerinin zayıf asidik ortamda hidrolizinden salgılanan major bir ürün olarak keşfedildi. Yaygın olarak doğada memelilerde bulunan sialik asit, bazı patojenik bakterilerde, virüsler ve böceklerde de bulunur. Sialik asitin yapısı, kimyası ve biyosentezi ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır (197).

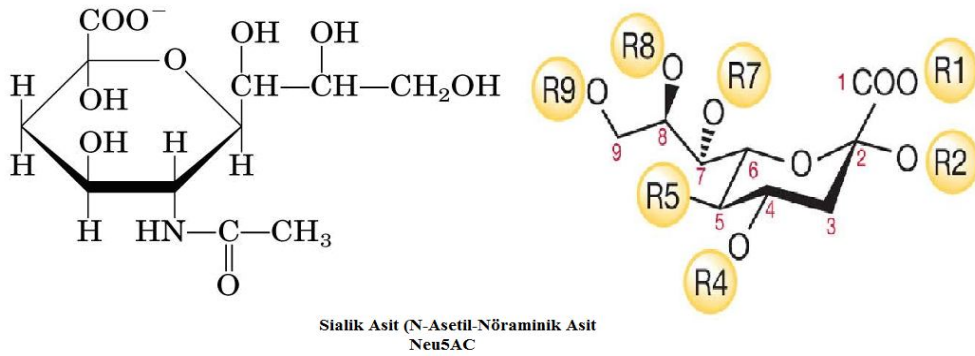
Sialik asit biyolojik membranların önemli yapısal bileşenleridir. Serum, plazma, süt, safra sıvısı, sinoviyal sıvı, ter, mide suyu ve idrar, tükürük gibi vücut sıvılarında bulunan sialik asit, eritrosit, lökosit, trombosit gibi kan hücrelerinde de bulunur. Fibrinojen, haptoglobulin, seruloplazmin, transferrin ve α -1-antitripsin gibi proteinlerin yapısında yer almaktadırlar (145).

Serum ve dokularda bulunan glikolipid ve glikoproteinlerin terminal oligosakkarit zincirlerinin önemli bir komponenti olan sialik asitler kompleks karbohidratların oluşumuna çok fazla yapısal farklılık katarak katkıda bulunurlar. Önemli pozisyonlardaki sialik asitler genelde bu moleküllerin dışında ve ucunda yer alırlar (178). İnsan serumu ve vücut sıvılarında sialik asitler %85-90 oranında proteinlere, %10-15 oranında lipit moleküllerine bağlı halde bulunurlar. Protein (PSA) ve lipide bağlı sialik asit (LSA) fraksiyonları total sialik asiti (TSA) oluşturmaktadır (145).

2.9.1. Sialik Asitin Yapısı

Asidik yapıya sahip olan sialik asidin 5. karbon atomunda bir amino grubu, 1. karbon atomunda karboksil grubu bulunur (Şekil 2.17). Yapısındaki karboksil grubu sialik aside negatif yük verir. Sialik asit glikoprotein ve glikolipidlerin karbohidrat zincirlerinin indirgenmemiş uçlarına bir α -glikozidik bağ ile bağlanmıştır. Sialik asit'in 50'den fazla türevidir (31).

Sialik asit, yapısındaki 4, 7, 8 ve 9 no'lu karbon atomlarındaki asetatlar, sülfatlar, fosfatlar ve metil esterleriyle hidroksillenmiş gruplar içerir. Sialik asit omurgasındaki bu grupların yer değiştirmesi sonucu meydana gelen modifikasyonlar sonucu sialik asit türevleri oluşur (31,143).



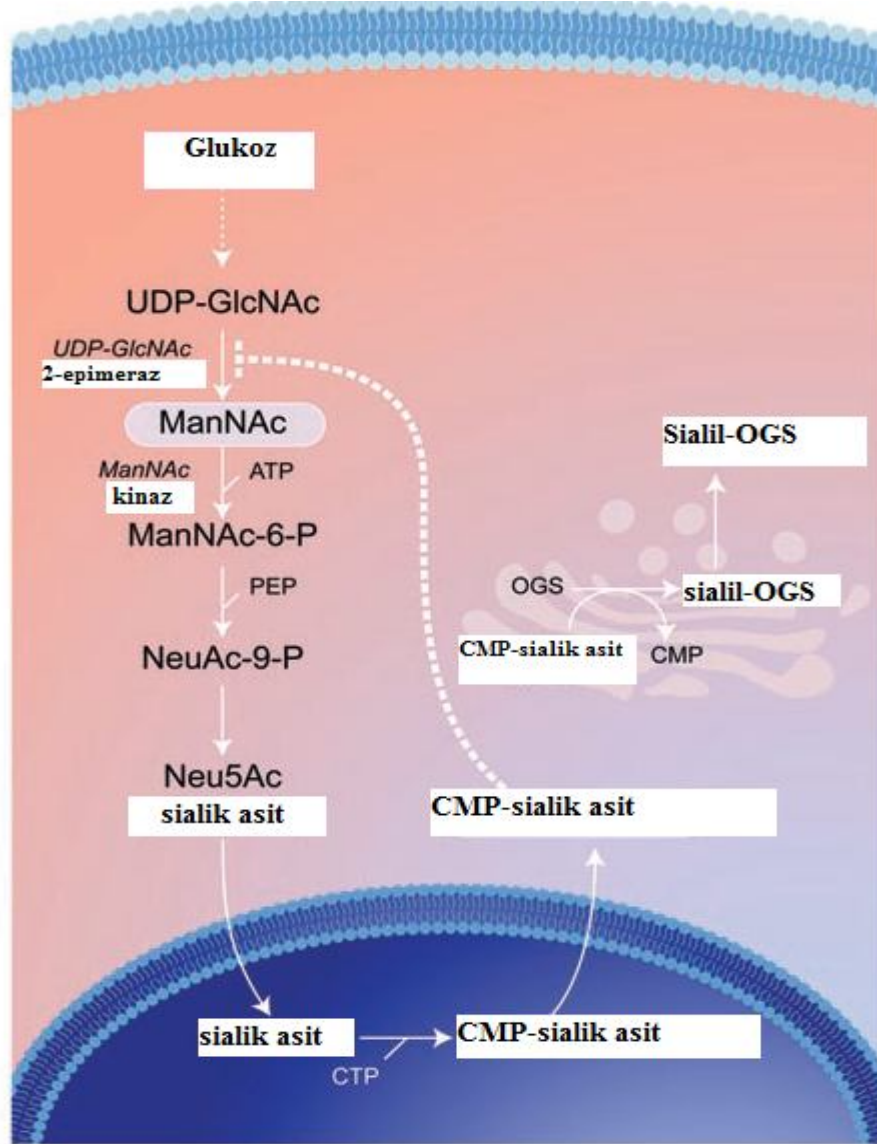
Şekil 2.17. Sialik asitin yapısı (143,208)

2.9.2. Sialik Asitin Biyosentezi

Sialik asitin biyosentezi sitozolik glukoz ile başlar (Şekil 2.18). Hekzokinaz enziminin katalizlediği reaksiyonla glukozdan, glukoz-6-fosfat oluşur ve glukoz-6-fosfattan fosfohekzoizomeraz enziminin katalizlediği reaksiyonla fruktoz-6-fosfat oluşur. Fruktoz-6-fosfat, fruktoz-6-fosfat aminotransferaz enziminin katalizlediği reaksiyonla glutaminden amino grubu alarak glikozamin-6-fosfat oluşur. Asetilaz enziminin katalizlediği reaksiyonla, glukozamin-6-fosfat asetil-CoA ile asetillenerek N-asetil glukozamin-6-fosfatı oluşur (68).

N-asetil-glukozamin-6-fosfatın iki ürünü vardır. Bunlardan biri mutaz enziminin katalizlediği reaksiyonla oluşan N-asetil glukozamin-1-fosfat, diğeri ise epimeraz enziminin katalizlediği reaksiyonla oluşan N-asetilmannozamin-6-fosfat'tır. N-asetilglukozamin-1-fosfat, üridin difosfat (UDP)-N-asetilglukozamin fosforilaz enzimi tarafından katalizlenen reaksiyonla UDP-N-asetilglukozamine (UDP-Glc-NAc) çevrilir.

Bu reaksiyon basamağı üridin trifosfat varlığında gerçekleşir (UTP). UDP-Glc-NAc, sialik asit biyosentezinde önemli hız kısıtlayıcı basamaktır. UDP-Glc-NAc enziminin epimerizasyonu gerçekleşir (55,182,203).



Şekil 2.18. Sialik Asit Biyosentezi (68)

UDP-N-asetilglukozamin; (UDP-Glc-NAc), N-asetilmannozamin; (ManNAc), N-asetilmannozamin-6-fosfat; (ManNAc-6-P), N-asetil nöraminik asit-9-fosfat; (NeuAc-9-P), Sitidin monofosfat; (CMP), oligosakkarit (OGS)

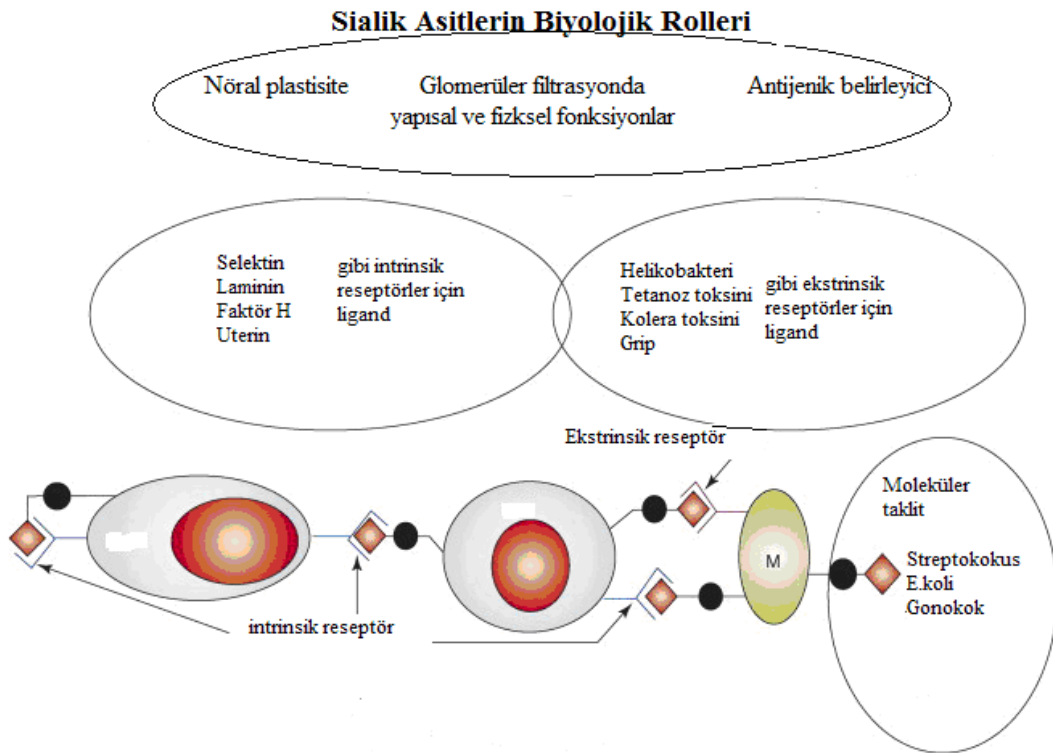
N-asetilglukozamin-6-fosfattan oluşan N-asetilmannozaminin (ManNAc) fosforillenmesiyle N-asetilmannozamin-6-fosfat (ManNAc-6-P) oluşur. ManNAc-6-P, fosfoenol pirüvat ile reaksiyona girerek N-asetil nöraminik asit-9-fosfat (NeuAc-9-P) oluşur. Reaksiyonu sialik asit fosfataz enzimi katalizler. NeuAc-9-P'nin hidroliziyle sialik asit oluşur. Sialik asit nükleus da sitidin trifosfat (CTP) ile aktiflenerek sitidin monofosfat- sialik asit (CMP-sialik asit) meydana gelir. CMP-sialik asit, golgi kompleksinde sialo-oligosakkaritlerin biyosentezinde substrat olarak kullanılır. CMP-sialik asit, sialik biyosentezinde biyosentezinde feedback inhibisyona sahiptir ve bu yolla intraselüler sialik asit düzeylerini kontrol eder (55,68,182).

2.9.3. Sialik Asitin Fonksiyonları

Sialik asitin yapısal çeşitliliği biyolojik fonksiyonlarına yansır. Bu şeker, büyüklüğü ve hidrofilik karakteri nedeniyle çevre üzerinde negatif fizikokimyasal etkiler oluşturabilir. Negatif yükü ve hidrofilik özelliği ile nöral plastisite ve glomerüler filtrasyon'da önemli roller üstlenir. Temel işlevi hücreler ve moleküler olaylarla ilgilidir ve hücreler ve moleküller arasındaki elektrostatik çekim süreçlerinde rol alırlar. Sialik asit kan grubu bileşenlerinde antijenik belirleyicidir. Hormon ve sitokinler gibi birçok endojen maddenin reseptörleri için gerekli bir bileşendir. Bunlara ilaveten çok sayıda toksin, bakteri ve virüs gibi patojenlerin hücreleri sialik asit içeren reseptörlere bağlanır. Sialik asit intrinsik reseptörler için ligand görevi görür. Sialik asitler kendilerini yararlı mikrobiyal patojenler gibi süsleyerek konak hücrede moleküler taklitçiler olarak görev yaparlar (Şekil 2.19) (203,207).

Sialik asitin önemli bir görevi eritrositlerin yaşam sürelerinin düzenlemesidir. Sialik asit düzeylerindeki bir azalma kırmızı kan hücrelerinin hızlı ve geri dönüşümsüz bir şekilde dolaşımdan temizlenmesine neden olur. Sialik asit hücre membranlarının ve glikoproteinlerinin yapısının stabilizasyonuna katılır. Sialik asit karboksil grubundan gelen negatif yükü sayesinde hücre ve moleküller arasında etkileşimde rol oynar (208).

Kanser üzerinde yapılan birçok çalışmada sialik asit düzeylerinin yükseldiği ve serum TSA düzeylerinin takibinin tümörün evresi ve prognozunda önemli olduğu belirtilmiştir. Serum TSA ve LSA düzeylerinin kanser çeşitlerinde önemli markır olabileceği vurgulanmıştır (58,208). Glikoproteinlere ve glikolipitlere bağlı olarak bulunan sialik asitlerin, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve renal hastalıklarla ilişkili olduğu düşünülmektedir (48,141).



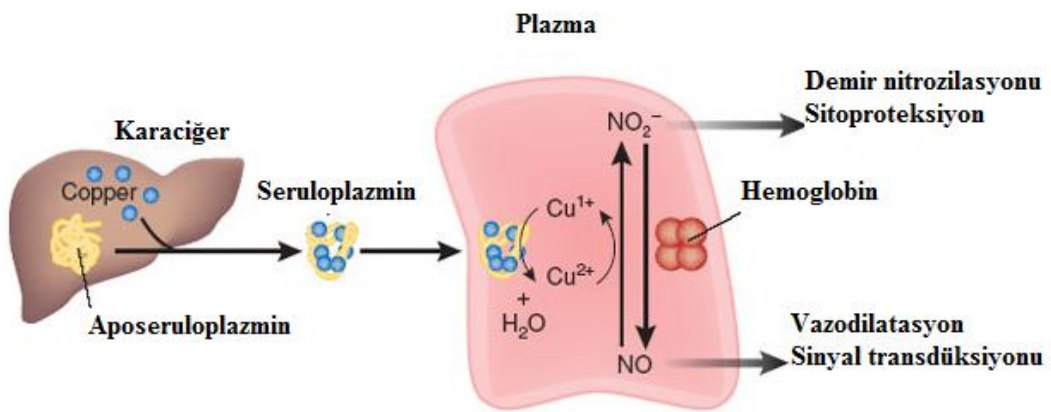
Şekil 2.19. Sialik Asitin Biyolojik Fonksiyonları (207)

Nöral plastisite ve glomerüler filtrasyon da önemli yapısal ve fiziksel fonksiyonlara sahiptir. Antijenik belirleyici olarak da fonksiyon gören sialik asitler; selektin, laminin, faktör H ve uterin gibi intrinsik reseptörler için ligand, helikobakteri, tetanoz ve kolera toksini ve grip gibi ekstrinsik reseptörler için ligand görevi görür.

2.10. SERULOPLAZMİN

Seruloplazmin, 132 kDa ağırlığında, yüksek bakır içeriği nedeniyle mavi renkte olan bir α_2 -globülinidir ve plazmadaki bakırın % 95'ini taşır. Seruloplazmin, başta karaciğerde sentezlenen, beyin, akciğer, testis, monosit, astrosit ve sertoli hücrelerinde de eksprese edilen akut faz proteinidir. Seruloplazmin molekülünde 6 bakır atomu bulunur ve yapısının % 7'si karbonhidrat olan bir glikoproteindir. Yapısındaki karbonhidrat içeriğini sialik asit oluşturur (158,163).

Seruloplazmin, mavi diye adlandırılan çoklu-bakır oksidaz enzim sisteminin üyesidir. Bu enzim sistemi yapılarında bakır bağlama bölgelerine göre tip 1, tip2 ve tip3 olmak üzere gruplara ayrılır. Seruloplazmin, tip 1 bakır ailesindedir. Bu grupta bakır atomları, tetrahedral olarak bulunan histidin, sistein ve metiyonin rezidülerine bağlı bulunur. Seruloplazmin, karaciğerde aposeruloplazmin (Şekil 2.12) olarak sentezlenerek golgi'ye geçer. Golgi organeli, seruloplazminin bakır atomu bağladığı bölgedir. Yapısına bakır bağlayan seruloplazmin, holoseruloplazmin olarak plazmaya salınır (65,115,173).



Şekil 2.20. Seruloplazmin Biyosentezi (173)

2.10.1. Seruloplazminin Fonksiyonları ve Klinik Önemi

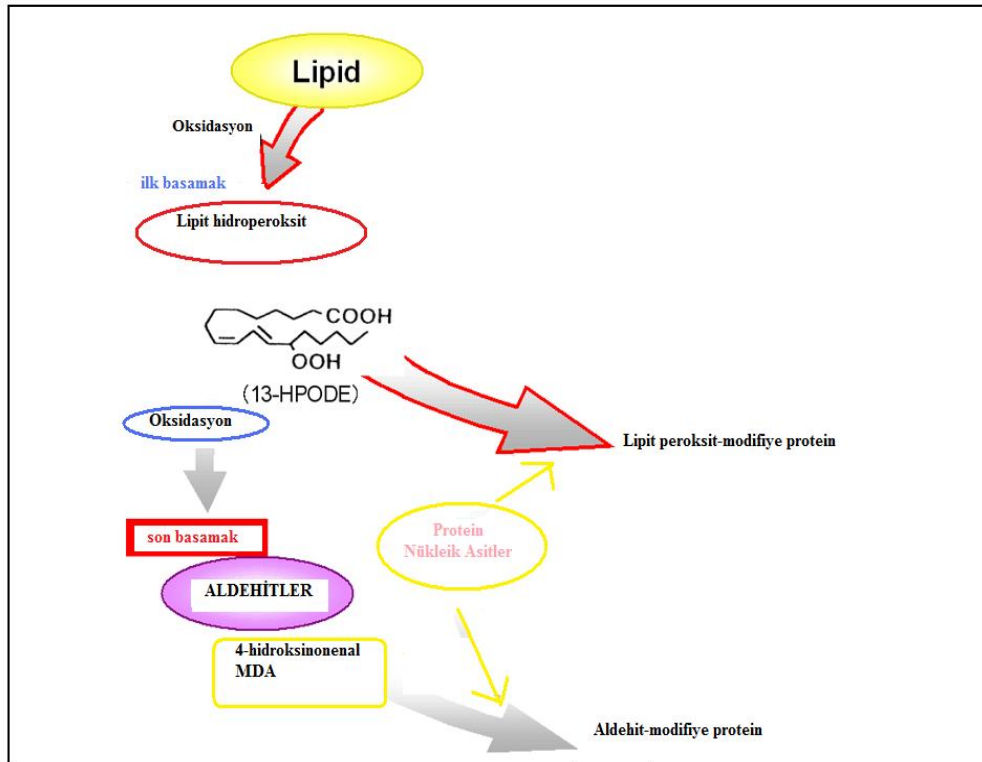
Seruloplazmin, bakırı karaciğerden diğer dokulara taşır. Seruloplazmin, bakıra bağımlı oksidaz aktivitesi gösterir ve ferroksidaz aktivitesiyle ferröz demirin (Fe^{2+}) ferrik demire (Fe^{3+}) oksidasyonunu katalizleyerek demirin transport proteini olan transferin ve depo proteini olan ferritine yüklenmesini kolaylaştırır (173).

Seruloplazmin, serbest oksijen radikallerinin oluşumunu ve lipid peroksidasyonunu engelleyerek, dokularda ve plazmada bulunan serbest radikallerin zararlarını engellemektedir. Epinefrin, norepinefrin ve dopaminin oksidasyonunda fonksiyon görerek nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde rol oynar (210). Seruloplazmin akut faz proteinidir ve organizmada antioksidan olarak da görev yapar. Damar tonusunun düzenlenmesinde etkili olan seruloplazmin eNOS fonksiyonu üzerinde etki gösterir (212). Bu fonksiyonlarına ek olarak koagülasyon, anjiogenez, biogenik aminlerin inaktivasyonu, oksidatif strese karşı koruyucu ve aynı zamanda süperoksit ve diğer reaktif oksijen türlerini uzaklaştırır (9,64).

Seruloplazmin, ferroksidaz aktivitesine sahip olduğu için demir metabolizmasında çok önemlidir. Seruloplazmin geninde meydana gelen bir mutasyon demir metabolizmasını ciddi olarak etiler. Demir ve bakır metabolizmasında meydana gelen hasarların nörodejeneratif hastalıkların moleküler mekanizmalarıyla ilgili olduğu belirtilmiştir (7). Ateroskleroz, miyokard infarktüsü, inflamasyon, gebelik, östrojen kullanımı gibi durumlarda seruloplazmin düzeyleri yüksek iken, erken çocukluk döneminde belirtilerini gösteren ilerleyici nörodejeneratif bir hastalık olan menkes hastalığı ve otozomal resesif bir hastalık olan wilson hastalığı, karaciğer yetersizliği ve malnütrisyon gibi protein sentez bozuklukları, nefrotik sendrom ve diyabetli hastalarda plazma seruloplazmin düzeylerinin önemli düzeyde düşük olduğu bildirilmiştir (137,186).

2.11. LİPİT PEROKSİDASYONU

Serbest oksijen gruplarının biyolojik sistemlerdeki en önemli etkileri lipitler üzerine olan lipit peroksidasyonudur. Lipit peroksidasyonu, hücrelerdeki zar fosfolipidlerinin yükseltgenerek peroksit türevlerine dönüşmesi olayı şeklinde tanımlanır. Fizyolojik şartlar altında düşük hızda gerçekleşen lipit peroksidasyonunun oksidanlar ve oksidatif stres ile oluşum hızı artabilmektedir. Lipit peroksidasyonu membran lipit tabakasının fizyolojik yapısını değiştirerek hücrel işlev kaybına neden olabilmektedir. Peroksidasyon başlangıç, ilerleme ve sonlanma olmak üzere üç evrede gerçekleşmektedir (Şekil 2.21).



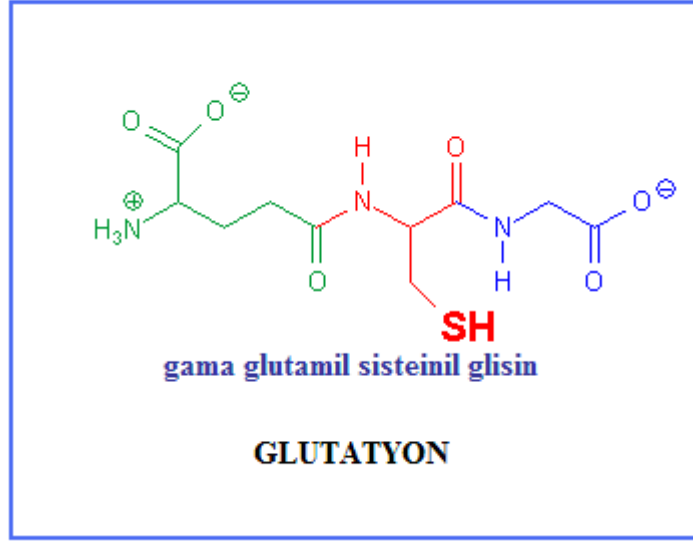
Şekil 2.21. Lipit peroksidasyonu (220)

Lipit peroksidasyon olayının zincir aşamasında ortaya çıkan lipid hidroperoksitler son derece dayanıksız ürünlerdir; özellikle zincirde açılmalar şeklinde yapısal bozulmalara uğrayarak, aldehidler, ketonlar, alkanlar, alkenler, karboksilik asitler ve polimerizasyon ürünler gibi çeşitli metabolik şekillere dönüşürler. Bu olaylar sonucunda ortaya çıkan 4-hidroksinonenal (4-HNE), malondialdehit (MDA), akrolein, glikoksal gibi oldukça toksik aldehit yapıda olan ürünler peroksidasyonunu şiddetini belirleyen maddelerdir. Peroksidasyon sonucu meydana gelen ürünlerden özellikle MDA ve 4-HNE mutajenik etki göstermektedir. Malondialdehid özellikle üç veya daha fazla çift bağlı yağ asitlerinin yıkımlanması ile meydana gelen bir üründür. Malondialdehit, lipit peroksidasyonunun derecesi ile korelasyon göstermektedir. Bu nedenle biyolojik materyalde MDA ölçülmesi lipit peroksit seviyelerinin indikatörü olarak kullanılır (190,232).

2.12. GLUTATYON

Glutatyon (γ -glutamil sisteinil glisin), antioksidan, antitoksin ve enzim kofaktörüdür. Glutatyon, glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptiddir (Şekil 2.21) ve bazı dokularda milimolar konsantrasyonlarda bulunan güçlü bir antioksidandır. Glutatyon çeşitli elektrofilik bileşenleri ve peroksidazlarla detoksifikasyonda rol oynar. Memeliler, bitkiler, mantarlar ve bazı prokaryotik organizmalarda GSH'un önemi açıktır. Glutatyon, detoksifikasyona ek olarak DNA ve RNA'nın redüksiyonu, protein ve gen ekspresyonu reaksiyonlarını da içine alan hücrel reaksiyonlarda da görev alır.

Glutatyon, GPx tarafından katalizlenen reaksiyonla potansiyel olarak toksik olan hidrojen peroksidin bozunmasına katılır. Glutatyon güçlü bir indirgeyicidir ve enzimlerin sülfidril gruplarının indirgenmiş halde tutulmasına yardım eder. GSH'un okside ve redükte olmak üzere iki formu vardır. Hücrelerdeki GSH/GSSG oranı hücrelerin hayatta kalması için önemlidir. Glutatyon eksikliği hücrelerde oksidatif hasara neden olur (108,201).

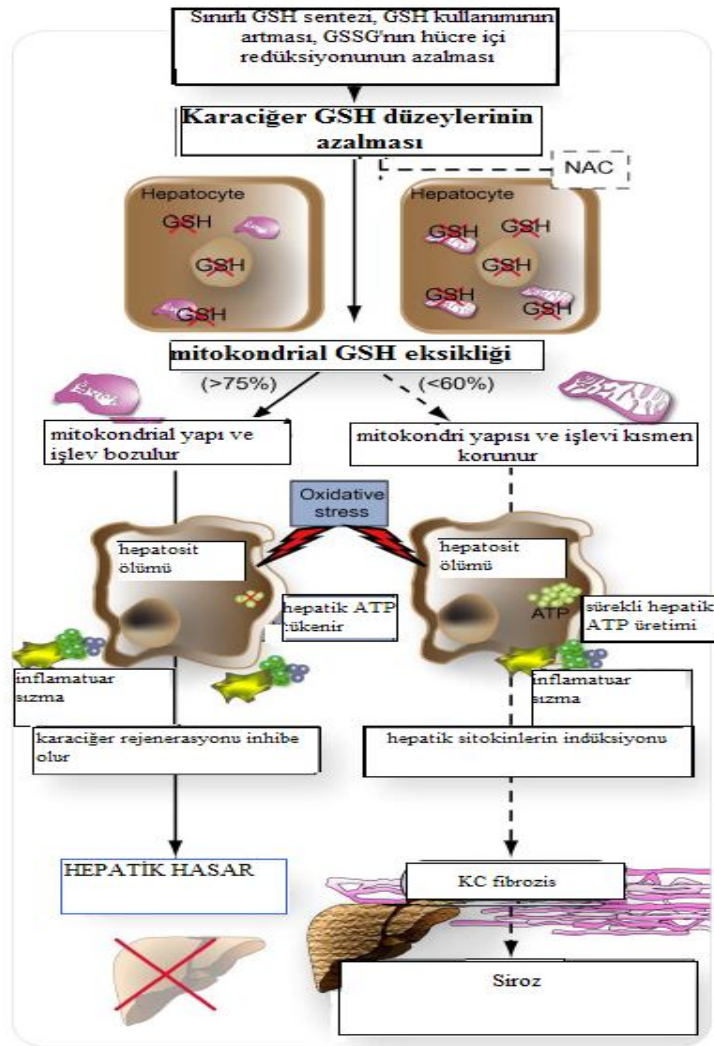


Şekil 2.22. Glutatyonun kimyasal yapısı (108)

Glutatyon eksikliği karaciğer hasarının oluşumunda ve karaciğer hasarı ile gelişen ölümlerde önemli bir faktördür. Karaciğerde yüksek intraselüler GSH düzeyleri bu organın detoksifikasyon fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için önemlidir. Glutatyon konjugatları atılmadan önce daha ileri metabolize edilir. Glutatyona ait glutamil ve glisinil grupları özgün enzimler ile uzaklaştırılır ve geri kalan sisteinil parçasının amino grubuna bir asetil grubu eklenir. Oluşan bileşik merkaptürik asit olup idrarlar atılır. Yapılan çalışmalarda sülfür içeren aminoasitleri düzenli olarak diyetleriyle alan kişilerin hücre içi GSH düzeylerinin daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Karaciğerde GSH düzeylerinin azalması çeşitli patolojilere neden olur (108).

İlaçlar, toksik maddeler ve karsinojenler GSH ile konjuge edilemediklerinde DNA, RNA veya hücre proteinleri ile serbestçe kovalan olarak bağlanır ve önemli düzeylerde karaciğer hasarı oluşur. Glutatyon kullanımının artması, sınırlı glutatyon sentezi ve GSSG'un hücre içi redüksiyonunun azaltılması sonucu karaciğer GSH düzeyleri azalır (Şekil 2.23) (38,108).

Glutasyon düzeylerinin azalmasıyla dışarıdan alınan zararlı maddelerin oluşturacağı hasarlara karşı karaciğer duyarlı hale gelir ve hücreler oksidatif strese karşı korunamaz. Oksidatif hasar sonucu hücresel ölümler olur. Hepatik ATP'nin tükenmesiyle karaciğer rejenerasyonu sağlanamaz ve hasar oluşur (78,215).



Şekil 2.23. Karaciğer glutasyon düzeylerinin azalması (38)

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. GEREÇ

3.1.1. DENEY HAYVANLARININ TEMİNİ VE BAKIMI

Çalışmalara başlamadan önce Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ) Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulundan onay (250/2011) alındı. Çalışmamızda deney hayvanı olarak ESOGÜ Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden (TICAM) alınan 8 haftalık Spraque Dawley türü 63 erkek sıçan kullanıldı. Çalışma başında ve sonunda deney hayvanlarının tartımları alındı. Deney süresince hayvanlar günlük olarak kontrol edilerek genel morfolojik görünümleri (tüy dökülmesi, dışkılama bozuklukları) makroskobik olarak değerlendirildi. Deney hayvanları uygun sıcaklık ve havalandırma koşullarında tutuldu ve temizlik kurallarına dikkat edildi. Yem ve su kısıtlaması yapılmadı.

3.1.2. DOZ VE DENEY GRUPLARI

Çalışmamızda kullandığımız 8 haftalık 200-250 gr ağırlığındaki Spraque-Dawley sıçanlar 7 gruba ayrıldı ve her grupta 9 adet olacak şekilde rastgele dağıtıldı. Çalışma grupları Tablo 3.1' de gösterilmiştir.

3.1.2.1. Maddelerin hazırlanması

- Asetaminofen hazırlanması: 250 mg/kg asetaminofen (Sigma, Germany) su da çözülerek hazırlandı (149).
- Blueberry hazırlanması: 60 mg/kg Blueberry (Wild Blueberry, *Vaccinium angustifolium*, Life Extension, USA) kapsül formu su da çözülerek hazırlandı (152).

- Kitosan hazırlanması: 200 mg/kg kitosan (Sigma, Germany) su da çözülerek hazırlandı (96).

Tablo 3.1. Deney grupları ve deney gruplarının özellikleri

Gruplar	Gruplardaki sıçanların özellikleri
Kontrol	Gruptaki sıçanlar 14 gün boyunca standart sıçan yemi ve içme suyu ile beslendiler.
BB	Gruptaki sıçanlar 14 gün boyunca standart sıçan yemi ve içme suyu ile beslendiler. 1. günden itibaren sıçanlara oral gavaj yöntemi ile 14 gün süresince günde bir kez 60 mg/kg blueberry verildi.
CS	Gruptaki sıçanlar 14 gün boyunca standart sıçan yemi ve içme suyu ile beslendiler. 1. günden itibaren sıçanlara oral gavaj yöntemi ile 14 gün süresince günde bir kez 200 mg/kg kitosan verildi.
APAP	Gruptaki sıçanlar 14 gün boyunca standart sıçan yemi ve içme suyu ile beslendiler. 1. günden itibaren sıçanlara oral gavaj yöntemi ile 14 gün süresince günde bir kez 250 mg/kg asetaminofen verildi.
APAP +BB	Gruptaki sıçanlar 14 gün boyunca standart sıçan yemi ve içme suyu ile beslendiler. 1. günden itibaren sıçanlara oral gavaj yöntemi ile 14 gün süresince günde bir kez 250 mg/kg asetaminofen ve asetaminofen uygulamasından 3 saat sonra 60 mg/kg blueberry verildi.
APAP + CS	Gruptaki sıçanlar 14 gün boyunca standart sıçan yemi ve içme suyu ile beslendiler. 1. günden itibaren sıçanlara oral gavaj yöntemi ile 14 gün süresince günde bir kez 250 mg/kg asetaminofen ve asetaminofen uygulamasından 3 saat sonra 200 mg/kg kitosan verildi.
APAP + BB + CS	Gruptaki sıçanlar 14 gün boyunca standart sıçan yemi ve içme suyu ile beslendiler. 1. günden itibaren sıçanlara oral gavaj yöntemi ile 14 gün süresince günde bir kez 250 mg/kg asetaminofen, asetaminofen uygulamasından 3 saat sonra 60 mg/kg blueberry ve yarım saat sonra 200 mg/kg kitosan verildi.

3.1.3. DENEY HAYVANLARINDAN ÇALIŞILACAK ÖRNEKLERİN ALINMASI

Çalışmamızda tüm maddeler başlandıktan sonraki 15. gün örnek alım zamanı olarak belirlendi ve tüm çalışma grupları kurban edildi. Deney sonunda intraperitoneal olarak ketamin (80mg/kg) ve ksilazin (10mg/kg) uygulanan sıçanların serum örnekleri için kardiyak yolla kanları alınarak servikal dislokasyon uygulandı ve karaciğerleri çıkartıldı. Serum örnekleri, separasyon tüplerinde 20 dakika bekletildikten sonra 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve üstte kalan süpernatant alanin amino transferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), alkalin fosfataz (ALP), laktat dehidrojenaz (LDH), TSA, LSA ve seruloplazmin oksidaz ölçümleri için kullanıldı. Çıkarılan karaciğer örnekleri, soğuk (4⁰C) % 0.9' luk sodyum klorürle üç kez yıkama serisinden geçirildi ve kısımlara ayrıldı. Histokimyasal görüntüleme için ayrılan karaciğer örnekleri nötral formalin içine alındı. Biyokimyasal analizler için ayrılan karaciğer örnekleri, Arginaz, Ornitin, TSA, LSA, NO, GSH, MDA ve total protein ölçümleri için -80⁰C de saklandı.

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1 SERUM ALT, AST, ALP VE LDH ENZİM AKTİVİTELERİNİN ÖLÇÜMÜ

Çalışmamızdaki biyokimyasal değişkinler Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya laboratuvarında çalışıldı. ALT, AST, ALP ve LDH'ın ölçümleri için Roche Modular otoanalizörle uyumlu kantitatif test kitleri kullanıldı.

3.2.1.1. ALT ölçüm prensibi

Alanin aminotransferaz tarafından katalizlenen reaksiyon ile artan piruvat, LDH'ın katalizlediği reaksiyon ile laktata dönüşürken NADH da oksitlenerek NAD⁺ye

dönüşür. Piruvatın oluşum hızı ve dolayısıyla ALT aktivitesindeki artışla direkt orantılı olarak NADH miktarındaki azalma fotometrik olarak ölçülür.

3.2.1.2. AST ölçüm prensibi

Aspartat aminotransferaz tarafından katalizlenen reaksiyon ile artan oksaloasetat, Malat Dehidrojenaz'ın (MDH) katalizlediği reaksiyon ile malata dönüşürken NADH da oksitlenerek NAD^+ 'ye dönüşür. NADH miktarındaki azalma fotometrik olarak ölçülür ve bu azalma AST aktivitesi ile direkt orantılıdır.

3.2.1.3. ALP ölçüm prensibi

p-nitrofenil fosfat, magnezyum ve çinko iyonları varlığında ALP tarafından hidrolize edilir ve ürünler fosfat ile p-nitrofenildir. ALP aktivitesi ile orantılı olarak salınan p-nitrofenil, kolorimetrik olarak ölçülür.

3.2.1.4. LDH ölçüm prensibi

Laktat dehidrojenaz, piruvatın laktata dönüşümünü katalizler ve bu esnada NADH oksitlenir ve NAD^+ oluşur. NADH'deki azalma oranı direkt olarak LDH aktivitesi ile orantılıdır ve fotometrik olarak belirlenir.

3.2.2. DOKU ARGİNAZ ENZİM AKTİVİTESİNİN ÖLÇÜMÜ

Ölçüm prensibi:

Arginaz enzim aktivitesi; substrat olan argininin, arginazla hidrolizi sonucunda oluşan üre miktarının Tiyosemikarbazid Diasetil Monoksim Üre (TDMU) yöntemi (74) ile spektrofotometrik olarak saptanması ile belirlenmiştir. TDMU yöntemi Feron reaksiyonunu temel alır. Diasetilmonoksim (DAM), üre ile direkt olarak reaksiyona girmez. İlk önce asit ortamda ısı etkisi ile hidroksilamin ve diasetile hidrolize olur.

Diasetil, asit çözeltide üre ile kondanse olur ve H₂O ve renkli bir bileşik olan diazin meydana gelir. Bu rengi stabilize etmek için tiyosemikarbazid (TSC) ve Fe⁺² iyonları kullanılır.

Doku homojenatının hazırlanması:

Derin dondurucudan çıkarılan karaciğer dokuları homojenizatör kullanılarak 1/10 oranında soğuk 0.05 M Tris/HCl tamponu (pH: 8.05) ile homojenize edildi. Doku homojenatları 11000 rpm ve +4°C'de 20 dakika süre ile santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi.

Çözeltiler:

- Asit Karışımı: 3.24 gr FeCl₃.6H₂O bir miktar distile su ile bir balon jodede çözündürülüp, üzerine %85'lik H₃PO₄'ten 66.7 mL eklenir. Daha sonra distile suyla 100 mL'ye tamamlanır. Oda ısısında saklanır. Hazırlanan çözeltiden 1 mL alınıp üzerine 999 mL %20'lik (v/v) H₂SO₄'ten ilave edilir. Deney aşamasında asit karışımı olarak kullanılır. Oda ısısında saklanır.
- Renk ayırıcı (3.6 mM Tiyosemikarbazid + 61.7 mM Diasetilmonoksim): Bu karışım 0.0036 M TSC (91.14 gr/mol) ve 0.0617 M DAM (101.1 gr/mol) içermektedir. 6.238 gr DAM ile 0.328 gr TSC karıştırılarak bir miktar distile suda çözüldükten sonra yine distile su ile litreye tamamlanır. Oda ısısında ve koyu renkli şişede uzun süre saklanabilir.
- Karbonat tamponu (pH 9.7 100 mM CO₃/HCO₃):
1.06 gr Na₂CO₃ bir miktar distile su ile balon jodede çözülür ve distile su ile 100 mL'ye tamamlanır. 0.1 M Na₂CO₃ elde edilir. 0.84 gr NaHCO₃ bir miktar distile su ile balon jodede çözülür ve distile su ile 100 mL'ye tamamlanır. 0.1 M NaHCO₃ elde edilir.

Karbonat tamponunun hazırlanması için; 100 mL 0.1 M Na₂CO₃ üzerine, 0.1 M NaHCO₃ ilave edilerek pH 9.7'ye getirilir. Hazırlanan tampon çözelti buzdolabında +4°C'de saklanır.

- 50 mM arginin çözeltisi: 0.87 gr L-arginin balon jodede bir miktar distile suda çözülür. 0.1 M HCl ile pH 9.7'ye getirilir. Distile su ile 100 mL'ye tamamlanır. Hazırlanan çözelti buzdolabında +4°C'de saklanır.
- 9 mM MnCl₂ çözeltisi: 1.781 gr MnCl₂.2H₂O bir miktar distile su ile balon jodede çözülür ve 1000 mL'ye tamamlanır. Hazırlanan çözelti buzdolabında +4°C'de saklanır.
- Üre standardı (0.5 µmol üre/mL): 3 mg üre, 100 mL 0.016 M benzoik asit içinde çözülür. Üre standardı 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 µmol üre/mL konsantrasyonlarda hazırlandı. Üre standart çözeltisi buzdolabında +4°C'de saklanır.

Deney protokolü:

Arginaz enzim aktivitesi tayini için iki deney düzeneği kuruldu. Birinci düzeneğe; numaralandırılmış deney tüpleri, ikinci düzeneğe ise kör, standart ve sıfır zaman tüpleri konuldu. Süpernatant içindeki endojen üre aktivitesinin eliminasyonu amacı ile sıfır zaman tüpleri hazırlandı. Homojenatlar 9 mM MnCl₂ ile 1/10 oranında dilüe edildi. Örnek 55 °C'lik su banyosunda 20 dakika preinkübasyona bırakıldı. Bu aşamada deney ve sıfır zaman tüplerine, 0.4 mL arginin çözeltisi ve 0.4 mL karbonat tamponundan konuldu. Kör tüpüne 1 mL distile su, standart tüplerine ise farklı konsantrasyonlarda hazırlanan 1 mL üre standartları konuldu. Ardından da enzimatik reaksiyonu engellemek amacı ile sıfır zaman, standart ve kör tüplerine 3'er mL asit karışımı konuldu.

Yirmi dakikalık preinkübasyon ardından enzim kaynağı ve hazırlanmış olan deney tüpleri 37 °C’de su banyosunda 3 dakika bekletilerek aynı ısılarla gelmeleri sağlandı. Daha sonra 37 °C’ye gelen süpernatanttan, deney ve sıfır zaman tüplerine 0.2 mL konarak, vorteks karıştırıcı ile iyice karıştırıldı.

Deney tüpleri enzimatik reaksiyonun oluşması için su banyosunda 37°C’de 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 3 mL asit karışımı ilave edilerek reaksiyon durduruldu. Bu işlemleri takiben her iki düzenekteki tüplere 2 mL renk ayırıcı ilave edildi ve vorteks karıştırıcı ile karıştırıldı. Ardından tüm tüplerin ağzıları kapatıldı ve tüpler 10 dakika kaynar su banyosunda bırakılarak renk oluşumu sağlandı. Deney sonunda tüpler musluk suyu altında soğutulurken, absorbansları 520 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçüldü (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Arginaz Deney Protokolü

1 : 10 Dilüsyon İşlemi				
Doku Örnekleri		MnCl ₂ (Mangan Klorür)		
100 µL		900 µL		
55°C’de 20 dakika ön-inkübasyon				
İŞLEM SIRASI	DENEY	KÖR	STANDART	SIFIR ZAMAN
L - Arginin	0.4 mL			0.4 mL
Karbonat Tamponu	0.4 mL			0.4 mL
Distile su		1 mL		
Üre Standartı			1 mL	
Asit Karışımı		3 mL	3 mL	3 mL
Tüm Deney Düzeneklerini 37 °C’de 3 dakika inkübasyon				
1:10 Dilüe süpernatant	0.2 mL			0.2 mL
37°C’de 15 dakika				
Asit Karışımı	3 mL			
Renk Reaktifi	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL
10 dakika kaynar su banyosu				

$\lambda = 520 \text{ nm}$

Doku arginaz enzim aktivitesinin hesaplanması:

- Gerçek arginaz absorbansı için, deney tüplerinden zaman tüplerinin absorbansı çıkarılarak hesaplama yapıldı. Tüm deney tüplerinin absorbansından, kendi sıfır zaman absorbansı çıkarılarak net absorbans elde edildi. Böylece enzim kaynağındaki endojen ürenin absorbansı hesabın dışında bırakıldı.
- Örneklerin konsantrasyonlarını hesaplayabilmek için üre standardı 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 ve 0.5 $\mu\text{mol/mL}$ konsantrasyonlarında hazırlandı.
- Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan üre standart çözeltileri ve absorbansları Microsoft Office Excel 2007 programı kullanılarak grafiğe geçirildi ve standart grafiği elde edildi (Grafik 3.1). Deney sırasında hesaplamalar için kullanılan standart konsantrasyonu 0.2 $\mu\text{mol üre/mL}$ olarak belirlendi.
- Arginaz enzim aktivitesini hesaplamak için faktör hesaplandı.

$$\text{Faktör} = \frac{(0.2 \mu\text{mol üre/mL}) \times 10 \times 5 \times 4}{0.2 \mu\text{mol üre/mL}'\text{nin absorbansı}}$$

10: Süpernatantın MnCl_2 ile sulandırılma katsayısı

5: Süpernatantın inkübasyon ortamındaki sulanma katsayısı

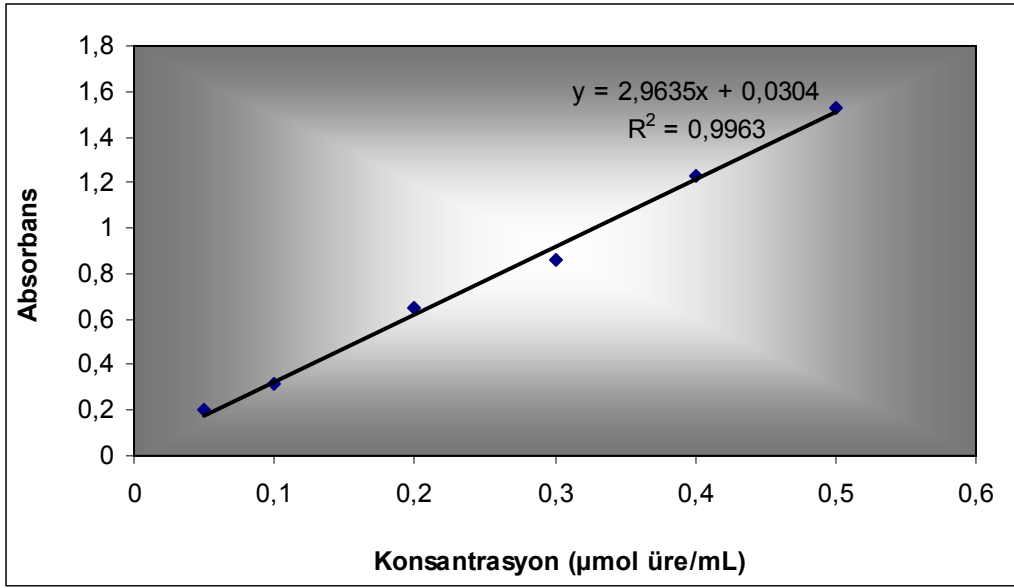
4: İnkübasyon süresinin 1 saate tamamlanma katsayısı

Standart ürenin absorbansı (0.2 $\mu\text{mol üre/mL}$ 'nin absorbansı): 0.648

Faktör = $(0.2 \mu\text{mol üre/mL}) \times 10 \times 5 \times 4 / 0.648$

Faktör = 61,728 olarak hesaplandı.

- Karaciğer dokusu için enzim aktivitesi; ünite olarak tanımlanmıştır. Enzim aktivitesinin hesaplanmasında net örnek absorbanları faktör ile çarpılarak doku protein sonuçlarına oranlanarak arginaz enzim aktivitesi $\mu\text{mol üre/mg protein/saat}$ olarak hesaplanmıştır.



Grafik 3.1. Arginaz standart grafiği

3.2.3. DOKU ORNİTİN DÜZEYLERİNİN ÖLÇÜMÜ

Ölçüm prensibi:

Karaciğer dokusu ornitin düzeylerinin hesaplanması, ornitin ninhidrin ile oluşturduğu mor renkli kompleksin Chinard yöntemi (41) ile kolorimetrik olarak ölçümüne dayanmaktadır.

Doku homojenatının hazırlanması:

Derin dondurucudan çıkarılan karaciğer dokuları homojenizatör kullanılarak 1/10 oranında soğuk 0.05 M Tris/HCl tamponu (pH: 8.05) ile homojenize edildi. Doku homojenatları 11000 rpm ve 4°C'de 20 dakika süre ile santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi.

Çözeltiler:

- %10'luk trikloro asetik asit (TCA) çözeltisi: 10 gr TCA bir miktar distile su içinde çözülerek son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.
- Ninhidrin ayıracı: 2.5 gr ninhidrin, 40 mL 6 N H₃PO₄ ve 60 mL glasiyel asetik asitin içinde çözülür.
- Derişik glasiyel asetik asit: Deney tüplerine 1 mL glasiyel asetik asit eklenir.
- 0.3 µmol/mL standart ornitin solüsyonu: 0.0506 gr L-ornitin bir miktar distile su içinde çözülerek son hacim distile suyla 1 litreye tamamlanır. Böylece 0.3 µmol/mL'lik ornitin konsantrasyonu elde edilir.

Deney protokolü:

Doku homojenatları %10'luk TCA ile 1/1 oranında dilüe edildikten sonra 3000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi ve süpernatantlar elde edildi. Deney tüpüne 1 mL süpernatant, kör tüpüne 1 mL distile su ve standart tüplerinede 1'er mL farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ornitin solüsyonları eklendi. Tüplere sırayla 2.5 mL glasiyel asetik asit ve 0.25 mL ninhidrin ayıracı eklendi. Tüm tüpler vorteksenerek karıştırıldıktan sonra 30 dakika kaynar su banyosunda tutuldu. Su banyosundan çıkarılan tüpler hızla soğutulularak 515 nm dalga boyunda absorbanları spektrofotometrede ölçüldü (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. Ornitin Deney Protokolü

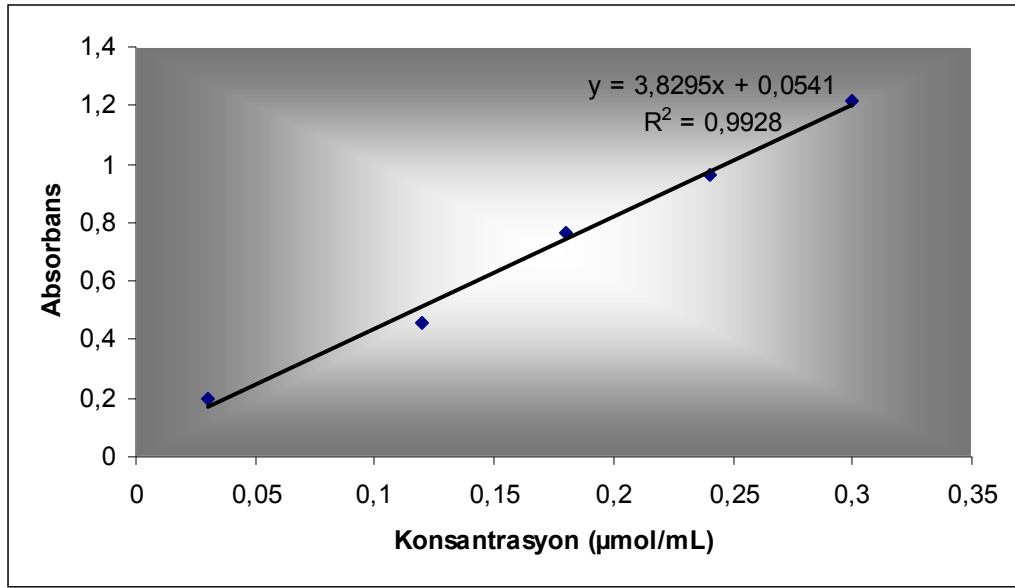
1:1 Dilüsyon İşlemi			
Doku Homojenatı		% 10 'luk TCA	
100 µL		100 µL	
3000 rpm de 5 dakika santrifüj			
İŞLEM SIRASI	DENEY	KÖR	STANDART
Süpernatant	1 mL		
Distile su		1 mL	
Ornitin solüsyonu			1 mL
Asetik asit	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
Ninhidrin ayırıcı	0,25 mL	0,25 mL	0,25 mL
Tüm tüpler vortekslelendikten sonra 30 dakika kaynar su banyosunda tutuldu.			
Tüpler soğutuldu			

$$\lambda = 515 \text{ nm}$$

Doku ornitin düzeylerinin hesaplanması:

- Örneklerin konsantrasyonlarını hesaplayabilmek için ornitin standardı 0.03, 0.12, 0.18, 0.24, 0.30 µmol/mL konsantrasyonlarda hazırlandı.
- Standart tüplerine 1 mL asetik asit, 0,25 mL ninhidrin ayırıcı konuldu ve farklı konsantrasyonlardaki standarttan 1 mL numaralandırılmış tüplere eklendi.
- Kör ve örnek tüplerinde olduğu gibi işlemlerden geçirildi ve 515 nm'de absorbanları okundu.
- Elde edilen absorbanlarla, konsantrasyon değerleri Microsoft Office Excel 2007 programı kullanılarak grafiğe geçirildi ve standart grafiği elde edildi (Grafik 3.2).
- Örneklerin konsantrasyonları, standart grafiği kullanılarak hesaplandı.

- Örneklerin konsantrasyonları, homojenatların TCA ile sulandırma katsayısı olan 2 ile çarpıldı.
- Aynı homojenatların total proteinleri ölçüldü ve örneklerin konsantrasyonları total proteinlerine oranlandı.
- Sonuçlar, $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein olarak verildi.



Grafik 3.2. Ornitin standart grafiği

3.2.4. SERUM VE DOKU TOTAL SİYALİK ASİT DÜZEYLERİNİN ÖLÇÜMÜ

Ölçüm prensibi:

Serum ve doku örneklerinde TSA düzeylerini belirlemek için Sydow (196) tarafından geliştirilen yöntem kullanıldı. Sialik asit, asit ile hidrolizde serbest hale geçer. Asidik ortamda ve periyodat varlığında okside edilir. Oksidasyon sonucu oluşan ürün, p-dimetilaminobenzaldehid varlığında pembe renkli bir ürün oluşmasına sebep olur. Absorbanslar 525 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür.

Doku homojenatının hazırlanması:

Derin dondurucudan çıkarılan karaciğer dokuları homojenizatör kullanılarak 1/10 oranında soğuk 0.1 M fosfat tamponu (pH:7.4) ile homojenize edildi. Doku homojenatları 4000x g'de ve +4°C'de 20 dakika süre ile santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi.

Çözeltiler:

- %5'lik Perklorik Asit Çözeltisi (V/V): 7,04 mL perklorik asit alınarak bir miktar distile su içinde çözüldü ve son hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- Ehrlich Ayıracı: 5 gr p-dimetilaminobenzaldehid 50 mL yoğun HCl asit içerisinde çözüldü ve üzerine 50 mL distile su ilave edilerek hacmi 100 mL'ye tamamlandı. (Ehrlich Ayıracı, her ölçümden önce taze olarak hazırlandı).
- N-asetil nöraminik asit (NANA) standart solüsyonunun hazırlanması: Fosfat tamponu (pH 7.4, 0.1 M) kullanılarak NANA (Sigma, Germany) standardından 100 mg/mL stok standart çözeltisi hazırlandı.

Stok standart çözeltilerden 75, 50, 25 ve 12,5 mg/100mL konsantrasyonunda dilüsyonlar yapıldı. Elde edilen konsantrasyonlar ve absorbans değerlerinden standart eğri oluşturuldu. Bu standart eğriden doku ve serum örneklerinin TSA değerleri hesaplandı.

Deney prosedürü:

0.2 mL serum ve doku homojenatı üzerine 1.5 mL perklorik asitten ilave edildi. 100°C'de 5 dakika kaynatıldı ve soğutuldu. Deney tüpleri 2500x g' de 4 dakika santrifüj edildi.

Süpernatanttan 1 mL alınarak diğer temiz tüplere aktarıldı. Üzerine 0.2 mL Ehrlich ayırıcı ilave edilerek 100°C’de 15 dakika kaynatıldı. Kaynatma işleminden sonra tüpler tekrar soğutuldu ve 1 mL distile su ilave edilerek 525 nm dalga boyunda absorbanları spektrofotometrik olarak okundu (Tablo 3.4).

Tablo 3.4. Total Sialik Asit Deney Protokolü

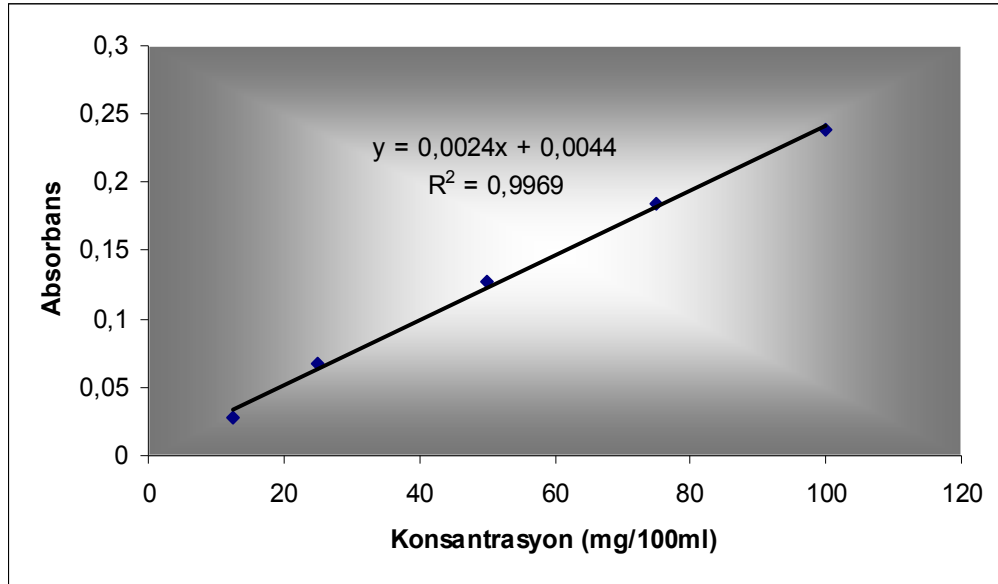
Doku homojenatları 4000x g de 20 dakika santrifüj			
İŞLEM SIRASI	DENEY	KÖR	STANDART
Süpernatant	0,2 mL		
Distile su		0,2 mL	
NANA			0,2 mL
%5 lik perklorik asit	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL
Tüm tüpler vortekslelendikten sonra 5 dakika kaynar su banyosunda tutuldu.			
Süpernatant	1 mL		
Ehrlich reaktifi	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL
Distile su	1 mL	1 mL	1 mL
15 dakika kaynar su banyosu			

$$\lambda = 525 \text{ nm}$$

Total sialik asit düzeylerinin hesaplanması:

- Örneklerin konsantrasyonlarını hesaplayabilmek için NANA standardı 12.5, 25, 50, 75 ve 100 mg/100mL konsantrasyonlarında hazırlandı.
- Standart tüplerine 1,5 mL perklorik asit, 0,2 mL Ehrlich reaktifi ve farklı konsantrasyonlardaki standartlardan 0,2 mL numaralandırılmış tüplere eklendi.

- K r ve örnek tüplerinde olduğu gibi işlemlerden geçirildi ve 525 nm'de absorbansları okundu.
- Elde edilen absorbanslarla, konsantrasyon değerleri Microsoft Office Excel 2007 programı kullanılarak grafiğe geçirilerek standart grafiği elde edildi (Grafik 3.3).
- Serum ve doku örneklerin konsantrasyonları, standart grafiği kullanılarak hesaplandı.
- Doku sialik düzeylerinin hesabı için, aynı doku homojenatların total proteinleri  lildi ve örneklerin konsantrasyonları total proteinlerine oranlandı.
- Doku TSA sonuçları, birim d nst r lmesi yapılarak $\mu\text{gr}/\text{mg}$ protein olarak verildi.
- Serum TSA sonuçları, mg/dL olarak verildi.



Grafik 3.3. Total sialik asit standart grafiği

3.2.5. SERUM VE DOKU LİPİD BAĞLI SİYALİK ASİT DÜZEYLERİNİN ÖLÇÜMÜ

Ölçüm prensibi:

Serum ve doku örneklerinde LSA ölçümü, resorsinolün siyalik asitle oluşturduğu rengin 580 nm'de ölçülmesi prensibine dayanan Katopodis ve arkadaşlarının (103,104) tanımladığı yönteme göre ölçüldü.

Doku homojenatının hazırlanması:

Derin dondurucudan çıkarılan karaciğer dokuları homojenizatör kullanılarak 1/10 oranında soğuk 0.1 M fosfat tamponu (pH:7.4) ile homojenize edildi. Doku homojenatları 4000x g'de ve +4°C'de 20 dakika süre ile santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi.

Çözeltiler:

- Rezorsinol ayıracı: 0.2 gr rezorsinol tartıldı ve 10 mL distile suda çözüldü. Üzerine 80 mL HCl (% 36.5) ve 0.25 mL 0.1 M CuSO₄ ilave edilerek distile suyla hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- Fosfotungistik asit: 10 gr fosfotungistik asit tartıldı ve 10 mL distile suda çözüldü.
- Kloroform/Metanol: 200 mL kloroform, 100 mL metanol alınarak son hacim 300 mL'ye tamamlandı.
- Butil asetat/butil alkol: 85 mL butil asetat, 15 mL butil alkol alınarak son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

Deney prosedürü:

44.7 µL serum veya doku homojenatı üzerine 150 µL distile su katılarak 5 sn vorteksle karıştırıldı. Buz üzerine bırakılan bu karışımın üzerine 3 mL Kloroform-Metanol (2:1 v/v) ilave edilerek 30 sn tekrar vorteks ile karıştırıldı sonra üzerine 50 µL mL soğuk distile su ilave edildi. Karışım oda sıcaklığında 15 dk 2500 rpm'de santrifüj edildi. Üstteki süpernatantın 1 mL'si temiz bir tüpe aktararak üzerine 50 µL fosfotungistik asit (1 gr.mL⁻¹) eklendi ve 15 dakika 2500 rpm'de santrifüj edildi. Üstteki süpernatant kısmı uzaklaştırılarak 1 mL distile suyla dipte katı partikül kalmayınca kadar karıştırıldı. Üstüne rezorsinol ayırıcından 1mL ilave edildi. Tüpler karıştırıldıktan sonra 15 dakika kaynar su banyosunda bekletilmesinin ardından 10 dakika buz banyosunda tutuldu. Soğumuş olan tüplere 2 mL butil asetat-butil alkol (85:15 v/v) eklenerek oda sıcaklığında tüpler vortekslendi. 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilen tüplerden süpernatant alınarak 580 nm'de spektrofotometrede absorbans değerleri okundu (Tablo 3.5).

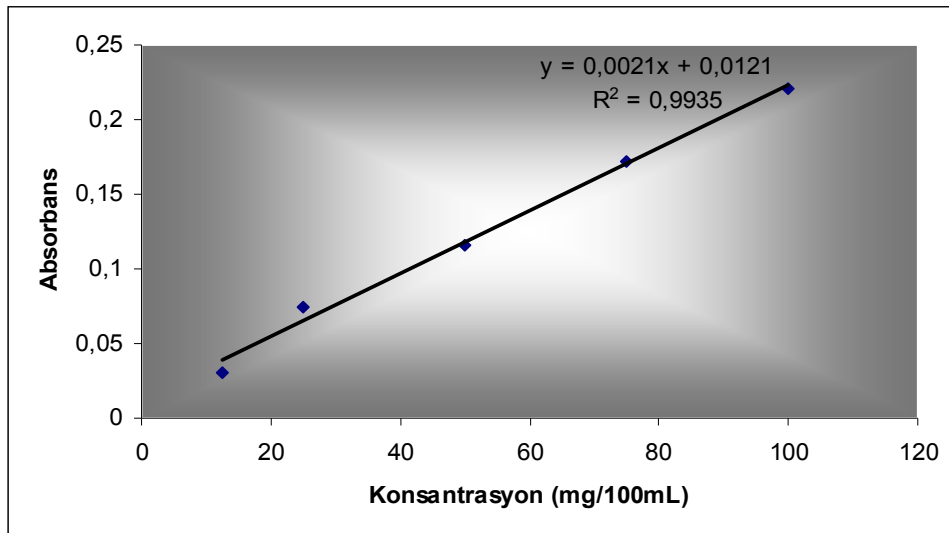
Tablo 3.5. Lipit Bağlı Sialik Asit Deney Protokolü

Doku homojenatları 4000g'de 20 dakika santrifüj			
İŞLEM SIRASI	DENEY	KÖR	STANDART
Süpernatant	44.7 µL		
Distile su	150 µL		
5 saniye vorteks			
NANA			44.7 µL
Distile su		44.7 µL	
2:1 kloroform:metanol	3 mL	3 mL	3 mL
Soğuk distile su	50 µL	200 µL	200 µL
2500 rpm'de 15 dakika santrifüj			
Süpernatant	1 mL		
Fosfotungistik asit	50 µL	50 µL	50 µL
2500 rpm'de 15 dakika santrifüj			
Süpernatant kısmı uzaklaştırılır			
1mL distile su ile dipteki partikül karıştırılarak kullanılır.			
Rezorsinol	1 mL	1 mL	1 mL
15 dakika kaynar su banyosunda bekletilir			
10 dakika buz banyosunda tutulur			
Bütil asetat/bütil alkol	2 mL	2 mL	2 mL
2500 rpm'de 5 dakika santrifüj			

$\lambda = 580 \text{ nm}$

Lipid bağı sialik asit düzeylerinin hesaplanması:

- Örneklerin konsantrasyonlarını hesaplayabilmek için NANA standardı 12.5, 25, 50, 75 ve 100 mg/100mL konsantrasyonlarında hazırlandı.
- Standart tüplerine 3 mL Kloroform-Metanol, 50 µL fosfotungistik asit 1mL rezorsinol ayırıcı ve 2 mL butil asetat-butil alkol eklendi ve farklı konsantrasyonlardaki standartlardan 44.7 µL numaralandırılmış tüplere eklendi.
- Kör ve örnek tüplerinde olduğu gibi işlemlerden geçirildi ve 580 nm'de absorbansları okundu.
- Elde edilen absorbanslarla, konsantrasyon değerleri Microsoft Office Excel 2007 programı kullanılarak grafiğe geçirilerek standart grafiği elde edildi (Grafik 3.4).
- Serum ve doku örneklerin konsantrasyonları, standart grafiği kullanılarak hesaplandı.
- Doku sialik düzeylerinin hesabı için, aynı doku homojenatların total proteinleri ölçüldü ve örneklerin konsantrasyonları total proteinlerine oranlandı.
- Doku LSA sonuçları, µgr/mg protein olarak verildi.
- Serum LSA sonuçları, mg/dL olarak verildi.



Grafik 3.4. Lipid bağı sialik asit standart grafiği

3.2.6. DOKU NİTRİK OKSİT DÜZEYLERİNİN ÖLÇÜMÜ

Ölçüm prensibi:

Nitrik oksit direkt ölçümü zor olduğu için biyolojik sıvılarda NO'nin stabil oksidasyon ürünleri olan nitrat (NO^{-3}) ve nitrit (NO^{-2}) düzeyleri in vivo ve in vitro NO markırı olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda rat karaciğer dokularındaki nitrit miktarı Cortas ve arkadaşlarının yöntemine göre belirlenmiştir (47).

Doku homojenatının hazırlanması:

Karaciğer dokuları homojenizatör kullanılarak 1/10 oranında soğuk 0.1 M Fosfat tamponu (pH:7.4) ile homojenize edildi. Doku homojenatları 4000x g'de ve +4°C'de 20 dakika süre ile santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi.

Çözeltiler:

- Kadmiyum granüllerinin aktive edilmesi: Kadmiyum granülleri 2,5-3 gr ağırlığında tartıldı. H_2SO_4 içerisinde tutulan kadmiyum granülleri distile su içerisinde üç defa yıkandı. CuSO_4 içerisinde iki dakika bekletildikten sonra glisin-NaOH tamponu ile üç defa yıkandı ve 10 dakika içerisinde kullanıldı.
- 0.2 M H_2SO_4 : 2.8 mL derişik H_2SO_4 alınır ve içinde 250 mL distile su olan balon jöjeye karıştırılarak aktarılır ve son hacim 500 mL' ye tamamlanır.
- 0.2 mol/L Glisin-NaOH tamponu: 15 gr glisin 100 mL distile suda çözüldü. 0.1 M'lık NaOH solüsyonu ile glisinin pH' sı 9.7'ye ayarlandı. Daha sonra çözelti 1000 mL'ye tamamlandı. Bu tampon çözelti +4-8°C'de buzdolabında bir ay saklanabilir.

- 58 mM'lık Sülfanilamid Çözeltisi: 3M HCl'den 66.2 mL alınıp hacmi distile suyla 250 mL'ye tamamlanıp 2.5 gr sülfanilamid eklendi. Sülfanilamid sıcak HCl içinde iyice çözüldü. Bu çözelti oda sıcaklığında saklandı.
- 0.1 M'lık NaOH: 3.2 gr NaOH tartılıp 40 mL suda çözüldü.
- 55 mM'lık NaOH: 1.1 gr NaOH alınıp bir miktar distile su ile çözülüp son hacim 500 mL'ye tamamlanır.
- 0.77 M'lık N-Naftiletilediamin Çözeltisi: 50 mg N-naftiletilediamin tartıldı ve 250 mL distile suda çözüldü.
- 5 mM CuSO₄ Çözeltisi: 6.24 gr CuSO₄. 5H₂O bir miktar distile suda çözülüp son hacim 500 mL'ye tamamlandı.
- 75 mM ZnSO₄ Çözeltisi: 10.78 gr alınıp ZnSO₄. 7H₂O alınıp distile suda çözüldü ve son hacim 500mL'ye tamamlandı.
- 3 M HCl Çözeltisi: 123.176 mL HCl alınıp son hacim distile suyla 500mL'ye tamamlandı.

Standart Sodyum Nitrit (NaNO₂) Çözeltisi: 5, 10, 20, 50, 100 µmol/L konsantrasyonlarda NaNO₂ çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiler kadmiyumsuz ortamda direkt renklendirilerek standart eğri elde edildi. 100 µM NaNO₂ çözeltisi hazırlamak için 6.9 mg NaNO₂ tartıldı, bir miktar distile su içinde çözülerek son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı. Stok çözelti seyreltilerek 5, 10, 20, 50, 100 µmol/L konsantrasyonlarda standart çözeltiler elde edildi.

Deney prosedürü:

Deproteinizasyon işlemi için 0,5 mL süpernatant, 2 mL NaOH, 2,5 mL ZnSO₄ ilave edilip 10 dakika beklenilir. 3500xg hızda 10 dakika santrifüj yapıldı ve süpernatant numune olarak kullanıldı. Bakır kaplı kadmiyum granülleri üzerine 1mL glisin tamponu eklendi. Üzerine 1 mL deproteinize numune konuldu. Üzerine 2 mL distile su ilave edildi. Oda ısısında 90 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 2 mL alınıp üzerine 2,5 mL distile su, 1 mL sülfanilamid ve 1 mL N-naftiletilendiamin ilave edildi. Oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildikten sonra 545 nm’de köre karşı okundu (Tablo 3.6).

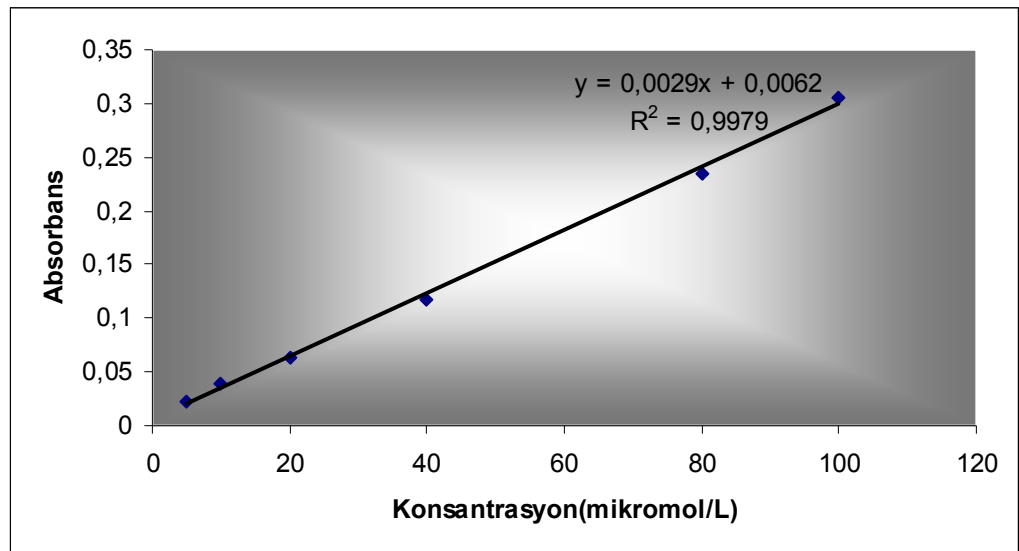
Tablo 3.6. Nitrik Oksit Deney Protokolü

İŞLEM SIRASI	DENEY	KÖR	STANDART
Süpernatant	0.5 mL		
NaOH	2 mL	2 mL	2 mL
ZnSO ₄	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL
3500 g'de 10 dakika santrifüj			
Süpernatant	1 mL		
Distile su	2 mL	2 mL	2 mL
Glisin tamponu	1 mL	1 mL	1 mL
Kadmiyum granülleri	Eklenir	Eklenir	Eklenmez
90 dakika inkübasyon			
Süpernatant	2 mL		
Sülfanilamid	1 mL	1 mL	1 mL
N-naftiletilendiamin	1 mL	1 mL	1 mL
Distile su	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL
60 dakika inkübasyon			

$$\lambda = 545 \text{ nm}$$

Doku nitrik oksit düzeylerinin hesaplanması:

- Örneklerin konsantrasyonlarını hesaplayabilmek için NaNO_2 standart çözeltisi seyreltilerek 5, 10, 20, 40, 80, 100 $\mu\text{mol/L}$ konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlandı.
- Standart tüplerine 2 mL NaOH, 2.5 mL ZnSO_4 , 1 mL glisin tamponu eklendi. Kadmiyumsuz ortamda 1 mL sülfanilamid ve 1 mL N-naftiletilediamin ve farklı konsantrasyonlardaki standartlardan numaralandırılmış tüplere eklendi.
- Kör ve örnek tüplerinde olduğu gibi işlemlerden geçirildi ve 545 nm'de absorbansları okundu.
- Elde edilen absorbanslarla, konsantrasyon değerleri Microsoft Office Excel 2007 programı kullanılarak grafiğe geçirilerek standart grafiği elde edildi (Grafik 3.5).
- Doku örneklerin konsantrasyonları, standart grafiği kullanılarak hesaplandı.
- Doku nitrik oksit düzeylerinin hesabı için, aynı doku homojenatların total proteinleri ölçüldü ve örneklerin konsantrasyonları total proteinlerine oranlandı.
- Doku NO sonuçları, $\mu\text{mol/mg}$ protein olarak verildi.



Grafik 3.5. Nitrik oksit standart grafiği

3.2.7. SERUM SERULOPLAZMİN OKSİDAZ AKTİVİTE ÖLÇÜMÜ

Ölçüm prensibi:

Optimum pH ve ısı koşullarında hazırlanan o-dianizidin dihidroklorid ile inkübe edilen örneklerin oluşturduğu renkli ürünün absorbansının spektrometrede 540 nm’de ölçülmesi prensine dayanan Schosinsky ve arkadaşlarının (181) tanımladığı yöntemle göre ölçüldü.

Çözeltiler:

- Substrat Çözeltisi (7,88mol/L): 2,47 gr o-dianizidin dihidroklorid, 1000 mL distile suda çözüldü.
- Asetat Tamponu (0,1 M, pH 5,0): 13,608 gr sodyum asetat ve 2,6 mL glasiyel asetik asit bir miktar distile suda çözüldü. Son hacim distile suyla 1000 mL’ye tamamlandı.
- Sülfürik asit çözeltisi (9mol/L): 256,102 mL sülfürik asit son hacim 500 mL olacak şekilde distile suyla tamamlanır.

Deney prosedürü:

Seruloplazmin oksidaz enzim aktivitesi tayini için iki deney düzeneği kuruldu. Birinci düzeneğe; numaralandırılmış deney tüpleri, ikinci düzeneğe ise kör tüpleri konuldu. Tüm deney ve kör tüplerine 750 µL asetat tamponu ve 50 µL serum ilave edilerek tüpler iyice karıştırıldı. İyice karıştırılan tüpler kapakları kapatılarak 30°C’deki su banyosunda 5 dakika inkübasyona bırakıldılar. İnkübasyon sonrasında tüm tüplere sıra ile 200 µL substrat çözeltisi olan o-dianizidin dihidroklorid çözeltisinden eklendi. Substrat eklenmesinden 5 dakika sonra deney tüpleri su banyosundan alındı ve 2 mL sülfürik asit eklendi.

Kör tüplerine ise substrat eklenmesinden 15 dakika sonra su banyosundan alınarak 2 mL sülfürik asit eklendi ve tüpler iyice karıştırıldı. Deney ve kör tüplerindeki karışımların absorbansları spektrofotometrede distile suya karşı 540 nm'de ölçüldü (Tablo 3.7)

Tablo 3.7. Seruloplazmin Oksidaz Deney Protokolü

İŞLEM SIRASI	DENEY	KÖR
Serum	50 µL	50 µL
Tampon çözelti	750 µL	750 µL
5 dakika 30°C'de su banyosunda inkübasyon		
o-dianizidin	200 µL	200 µL
Sülfürik asit	2 mL	2 mL
Tüm tüpler vortekslenir		

$$\lambda = 540 \text{ nm}$$

Serum seruloplazmin oksidaz aktivitesinin hesaplanması:

- Gerçek seruloplazmin oksidaz absorbansı için, tüm deney tüplerinin absorbansından, kendi kör absorbansı çıkarılarak net absorbans elde edildi.
- Seruloplazmin oksidaz enzim aktivitesini hesaplamak için Schosinsky ve arkadaşlarının (121) geliştirdiği formül kullanıldı.

$$\text{Seruloplazmin oksidaz aktivitesi} = (A15 - A5) \times 6.25 \times 100 \text{ (U/L)}$$

A15: 15 dakika inkübasyona bırakılan örnek absorbansı

A5: 5 dakika inkübasyona bırakılan örnek absorbansı

- Serum seruloplazmin oksidaz sonuçları U/L olarak verildi.

3.2.8. DOKU GLUTATYON DÜZEYLERİNİN ÖLÇÜMÜ

Ölçüm prensibi:

Doku glutatyon ölçümü, hafif alkali ortamda 5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asidin (DTNB, Elman reaktifi), dokudaki alifatik tiyol bileşikleriyle reaksiyonu sonucu her molekül tiyol başına oluşan, p-nitrofenol anyonunun miktarının spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır (73).

Doku homojenatının hazırlanması:

Derin dondurucudan çıkarılan karaciğer dokuları homojenizatör kullanılarak 1/10 oranında soğuk 0.1 M Fosfat tamponu (pH: 7.4) ile homojenize edildi. Doku homojenatları 4000x g'de ve 4°C'de 20 dakika süre ile santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi.

Çözeltiler:

- Çöktürme çözeltisi: 1,67 gr metafosforik asit, 0,2 gr EDTA, 30 gr NaCl bir miktar distile su içinde çözülerek son hacim distile suyla 100 mL'ye tamamlanır.

- % 1'lik sodyum sitrat çözeltisi: 1 gr sodyum sitrat distile suda çözülerek 100 mL'ye tamamlanır. Bu çözelti belirtme reaktifi hazırlanırken kullanılır.
- Belirtme reaktifi: 40 mg 5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) % 1'lik sodyum sitrat çözeltisinde çözülerek, yine aynı çözelti ile 100 mL'ye tamamlanır.
- Sekonder sodyum fosfat: 0.3 M Na₂HPO₄ çözeltisi hazırlanır.
- Glutasyon standart çözeltisi: 100 mg/100mL olarak hazırlanan glutasyon stok çözeltisinden farklı konsantrasyonlarda standartlar hazırlandı.

Deney prosedürü:

Deney tüplerine 0.5 mL süpernatant ilave edildi. Üzerine 0.75 mL çöktürme çözeltisinden ilave edilip, iyice karıştırıldıktan sonra 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilir. Süpernatant ayrılır, çökelti atılır. Tüplere alınan 0,5 mL süpernatant üzerine 2 mL fosfat solüsyonu ve 1,5 mL DTNB eklenerek tüpler vortekste iyice karıştırıldıktan sonra oda ısısında 5 dakika bekletilir. Örnek absorbansları 412 nm dalga boyunda okunarak kaydedildi (Tablo 3.8).

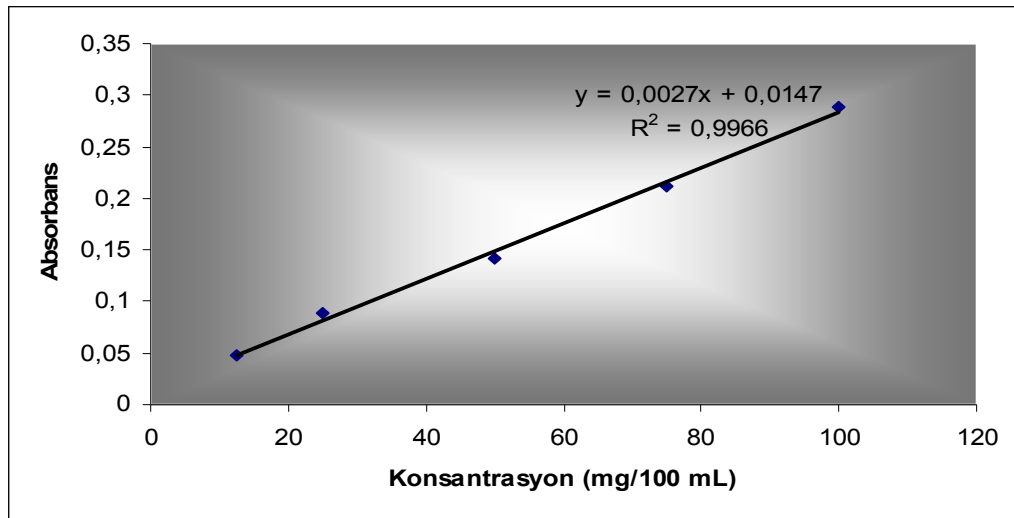
Tablo 3.8. Glutasyon Deney Protokolü

0,5 mL süpernatant + 0,75 mL çöktürme çözeltisi			
Doku homojenatları 4000 rpm de 15 dakika santrifüj			
İŞLEM SIRASI	DENEY	KÖR	STANDART
Süpernatant	0,5 mL		
Distile su		0,5 mL	
Standart glutasyon çözeltisi			0,5 mL
Sekonder sodyum fosfat	2 mL	2 mL	2 mL
DTNB (5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL
Vorteksledikten sonra oda ısısında 5 dakika bekletilir.			

$$\lambda = 412\text{nm}$$

Doku GSH düzeylerinin hesaplanması:

- Örneklerin konsantrasyonlarını hesaplayabilmek için glutatyon standardı 12.5, 25, 50, 75 ve 100 mg/100mL konsantrasyonlarında hazırlandı.
- Standart tüplerine 2 mL sekonder sodyum fosfat, 1,5 mL DTNB ve farklı konsantrasyonlardaki standartlardan 0,5 mL numaralandırılmış tüplere eklendi.
- Kör ve örnek tüplerinde olduğu gibi işlemlerden geçirildi ve 412 nm'de absorbansları okundu.
- Elde edilen absorbanslarla, konsantrasyon değerleri Microsoft Office Excel 2007 programı kullanılarak grafiğe geçirilerek standart grafiği elde edildi (Grafik 3.6).
- Örneklerin konsantrasyonları, standart grafiği kullanılarak hesaplandı.
- Aynı homojenatların total proteinleri ölçüldü ve örneklerin konsantrasyonları total proteinlerine oranlandı.
- Doku glutatyon düzeyleri $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein olarak verildi.



Grafik 3.6. Glutatyon standart grafiği

3.2.9. DOKU MALONDİALDEHİT DÜZEYLERİNİN ÖLÇÜMÜ

Ölçüm prensibi:

Yöntem, lipid peroksidasyonu son ürünlerinden olan malondialdehit (MDA)'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile verdiği renk reaksiyonuna dayanmaktadır (148).

Doku homojenatının hazırlanması:

Dokular -80°C 'lik derin dondurucudan çıkarıldı ve her biri tartıldı. Örnek sayısı kadar alınan ve numaralandırılan tüplere konuldu. Tüplere 1 gr doku için 9 mL hacimde olacak şekilde 0,15 N KCl solüsyonundan eklenerek örnekler homojenize edildi. Homojenatlar, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar alındı ve ölçüm için kullanıldı.

Çözeltiler:

- %8,1'lik sodyum dodesil sülfat (SDS): 8,1 gr SDS tartılıp, bir miktar distile suda eritildi ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.
- %20'lik Asetat Tamponu (pH:3,5): 20 ml asetik asit alındı ve 100 mL'ye tamamlandı. NaOH ile pH, 3,5'e ayarlandı.
- %0,8'lik TBA: 0,8 gr TBA tartılıp, bir miktar distile suda eritildi ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.
- N-butanol/pyridine karışımı: 15/1 hacimleri karıştırılarak kullanılmadan hemen önce hazırlandı.

Deney protokolü:

Kapaklı tüpler alınarak kör, standart ve örnek tüpleri hazırlandı. Kör tüpüne, 0,2 mL SDS, 1,5 mL asetat tamponu, 1,5 mL TBA ve 0,4 mL distile su; örnek tüplerine 0,4 mL süpernatant, 0,2 mL SDS, 1,5 mL asetat tamponu ve 1,5 mL TBA eklendi. Tüpler 95⁰C’de 60 dakika inkübasyona bırakıldı ve süre sonunda musluk suyu altında soğutuldu. Soğutulmuş tüplere n-butanol/pyridine karışımından 5’er mL eklenerek vortekslendi. 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki süpernatant alınarak ölçüm için kullanıldı. Örneklerin absorbansları 532 nm’de köre karşı okundu (Tablo 3.9).

Tablo 3.9. Malondialdehit Deney Protokolü

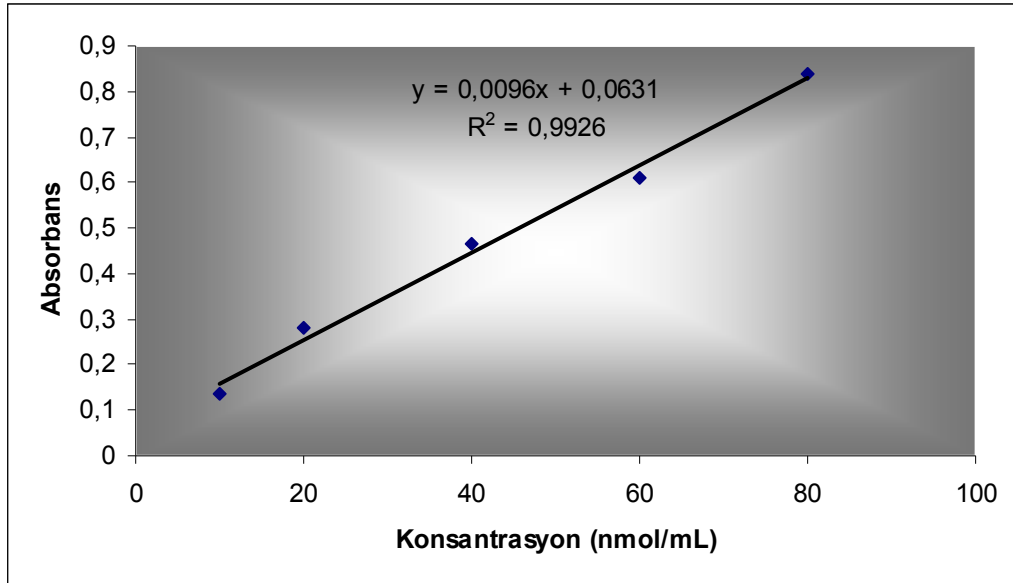
Doku homojenatları 4000 rpm de 15 dakika santrifüj			
İŞLEM SIRASI	DENEY	KÖR	STANDART
Süpernatant	0,4 mL		
Distile su		0,4 mL	
Standart			0,4 mL
SDS	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL
Asetat tamponu	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL
TBA	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL
60 dakika kaynar su banyosu			
N-Bütanol/piridin	5 mL	5 mL	5 mL
4000 rpm de 10 dakika santrifüj			

$$\lambda = 532 \text{ nm}$$

Doku MDA düzeylerinin hesaplanması:

- Örneklerin konsantrasyonlarını hesaplayabilmek için lipid peroksit standardı (1.1.3.3.tetraetoksipropan) 10, 20, 40, 60, 80, 100 nmol/mL konsantrasyonlarda hazırlandı.

- Standart tüplerine 0,2 mL SDS, 1,5 mL asetat tamponu ve 1,5 mL TBA konuldu ve farklı konsantrasyonlardaki standarttan 0,4 mL numaralandırılmış tüplere eklendi.
- Kör ve örnek tüplerinde olduğu gibi işlemlerden geçirildi ve 532 nm’de absorbansları okundu.
- Elde edilen absorbanslarla, konsantrasyon değerleri Microsoft Office Excel 2007 programı kullanılarak grafiğe geçirilerek standart grafiği elde edildi (Grafik 3.7).
- Örneklerin konsantrasyonları, standart grafiği kullanılarak hesaplandı.
- Aynı homojenatların total proteinleri ölçüldü ve örneklerin konsantrasyonları total proteinlerine oranlandı.
- Doku MDA sonuçları nmol/mg protein olarak verildi.



Grafik 3.7. Malondialdehit standart grafiği

3.2.10. KARACİĞER DOKUSU PROTEİN ÖLÇÜMÜ

Ölüm Prensibi:

Ölüm, Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının farklı konsantrasyonlardaki protein çözeltilerinde değişik şiddette mavi renk ortaya koymasına dayanan Bradford yöntemine göre yapıldı (26).

Doku homojenatının hazırlanması:

Arginaz, ornitin, NO, TSA, LSA, GSH ve MDA ölçümlerinde kullanılan homojenatlar kullanıldı ve ölçümlerin yapıldığı fraksiyonlarda protein değerleri belirlendi.

Çözeltiler:

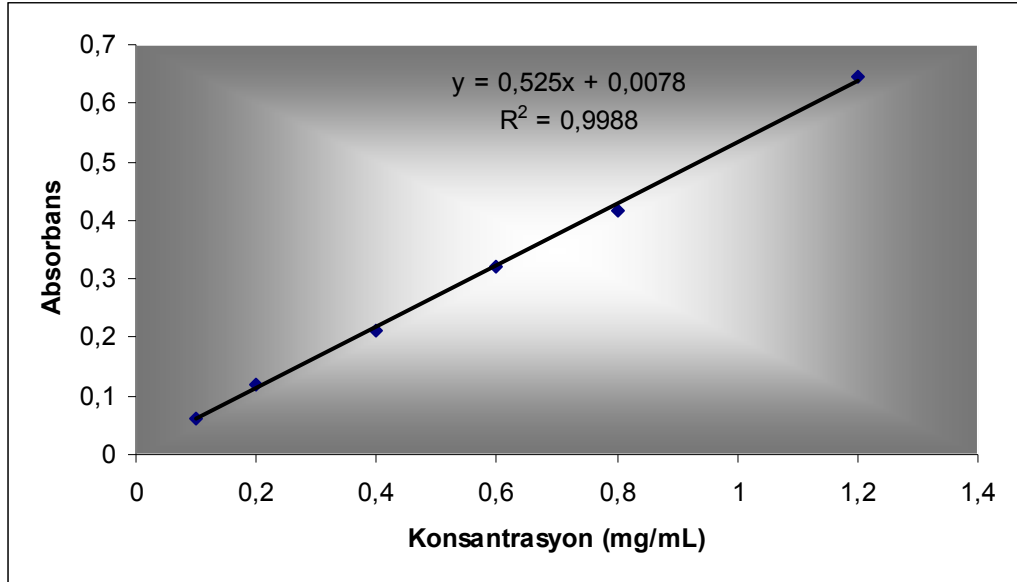
- Belirteç: 25 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 tartıldı. 12.5 mL %95'lik etanolde çözdürölüp üzerine 25 mL %85'lik H₃PO₄ eklendi. Son hacim distile su ile 250 mL'ye tamamlandı. Bu derişik çözeltidir. Kullanılacağı zaman 5 kat sulandırıldı. Whatman no 1 filtreden geçirildikten sonra kullanıldı.

Deney protokolü:

- Kör, örnek ve standart tüpleri hazırlandı.
- Kör tüpüne 0,1 mL distile su ve 5 mL belirteç eklendi. Örnek tüplerine 0,1 mL homojenat ve 5 mL belirteç eklendi.
- Tüpler vortekslelendikten sonra 5 dakika beklendi ve 595 nm'de absorbanları köre karşı okundu.

Sonucun hesaplanması:

- Örnek konsantrasyonlarının hesaplanabilmesi için protein standardı olarak bovine serum albumin (BSA) 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 ve 1,2 mg/mL konsantrasyonlarda hazırlandı.
- Belirteçten 5 mL ve farklı konsantrasyonlardaki standarttan 0,1 mL numaralandırılmış standart tüplerine eklendi.
- Vortekslenen tüpler 5 dakika bekledikten sonra 595 nm'de absorbansları okundu.
- Elde edilen absorbanslarla, konsantrasyon değerleri Microsoft Office Excel 2007 programı kullanılarak grafiğe geçirilerek standart grafiği elde edildi (Grafik 3.8).
- Örneklerin konsantrasyonları, standart grafiği kullanılarak hesaplandı.



Grafik 3.8. Protein (BSA) standart grafiği

3.2.11. KARACİĞER DOKUSU HİSTOLOJİK PREPERATLARIN HAZIRLANMASI

Kontrol, BB, CS, APAP, APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarını oluşturan tüm sıçanlardan karaciğer dokusu örnekleri alındı. Sıçanların karaciğer örnekleri, ışık mikroskopik düzeyde histolojik incelemelerinin yapılabilmesi için %10'luk formalin fiksatifine içine alınarak 48 saat süre ile fiksasyonları sağlandı. Fiksasyonları sağlanan örnekler fiksatifin çökmesini engellemek amacıyla 3-4 saat çeşme suyunda yıkandı. Çeşme suyuyla yıkanan doku parçaları daha sonra sırasıyla kademeli olarak %70'lik, %80'lik, %90'lık ve %96'lık alkol serilerinde 45'er dakika bekletilerek dehidratasyonları sağlandı. Dehidratasyonlarının ardından örnekler şeffaflandırılmak üzere 2 kez 20'er dakika ksilolde bekletildi. Karaciğer örnekleri şeffaflanmalarının ardından etüv içinde 65°C'de eritilmiş parafinlere alınarak 60 dakika süreyle üç ayrı parafinde bekletildi.

Parafinize edilen dokular ayrı ayrı parafin içeren kasetlere gömülerek bloklandı ve kesit alınmaya hazır duruma getirildi. Parafin bloklardan kesitlerin alınmasında kullanılacak mikrotom bıçağı buzdolabında soğutularak, mikrotom aracılığı ile her bir örnekten 5'er mikrometre kalınlığında doku kesitleri alındı. Kesitlerin 45°C'de su banyosunda açılmaları sağlanarak temiz lamalar üzerine alınmasından sonra etüv içinde 1 saat süre ile bekletilmeleri sağlandı. Preparatlar 1'er saat süre ile iki ayrı ksilolde tutulup deparafinizasyonları sağlandıktan sonra boyama aşamasına geçildi. Kesitlerin boyanmasında Hematoksilen-Eosin ikili boyası kullanıldı. Deparafinizasyonu yapılmış olan doku kesitleri 5'er dakika süreyle %96, %90, %80, %70'lik alkollerde ve distile suda bekletildi. Kesitler Hematoksilen ile 2 dakika ve Eosin ile 10 dakika boyandı. Çeşme suyu ile fazla boyası alınan kesitler hızla alkol serilerinden geçirilip dehidratasyonları sağlandı ve dokular iki ayrı ksilolde 30'ar dakika tutularak şeffaflandırıldı. Şeffaflanan dokular daha sonra entellan ile kapatılarak ışık mikroskopik düzeyde Olympus BH-2 mikroskop ile değerlendirmeleri yapıldı ve karaciğer örneklerini içeren tüm preparatların Olympus DP-70 digital kamera ile fotoğrafları çekildi.

Bulguların değerlendirilmesinde yoğun hücrel dejenerasyon, sinüzoidal dilatasyon, vasküler konjesyon ve hücrel inflamasyona göre skorlama yapılmıştır. Karaciğer dokularında oluşan yapısal değişiklikler Abdel-Wahhab ve arkadaşlarının (2) yapmış oldukları skorlamaya göre değerlendirildi.

Skorlamada:

- (-) skor (0, negatif skor): hiçbir yapısal değişikliğin olmaması, hasar yok
- (+) skor (1 pozitif skor): hafif derecede hasar
- (++) skor (2 pozitif skor): orta derecede hasar
- (+++) skor (3 pozitif skor): ciddi derecede yapısal hasar olarak belirtildi.

3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 20.0 paket programı kullanıldı. Gruplar arasında klinik ve metabolik değişken ölçümleri açısından fark olup olmadığını analiz etmek için öncelikle dağılımların normal dağılıma uygunlukları analiz edildi. Parametrik verilerin normal dağılıp dağılmadığı Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testleri kullanılarak değerlendirildi. Normal dağılım gösteren verilerin karşılaştırmaları Tek Yönlü Varyans Analiz (Oneway ANOVA) testi ve grupların çoklu karşılaştırmalarında TUKEY HSD testi ve Student Newman Keuls testi kullanılmıştır. Veriler, ortalama±standart sapma (SD, standard deviation) olarak verildi. Normal dağılım göstermeyen verilerin karşılaştırmalarında Kruskal-Wallis testi ve grupların çoklu karşılaştırmalarında TUKEY HSD testi ve Student Newman Keuls testi kullanılmıştır. Veriler ortanca değer, 25'inci ve 75'inci yüzdeler olarak ifade edilmiştir. Değişkenler arasındaki ilişkiyi gösterebilmek için normalite testleri sonucuna göre Pearson ve Spearman korelasyon testlerinden yararlanıldı. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulguların istatistiki anlamlılıkları belirtilmiş ve gruplara ait veriler hem tablo hem de grafik halinde verilmiştir.

4.1. RAT AĞIRLIK BULGULARI

Çalışma gruplarının, çalışma başında ve sonundaki rat ağırlıkları Tablo 4.1' de verilmiştir. Çalışma başında, gruplar arasında ağırlık bakımından istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p>0,05$).

Tablo 4.1. Çalışma başında ve sonunda rat ağırlıkları

Gruplar	N	Çalışma başında rat ağırlıkları	Çalışma sonunda rat ağırlıkları
Kontrol	9	221,22 ± 5,59	223,11 ± 2,40
BB	9	218,67 ± 11,14	225,56 ± 8,78
CS	9	222,78 ± 7,50	196,00 ± 9,21
APAP	9	224,00 ± 16,23	194,67 ± 7,12
APAP+BB	9	218,67 ± 9,43	206,11 ± 6,53
APAP+CS	9	225,33 ± 17,64	200,78 ± 10,34
APAP+BB+CS	9	220,89 ± 11,67	213,00 ± 11,12

Verilerin karşılaştırılmaları Oneway ANOVA testi ve grupların çoklu karşılaştırılmalarında TUKEY HSD testi ve Student Newman Keuls testi kullanılmıştır.

İstatistiksel sonuçlar ortalama ± standart sapma (SD) olarak verildi.

Çalışma sonunda rat ağırlıkları değerlendirildiğinde APAP, CS ve APAP+CS gruplarında kontrol grubuna göre ileri derecede önemli ($p<0,001$), APAP+BB ve APAP+BB+CS gruplarında kontrol grubuna göre önemli ($p<0,05$) düzeyde azalma gözlemlendi. BB grubunda ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak fark ($p>0,05$) bulunmadı.

Rat ağırlıkları APAP grubuna göre değerlendirildiğinde, APAP+BB+CS grubunda ileri derecede önemli ($p<0,001$), APAP+BB grubunda önemli düzeyde ($p<0,05$) artış bulundu. APAP+CS grubunda da istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p>0,05$). Çalışmamızda APAP, CS, APAP+BB ve APAP+CS gruplarının rat ağırlıklarında BB grubuna göre ileri derecede önemli ($p<0,001$), APAP+BB+CS grubunda da önemli düzeyde ($p<0,05$) azalma gözlemlendi. Çalışma gruplarımızın rat ağırlıkları CS grubuna göre değerlendirildiğinde, APAP+BB+CS grubunda önemli düzeyde ($p<0,05$) artış gözlemlendi. APAP, APAP+BB ve APAP+CS gruplarının rat ağırlıklarında CS grubuna göre istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p>0,05$). Tedavi gruplarımız olan APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS kendi aralarında değerlendirildiğinde istatistiksel olarak fark ($p>0,05$) bulunmamıştır.

4.2. SERUM AST BULGULARI

Çalışma gruplarımızın serum AST enzim aktivitelerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi Tablo 4.2’de verilmiştir. Çalışma gruplarımızın serum AST enzim aktiviteleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde APAP grubunda kontrol grubuna göre ileri derecede önemli ($p<0,001$), APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarında çok önemli ($p<0,01$) düzeyde artış bulundu. BB ve CS gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli fark ($p>0,05$) bulunmadı. APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarının serum AST enzim aktivitelerinde APAP grubuna göre ileri derecede önemli ($p<0,001$) azalma bulundu.

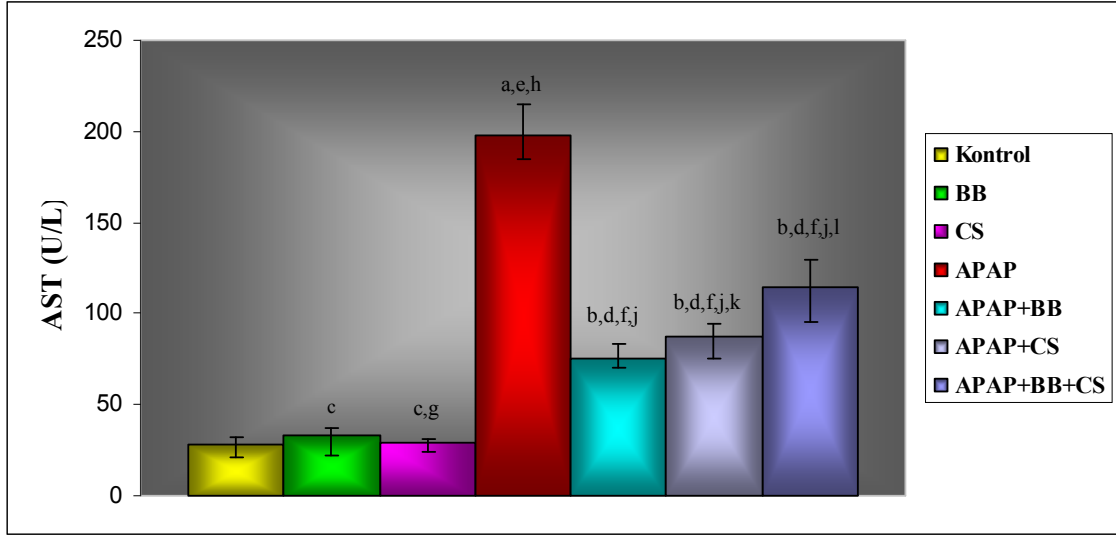
Tablo 4.2. Çalışma gruplarının serum AST enzim aktiviteleri

Gruplar	N	AST(U/L)
		Median (%25 - %75)
Kontrol	9	28,00 (21,25 - 32,25)
BB	9	33,00 (22,50 - 37,25)
CS	9	29,00 (23,50 - 31,25)
APAP	9	198,00 (184,25 – 215,50)
APAP+BB	9	75,00 (70,50 - 83,75)
APAP+CS	9	87,00 (75,75 - 94,25)
APAP+BB+CS	9	114,00 (95,75 – 130,00)

Verilerin karşılaştırılmalarında Kruskal-Wallis testi ve grupların çoklu karşılaştırılmalarında TUKEY HSD testi ve Student Newman Keuls testi kullanılmıştır.

İstatistiksel sonuçlar median (%25-%75) olarak verildi.

Serum AST enzim aktiviteleri BB grubuna göre değerlendirildiğinde APAP grubunda ileri derecede önemli ($p<0,001$), APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarında ise çok önemli ($p<0,01$) düzeyde artış gözlemlendi. CS grubunda ise BB grubuna göre istatistiksel olarak önemli fark ($p>0,05$) bulunmadı. Çalışma gruplarımızı CS grubuna göre değerlendirdiğimizde serum AST aktivitelerinde APAP grubunda ileri derecede önemli ($p<0,001$), APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarında çok önemli ($p<0,01$) düzeyde artış bulundu. Tedavi gruplarımız kendi aralarında değerlendirildiğinde, APAP+BB+CS grubunun serum AST aktivitelerinde APAP+BB grubuna göre önemli düzeyde ($p<0,05$) artış bulunmuş, APAP+CS grubunda istatistiksel olarak fark ($p>0,05$) bulunmamıştır (Grafik 4.1).



Grafik 4.1. Çalışma gruplarının serum AST enzim aktiviteleri

Kontrole göre : a; $p < 0,001$, b; $p < 0,01$, c; $p > 0,05$.

APAP grubuna göre : d; $p < 0,001$.

BB grubuna göre : e; $p < 0,001$, f; $p < 0,01$, g; $p > 0,05$.

CS grubuna göre : h; $p < 0,001$, j; $p < 0,01$.

APAP+BB grubuna göre fark: k; $p > 0,05$, l; $p < 0,05$.

4.3. SERUM ALT BULGULARI

Çalışma gruplarımızın serum ALT enzim aktivitelerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi Tablo 4.3' de verilmiştir. Çalışma gruplarımızın serum ALT enzim aktiviteleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde APAP grubunda kontrol grubuna göre ileri derecede önemli artış ($p < 0,001$), APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarında çok önemli ($p < 0,01$) düzeyde artış gözlemlendi. BB ve CS gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli fark ($p > 0,05$) bulunmadı. APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarının serum ALT enzim aktivitelerinde APAP grubuna göre ileri derecede önemli ($p < 0,001$) azalma bulundu.

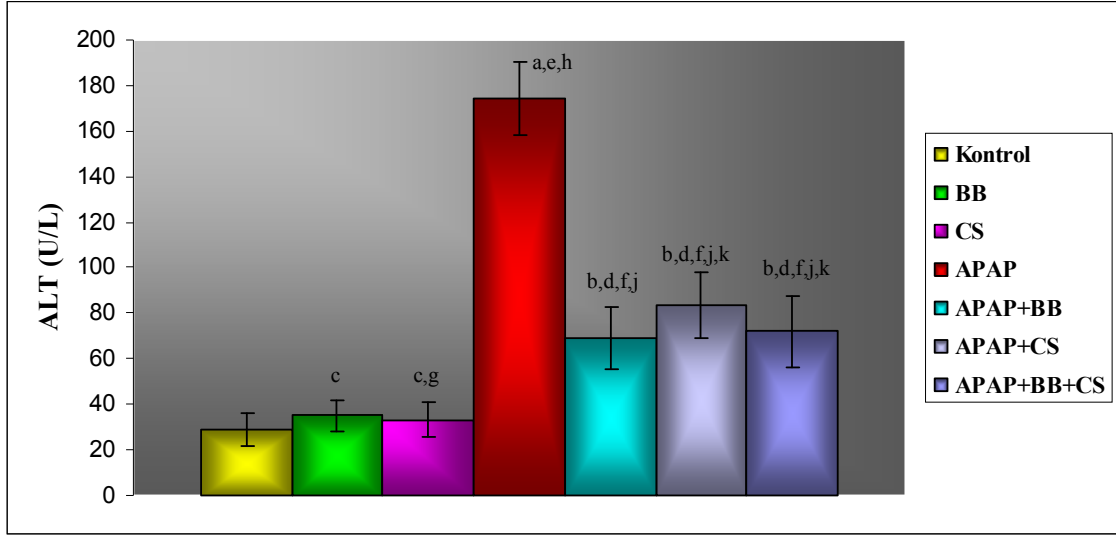
Tablo 4.3. Çalışma gruplarının serum ALT enzim aktiviteleri

Gruplar	N	ALT(U/L)
Kontrol	9	28,89 ± 7,08
BB	9	35,00 ± 6,57
CS	9	33,33 ± 7,29
APAP	9	174,33 ± 15,77
APAP+BB	9	69,34 ± 13,79
APAP+CS	9	83,44 ± 14,32
APAP+BB+CS	9	72,25 ± 15,66

Verilerin karşılaştırılmaları Oneway ANOVA testi ve grupların çoklu karşılaştırılmalarında TUKEY HSD testi ve Student Newman Keuls testi kullanılmıştır.

İstatistiksel sonuçlar ortalama ± standart sapma (SD) olarak verildi.

Serum ALT enzim aktiviteleri BB grubuna göre değerlendirildiğinde APAP grubunda ileri derecede önemli ($p<0,001$), APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarında ise çok önemli ($p<0,01$) düzeyde artış bulundu. CS grubunda ise BB grubuna göre istatistiksel olarak önemli fark ($p>0,05$) bulunmadı. Çalışma gruplarımızı CS grubuna göre değerlendirdiğimizde serum ALT enzim aktivitelerinde APAP grubunda ileri derecede önemli ($p<0,001$), APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarında çok önemli ($p<0,01$) düzeyde artış bulundu. Tedavi gruplarımız kendi aralarında değerlendirildiğinde APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarının serum ALT enzim aktivitelerinde APAP+BB grubuna göre istatistiksel olarak fark ($p>0,05$) bulunmamıştır (Grafik 4.2).



Grafik 4.2. Çalışma gruplarının serum ALT enzim aktiviteleri

Kontrole göre : a; $p < 0,001$, b; $p < 0,01$, c; $p > 0,05$.

APAP grubuna göre : d; $p < 0,001$.

BB grubuna göre : e; $p < 0,001$, f; $p < 0,01$, g; $p > 0,05$.

CS grubuna göre : h; $p < 0,001$, j; $p < 0,01$.

APAP+BB grubuna göre : k; $p > 0,05$.

4.4. SERUM ALP BULGULARI

Çalışma gruplarımızın serum ALP enzim aktivitelerinin istatistiksel açıdan değerlendirilmesi Tablo 4.4’de verilmiştir. Çalışma gruplarımızın serum ALP enzim aktiviteleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde APAP grubunda kontrol grubuna göre ileri derecede önemli ($p < 0,001$), APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarında çok önemli ($p < 0,01$) düzeyde artış gözlemlendi. BB ve CS gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli fark ($p > 0,05$) bulunmadı. APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarının serum ALP aktivitelerinde APAP grubuna göre ileri derecede önemli ($p < 0,001$) azalma bulundu.

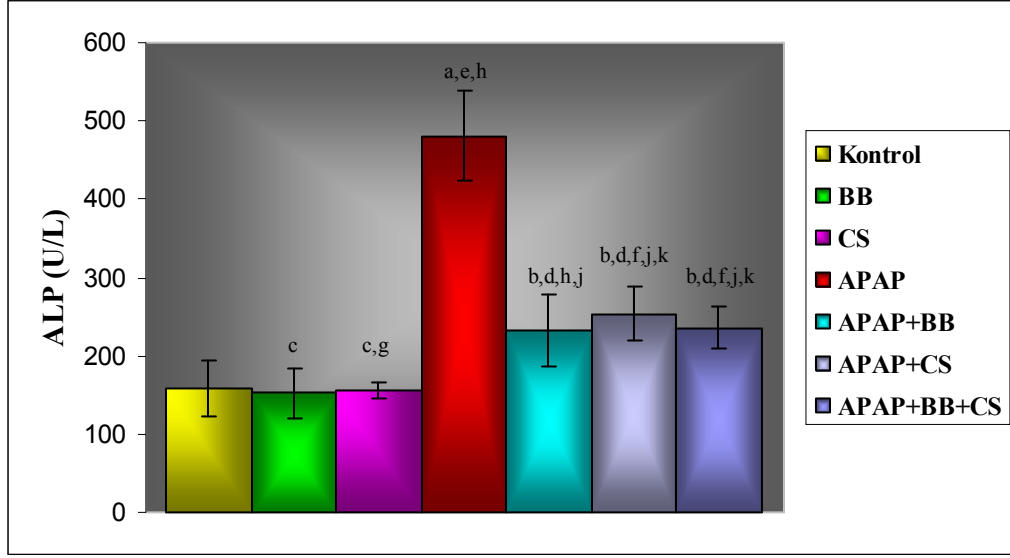
Tablo 4.4. Çalışma gruplarının serum ALP enzim aktiviteleri

Gruplar	N	ALP(U/L)
Kontrol	9	157,78 ± 35,61
BB	9	152,22 ± 32,23
CS	9	156,00 ± 11,03
APAP	9	480,67 ± 57,32
APAP+BB	9	232,44±45,12
APAP+CS	9	254,00 ± 34,27
APAP+BB+CS	9	236,10 ± 26,35

Verilerin karşılaştırılmaları Oneway ANOVA testi ve grupların çoklu karşılaştırılmalarında TUKEY HSD testi ve Student Newman Keuls testi kullanılmıştır.

İstatistiksel sonuçlar ortalama ± standart sapma (SD) olarak verildi.

Serum ALP enzim aktiviteleri BB grubuna göre değerlendirildiğinde APAP grubunda ileri derecede önemli ($p<0,001$), APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarında ise çok önemli ($p<0,01$) düzeyde artış bulundu. CS grubunda ise BB grubuna göre istatistiksel olarak önemli fark ($p>0,05$) bulunmadı. Çalışma gruplarımızı CS grubuna göre değerlendirdiğimizde serum ALP enzim aktivitelerinde APAP grubunda ileri derecede önemli ($p<0,001$), APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarında çok önemli ($p<0,01$) düzeyde artış bulundu. Tedavi gruplarımız kendi aralarında değerlendirildiğinde APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarının serum ALP enzim aktivitelerinde APAP+BB grubuna göre istatistiksel olarak fark ($p>0,05$) bulunmamıştır (Grafik 4.3).



Grafik 4.3. Çalışma gruplarının serum ALP enzim aktiviteleri

Kontrolle göre : a; $p < 0,001$, b; $p < 0,01$, c; $p > 0,05$.

APAP grubuna göre : d; $p < 0,001$.

BB grubuna göre : e; $p < 0,001$, f; $p < 0,01$, g; $p > 0,05$.

CS grubuna göre : h; $p < 0,001$, j; $p < 0,01$.

APAP+BB grubuna göre : k; $p > 0,05$.

4.5. SERUM LDH BULGULARI

Çalışma gruplarımızın serum LDH enzim aktivitelerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi Tablo 4.5’ de verilmiştir. Çalışma gruplarımızın serum LDH enzim aktiviteleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde APAP, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarında kontrol grubuna göre ileri derecede önemli ($p < 0,001$), APAP+BB grubunda ise çok önemli ($p < 0,01$) düzeyde artış oldu. BB ve CS gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli fark ($p > 0,05$) bulunmadı. APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarının serum LDH enzim aktivitelerinde APAP grubuna göre ileri derecede önemli ($p < 0,001$) azalma bulundu.

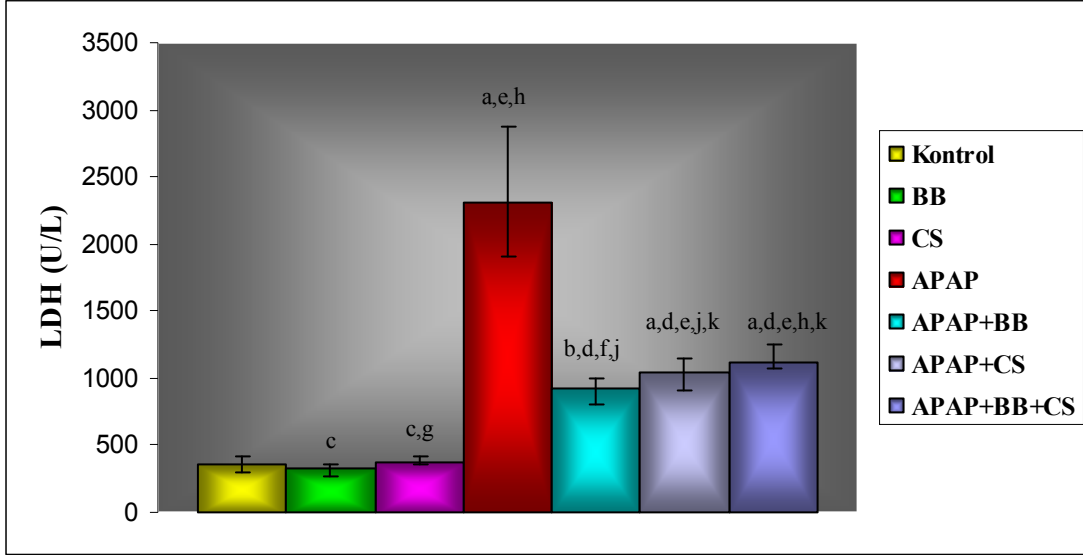
Tablo 4.5. Çalışma gruplarının serum LDH enzim aktiviteleri

Gruplar	N	LDH (U/L)
		Median (%25 - %75)
Kontrol	9	363,00 (332,00 – 423,00)
BB	9	327,00 (265,50 – 358,25)
CS	9	368,00 (351,00 – 421,25)
APAP	9	2313,00 (1904,00 – 2875,25)
APAP+BB	9	929,00 (810,75 - 1005,25)
APAP+CS	9	1046,00 (908,75 - 1143,25)
APAP+BB+CS	9	1117,00 (1077,50 – 1246,00)

Verilerin karşılaştırılmalarında Kruskal-Wallis testi ve grupların çoklu karşılaştırılmalarında TUKEY HSD testi ve Student Newman Keuls testi kullanılmıştır.

İstatistiksel sonuçlar median (%25-%75) olarak verildi.

Serum LDH enzim aktiviteleri BB grubuna göre değerlendirildiğinde APAP, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarında ileri derecede önemli ($p<0,001$), APAP+BB grubunda ise çok önemli ($p<0,01$) düzeyde artış bulundu. CS grubunda ise BB grubuna göre istatistiksel olarak önemli fark ($p>0,05$) bulunmadı. Çalışma gruplarımızı CS grubuna göre değerlendirdiğimizde LDH enzim aktivitelerinde APAP ve APAP+BB+CS gruplarında ileri derecede önemli ($p<0,001$), APAP+BB, APAP+CS gruplarında çok önemli düzeyde ($p<0,01$) artış bulundu. Tedavi gruplarımız kendi aralarında değerlendirildiğinde APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarının LDH enzim aktivitelerinde APAP+BB grubuna göre istatistiksel olarak fark ($p>0,05$) bulunmamıştır (Grafik 4.4).



Grafik 4.4. Çalışma gruplarının serum LDH enzim aktiviteleri

Kontrole göre : a; $p < 0,001$, b; $p < 0,01$, c; $p > 0,05$.

APAP grubuna göre : d; $p < 0,001$.

BB grubuna göre : e; $p < 0,001$, f; $p < 0,01$, g; $p > 0,05$.

CS grubuna göre : h; $p < 0,001$, j; $p < 0,01$.

APAP+BB grubuna göre : k; $p > 0,05$.

4.6. DOKU ARGİNAZ BULGULARI

Çalışma gruplarımızın doku arginaz enzim aktivitelerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi Tablo 4.6'da verilmiştir. Çalışma gruplarımızın doku arginaz enzim aktivitelerini kontrol grubuna göre değerlendirdiğimizde, APAP grubunda ileri derecede önemli ($p < 0,001$), APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarında çok önemli düzeyde ($p < 0,01$) artış bulunmuştur. BB ve CS gruplarının doku arginaz enzim aktivitelerinde ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak fark ($p > 0,05$) bulunmamıştır.

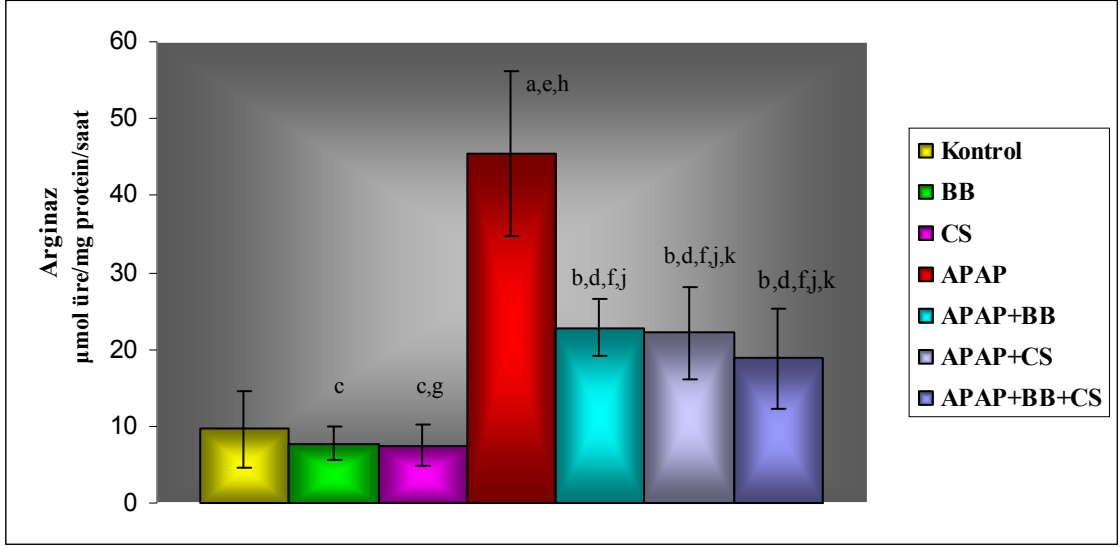
Tablo 4.6. Çalışma gruplarının doku arginaz enzim aktiviteleri

Gruplar	N	Arginaz ($\mu\text{mol üre/mg protein/saat}$)
Kontrol	9	9,59 \pm 4,96
BB	9	7,78 \pm 2,27
CS	9	7,52 \pm 3,63
APAP	9	45,42 \pm 10,64
APAP+BB	9	22,80 \pm 4,23
APAP+CS	9	22,16 \pm 6,02
APAP+BB+CS	9	18,77 \pm 6,62

Verilerin karşılaştırılmaları Oneway ANOVA testi ve grupların çoklu karşılaştırılmalarında TUKEY HSD testi ve Student Newman Keuls testi kullanılmıştır.

İstatistiksel sonuçlar ortalama \pm standart sapma (SD) olarak verildi.

APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarının doku arginaz enzim aktivitelerinde APAP grubuna göre ileri derecede önemli ($p<0,001$) azalma bulundu. Arginaz enzim aktiviteleri BB grubuna göre değerlendirildiğinde, APAP grubunda ileri derecede önemli ($p<0,001$), APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarında çok önemli düzeyde ($p<0,01$) artış bulunmuştur. Kontrol ve CS gruplarında, BB grubuna göre istatistiksel olarak fark ($p>0,05$) bulunmamıştır. Çalışma gruplarımızı CS grubuna göre değerlendirdiğimizde, APAP grubunda ileri derecede önemli ($p<0,001$), APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarında çok önemli ($p<0,01$) düzeyde artış bulunmuştur. Tedavi gruplarımızı kendi aralarında değerlendirdiğimizde APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarının arginaz enzim aktivitelerinde APAP+BB grubuna göre istatistiksel olarak fark ($p>0,05$) bulunmamıştır (Grafik 4.5).



Grafik 4.5. Çalışma gruplarının doku arginaz enzim aktiviteleri

Kontrole göre : a; $p < 0,001$, b; $p < 0,01$, c; $p > 0,05$.

APAP grubuna göre : d; $p < 0,001$.

BB grubuna göre : e; $p < 0,001$, f; $p < 0,01$, g; $p > 0,05$.

CS grubuna göre : h; $p < 0,001$, j; $p < 0,01$.

APAP+BB grubuna göre : k; $p > 0,05$.

4.7. DOKU ORNİTİN BULGULARI

Çalışma gruplarımızın doku ornitin düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi Tablo 4.7' de verilmiştir. Çalışma gruplarımızın doku ornitin düzeylerini kontrol grubuna göre değerlendirdiğimizde APAP grubunda ileri derecede önemli ($p < 0,001$) artış bulunmuştur. APAP+BB, APAP+CS, APAP+BB+CS, BB ve CS gruplarının doku ornitin düzeylerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak fark ($p > 0,05$) bulunmamıştır. APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarının ornitin düzeylerinde APAP grubuna göre ileri derecede önemli ($p < 0,001$) azalma bulunmuştur.

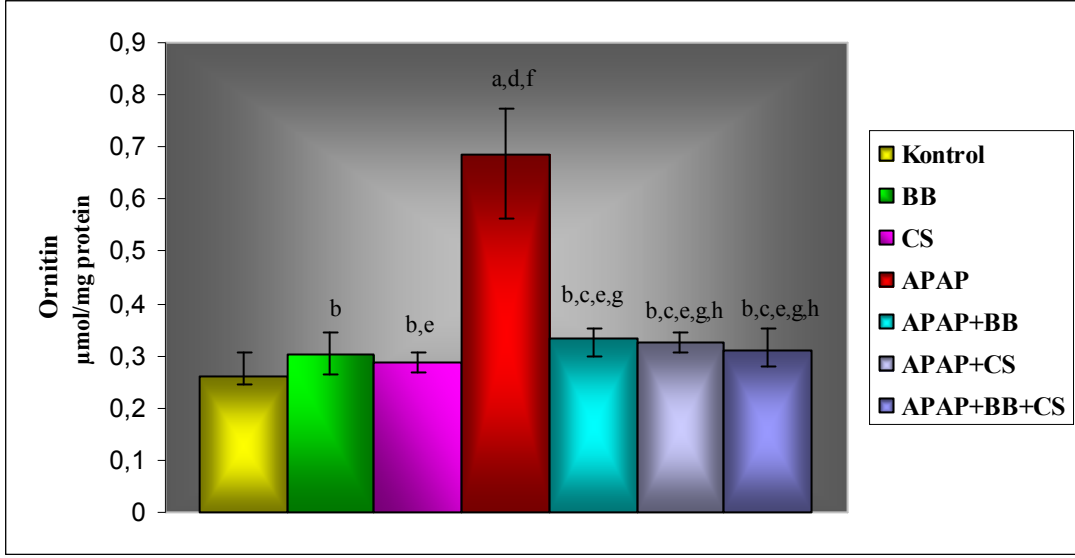
Tablo 4.7. Çalışma gruplarının doku ornitin düzeyleri

Gruplar	N	Ornitin düzeyleri ($\mu\text{mol/mg protein}$)
		Median (%25-%75)
Kontrol	9	0,26 (0,25 - 0,31)
BB	9	0,30 (0,30 - 0,32)
CS	9	0,29 (0,28 - 0,31)
APAP	9	0,69 (0,56 - 0,78)
APAP+BB	9	0,33 (0,29 - 0,35)
APAP+CS	9	0,32 (0,30 - 0,33)
APAP+BB+CS	9	0,31 (0,28 - 0,35)

Verilerin karşılaştırılmalarında Kruskal-Wallis testi ve grupların çoklu karşılaştırılmalarında TUKEY HSD testi ve Student Newman Keuls testi kullanılmıştır.

İstatistiksel sonuçlar median (%25-%75) olarak verildi.

Ornitin düzeyleri BB grubuna göre değerlendirildiğinde, APAP grubunda ileri derecede önemli ($p<0,001$) artış bulundu. APAP+BB, APAP+CS APAP+BB+CS, kontrol ve CS gruplarında, BB grubuna göre istatistiksel olarak fark ($p>0,05$) bulunmamıştır. Çalışma gruplarımızı CS grubuna göre değerlendirdiğimizde, APAP grubunda ileri derecede önemli ($p<0,001$) artış bulunmuş, APAP+BB, APAP+CS APAP+BB+CS gruplarında CS grubuna göre istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Tedavi gruplarımızı kendi aralarında değerlendirdiğimizde, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarının doku ornitin düzeylerinde APAP+BB grubuna göre istatistiksel olarak fark ($p>0,05$) bulunmamıştır (Grafik 4.6).



Grafik 4.6. Çalışma gruplarının doku ornitin düzeyleri

Kontrole göre : a; $p < 0,001$, b; $p > 0,05$.

APAP grubuna göre : c; $p < 0,001$.

BB grubuna göre : d; $p < 0,001$, e; $p > 0,05$.

CS grubuna göre : f; $p < 0,001$, g; $p > 0,05$.

APAP+BB grubuna göre : h; $p > 0,05$

4.8. DOKU NİTRİK OKSİT BULGULARI

Çalışma gruplarımızın doku NO düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi Tablo 4.8' de verilmiştir. Çalışma gruplarımızın doku NO düzeylerini kontrol grubuna göre değerlendirdiğimizde APAP, APAP+CS ve APAP+BB gruplarında ileri derecede önemli ($p < 0,001$), BB, CS ve APAP+BB+CS gruplarında önemli ($p < 0,05$) düzeyde azalma bulunmuştur. APAP+BB ve APAP+CS gruplarının NO düzeylerinde APAP grubuna göre önemli düzeyde ($p < 0,05$), APAP+BB+CS grubunun doku NO düzeylerinde ileri derecede önemli ($p < 0,001$) artış bulunmuştur.

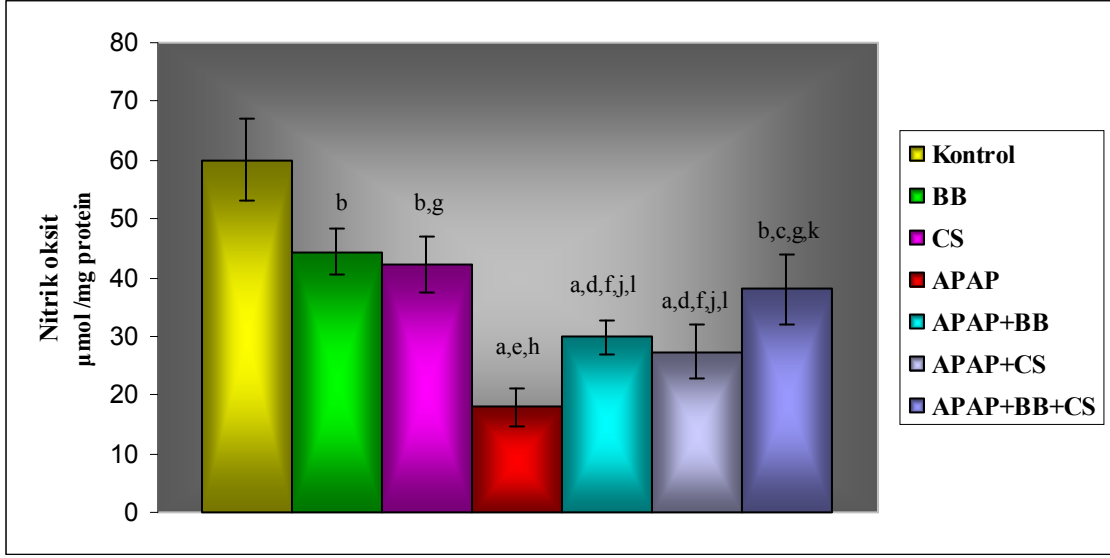
Tablo 4.8. Çalışma gruplarının doku NO düzeyleri

Gruplar	N	NO ($\mu\text{mol} / \text{mg protein}$)
Kontrol	9	60,08 \pm 7,05
BB	9	44,31 \pm 3,88
CS	9	42,33 \pm 4,80
APAP	9	17,95 \pm 3,26
APAP+BB	9	29,91 \pm 2,89
APAP+CS	9	27,27 \pm 4,57
APAP+BB+CS	9	38,04 \pm 6,02

Verilerin karşılaştırılmaları Oneway ANOVA testi ve grupların çoklu karşılaştırılmalarında TUKEY HSD testi ve Student Newman Keuls testi kullanılmıştır.

İstatistiksel sonuçlar ortalama \pm standart sapma (SD) olarak verildi.

Doku NO düzeyleri BB grubuna göre değerlendirildiğinde, APAP grubunda ileri derecede önemli ($p < 0,001$), APAP+BB, APAP+CS gruplarında önemli düzeyde ($p < 0,05$) azalma bulunmuştur. CS ve APAP+BB+CS gruplarında BB grubuna göre istatistiksel olarak fark ($p > 0,05$) bulunmamıştır. Çalışma gruplarımızı CS grubuna göre değerlendirdiğimizde, APAP grubunda ileri derecede önemli ($p < 0,001$), APAP+BB, APAP+CS gruplarında önemli düzeyde ($p < 0,05$) azalma bulunmuştur. APAP+BB+CS grubunun NO düzeylerinde CS grubuna göre istatistiksel olarak fark ($p > 0,05$) bulunmamıştır. Tedavi gruplarımızı kendi arasında değerlendirdiğimizde, APAP+CS ve APAP+BB gruplarının doku NO düzeylerinde APAP+BB+CS grubuna göre önemli ($p < 0,05$) düzeyde azalma bulunmuştur (Grafik 4.7).



Grafik 4.7. Çalışma gruplarının doku NO düzeyleri

Kontrole göre : a; $p < 0,001$, b; $p < 0,05$.

APAP grubuna göre : c; $p < 0,001$, d; $p < 0,05$.

BB grubuna göre : e; $p < 0,001$, f; $p < 0,05$, g; $p > 0,05$.

CS grubuna göre : h; $p < 0,001$, j; $p < 0,05$, k; $p > 0,05$.

APAP+BB+CS grubuna göre : l; $p < 0,05$.

4.9. DOKU TOTAL SİYALİK ASİT BULGULARI

Çalışma gruplarımızın doku TSA düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi Tablo 4.9' da verilmiştir. Çalışma gruplarımızın doku TSA düzeylerini kontrol grubuna göre değerlendirdiğimizde APAP grubunda ileri derecede önemli ($p < 0,001$), APAP+CS, APAP+BB ve APAP+BB+CS gruplarında çok önemli derecede ($p < 0,01$) artış bulunmuştur. BB ve CS gruplarının doku TSA düzeylerinde kontrol grubuna göre istatistiksel fark ($p > 0,05$) bulunmamıştır. APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarının TSA düzeylerinde APAP grubuna göre ileri derecede ($p < 0,001$) önemli azalma bulunmuştur.

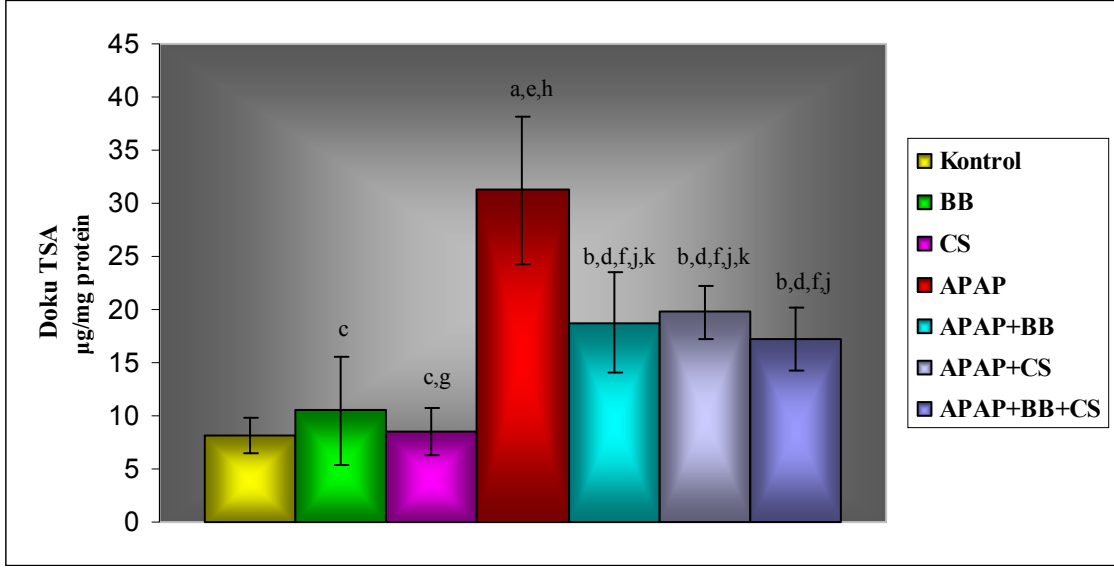
Tablo 4.9. Çalışma gruplarının doku TSA düzeyleri

Gruplar	N	TSA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)
Kontrol	9	8,18 \pm 1,61
BB	9	10,54 \pm 5,09
CS	9	8,51 \pm 2,19
APAP	9	31,21 \pm 6,89
APAP+BB	9	18,77 \pm 4,67
APAP+CS	9	19,76 \pm 2,50
APAP+BB+CS	9	17,23 \pm 3,02

Verilerin karşılaştırılmaları Oneway ANOVA testi ve grupların çoklu karşılaştırılmalarında TUKEY HSD testi ve Student Newman Keuls testi kullanılmıştır.

İstatistiksel sonuçlar ortalama \pm standart sapma (SD) olarak verildi.

TSA düzeyleri BB grubuna göre değerlendirildiğinde, APAP grubunda ileri derecede önemli ($p<0,001$), APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarında çok önemli derecede ($p<0,01$) artış bulunmuştur. Kontrol ve CS gruplarında BB grubuna göre istatistiksel olarak fark ($p>0,05$) bulunmamıştır. Çalışma gruplarımızı CS grubuna göre değerlendirdiğimizde, APAP grubunda ileri derecede önemli ($p<0,001$), APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarında çok önemli derecede ($p<0,01$) artış bulunmuştur. Tedavi gruplarımızı kendi aralarında değerlendirdiğimizde APAP+CS ve APAP+BB gruplarının TSA düzeylerinde APAP+BB+CS grubuna göre istatistiksel olarak fark ($p>0,05$) bulunmamıştır (Grafik 4.8).



Grafik 4.8. Çalışma gruplarının doku TSA düzeyleri

Kontrole göre : a; $p < 0,001$, b; $p < 0,01$, c; $p > 0,05$.

APAP grubuna göre : d; $p < 0,001$.

BB grubuna göre : e; $p < 0,001$, f; $p < 0,01$, g; $p > 0,05$.

CS grubuna göre : h; $p < 0,001$, j; $p < 0,01$.

APAP+BB+CS grubuna göre : k; $p > 0,05$.

4.10. SERUM TOTAL SİALİK ASİT BULGULARI

Çalışma gruplarımızın serum TSA düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi Tablo 4.10' da verilmiştir. Çalışma gruplarımızın serum TSA düzeylerini kontrol grubuna göre değerlendirdiğimizde APAP grubunda ileri derecede önemli ($p < 0,001$) artış bulunmuş, BB, APAP+CS, APAP+BB ve APAP+BB+CS gruplarında istatistiksel olarak fark ($p > 0,05$) bulunmamıştır. CS grubunun serum TSA düzeylerinde kontrol grubuna göre önemli düzeyde ($p < 0,05$) azalma bulunmuştur. APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarının serum TSA düzeylerinde APAP grubuna göre ileri derecede önemli ($p < 0,001$) azalma bulunmuştur.

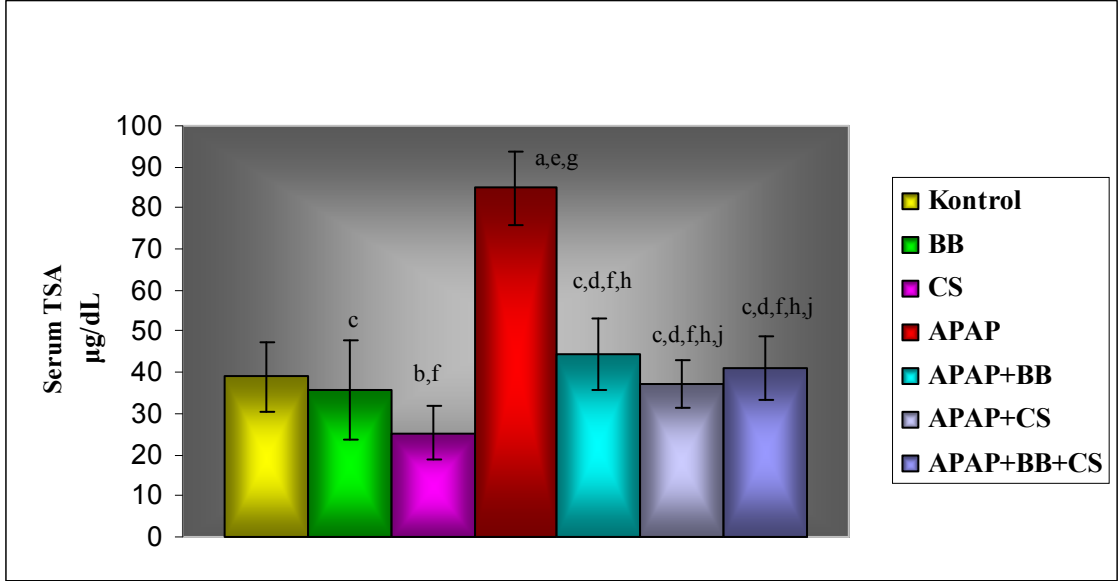
Tablo 4.10. Çalışma gruplarının serum TSA düzeyleri

Gruplar	N	TSA (mg/dL)
Kontrol	9	39,11 ± 8,45
BB	9	35,85 ± 12,14
CS	9	25,36 ± 6,34
APAP	9	84,88 ± 8,96
APAP+BB	9	44,65 ± 8,72
APAP+CS	9	37,06 ± 5,81
APAP+BB+CS	9	40,94 ± 7,67

Verilerin karşılaştırılmaları Oneway ANOVA testi ve grupların çoklu karşılaştırılmalarında TUKEY HSD testi ve Student Newman Keuls testi kullanılmıştır.

İstatistiksel sonuçlar ortalama ± standart sapma (SD) olarak verildi.

Serum TSA düzeyleri BB grubuna göre değerlendirildiğinde, APAP grubunda ileri derecede önemli ($p<0,001$) artış bulundu. CS, APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarının serum TSA düzeylerinde, BB grubuna göre istatistiksel olarak fark ($p>0,05$) bulunmadı. Çalışma gruplarımızı CS grubuna göre değerlendirdiğimizde, APAP grubunda ileri derecede önemli ($p<0,001$), APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarında önemli derecede ($p<0,05$) artış bulundu. Tedavi gruplarımızı kendi arasında değerlendirdiğimizde, APAP+CS ve APAP+BB gruplarının serum TSA düzeylerinde APAP+BB+CS grubuna göre istatistiksel olarak fark ($p>0,05$) bulunmamıştır ($p>0,05$) (Grafik 4.9).



Grafik 4.9. Çalışma gruplarının serum TSA düzeyleri

Kontrolle göre : a; $p < 0,001$, b; $p < 0,05$, c; $p > 0,05$.

APAP grubuna göre : d; $p < 0,001$.

BB grubuna göre : e; $p < 0,001$, f; $p > 0,05$.

CS grubuna göre : g; $p < 0,001$, h; $p < 0,01$.

APAP+BB grubuna göre : j; $p > 0,05$.

4.11. DOKU LİPİD BAĞLI SİALİK ASİT BULGULARI

Çalışma gruplarımızın doku LSA düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi Tablo 4.11’ de verilmiştir. Çalışma gruplarımızın doku LSA düzeylerini kontrol grubuna göre değerlendirdiğimizde APAP grubunda ileri derecede önemli artış ($p < 0,001$), BB, CS APAP+CS, APAP+BB ve APAP+BB+CS gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak fark ($p > 0,05$) bulunmamıştır. APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarının doku LSA düzeylerinde APAP grubuna göre ileri derecede önemli ($p < 0,001$) azalma bulunmuştur.

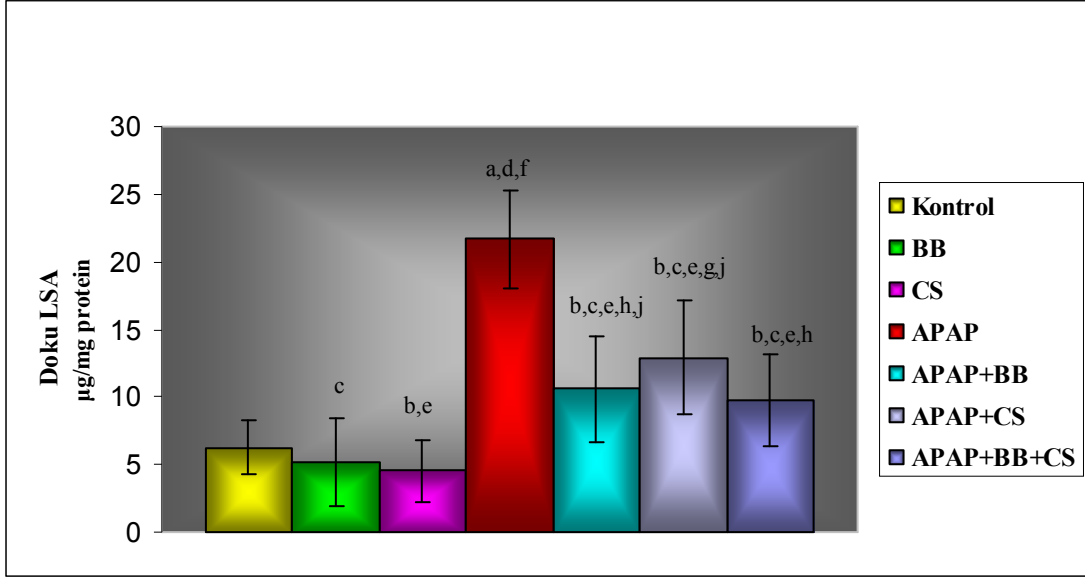
Tablo 4.11. Çalışma gruplarının doku LSA düzeyleri

Gruplar	N	LSA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)
Kontrol	9	6,28 \pm 1,94
BB	9	5,16 \pm 3,21
CS	9	4,51 \pm 2,31
APAP	9	21,66 \pm 3,60
APAP+BB	9	10,60 \pm 3,92
APAP+CS	9	12,89 \pm 4,20
APAP+BB+CS	9	9,78 \pm 3,42

Verilerin karşılaştırılmaları Oneway ANOVA testi ve grupların çoklu karşılaştırılmalarında TUKEY HSD testi ve Student Newman Keuls testi kullanılmıştır.

İstatistiksel sonuçlar ortalama \pm standart sapma (SD) olarak verildi.

Doku LSA düzeyleri BB grubuna göre değerlendirildiğinde, APAP grubunda ileri derecede önemli ($p < 0,001$) artış bulunmuş, CS, APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarında BB grubuna göre istatistiksel olarak fark ($p > 0,05$) bulunmamıştır. Çalışma gruplarımızı CS grubuna göre değerlendirdiğimizde, APAP grubunun doku LSA düzeylerinde ileri derecede önemli ($p < 0,001$), APAP+CS grubunda önemli düzeyde ($p < 0,05$) artış bulunmuştur. APAP+BB ve APAP+BB+CS gruplarının doku LSA düzeylerinde CS grubuna göre istatistiksel olarak fark ($p > 0,05$) bulunmamıştır. Tedavi gruplarımızı kendi aralarında değerlendirdiğimizde APAP+CS ve APAP+BB gruplarının doku LSA düzeylerinde APAP+BB+CS grubuna göre istatistiksel olarak fark ($p > 0,05$) bulunmamıştır (Grafik 4.10).



Grafik 4.10. Çalışma gruplarının doku LSA düzeyleri

Kontrole göre : a; $p < 0,001$, b; $p > 0,05$.

APAP grubuna göre : c; $p < 0,001$.

BB grubuna göre : d; $p < 0,001$, e; $p > 0,05$.

CS grubuna göre : f; $p < 0,001$, g; $p < 0,05$, h; $p > 0,05$.

APAP+BB grubuna göre : j; $p > 0,05$.

4.12. SERUM LİPİD BAĞLI SİALİK ASİT BULGULARI

Çalışma gruplarımızın serum LSA düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi Tablo 4.12' de verilmiştir. Çalışma gruplarımızın serum LSA düzeylerini kontrol grubuna göre değerlendirdiğimizde APAP grubunda ileri derecede önemli ($p < 0,001$) artış bulunmuş, BB, CS, APAP+CS, APAP+BB ve APAP+BB+CS gruplarında istatistiksel olarak fark ($p > 0,05$) bulunmamıştır. APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarının serum LSA düzeylerinde APAP grubuna göre ileri derecede önemli ($p < 0,001$) azalma bulunmuştur.

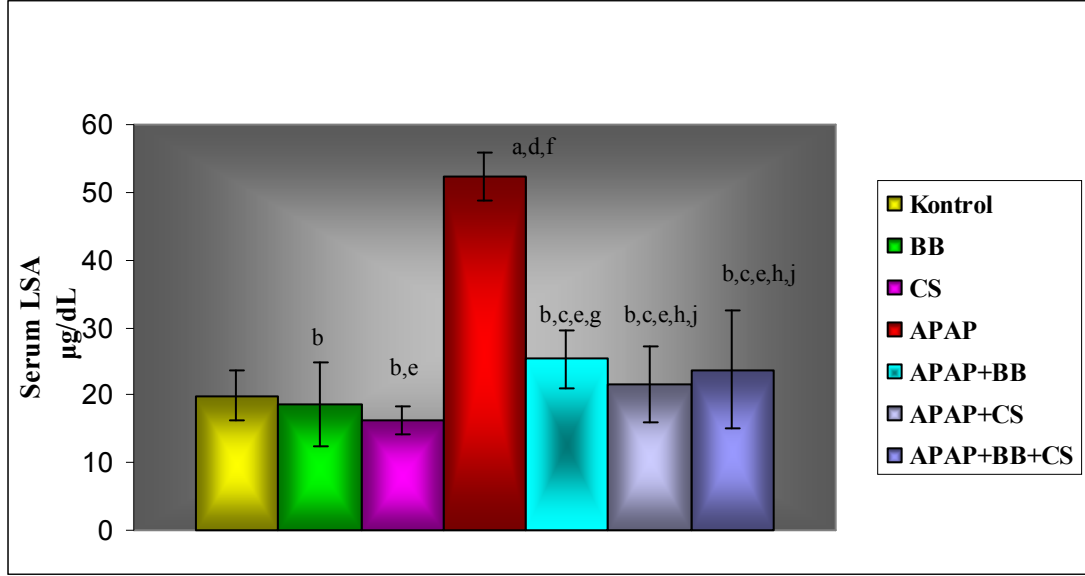
Tablo 4.12. Çalışma gruplarının serum LSA düzeyleri

Gruplar	N	LSA (mg/dL)
Kontrol	9	19,95 ± 3,63
BB	9	18,63 ± 6,16
CS	9	16,20 ± 2,14
APAP	9	52,33 ± 3,69
APAP+BB	9	25,35 ± 4,31
APAP+CS	9	21,64 ± 5,57
APAP+BB+CS	9	23,72 ± 8,74

Verilerin karşılaştırılmaları Oneway ANOVA testi ve grupların çoklu karşılaştırılmalarında TUKEY HSD testi ve Student Newman Keuls testi kullanılmıştır.

İstatistiksel sonuçlar ortalama ± standart sapma (SD) olarak verildi.

Serum LSA düzeyleri BB grubuna göre değerlendirildiğinde, APAP grubunda ileri derecede önemli ($p<0,001$) artış bulunmuş, CS, APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarının serum LSA düzeylerinde BB grubuna göre istatistiksel olarak fark ($p>0,05$) bulunmamıştır. Çalışma gruplarımızı CS grubuna göre değerlendirdiğimizde, APAP grubunda ileri derecede önemli ($p<0,001$), APAP+BB grubunda önemli düzeyde ($p<0,05$) artış bulunmuştur. APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarının serum LSA düzeylerinde, CS grubuna göre istatistiksel olarak fark ($p>0,05$) bulunmamıştır. Tedavi gruplarımızı kendi aralarında değerlendirdiğimizde, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarının serum LSA düzeylerinde APAP+BB grubuna göre istatistiksel olarak fark ($p>0,05$) bulunmamıştır (Grafik 4.11).



Grafik 4.11. Çalışma gruplarının serum LSA düzeyleri

Kontrole göre : a; $p < 0,001$, b; $p > 0,05$.

APAP grubuna göre : c; $p < 0,001$.

BB grubuna göre : d; $p < 0,001$, e; $p > 0,05$.

CS grubuna göre : f; $p < 0,001$, g; $p < 0,05$, h; $p > 0,05$.

APAP+BB grubuna göre: j; $p > 0,05$.

4.13. SERUM SERULOPLAZMİN OKSİDAZ BULGULARI

Çalışma gruplarımızın serum seruloplazmin oksidaz enzim aktivitesinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi Tablo 4.13' de verilmiştir. Çalışma gruplarımızın serum seruloplazmin oksidaz enzim aktivitelerini kontrol grubuna göre değerlendirdiğimizde APAP grubunda ileri derecede önemli ($p < 0,001$) azalma bulunmuş, BB, CS, APAP+CS, APAP+BB ve APAP+BB+CS gruplarında istatistiksel olarak fark ($p > 0,05$) bulunmamıştır. APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarının serum seruloplazmin oksidaz enzim aktivitelerinde APAP grubuna göre ileri derecede önemli ($p < 0,001$) artış bulunmuştur.

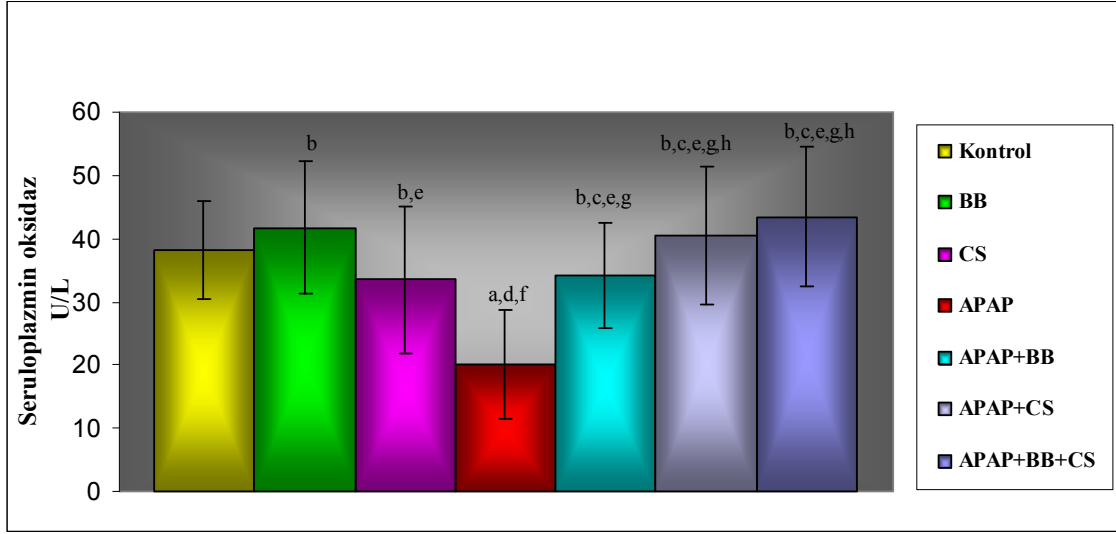
Tablo 4.13. Çalışma gruplarının serum seruloplazmin oksidaz enzim aktiviteleri

Gruplar	N	Seruloplazmin oksidaz (U/L)
Kontrol	9	38,19 ± 7,61
BB	9	41,77 ± 10,58
CS	9	33,45 ± 11,73
APAP	9	20,04 ± 8,70
APAP+BB	9	34,08 ± 8,36
APAP+CS	9	40,50 ± 12,55
APAP+BB+CS	9	43,45 ± 10,94

Verilerin karşılaştırılmaları Oneway ANOVA testi ve grupların çoklu karşılaştırılmalarında TUKEY HSD testi ve Student Newman Keuls testi kullanılmıştır.

İstatistiksel sonuçlar ortalama ± standart sapma (SD) olarak verildi.

Serum seruloplazmin oksidaz enzim aktiviteleri BB grubuna göre değerlendirildiğinde APAP grubunda ileri derecede önemli ($p < 0,001$) azalma bulundu. KOS, APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarının serum seruloplazmin oksidaz enzim aktivitelerinde BB grubuna göre istatistiksel olarak fark ($p > 0,05$) bulunmadı. Çalışma gruplarımızı CS grubuna göre değerlendirdiğimizde APAP grubunda ileri derecede önemli ($p < 0,001$) azalma bulunmuş, APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarının serum seruloplazmin oksidaz enzim aktivitelerinde CS grubuna göre istatistiksel olarak fark ($p > 0,05$) bulunmamıştır. Tedavi gruplarımızı kendi aralarında değerlendirdiğimizde APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarının serum seruloplazmin oksidaz enzim aktivitelerinde APAP+BB grubuna göre istatistiksel olarak fark ($p > 0,05$) bulunmadı (Grafik 4.12).



Grafik 4.12. Çalışma gruplarının serum seruloplazmin oksidaz enzim aktiviteleri

Kontrole göre : a; $p < 0,001$, b; $p > 0,05$.

APAP grubuna göre : c; $p < 0,001$.

BB grubuna göre : d; $p < 0,001$, e; $p > 0,05$.

CS grubuna göre : f; $p < 0,001$, g; $p > 0,05$.

APAP+BB grubuna göre : h; $p > 0,05$.

4.14. DOKU GLUTATYON BULGULARI

Çalışma gruplarımızın doku GSH değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi Tablo 4.14' de verilmiştir. Çalışma gruplarımızın doku GSH düzeylerini kontrol grubuna göre değerlendirdiğimizde APAP grubunda ileri derecede önemli ($p < 0,001$) azalma bulunmuş, BB, CS, APAP+CS, APAP+BB ve APAP+BB+CS gruplarının GSH düzeylerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak fark ($p > 0,05$) bulunmamıştır. APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarının GSH düzeylerinde APAP grubuna göre ileri derecede önemli ($p < 0,001$) artış bulunmuştur.

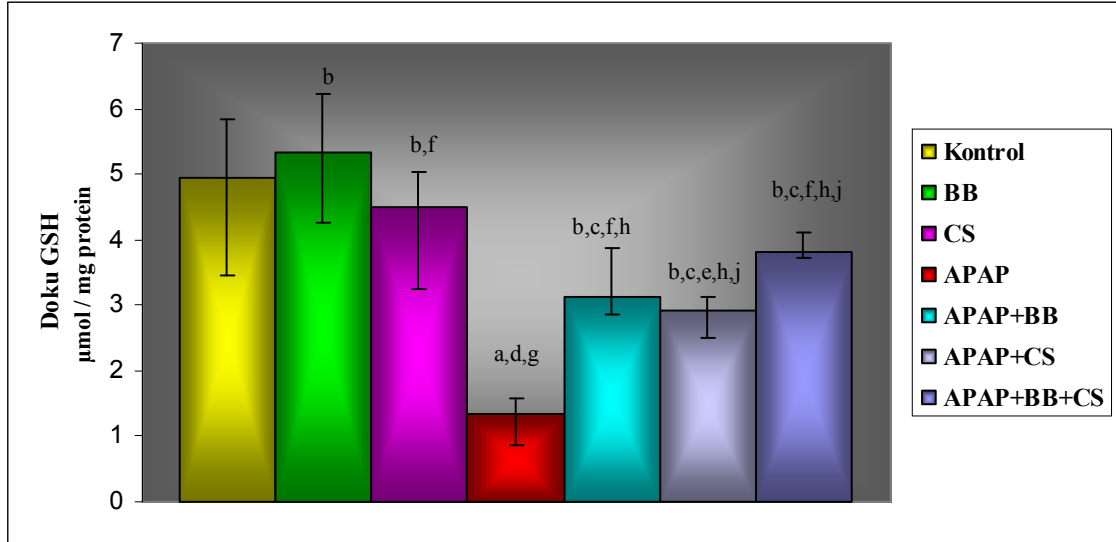
Tablo 4.14. Çalışma gruplarının doku GSH düzeyleri

Gruplar	N	GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)
		Median (%25-%75)
Kontrol	9	4,93 (3,47 - 5,85)
BB	9	5,32 (4,27 - 6,23)
CS	9	4,50 (3,26 - 5,04)
APAP	9	1,34 (0,88 - 1,60)
APAP+BB	9	3,12 (2,84 - 3,88)
APAP+CS	9	2,93 (2,49 - 3,13)
APAP+BB+CS	9	3,81 (3,76 - 4,21)

Verilerin karşılaştırılmalarında Kruskal-Wallis testi ve grupların çoklu karşılaştırılmalarında TUKEY HSD testi ve Student Newman Keuls testi kullanılmıştır.

İstatistiksel sonuçlar median (%25-%75) olarak verildi.

GSH düzeyleri BB grubuna göre değerlendirildiğinde, APAP grubunda ileri derecede önemli ($p<0,001$), APAP+CS grubunun GSH düzeyleri BB grubuna göre önemli düzeyde ($p<0,05$) azalma gözlemlendi. CS, APAP+BB ve APAP+BB+CS gruplarının GSH düzeyleri BB grubuna göre değerlendirildiğinde istatistiksel fark ($p>0,05$) bulunmadı. Çalışma gruplarımızı CS grubuna göre değerlendirdiğimizde APAP grubunda ileri derecede önemli ($p<0,001$) azalma bulunmuş, APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarında istatistiksel olarak fark ($p>0,05$) bulunmamıştır. Tedavi gruplarımızı kendi aralarında değerlendirdiğimizde APAP+BB ve APAP+CS gruplarının GSH düzeylerinde APAP+BB+CS grubuna göre istatistiksel olarak fark ($p>0,05$) bulunmadı (Grafik 4.13).



Grafik 4.13. Çalışma gruplarının doku GSH düzeyleri

Kontrole göre : a; $p < 0,001$, b; $p > 0,05$.

APAP grubuna göre : c; $p < 0,001$.

BB grubuna göre : d; $p < 0,001$, e; $p < 0,05$, f; $p > 0,05$.

CS grubuna göre : g; $p < 0,001$, h; $p > 0,05$.

APAP+BB+CS grubuna göre : j; $p > 0,05$.

4.15. DOKU MDA BULGULARI

Çalışma gruplarımızın doku MDA düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi Tablo 4.15 de verilmiştir. Çalışma gruplarımızın doku MDA düzeylerini kontrol grubuna göre değerlendirdiğimizde APAP grubunda ileri derecede önemli ($p < 0,001$), APAP+CS, APAP+BB ve APAP+BB+CS gruplarında çok önemli düzeyde ($p < 0,01$) artış bulundu. BB ve CS gruplarının MDA düzeylerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak fark ($p > 0,05$) bulunmadı.

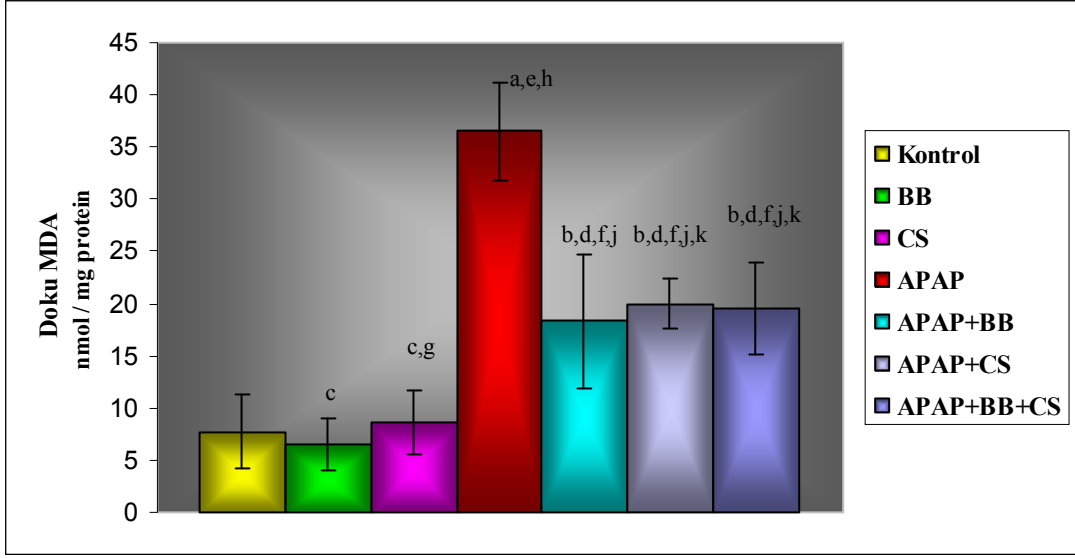
Tablo 4.15. Çalışma gruplarının doku MDA düzeyleri

Gruplar	N	MDA (nmol/mg protein)
Kontrol	9	7,73 ± 3,58
BB	9	6,54 ± 2,45
CS	9	8,62 ± 3,11
APAP	9	36,55 ± 4,71
APAP+BB	9	18,32 ± 6,40
APAP+CS	9	19,98 ± 2,45
APAP+BB+CS	9	19,51 ± 4,44

Verilerin karşılaştırılmaları Oneway ANOVA testi ve grupların çoklu karşılaştırılmalarında TUKEY HSD testi ve Student Newman Keuls testi kullanılmıştır.

İstatistiksel sonuçlar ortalama ± standart sapma (SD) olarak verildi.

APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarının MDA düzeylerinde APAP grubuna göre ileri derecede önemli ($p<0,001$) azalma bulundu. Doku MDA düzeyleri BB grubuna göre değerlendirildiğinde APAP grubunda ileri derecede önemli ($p<0,001$), APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarında çok önemli düzeyde ($p<0,01$) artış bulundu. CS grubunun MDA düzeylerinde BB grubuna göre istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p>0,05$). Çalışma gruplarımızı CS grubuna göre değerlendirdiğimizde APAP grubunda ileri derecede önemli ($p<0,001$), APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarının MDA düzeylerinde CS grubuna çok önemli düzeyde ($p<0,01$) artış bulundu. Tedavi gruplarımızı kendi aralarında değerlendirdiğimizde, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarının MDA düzeylerinde APAP+BB grubuna göre istatistiksel olarak fark ($p>0,05$) bulunmadı (Grafik 4.14).



Grafik 4.14. Çalışma gruplarının doku MDA düzeyleri

Kontrole göre : a; $p < 0,001$, b; $p < 0,01$, c; $p > 0,05$.

APAP grubuna göre : d; $p < 0,001$.

BB grubuna göre : e; $p < 0,001$, f; $p < 0,01$, g; $p > 0,05$.

CS grubuna göre : h; $p < 0,001$, j; $p < 0,01$.

APAP+BB grubuna göre : k; $p > 0,05$.

Tablo 4.16. Çalışma gruplarında MDA, GSH düzeyleri ile Seruloplazmin Oksidaz aktiviteleri arasındaki korelasyonlar

KONTROL GRUBU		
	GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)	Seruloplazmin oksidaz (U/L)
MDA (nmol/mg protein)	$r = -.331$ $p = 0.384$	$r = -.540$ $p = 0.133$
BLUEBERRY GRUBU		
	GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)	Seruloplazmin oksidaz (U/L)
MDA (nmol/mg protein)	$r = -.188$ $p = 0.628$	$r = -.437$ $p = 0.240$
KİTOSAN GRUBU		
	GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)	Seruloplazmin oksidaz (U/L)
MDA (nmol/mg protein)	$r = -.731^*$ $p < 0.05$	$r = -.433$ $p = 0.245$
ASETAMİNOFEN GRUBU		
	GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)	Seruloplazmin oksidaz (U/L)
MDA (nmol/mg protein)	$r = -.800^{**}$ $p < 0.01$	$r = -.706^*$ $p < 0.05$
ASETAMİNOFEN + BLUBERRY GRUBU		
	GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)	Seruloplazmin oksidaz (U/L)
MDA (nmol/mg protein)	$r = -.681^*$ $p < 0.05$	$r = -.437$ $p = 0.240$
ASETAMİNOFEN + KİTOSAN GRUBU		
	GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)	Seruloplazmin oksidaz (U/L)
MDA (nmol/mg protein)	$r = -.695^*$ $p < 0.01$	$r = -.731^*$ $p < 0.05$
ASETAMİNOFEN + BLUEBERRY + KİTOSAN GRUBU		
	GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)	Seruloplazmin oksidaz (U/L)
MDA (nmol/mg protein)	$r = -.687^*$ $p < 0.05$	$r = -.711^*$ $p < 0.05$

Veriler arasındaki ilişkiyi gösterebilmek için normalite testleri sonucuna göre Pearson ve Spearman korelasyon testleri kullanıldı.

4.17. KARACİĞERDE HİSTOLOJİK BULGULAR

Çalışmamızdaki karaciğer doku örnekleri H&E boyama yöntemiyle incelendi. Işık mikroskobu incelemesinde tüm gruplar, yoğun hücrel dejenerasyon, sinüzoidal dilatasyon, vasküler konjesyon ve hücrel inflamasyon bakımından değerlendirilmiş olup sonuçlar tablo halinde verilmiştir (Tablo 4.17).

Tablo 4.17. Çalışma gruplarının ışık mikroskobu görüntüleri skorlama sonuçları

Gruplar	Yoğun hücrel dejenerasyon	Sinüzoidal dilatasyon	Vasküler konjesyon	Hücrel inflamasyon
Kontrol	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
BB	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^d
CS	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^d
APAP	2,78±0,13 ^a	2,64±0,32 ^a	2,71±0,13 ^a	2,65±0,27 ^a
APAP+BB	0,86±0,32 ^{b,e}	0,71±0,13 ^{b,e}	0,91±0,28 ^{b,e}	0,82±0,13 ^{b,e}
APAP+CS	1,11±0,29 ^{b,e}	1,08±0,38 ^{b,e}	0,94±0,27 ^{b,e}	1,09±0,32 ^{b,e}
APAP+BB+CS	0,43±0,27 ^{c,e,f}	0,29±0,13 ^{c,e,f}	0,50±0,32 ^{c,e,f}	0,47±0,29 ^{c,e,f}

Verilerin karşılaştırılmaları Oneway ANOVA testi ve grupların çoklu karşılaştırılmalarında TUKEY HSD testi ve Student Newman Keuls testi kullanılmıştır.

Histolojik bulguların istatistiksel sonuçları ortalama±S.D olarak tanımlandı.

Kontrol grubuna göre ; a: p<0,001, b: p<0,01, c: p<0,05, d: p>0,05

APAP grubuna göre ; e: p<0,001;

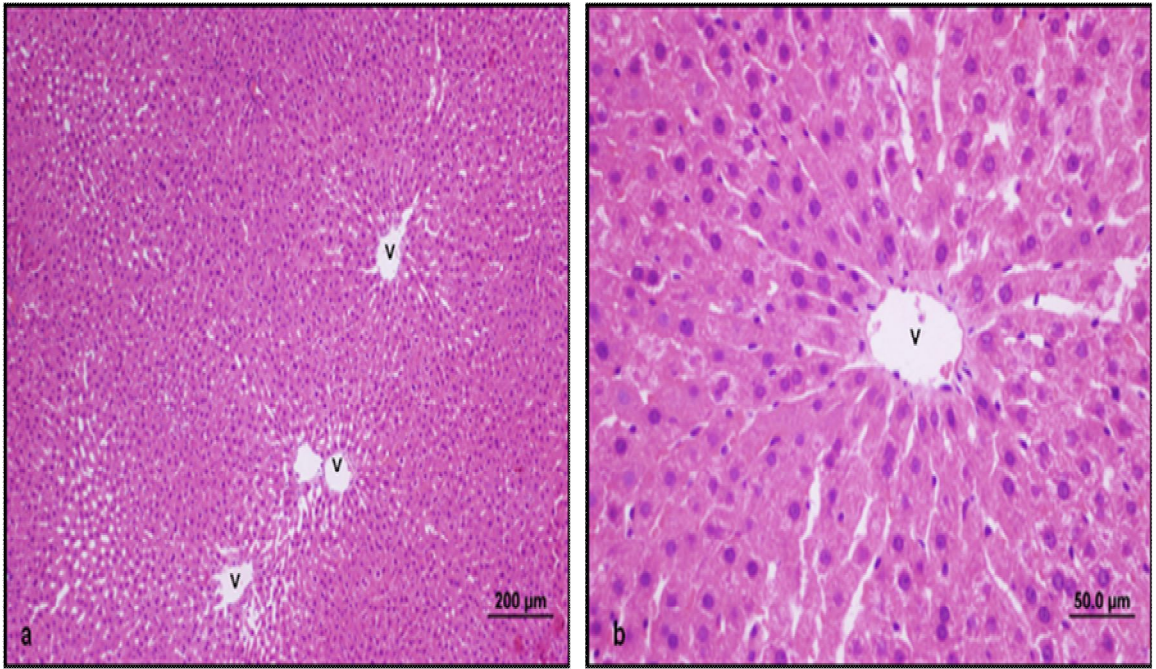
APAP+BB, APAP+CS gruplarına göre ; f: p<0,05

Hücrel dejenerasyon bakımından kontrol, BB ve CS gruplarında herhangi bir dejeneratif bulguya rastlanmadı ($p>0,05$). APAP grubunda kontrol grubuna göre ileri derecede önemli düzeyde artış ($p<0,001$) bulundu. APAP+BB ve APAP+CS gruplarında kontrol grubuna göre çok önemli düzeyde ($p<0,01$), APAP+BB+CS grubunda önemli düzeyde ($p<0,05$) artış bulundu. APAP grubunda ciddi derecede yoğun hücrel dejenerasyon gözlenmiştir. Tedavi gruplarımızı APAP grubuna göre değerlendirdiğimizde, APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarında hücrel dejenerasyonda ileri derecede önemli ($p<0,001$) azalma gözlenmiştir. Tedavi gruplarımızı kendi aralarında değerlendirdiğimizde, APAP+BB+CS grubunda hücrel dejenerasyon bulgularının APAP+BB ve APAP+CS gruplarına göre önemli düzeyde ($p<0,05$) azaldığı gözlenmiştir.

Sinüzoidal dilatasyon bakımından kontrol, BB ve CS gruplarında herhangi bir bulguya rastlanmadı ($p>0,05$). APAP grubunda kontrol grubuna göre ileri derecede önemli düzeyde artış ($p<0,001$) gözlenmiştir. APAP+BB ve APAP+CS gruplarında kontrol grubuna göre çok önemli düzeyde ($p<0,01$), APAP+BB+CS grubunda önemli düzeyde ($p<0,05$) artış gözlenmiştir. Tedavi gruplarımızı APAP grubuna göre değerlendirdiğimizde, APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarında sinüzoidal dilatasyonda ileri derecede önemli ($p<0,001$) azalma gözlenmiştir. Tedavi gruplarımızı kendi aralarında değerlendirdiğimizde, APAP+BB+CS grubunda sinüzoidal dilatasyon bulgularının APAP+BB ve APAP+CS gruplarına göre önemli düzeyde ($p<0,05$) azaldığı gözlenmiştir.

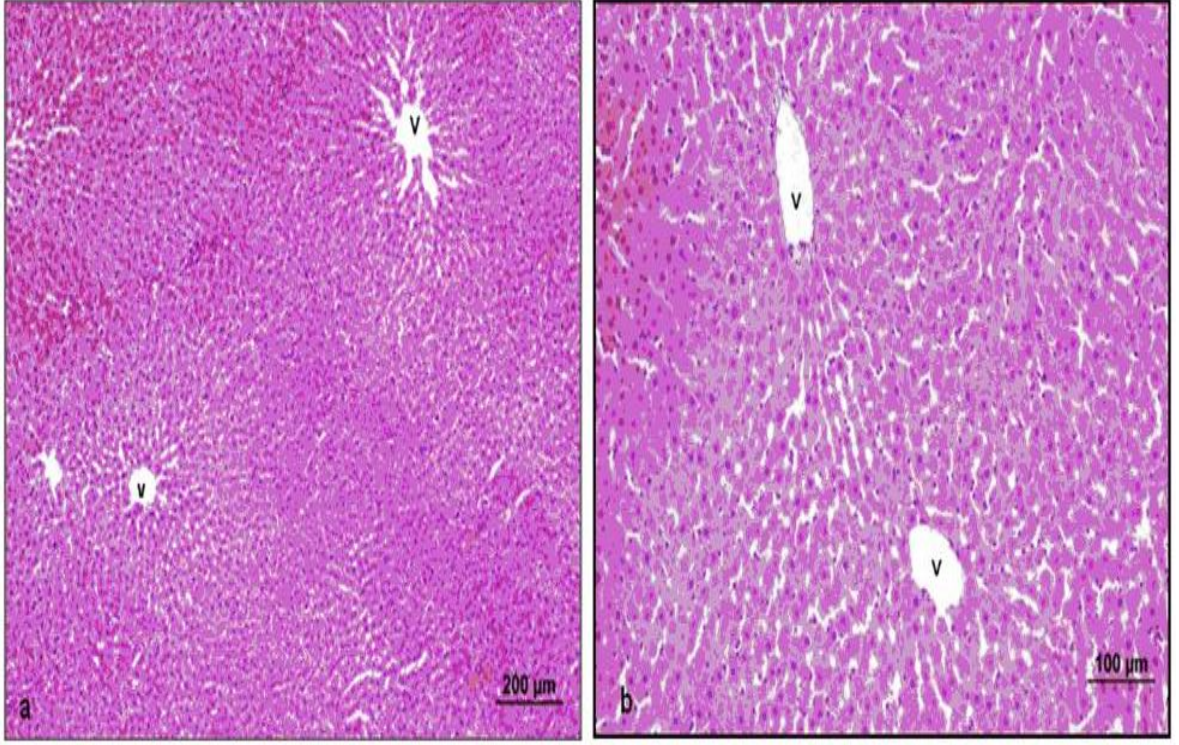
Vasküler konjesyon bakımından kontrol, BB ve CS gruplarında herhangi bir bulgu gözlenmemiştir. APAP grubunda kontrol grubuna göre ileri derecede önemli düzeyde artış ($p<0,001$) bulunmuştur. APAP+BB ve APAP+CS gruplarında kontrol grubuna göre çok önemli düzeyde ($p<0,01$), APAP+BB+CS grubunda vasküler konjesyonda önemli düzeyde ($p<0,05$) artış gözlenmiştir. Tedavi gruplarımızı APAP grubuna göre değerlendirdiğimizde, APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarında vasküler konjesyonda ileri derecede önemli ($p<0,001$) azalma gözlenmiştir. Tedavi gruplarımızı kendi aralarında değerlendirdiğimizde, APAP+BB +CS grubunda vasküler konjesyon bulgularının APAP+BB ve APAP+CS gruplarına göre önemli düzeyde ($p<0,05$) azaldığı gözlenmiştir.

Hücresel inflamasyon bakımından kontrol, BB ve CS gruplarında herhangi bir bulguya rastlanmadı. APAP grubunda kontrol grubuna göre ileri derecede önemli düzeyde ($p<0,001$) artış gözlenmiştir. APAP+BB ve APAP+CS gruplarında kontrol grubuna göre çok önemli düzeyde ($p<0,01$), APAP+BB+CS grubunda hücresel inflamasyonda önemli düzeyde ($p<0,05$) artış gözlenmiştir. Tedavi gruplarımızı APAP grubuna göre değerlendirdiğimizde, APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarında hücresel inflamasyonda ileri derecede önemli ($p<0,001$) azalma gözlenmiştir. Tedavi gruplarımızı kendi aralarında değerlendirdiğimizde, APAP+BB +CS grubunda hücresel inflamasyon bulgularının APAP+BB ve APAP+CS gruplarına göre önemli düzeyde ($p<0,05$) azaldığı gözlenmiştir.



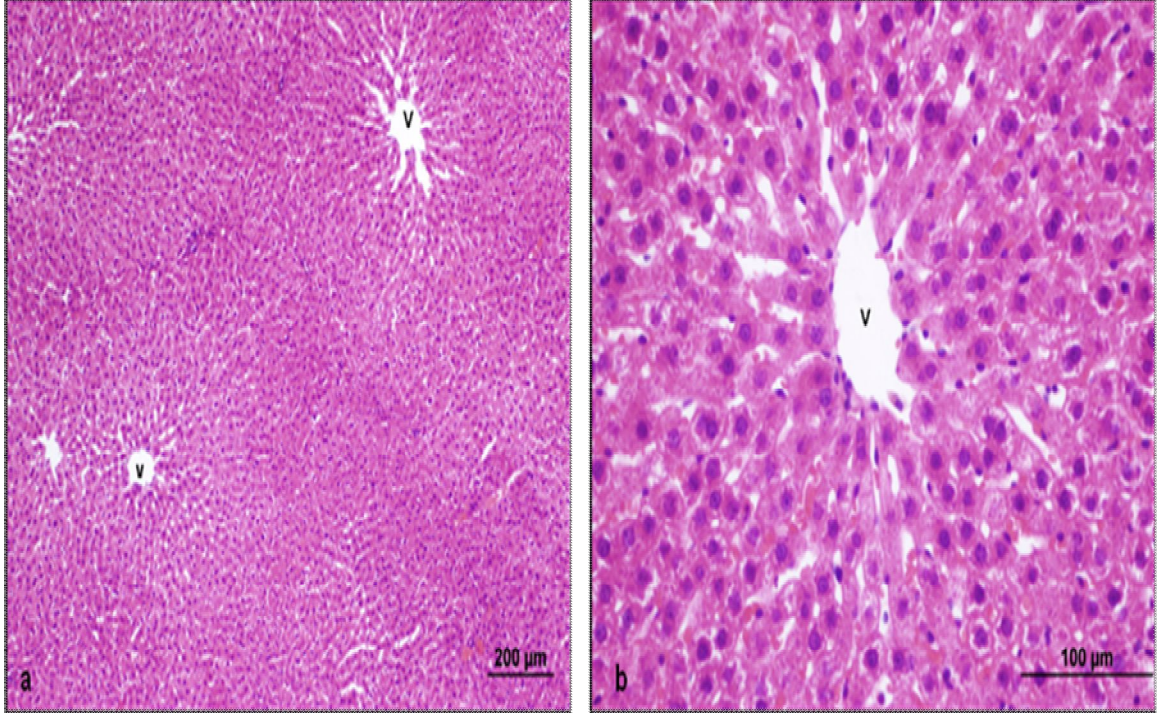
Şekil 4.1. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu örneklerinin ışık mikroskobu inceleme görüntüleri (HE, bar 200µm, bar:50.0µm). v; vena sentralis

Kontrol grubunda karaciğerin ışık mikroskopik olarak yapılan incelemesinde karaciğerin hepatosit hücreleri, portal alan ve içerdiği oluşumları, sinüzoidal yapıları gibi tüm yapılarıyla birlikte normal görünümlü olduğu gözlemlendi.



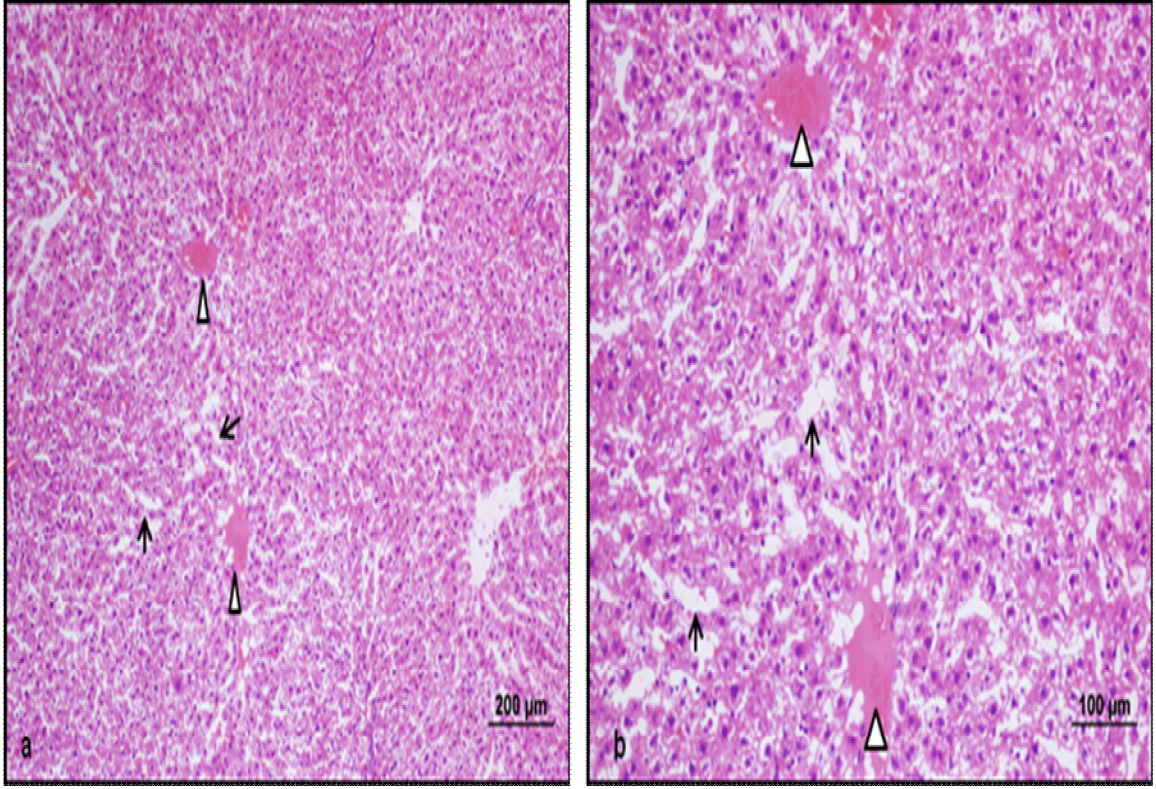
Şekil 4.2. Blueberry grubuna ait karaciğer dokusu örneklerinin ışık mikroskobu inceleme görüntüleri (HE, bar 200µm, bar:100.0µm). v; vena sentralis

Blueberry grubunda karaciğerin ışık mikroskopik olarak yapılan incelemesinde karaciğerin hepatosit hücreleri ve sinüzoidal yapıları ile normale yakın histolojik yapıdaki karaciğer olduğu gözlemlendi.



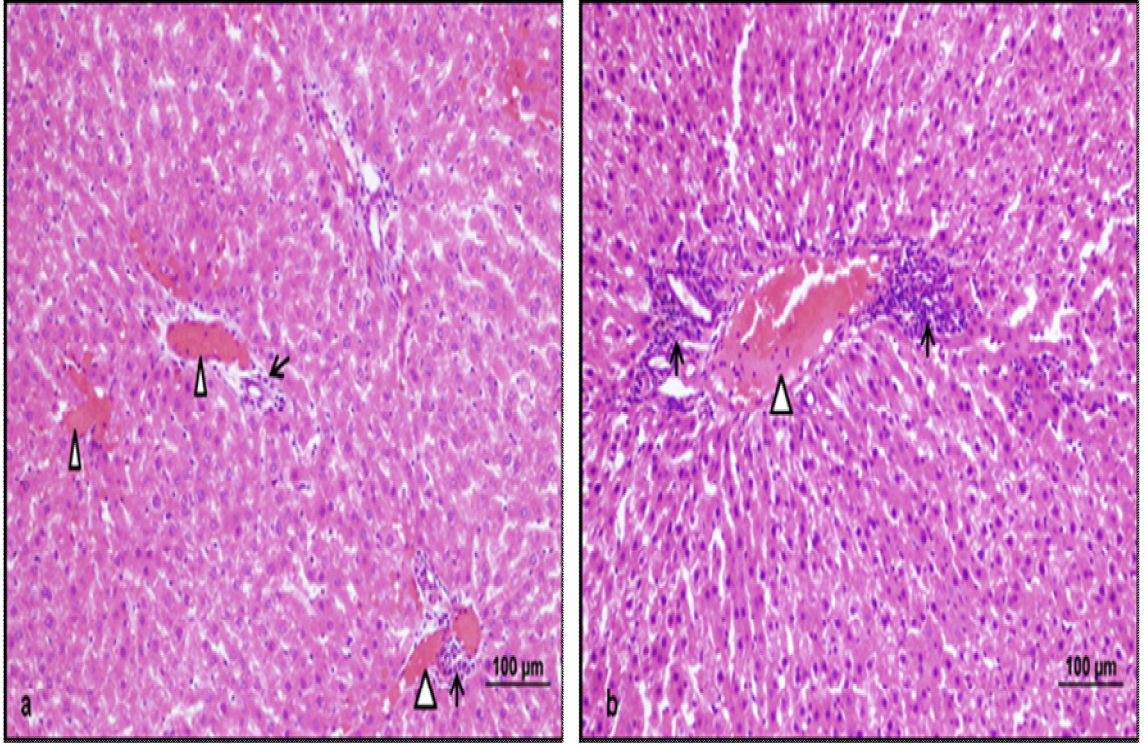
Şekil 4.3. Kitosan grubuna ait karaciğer dokusu örneklerinin ışık mikroskobu inceleme görüntüleri (HE, bar 200µm, bar:100.0µm). v; vena sentralis

Kitosan grubunda karaciğerin ışık mikroskobik olarak yapılan incelemesinde karaciğerin hepatosit hücreleri ve sinüzoidal yapıları ile normale yakın histolojik yapıdaki karaciğer olduğu gözlemlendi.



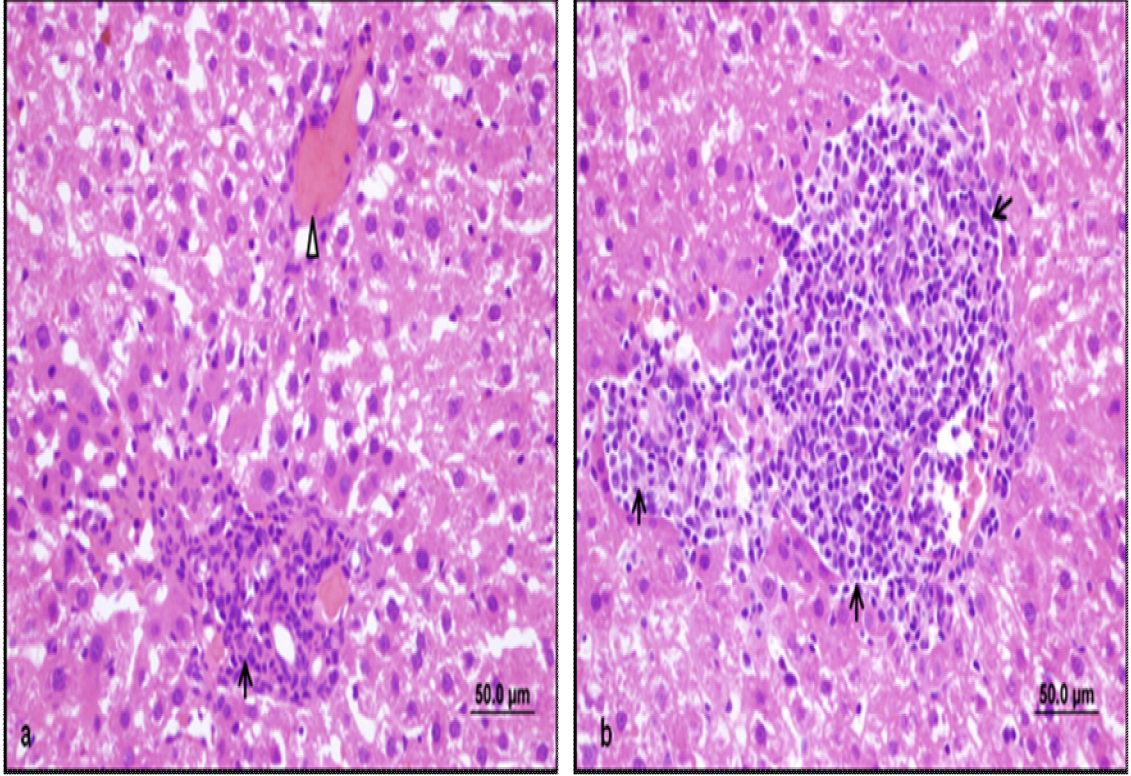
Şekil 4.4. Asetaminofen grubuna ait karaciğer dokusu örneklerinin ışık mikroskobu incelenmesinde parankim dokuda yoğun hücresel hasar, sinüzoidal dilatasyon (→) ve damar içi kongesyon (►) dikkat çekmekte (HE, bar 200µm, bar:100.0µm). v; vena sentralis

Asetaminofen grubunun karaciğerlerinin ışık mikroskobik olarak yapılan incelemesinde parankim dokuda özellikle hepatosit hücrelerinin oldukça dejenere olduğu ve yoğun hücresel hasara sahip olduğu izlendi. Ayrıca sinüzoidal dilatasyon ve damar içi kongesyon bu gruptaki karaciğerlerde dikkat çekti (Şekil 4.4).



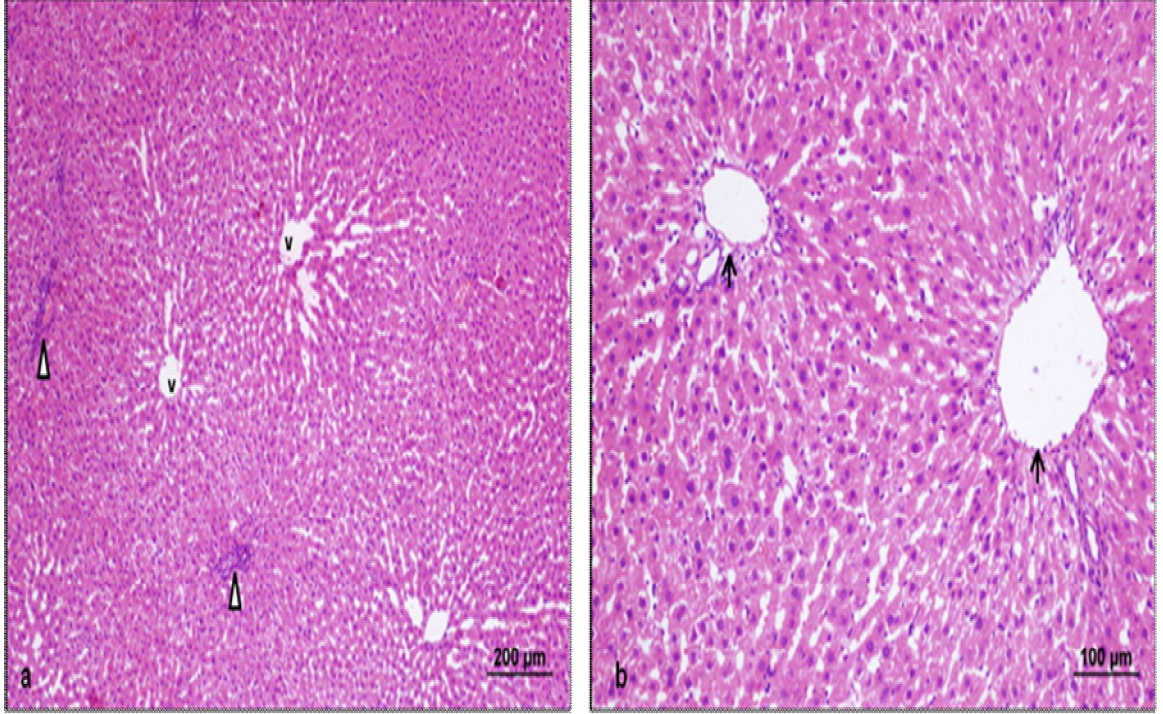
Şekil 4.5. Asetaminofen grubuna ait karaciğer dokusu örneklerinin ışık mikroskobu incelenmesinde özellikle portal alanda venül içi kongesyon (►) ve periportal alanda hücresel inflamasyon (→) dikkat çekmekte (a,b) (HE, bar:100.0µm). v; vena sentralis

Asetaminofen grubunun karaciğerlerinin ışık mikroskobik olarak yapılan incelemesinde özellikle portal alanda venül içi kongesyon ve periportal alanda hücresel inflamasyon gözlemlendi (Şekil 4.5).



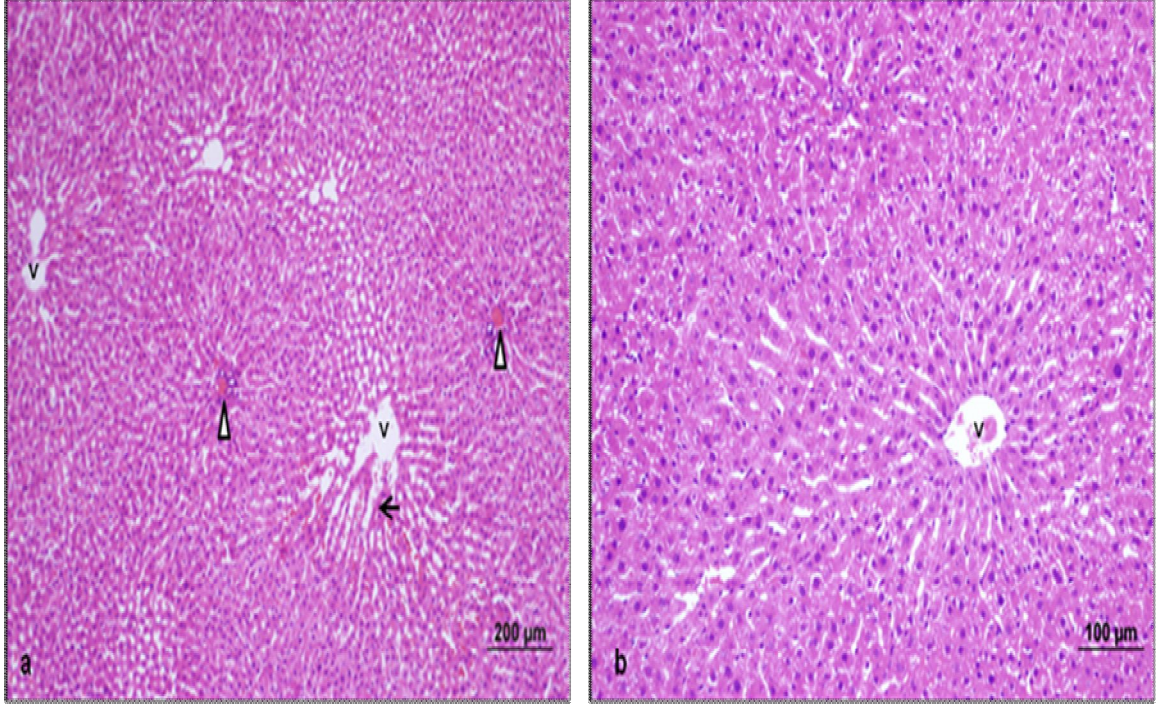
Şekil 4.6. Asetaminofen grubuna ait karaciğer dokusu örneklerinin ışık mikroskobu incelenmesinde yoğun hücresel hasar, damar içi kongesyon (►) ve periportal alanda hücresel inflamasyon (→) dikkat çekmekte (a,b) (bar:50.0µm, HE). v; vena sentralis

Asetaminofen grubunun bir başka görüntüsünde de karaciğerde yoğun hücresel hasara ve damar içi kongesyonun olduğu ve periportal alanda hücresel inflamasyonun olduğu dikkat çekti (Şekil 4.6).



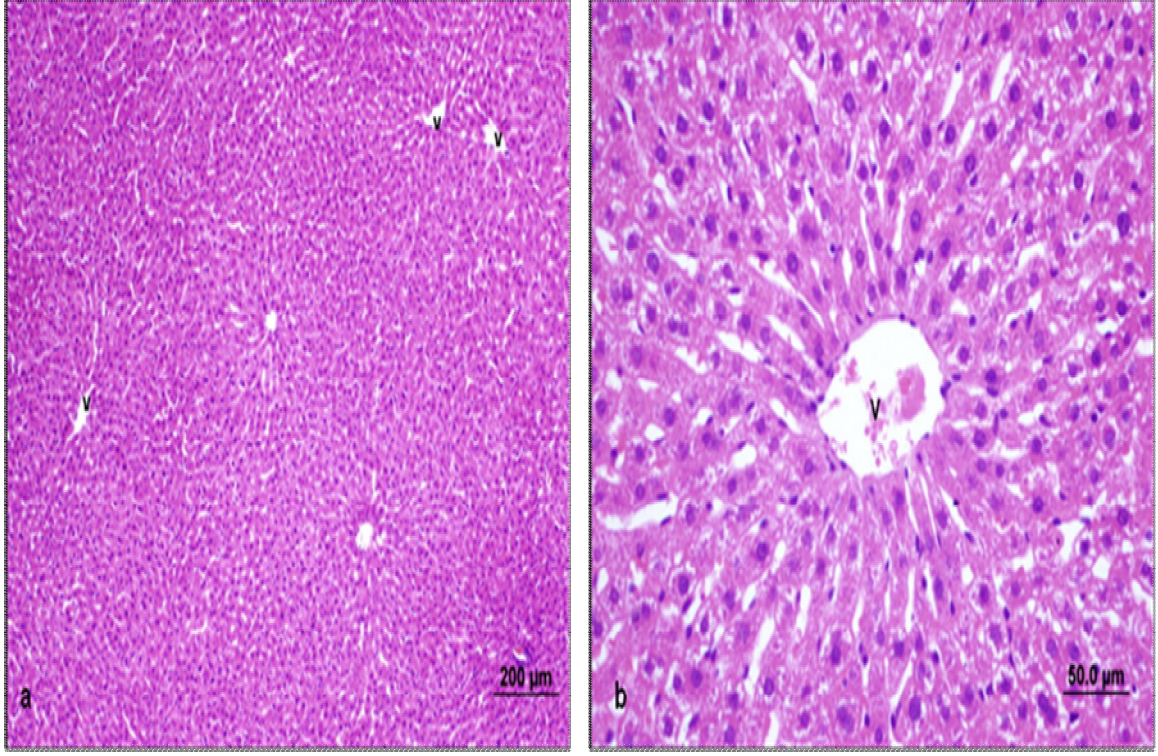
Şekil 4.7. Asetaminofen+Blueberry grubuna ait karaciğer dokularının ışık mikroskopik incelenmesinde portal alanda az da olsa kısmi hücresel inflamasyon izlenmekle birlikte (►) (a), genelde inflamasyonun da azalmış olduğu görülmekte (→) (b) hepatosit hücreleri ve sinüzoidal yapıları ile normale yakın histolojik yapıdaki karaciğer izlenmekte. V:vena sentralis. (bar:200µm, bar:100µm, HE).

Asetaminofen+Blueberry grubunda karaciğerin ışık mikroskopik incelenmesinde sadece asetaminofen verilen gruba oranla azalmış hücresel hasar dikkat çekmektedir. Bu grubumuzda portal alanda az da olsa kısmi hücresel inflamasyon izlendi. Deney grubumuzun karaciğerinin bütünü değerlendirildiğinde inflamasyonun azalmış olduğu görüldü. Hepatosit hücreleri ve sinüzoidal yapıları ile normale yakın histolojik yapıdaki karaciğer izlendi (Şekil 4.7).



Şekil 4.8. Asetaminofen+Kitosan grubuna ait karaciğer dokularının ışık mikroskopik incelenmesinde portal alanda az da olsa damar içi kongesyon (►) ve kısmi sinüzoidal dilatasyon (↔) izlenmekle birlikte, hepatosit hücreleri ve sinüzoidal yapıları ile normale yakın histolojik yapıdaki karaciğer izlenmekte. V:vena sentralis. (bar:200µm, bar:100µm, HE).

Asetaminofen+Kitosan grubunun karaciğer örneklerinin ışık mikroskopik incelenmesinde sadece asetaminofen verilen gruba oranla azalmış hücresel hasar dikkat çekmektedir. Portal alanda az da olsa damar içi kongesyon ve kısmi sinüzoidal dilatasyon görülmüştür. Deney grubumuzun karaciğerinin bütünü değerlendirildiğinde hepatosit hücreleri ve sinüzoidal yapıları ile normale yakın histolojik yapıdaki karaciğer gözlenmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.9. Asetaminofen+Blueberry+Kitosan grubuna ait karaciğer dokularının ışık mikroskopik incelenmesinde portal hepatosit hücreleri ve sinüzoidal yapıları ile tüm gruplara göre oldukça düzgün karaciğer yapısı izlenmekte (a,b). V:vena sentralis. (bar:200µm, bar:50.0µm, HE).

Asetaminofen+Blueberry+Kitosan grubunun karaciğer örneklerinin ışık mikroskopik incelenmesinde tüm gruplar değerlendirildiğinde özellikle bu grupta hepatosit hücreleri, portal alan ve içerdiği oluşumlar ile sinüzoidal yapıların APAP+BB ve APAP+CS gruplarına göre oldukça düzgün olduğu ve karaciğerin önemli düzeyde korunarak, kontrol grubuna yakın bulgulara sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.9).

5. TARTIŞMA

Organizmada biyolojik bir fabrika olarak görev yapan ve önemli yaşamsal fonksiyonları yürüten karaciğer, ilaç toksisitesi açısından en riskli organdır. Genetik ve çevresel etmenler zemininde gelişen ilaca bağlı karaciğer hastalıkları, akut, kronik, fulminan hepatit, siroz ve tümör gibi çok çeşitli klinik durumlarla karşımıza çıkmaktadır. Tüm Dünya’da bilim adamlarının ve ilaç endüstrisinin ortak çalıştığı en önemli sağlık sorunlarından biri olan ilaçlara bağlı gelişen karaciğer hastalıklarının doğrudan hepatotoksisite ve olumsuz immün reaksiyonlar sonucu oluştuğu düşünülmektedir. Mortalite riski taşıyan hepatotoksisitenin etki mekanizmalarının açıklanması, toksik maddelerin biyolojik takipleri ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için önemlidir (87).

İlaçlara bağlı gelişen akut karaciğer yetmezliğinin % 50’den fazla olduğu ve bu oranında % 39’unu APAP ve % 13’lük kısmında diğer ilaçların oluşturduğu araştırmalarda belirtilmiştir. Asetaminofen birçok ülkede yaygın olarak kullanılan analjezik ve antipiretik ilaçtır. Deneysel ve klinik çalışmalarda, terapötik dozlardan yüksek dozlara kadar kullanılan APAP’in öldürücü hepatoselüler nekroza neden olabileceği belirtilmiştir (85). Asetaminofen metabolizmasının minör metaboliti olan NAPQI, yüksek dozlarda APAP alındığında karaciğer GSH depolarının tükenmesine neden olur ve protein, lipit, nükleik asitler gibi hücrel makromoleküllerle etkileşime geçer. Bu etkileşim sonucu protein disfonksiyonu, oksidatif stres, lipit peroksidasyonu, DNA hasarı, hücre içi kalsiyum homeostazının bozulması ve mitokondrial disfonksiyon gelişir. Hücre fonksiyonlarındaki bu bozukluk hücre ölümü ve karaciğer yetmezliği ile sonuçlanabilir (87).

Karaciğer hastalıklarının teşhisi, takibi ve tedavisinde kullanılan laboratuvar bulguları, karaciğer hasarını, karaciğer ve safra yollarına ilişkin patolojileri ve karaciğerin fonksiyonel durumunu göstermekte olup, rutin karaciğer testleri olarak adlandırılmaktadır (75,76).

Karaciğer hücre hasarının önemli parametreleri olan AST, ALT, ALP ve LDH karaciğer hastalığının varlığını, niteliğini ve tedaviye yanıtını da değerlendiren önemli rutin karaciğer testlerindedir. Aspartat aminotransferaz, hem sitoplazmik hem de mitokondrial bir enzim iken, ALT sitoplazmik bir enzimdir. Transaminazlar olarak adlandırılan her iki enzim de intrasellüler enzimler olup oldukça yüksek miktarlarda hepatositlerde bulunmaktadır. Hepatoselüler lezyonların olduğu karaciğer hasarında bu enzimler hasarlı dokudan kana salınırlar. İlaç toksisitesi, akut ve kronik karaciğer yetmezliği, akut viral hepatit, siroz, kanser ve alkolik karaciğer hastalığı gibi tüm karaciğer hastalıklarında AST ve ALT enzim aktiviteleri artış göstermektedir. Hepatoselüler hastalıklarda ALT enzim aktiviteleri daha spesifik bir belirteç olmasına rağmen, bazı karaciğer hastalıklarında AST'ın daha fazla artış göstermesi mümkündür (75,76).

Karaciğerde safra kanalı bölgesindeki hücrelerin sitozol ve membranında bulunan ALP, fosfat gruplarının transferinde gerekli izoenzimler grubundandır. Safra asitleri tarafından uyarılan ALP, hepatobiliyer hastalıklar, kolestaz, karaciğer lezyonları, çeşitli ilaç ve kimyasallar için duyarlı bir belirteçtir ve serum ALP enzim aktiviteleri bu durumlarda yükselmektedir (75,117). Karaciğer hasarının göstergelerinden biri olan LDH, sitozolik bir enzimdir ve hemen hemen tüm dokularda bulunan 5 izoenzime sahiptir. Karaciğer de baskın olarak bulunan LDH izoenzimleri LDH₄ ve LDH₅'dir. Karaciğer parankimasının hasarlanmasından sonra bu izoenzimler yükselbilmektedir. Yükselmiş serum LDH enzim aktiviteleri genellikle karaciğer hasarı ile ilişkilidir ve hasarlanan hücrelerden kana salınır (117).

Asetaminofen ile ilgili yapılan hem klinik hem de deneysel çalışmalarda APAP'in serum AST, ALT, ALP ve LDH enzim aktivitelerini arttırdığı bildirilmiştir (200). Asetaminofen hepatotoksitesinin belirlendiği Bhadauria ve arkadaşlarının ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada APAP'e bağlı akut karaciğer hasarında serum AST, ALT, LDH ve ALP enzim aktivitelerinin kontrol grubuna göre yükseldiği bulunmuştur (21). Larrey ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada APAP'in karaciğer yetmezliği etiyojisinde önemli bir role sahip olduğunu ve ilk sırayı aldığını belirtmişlerdir. Yine bu çalışmada APAP'in, AST ve ALT enzim aktivitelerini hepatotoksite artışı ile paralel olarak arttırdığı bildirilmiştir (120).

Knigh ve arkadaşlarının ratlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada, ratlara APAP verilmiş, ALT enzim aktivitelerinin kontrol grubuna göre yüksek düzeyde artış gösterdiği belirtilmiştir (113). Yousef ve arkadaşları yaptıkları deneysel çalışmalarında, oral 650 mg/kg dozunda 15 gün uygulanan APAP'in plazma AST, ALT, ALP ve LDH enzim aktivitelerinde yükselmeye neden olduğunu ileri sürmüşlerdir (239). Çalışmamızda da, APAP'e bağlı gelişen karaciğer hasarını değerlendirmek için aynı rutin biyokimyasal parametreler kullanılmıştır. Oral gavaj ile APAP uygulanan rat grubumuzda AST, ALT, ALP ve LDH enzim aktiviteleri kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur ve bu yüksek bulgular APAP'in toksik etkileri nedeniyle gelişen karaciğer hasarını desteklemektedir.

Kuersetin, kurkumin, ginkgo biloba ve L-karnitin gibi antioksidan özelliği olan birçok madde APAP'in karaciğerdeki toksik etkilerine karşı araştırılmıştır (161,231, 239). Çalışmamızda, APAP toksisitesine karşı koruyucu amaçlı BB ve CS kullanılmıştır. Yaptığımız hem ulusal hem de uluslararası literatür taramalarında BB ve CS'in APAP toksisitesi üzerine etkilerinin araştırıldığı hiçbir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Çalışmamızda BB ve CS, APAP uygulanan gruplara hem tek olarak hem de BB+CS kombinasyonu şeklinde uygulanmış ve tedavi gruplarımız APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS şeklinde oluşturulmuştur. Her üç grubumuzda da APAP toksisitesine karşı koruyucu olarak kullandığımız BB ve CS, serum AST, ALT, ALP ve LDH enzim aktivitelerinin hemen hemen kontrol düzeylerine inmesini sağlayarak koruyucu etki göstermiştir.

Çalışmamız kapsamında, BB ve CS'in sağlıklı karaciğer üzerinde herhangi bir toksik etkisinin olup olmadığını da gözlemlemek için sağlıklı ratlara da BB ve CS oral gavaj yöntemiyle uygulandı. Bu gruplarımızın serum AST, ALT, ALP ve LDH enzim aktivitelerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmamıştır ve bu sonuçlara göre BB ve CS'in karaciğer üzerinde toksik etkilerinin olmadığını söyleyebiliriz. APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarımızı kendi aralarında değerlendirdiğimizde, APAP+BB grubunda AST enzim aktiviteleri, APAP+BB+CS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklı iken; APAP+CS grubu ile arasında

anlamli fark bulunmadı. Bu üç grubumuzun arasında ALT, ALP ve LDH enzim aktiviteleri yönünden istatistiksel olarak anlamli fark gözlenmemiştir.

Blueberry yapısında bulunan flavonoidler sayesinde en yüksek antioksidan aktiviteye sahip meyvelerden biridir ve birçok araştırma BB'nin yararlı etkilerine odaklanmıştır. Yapılan çalışmalarda BB'nin, antimikrobia, antikanser, antioksidan, antimutajenik, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi gibi pek çok etkileri belirtilmiştir fakat karaciğer hasarı üzerindeki etkileri henüz tam olarak açıklanmış değildir (40). Yang ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada karbon tetraklorür (CCl₄) ile deneysel karaciğer hasarı oluşturmuş ve deney hayvanlarına tedavi amaçlı diyetle BB vermişlerdir. Çalışma sonunda BB ile beslenen deney hayvanlarının AST ve ALT enzim aktivitelerinin, karaciğer hasarı oluşturulan deney hayvanlarına göre önemli düzeyde azaldığı ve BB'nin CCl₄'in indüklediği karaciğer hasarına karşı koruyucu bir ajan olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (228).

Asetaminofen hepatotoksitesine karşı koruyucu olarak kullandığımız diğer bir ajanımız CS'dır. Kitosan, antibakteriyal, antiülser, antitümör ve çeşitli biyolojik aktiviteleri olan biyomedikal bir materyaldir. Son yıllarda CS'in antioksidan özelliği dikkat çekmektedir. Jeon ve arkadaşlarının CCl₄ ile oluşturulan karaciğer hasarı üzerinde yaptıkları bir deneysel çalışmada CS'in AST ve ALT enzim aktivitelerini düşürdüğü ve karaciğer hasarı üzerindeki koruyucu etkisinin antioksidan aktivitesinden kaynaklandığı belirtilmiştir (96).

Santhosh ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada rifampisin ile deneysel olarak oluşturulan karaciğer hasarında CS'in serum AST, ALT ve ALP enzim aktivitelerini düşürdüğü ve karaciğer hasarı üzerinde koruyucu etkisinin olduğu belirtilmiştir (175). Kitosanın koruyucu etkilerinin çalışıldığı bir hiperkolesterolemi çalışmasında, diyetlerine CS katılan ratların serum AST, ALT ve LDH enzim aktivitelerinin azaldığı ve CS'in hiperkolesterolemik bir ajan olarak da kullanılabileceği vurgulanmıştır (151).

Karaciğer hasarının belirlenmesinde önemli biyokimyasal testler olan AST, ALT, ALP ve LDH enzim aktiviteleri, karaciğer dokusunda oluşan hasar sonucu kana salınmaktadır ve serum düzeyleri artmaktadır. Çalışma sonuçlarımıza göre, BB ve KOS'ın, APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarında, serum AST, ALT, ALP ve LDH enzim aktivitelerini düşürdüğü ve karaciğer dokusunda rejenerasyonu sağlayarak karaciğer hasarını engellediğini söyleyebiliriz.

Glutasyon, APAP'in toksik etkilerinin ortaya çıkmasında önemli olan ve metabolizmada meydana gelen serbest radikallerin yıkıcı etkilerine karşı hücreleri koruyan en önemli hücre içi antioksidan maddelerden birisidir. Asetaminofen metabolizması sonucu CYP450 enzim sistemi üzerinden açığa çıkan bir metabolit olan NAPQI, karaciğer üzerindeki toksik etkilerini hücre içi bir antioksidan olan GSH ile konjuge olarak zararsız hale getirmektedir. Yüksek dozlarda APAP alınması sonrasında NAPQI metabolitlerinin miktarında artış olur. Karaciğer GSH depolarının tükenmesi sonucu, açığa çıkan fazla miktardaki NAPQI molekülü detoksifikasyona uğramaz ve serbest haldeki NAPQI karaciğer hepatosit hücrelerine bağlanarak, karaciğer dokusunda hasar oluşumuna neden olur. İntraselüler GSH düzeyleri, APAP hepatotoksitesinin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır (169).

Shankar ve arkadaşlarının APAP toksisitesi üzerine yaptıkları deneysel bir çalışmada, doku GSH düzeylerinin kontrol grubuna göre önemli düzeyde azaldığı belirtilmiştir (184). APAP toksisitesi üzerine yapılan başka bir çalışmada, Bhadauria ve arkadaşları 21 gün süreyle ratlara 20 mg/kg APAP uygulamışlar ve çalışma sonunda karaciğer GSH düzeylerinin azaldığı gözlemlenmiştir (22). Literatüre uyumlu şekilde bulduğumuz çalışma sonuçlarında, APAP grubumuzun GSH düzeyleri, kontrol, BB ve KOS gruplarına göre önemli düzeyde azalmıştır. Asetaminofen grubumuzdaki azalmış GSH düzeyleri, APAP metabolizmasının toksik bir metaboliti olan NAPQI'nın, sitozolik ve mitokondrial GSH ile kovalent olarak bağlanması sonucu GSH düzeylerinin tükenmesiyle hücresel homeostazının bozulmasından kaynaklandığını göstermektedir.

Literatürde BB'nin GSH düzeyleri üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalar yok denecek kadar azdır. Lu ve arkadaşlarının hepatik fibrozis üzerine yaptıkları deneysel çalışmada, ratlara üç farklı dozda BB verilmiş, orta ve yüksek doz verilen BB'nin hepatositlerdeki hasarı azalttığı, karaciğer GSH düzeylerini önemli düzeyde arttırdığı belirtilmiştir. Çalışmada GSH düzeylerindeki artışın BB'nin hücre içi antioksidan kapasiteyi arttırmasından kaynaklandığı ileri sürülmüştür (39,128).

Bao ve arkadaşları, farklı bir protokol ile karaciğer hasarı oluşturdukları deney hayvanlarını üç farklı dozda BB ile beslemişler, karaciğer GSH düzeylerinin hem sağlıklı kontrol hem de karaciğer hasarı oluşmuş gruba göre yüksek düzeylerde artış gösterdiğini belirtmişlerdir. Glutasyon düzeylerindeki artışın, BB'nin serbest radikalleri elimine ederek oksidatif stresi ve lipid peroksidasyonunu inhibe etmesinden kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir (16).

Olteanu ve arkadaşları safra kanalı ligasyonu ile oluşturdukları karaciğer hasarında tedavi edici ajan olarak CS kullanmışlar ve karaciğer dokusunda GSH düzeylerini araştırmışlardır. Kitosan ile tedavi edilen grubun GSH düzeylerinin, karaciğer hasarı oluşturulan gruba göre önemli düzeyde artış gösterdiğini ve hem histolojik hem de biyokimyasal sonuçlarla CS'in hepatositleri oksidatif strese karşı önemli düzeyde koruduğunu belirtmişlerdir (150).

Kitosanın antioksidatif ve anti-inflamatuar etkilerinin gözlemlendiği deneysel bir çalışmada, ratlarda sepsis oluşturulmuş ve CS'in sepsis üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Kitosan ile beslenen grubun karaciğer GSH düzeyleri, sepsis grubuna göre önemli düzeyde artış göstermiştir. Kitosanın antioksidan ve anti-inflamatuar özellikleri ile oksidatif stresi inhibe ettiği ve karaciğer GSH düzeylerinin azalmasını engelleyerek sepsise karşı korucu etki gösterdiği belirtilmiştir (160).

Çalışmamızda, BB ve CS uygulanan APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarının karaciğer GSH düzeyleri, APAP grubuna göre önemli düzeyde artış göstererek kontrol grubuna yakın seviyelere gelmiştir. Tedavi gruplarımız kendi aralarında karşılaştırıldığında GSH düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Üç grubumuzda GSH düzeyleri benzer şekilde artış göstermiştir.

Hücre içi savunmanın ana kaynağını oluşturan GSH, ksenobiyotikler ve oksidatif strese karşı önemli bir koruyucudur. Çalışma sonuçlarımıza göre, APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarındaki artmış GSH düzeylerinin, BB ve CS'in hücre içi antioksidan kapasiteyi arttırarak oksidatif stresi inhibe etmesinden kaynaklandığını düşünüyoruz.

Karaciğer GSH düzeylerinin artmasıyla APAP metaboliti NAPQI, GSH ile konjuge olarak toksik olmayan ürünlere dönüşerek vücuttan atılır ve serbest halde dolaşan NAPQI'inin azalmasıyla karaciğer hasarı engellenir. Sağlıklı ratlara verdiğimiz BB ve CS'in GSH düzeylerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ve kontrol grubu ile aynı seviyelerde bulunmuştur. Sonuçlarımıza göre, BB ve CS'in karaciğerde toksik etkilerinin olmadığını söyleyebiliriz. Aynı zamanda BB ve CS'in, APAP toksisitesine karşı GSH yolu ile detoksifikasyonu arttıran antidotlar olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

Asetaminofen hepatotoksitesinde önemli mekanizmalardan biri de lipid peroksidasyonudur. Birçok hastalığın oluşumuna neden olan lipid peroksidasyonu, karaciğer hasarının oluşumundaki en belirgin moleküller olan serbest oksijen radikallerinin üretiminin artması sonucu CYP450 enzim sistemi tarafından oluşturulur (239). Asetaminofenin doz aşımında mitokondrial ve sitozolik GSH düzeylerinin fizyolojik değerinin altına düşmesi sonucu, intraselüler peroksit düzeyleri artar ve bunun sonucu olarak fenton mekanizması ile oksidatif stres artar. Serbest radikallerin hücre membranındaki çoklu doymamış yağ asitlerini okside etmesi lipid peroksidasyonunun başlamasına sebep olur (85).

Aldehitler, hidrokarbon gazları ve MDA, lipid peroksidasyonu sonucu oluşan genotoksik ve karsinojenik ürünlerdir. Malondialdehit, karaciğer hasarının belirlenmesinde en önemli lipid peroksidasyon ürünüdür. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin serbest oksijen radikalleri ile peroksidasyonu sonucunda oluşan MDA, hücre membranının geçirgenliğinin bozulmasına, hücre işlev kaybına ve inflamasyona neden olmaktadır (120,14).

Morsy ve arkadaşlarının yaptıkları deneysel çalışmada, ratlara tek doz 650 mg/kg APAP verilmiş ve karaciğer doku örneklerinde MDA ve GSH düzeyleri ölçülmüştür. Asetaminofen grubunda MDA düzeyleri artmış ve GSH düzeyleri azalmıştır. Çalışmada azalmış GSH düzeylerinin lipid peroksidasyonunu arttırarak MDA düzeylerini arttırdığı ileri sürülmüştür (140). Yapar ve arkadaşları ratlara tek doz 500 mg/kg APAP uygulamışlar ve APAP uygulamasından 4, 8 ve 24 sonra kan örnekleri alınmış ve hem kan hem de karaciğer doku örneklerinde MDA düzeylerini ölçmüşlerdir. Doku ve her üç saat diliminde alınan kan örneklerinde MDA düzeyleri yüksek bulunmuştur (231).

Yen ve arkadaşlarına göre tek doz 835 mg/kg APAP uygulanan ratlarda doku MDA düzeyleri sağlıklı kontrole göre artış göstermiştir. Malondialdehit düzeylerindeki bu artışın, APAP'in indüklediği hepatotoksisitede major mekanizmalardan biri olan oksidatif stresden kaynaklandığı ve yüksek doz APAP'in antioksidan enzim düzeylerini düşürerek lipid peroksidasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (234). Literatürlerde varılan ortak yargı, intraselüler serbest radikallerin membran yağ asitleriyle etkileşmesi sonucu lipid peroksidasyonunun düzeyinin arttığı ve lipid peroksidasyonunun hücre membranından salınarak sistemik dolaşıma geçerek spesifik aktivite gösterdikleridir (239).

Çalışmamızda, APAP grubunda doku MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek çıkması, APAP toksisitesi sonucu azalmış GSH düzeylerinin, hücre içi serbest radikal düzeylerinin sitotoksik düzeylere ulaşarak oksidatif stres aracılı lipid peroksidasyonunu stimüle ettiği ve MDA düzeylerini arttırdığını düşündürmektedir.

Asetaminofenin karaciğer üzerindeki lipid peroksidasyonunu arttırıcı etkisini azaltma amacıyla çeşitli antioksidanlar denenmiş ve APAP'in toksik etkilerine karşı koruyucu etkileri araştırılmıştır. Araştırmalarda, lipid peroksidasyonunu önlemek için çeşitli savunma mekanizmaları tartışılmıştır. Bunlardan ilki, hücre içi antioksidan enzimlerin aktivitesinin arttırılarak, peroksinitrit ve hidrojen peroksit gibi serbest oksijen radikallerinin etkinliğinin azaltılmasıdır (183).

Diğer bir savunma mekanizması ise dışarıdan beslenme ile alınan antioksidanlardır. Dışarıdan alınan antioksidanlar, intraselüler antioksidan aktiviteyi arttırarak hücre membranındaki lipitlerin oksidasyonunu inhibe ederek hasar oluşumunu engelleyebilmektedir (183).

İnsanların daha sağlıklı ve kaliteli bir yaşam sürmeleri için beslenme şekli ve gıda tercihleri dikkat etmeleri gereken temel ve önemli davranışlardan biridir. Son yıllarda, antioksidan özellikli maddelerin hücreleri, doğal oksidasyon reaksiyonlarının yıkımlayıcı etkilerine karşı koruduğu fark edilmiş, böylece araştırmalar bu bakış açısına yoğunlaşmıştır. Fitokimyasallar polifenolik içeriklerinden dolayı potansiyel antioksidanlardır. Blueberry'de yüksek polifenolik içeriğinden dolayı yüksek antioksidan aktiviteye sahip önemli fitokimyasallardan biridir (180). Dulebohn ve arkadaşları deneysel çalışmalarında, ratları 3 hafta boyunca BB ile beslemişlerdir. Çalışmada BB'nin, yüksek antioksidan kapasitesi sayesinde karaciğerdeki DNA hasarını azalttığı, faz II detoksifikasyon enzim aktivitelerini arttırdığı ve oksidatif stresi azaltarak, lipid peroksidasyonunu engellediği ve MDA düzeylerini azalttığı ileri sürülmüştür (56).

Wang ve arkadaşlarının karaciğer hasarı üzerinde yaptıkları çalışmada, ratlara 8 hafta süresince CCl₄ uygulanmış ve bu süre zarfında ratlar aynı zamanda BB içeren diyetle beslenmişlerdir. Çalışma sonunda BB ile beslenen gruplarda, BB ile beslenmeyen gruba göre karaciğer hasarının önemli düzeyde azalmış olduğu ve doku MDA düzeylerinin önemli ölçüde azaldığı belirtilmiştir. Blueberry'nin karaciğer hasarına karşı koruyucu etkilerinin, oksidatif strese karşı bir bariyer olarak görev yapmasından ve karaciğer inflamasyonunu inhibe ederek lipid peroksidasyonunu engellemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (213). Literatürdeki deneysel çalışmalarda, BB'nin oksidatif stresi azaltarak, lipid peroksidasyonunu önemli düzeyde azalttığı ve BB'nin oksidatif strese karşı koruyucu etkilerinin olduğu bildirilirken (156,213), klinik çalışmalarda, BB içeren diyetle beslenen sağlıklı kişilerin serum antioksidan kapasiteleri yüksek bulunmuştur (131, 167).

Kitosanın lipit peroksidasyonu üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalar mevcuttur fakat APAP toksisitesinin indüklediği lipit peroksidasyonu üzerine yapılmış bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Jeon ve arkadaşları, ratlarda CCl_4 ile intraperitoneal olarak karaciğer hasarı oluşturmuşlar ve aynı zamanda ratları çalışma süresince 200 mg/kg CS ile beslemişlerdir. Kitosan ile beslenen ratlarda MDA düzeylerinin önemli düzeyde azaldığı ve CS'in karaciğer hasarında antioksidatif etki göstererek lipit peroksidasyonunu önlediği belirtilmiştir (96).

Santhosh ve arkadaşlarının yaptıkları deneysel çalışmada, rifampisin indüklediği karaciğer hasarına karşı koruyucu olarak 200 mg/kg CS uygulanmış ve lipit parametreleri ile lipit peroksidasyonu ölçülmüştür. Kitosan ile beslenen grupta serum örneklerinde total kolesterol ve trigliserid düzeylerinde önemli düzeyde azalma gözlenirken, karaciğer doku örneklerinde lipit peroksidasyonunun inhibisyonu sonucu MDA düzeylerinde azalma gözlenmiştir. Araştırma sonucuna göre, CS'in antilipidemik ve antioksidan özelliği ile lipit peroksidasyonunu engellediği ve karaciğer hasarına karşı koruyucu rolünün olduğu ileri sürülmüştür (176).

Çalışma sonuçlarımızda, BB ve CS ile beslenen sağlıklı sıçan gruplarımızın MDA düzeylerinde, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ve BB ile CS'in karaciğer üzerine toksik etkilerinin olmadığını MDA sonuçlarına göre söyleyebiliriz. Tedavi gruplarımız olan APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarının MDA düzeylerinde APAP grubuna göre istatistiksel olarak önemli azalma gözlenmiştir. Tedavi gruplarımızın MDA düzeylerindeki azalmanın, BB ve CS'in intraselüler antioksidan aktiviteyi arttırarak, lipit peroksidasyonuna karşı bariyer görevi görmesinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Tedavi gruplarımız kendi aralarında tedavi etkinlikleri bakımından karşılaştırıldığında MDA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. APAP ($r = -0.800$, $p < 0.01$), APAP+BB ($r = -0.681$, $p < 0.05$), APAP+CS ($r = -0.695$, $p < 0.05$) ve APAP+BB+CS ($r = -0.687$, $p < 0.05$) gruplarında MDA ve GSH düzeyleri arasında negatif korelasyon bulunmuştur. Bu gruplarımızda MDA ve GSH düzeyleri arasındaki anlamlı korelasyon, BB ve CS'in GSH düzeylerindeki artış sonucu serbest oksijen radikallerinin üretimini baskılayarak lipit

peroksidasyonunu inhibe ettiğini desteklemektedir. Hem CS'ın hem de BB'nin APAP toksisitesiyle indüklenmiş lipid peroksidasyonunda benzer etkiler gösterdiğini düşünüyoruz.

Biyolojik sistemlerde arginaz enziminin önem taşıdığı başlıca metabolik yollar, üre döngüsü, prolin ve poliaminlerin biyosentez yolu ile sitotoksik NO radikalini sentezleyen NOS enzimiyle paylaştığı substrat için girdiği yarışma yoludur. Arginaz, üre ve ornitini meydana getirirken L-arginini substrat olarak kullanan bir enzimdir. Araştırmalarda arginazın, çeşitli patolojik süreçlerdeki önemli biyokimyasal yollarda anahtar enzim görevi gördüğü belirtilmiştir (34,44,71).

Arginaz, karaciğerdeki yerleşimleri ve fonksiyonları birbirinden farklı iki izoenzime sahiptir. Toplam vücut arginaz aktivitesinin çoğunu oluşturan Arginaz I izoenzimi periportal bölgede oluşur ve amonyak detoksifikasyonuna katılır. Arginaz II izoenziminin ise tam olarak fonksiyonları net değildir fakat perivenöz bölgede lokalize olduğu, poliaminlerin biyosentezi için ornitin iletiminde fonksiyon gördüğü belirtilmektedir (34,44,71).

Araştırmalarda, serum arginaz aktivitelerinin hepatoselüler hasarlarda güvenilir, spesifik ve etkili indikatör olduğu belirtilmiş (159), tümör patogeneğinde (45) ve kronik karaciğer hastalıklarında (92) önemli rol oynadığı vurgulanmıştır. Literatürde, karaciğer hasarında arginaz enzim aktiviteleri ile ilgili çalışmalar mevcuttur fakat APAP toksisitesi ve arginaz enziminin ilişkisini inceleyen çalışmalar yok denecek kadar azdır. Sajedianfard ve arkadaşları, dişi tavşanlara oral yoldan tek doz 3,24 gr/kg APAP uygulamışlar ve 0, 12, 24 ve 36. saatlerde kan örnekleri almışlardır. Kan örneklerinde AST, ALT, ALP ve arginaz enzim aktivitelerini ölçmüşlerdir. AST, ALT, ALP ve arginaz enzim aktiviteleri karaciğer hasarı oluşturulan grupta kontrol grubuna göre önemli derecede yüksek bulunmuştur (171).

Ikemato ve arkadaşlarının yaptıkları deneysel bir çalışmada, ratlarda CCl₄ ile karaciğer karaciğer hasarı oluşturulmuş ve 15, 30, 45, 60 ve 90 dakika sonra ratlar öldürülerek kan ve doku örnekleri alınmıştır. Serum örneklerinde AST, ALT aktiviteleri ölçülürken, arginaz aktiviteleri hem serum hem de doku örneklerinde ölçülmüştür (90).

Karaciğer hasarı oluşturulmuş grupta AST, ALT ve arginaz aktiviteleri sağlıklı kontrole göre çok yüksek bulunmuştur. Çalışmada arginaz aktivitelerinin 15. dakikadan itibaren yükseldiği, AST ve ALT'nin daha geç yükseldiği belirtilmiştir. Araştırmacılar karaciğer hasarında arginazın, hepatik belirteçler olan AST ve ALT'ye göre daha yüksek miktarlarda ve daha hızlı bir şekilde kan dolaşımına geçtiğini ve klinik için daha yararlı hepatik markır olabileceğini ileri sürmüşlerdir (90).

Araştırmalar, başta arginaz olmak üzere üre döngüsü enzimlerinin karaciğere daha spesifik olduğu için, karaciğer hasarında daha hızlı bir şekilde pik yaptığı ve rutin enzimlerle karşılaştırıldığında serum konsantrasyonlarının çok daha hızlı bir şekilde değiştiğini bildirmiştir. Ayrıca arginaz ekspresyonunun, inflamatuvar koşullar altında, çeşitli hücre ve dokularda yükseldiğinin önemli kanıtları vardır (90,92). Çalışmamızda karaciğer doku örneklerinde belirlediğimiz arginaz enzim aktiviteleri APAP ile karaciğer hasarı oluşturduğumuz grupta, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli derecede yüksek çıkmıştır.

Son yıllarda arginaz enzimi ile yapılan çalışmalarda artış vardır. Bunun nedeni, arginazın üre döngüsündeki önemli rolünün yanı sıra poliamin, prolin ve glutamat sentezi için ornitin üretimini sağlaması ve NO sentezinde oynadığı roldür. Ornitin, üre siklusunda yer alan nonesansiyel bir amino asittir. Ornitinin organizmada farklı fonksiyonları vardır. Kollajen sentezinin de içinde olduğu birçok yapısal proteinin sentezi için gerekli olan prolin, hücre proliferasyonu ve büyümesi için gerekli olan poliaminler ile protein sentezinde görev alan glutamat sentezi için ortak substrattır (62). Literatürde karaciğer hasarı ve ornitin arasındaki ilişkiyi araştıran araştırmalar mevcut değildir. Fakat çeşitli kanser türlerinde yapılmış birçok çalışmada arginaz enzim aktivitelerinin ve ornitin düzeylerinin arttığı belirtilmiştir (61).

Çalışmamızda, APAP grubumuzda doku ornitin düzeyleri kontrol grubuna göre önemli düzeyde artış göstermiştir. Ornitin düzeylerindeki bu artışın, karaciğer hasarında arginaz enzim aktivitesinin artması sonucu, NOS enzimini baskılayarak üretimi ornitin lehine çevirmesinden kaynaklandığını düşünüyoruz. Bu durum poliamin sentezini artırırken, NO üretiminin azalmasına neden olacaktır. Sonuç olarak ise NO düzeyinin azalması, hepatoselüler hasar sürecini hızlandırabilecektir.

Nitrik oksit, fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerde önemli bir mediatör olarak tanımlanmaktadır. Nitrik oksitin biyokimyası, hepatik metabolizmayı direk ve indirek olarak iki şekilde düzenler. Direk etkileri; NO'i, biyolojik hedef molekül ile direk tepkimeye sokacak kadar hızlı oluşan kimyasal tepkimelerdir. Hepatoselüler metabolizmada ve fonksiyonlarda direkt olarak değişime neden olur. Bu durumun tersine; indirek etkileri NO'in, O₂ veya süperoksit (O₂⁻) ile tepkimeye girerek reaktif nitrojen molekülleri oluşturması, ardından reaktif nitrojen moleküllerinin biyolojik hedefle tepkimeye girmesiyle oluşan kimyasal tepkimelerdir (199).

Serbest radikal olan NO karaciğer için hem sitotoksik hem de hücre koruyucu özellikleri olan bir reaktif moleküldür. Bazı araştırmalar endojen NO'in toksik olduğunu açıkça belirtirken, diğerleri ise koruyucu olduğunu göstermiştir. Koruyucu etkileri antioksidan mekanizmalar üzerinden sunulurken, NO aracılı toksisite hücre ölümüne yol açan reaktif nitrojen türlerinin oluşumuna dayandırılır (195). Hepatik hücre sinyalizasyonunda hem inhibitör hem de agonist olarak görev yapan NO, çeşitli karaciğer hastalıklarının oluşumunda önemli olan bir moleküldür. NO, hem pro-oksidan hem de antioksidan olarak fonksiyon görebilir. Karaciğerde apoptozu indükleyebildiği gibi inhibe de edebilir. Araştırmalarda NO inhibisyonunun hem zararlı hem de yararlı etkilerinin olabileceği belirtilmiştir (69).

Asetaminofen hepatotoksitesinde arginaz-NO ile ilgili zıt görüşler bulunmaktadır. Sharma ve arkadaşları, akut karaciğer hasarında arginaz aktivitesinin önemli düzeyde arttığını ve NO düzeylerinin ise azaldığını belirtmişlerdir. Arginaz up-regülasyonunun, NO sinyalinin regülasyonunun bozulduğu hastalık süreçlerindeki patofizyolojiye katkıda bulunduğu gösterilmiştir (185).

Araştırmalarda karaciğer hasarında NO düzeylerinin artış gösterdiği de belirtilmiştir. Gardner ve arkadaşları, tek doz 1 gr/kg APAP uyguladıkları ratlarda, AST, ALT ve NO düzeylerini ölçmüşlerdir. APAP'in indüklediği karaciğer hasarında AST ve ALT enzim aktivitelerindeki artışın, hepatositler tarafından arttırılmış NO üretimi ile ilişkili olduğunu ve NO'in, APAP'in indüklediği karaciğer hasarında önemli bir mediatör olduğunu belirtmişlerdir. Aynı zamanda hepatositlerde NO'in inhibisyonunun, AST ve ALT enzim aktivitelerinde azaltacağı belirtilmiştir (69).

Karabay ve arkadaşları, tiyoasetamid ile uyarılmış akut karaciğer hasarının arginaz aktivitesinde düşüşe yol açarken total hepatik NO derişimini arttırdığını belirtmişlerdir. Karaciğer doku arginaz enzim aktivitesindeki azalmanın enzimin karaciğerden salınmasını veya hasara bağlı olarak sağlam hepatosit sayısının azalmasını yansıtabileceği bildirilmiştir (102).

Jeyabalan ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptıkları bir çalışmada, ratlarda iskemi-reperfüzyon ile karaciğer hasarı oluşturulmuş ve arginaz, ornitin, NO düzeyleri ölçülmüştür. Karaciğer hasarı oluşturulmuş grupta arginaz ve ornitin düzeylerinin artış gösterdiği ve NO düzeylerinde azalma olduğu belirtilmiştir. L-arginin-NOS yolağı karaciğer hasarında önemli rol oynamaktadır. İskemi-reperfüzyon ile oluşturulmuş karaciğer hasarında artan arginaz aktiviteleri, L-argininin hızlı bir şekilde tüketilmesine neden olur (97).

Arginaz enzim aktivitesindeki artış reaksiyonu ornitin lehine çevirerek, ornitin düzeylerini arttırır. L-arginin düzeylerinin tükenmesi NO düzeylerinde azalma ile sonuçlanır. Arginin katabolizmasındaki arginaz/NOS yarışının organizma için hem yararlı hem de zararlı etkileri vardır. Arginaz inhibisyonu sonucu reaksiyon NO lehine çevrilir. Reaksiyonunu NO lehine çevrilmesi, hücre proliferasyonu ve kollajen sentezi için önemli mediatörler olan poliamin ve prolin üretimini azaltır. Böylece karaciğer rejenerasyonunda yararlı etkiler oluşabilir (97).

Çalışmamızda doku NO düzeylerine baktığımızda, NO değerlerinin APAP toksisitesi oluşturulan grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düştüğü gözlenmektedir. Çalışmamızda APAP grubunda, doku arginaz enzim aktiviteleri ile ornitin düzeylerinde anlamlı bir artış olduğu ve bu mekanizma sonucu poliamin biyosentezinin artacağı, bu durumun ise karaciğer hasarının gelişeceği yönündeki mekanizmayı tetikleyebileceğini düşündürmektedir. Bu olguya ek olarak APAP grubumuzda, NO düzeylerindeki azalmanın artmış arginaz enzim aktivitesinden kaynaklandığını düşünüyörüz.

Asetaminofenin indüklediği karaciğer hasarının oluşum mekanizmaları hala net değildir. Birbirinden farklı mekanizmalar tanımlanmış ve farklı görüşler ortaya koyulmuştur. APAP aracılı hepatotoksisitede; arjinaz/NO ilişkisi ile zıt görüşler bulunmaktadır. Çalışma bulgularımıza göre, arginaz up-regülasyonunun serbest oksijen radikallerinin artışına bağlı olarak geliştiğini düşünmekteyiz. Arginaz aktivitelerindeki artışın hızlı şekilde L-argininin tükenmesine neden olduğunu ve bunun sonucu olarak NO sinyal regülasyonunun bozulduğu hastalık sürecindeki patofizyolojiye katkıda bulunduğunu düşünmekteyiz.

Sağlıklı beslenme ve sağlıklı yaşam arasındaki ilişki her geçen gün önem kazanmaktadır. Buna bağlı olarak, ilaç veya kimyasallarla kontamine olmamış doğal antioksidanlara ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Araştırmalarda BB'nin güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip olmasının ve besin amaçlı kullanılmasının yanı sıra, tedavi açısından önemli olan antosiyaninler ve polifenoller gibi biyoaktif moleküllerin potansiyel bir kaynağı olarak kullanılması cazip kılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, artmış serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonun, birçok hastalığın patogenezinde rol aldığını göstermektedir. Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki dengesizlik doku hasarına yol açmaktadır (6).

Çalışmamız APAP hepatotoksisitesinde BB'nin arginaz enzim aktivitesi ve ornitin düzeyleri üzerine etkilerinin incelendiği ilk çalışmadır. Araştırmalarda serbest radikallerin ve buna bağlı olarak oluşan oksidatif stresin arginaz enzim aktivitelerini arttırdığı belirtilmektedir (155). Asetaminofen hepatotoksisitesinin oluşumunda en önemli mekanizmalardan biri serbest radikallerin artışına bağlı olarak gelişen oksidatif stresdir. Karaciğer hasarında artan arginaz aktiviteleri oksidatif stres ile ilişkili bulunmuş ve oksidatif radikallerin arginaz aktivitesindeki artışta anahtar rol oynadığı bildirilmiştir. Araştırmalarda, birçok hastalığın patogenezinde artmış arginaz aktivitelerinin rol aldığı ve buna bağlı olarak azalmış NO düzeylerinin buna eşlik ettiği bildirilmiştir (37).

Sankaralingam ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, oksidatif stresin arginaz enzim aktivitelerinin kontrolünde önemli rolünün olduğunu fakat bu rolünün tam olarak aydınlatılmadığını belirtmişlerdir (174). McAnulty ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptıkları çalışmada, BB'nin anti-inflamatuvar sitokinleri arttırarak oksidatif stresi azalttığı ve BB'nin sağlık için çok önemli bir besin olduğu belirtilmiştir (132).

Çalışmamızda BB tedavisi uyguladığımız APAP+BB ve APAP+BB+CS gruplarında arginaz enzim aktivitelerinin APAP grubuna göre önemli derecede azaldığını gözlemledik. Tedavi gruplarımızdaki ornitin düzeyleri de APAP grubuna göre önemli derecede azalmış ve hemen hemen kontrol grubuna yakın düzeylere gelmiştir. Sonuçlarımızda NO düzeylerinin APAP+BB ve APAP+BB+CS gruplarında önemli derecede arttığını gözlemledik.

Blueberry uygulamasının arginaz enzim aktivitelerini düşürmesini, oksidatif stresi azaltmasından kaynaklandığını düşünüyoruz. Azalmış arginaz aktivitelerine bağlı olarak reaksiyon NO lehine çevrilerek NO düzeylerinin artmasına sebep olmuştur. Reaksiyonun NO lehine çevrilmesinin, hücre proliferasyonu ve kollajen sentezi için önemli mediatörler olan poliamin ve prolin üretimini azaltarak, karaciğer rejenerasyonunda yararlı etkiler oluşturduğunu düşünüyoruz.

Birçok alanda önemli yararları olan CS, yapısındaki hidroksil ve amino grupları sayesinde şelatlayıcı yeteneğinin olduğu ve bu özelliğine ek olarak serbest radikal tutucu özelliğininde olduğu belirtilmiştir (89). Yang ve arkadaşları, karaciğer hasarı oluşturmadan önce ratlara CS uygulamışlar, CS ile yapılan ön tedaviden sonra karaciğer hasarı oluşturmuşlardır. Kitosan ile yapılan tedavinin antioksidan savunma mekanizmasını güçlendirdiği, oksidatif hasara karşı koruyucu rol üstlendiği belirtilmiştir (227).

Çalışmamızda CS tedavisi uyguladığımız APAP+CS grubunda arginaz aktiviteleri, APAP grubuna göre önemli derecede azalırken, NO düzeyleri artış göstermiştir. Çalışma grubumuzun ornitin düzeylerinde APAP grubuna göre önemli derecede azalma olmuştur.

Olteanu ve arkadaşları, CS'in hepatosit hücrelerini oksidatif strese karşı koruduğunu bildirmişlerdir (150). APAP+CS grubumuzun arginaz aktivitelerindeki azalmanın, CS'in serbest radikaller üzerindeki tutucu özelliği sonucu oksidatif stresi azaltmasından kaynaklandığını düşünüyoruz. Tedavi etkinlikleri açısından APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarımızı kendi aralarında değerlendirdiğimizde arginaz aktiviteleri ile ornitin düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenirken, BB ve CS'ı ikili kombinasyon şeklinde uyguladığımız APAP+BB+CS grubunda NO düzeylerinde APAP+BB ve APAP+CS gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenmiştir. İkili kombinasyonun bu grupta antioksidan savunma mekanizmasını daha fazla güçlendirdiğini söyleyebiliriz.

Asetaminofen hepatosisitesinde BB ve CS'ın koruyucu rollerini arginaz-ornitin-NO yolu yönünden değerlendirdiğimizde, hem BB'nin hem de CS'ın, hepatositleri APAP toksisitesi sonucu oluşan oksidatif strese karşı koruyarak arginaz aktivitelerini ve ornitin düzeylerini azalttığını ve reaksiyonun NO lehine çevrilmesi sonucu NO düzeylerinde artış olduğunu söyleyebiliriz. Bozulan NO regülasyonunun APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarında düzelmesi sonucu hepatoselüler hasar süreci yavaşlamıştır.

Dokuz karbonlu şeker nöraminik asitin asetilenmiş türevleri olan sialik asitler, doku ve hücrelerin çözünebilir ve çözünemez komponentlerinin yapısal bileşenleridir. Asidik yapılarından dolayı hücre yüzeyine negatif yük kazandırır ve hücre-hücre ya da hücre-matriks etkileşimlerinde önemli rol oynarlar. Spesifik hücresel tanıma bölgelerini maskeleyen yeteneğine sahip olan sialik asitler, glikolipidlere ve glikoproteinlere antijenik özellik kazandırır ve glukokonjugatların makromoleküler yapısını etkileyebilirler (193). Organizmada sialik asit, lipit bağlı, proteine bağlı ve serbest olarak bulunur, bunların hepsi ise total sialik asit seviyesi ile ifade edilir (49). Hücre yüzeyindeki sialik asit miktarlarının artması, azalması ya da sialik asitlerin özelliklerinin değişmesi, hücre ya da dokularda oluşan değişikliği ortaya koymaktadır. Akut-faz reaksiyonun göstergesi olan sialik asit düzeylerinin, kanser, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, bakteriyel enfeksiyonlar, romatoid artrit ve kronik karaciğer hastalıkları gibi pek çok hastalıkta yükselmiş olduğu araştırmalarda belirtilmiştir (5,11,48,141).

İnflamatuvar karaciğer hastalıklarında doku ve serum sialik asitlerinin düzeylerindeki farklılık önemli diagnostik ve prognostik bir araçtır. Karaciğer hasarında, TSA ve LSA düzeyleri hasar derecesi ile orantılı bir şekilde yükselir. Bunun nedeni dolaşımdaki sialik asitlerin glikoproteinlere kovalent olarak bağlanması ve TSA düzeylerinin % 50'den fazlasının akut faz proteini gibi davranmasıdır (5,114).

Cemek ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada karaciğer hasarında serum sialik düzeylerinin artış gösterdiği belirtilmiştir. Serum sialik asit düzeylerindeki artışın akut faz cevabını yansıttığını, serum sialik asit düzeyleri ile lipid peroksidasyonu arasında paralel bir artış olduğunu ve sialik asit düzeylerinin oksidatif stres sonucu artış gösterdiğini belirtmişlerdir. Çalışma sonuçlarına göre sialik asidin karaciğer hastalıklarında prognostik araç olabileceğini söylemişlerdir (35).

Çalışmamızda, hem doku hem de serum örneklerinde incelenen TSA düzeylerine bakıldığında, kontrol grubuna göre APAP uygulanan ratların TSA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir.

Yapar ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, APAP toksisitesi oluşturulan grupta serum TSA düzeyleri yüksek bulunmuş ve bu artışın APAP aracılı karaciğer hasarı sonucu oluşan oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyondan kaynaklandığını söylemişlerdir (49). Son yıllarda yapılan araştırmalarda, yükselmiş TSA düzeylerinin, yağlı karaciğer, siroz, karaciğer kanseri, akut ve kronik karaciğer hastalıkları ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (233).

Sialik asitler, lipoprotein ve lipid metabolizmasında önemli roller oynar. Protein ve lipidlerin sializasyonu ve glikozilasyonu karaciğerde gerçekleşmektedir. Yapılan araştırmalarda, protein ve lipidlerin sializasyon ve glikozilasyonunda meydana gelen değişimlerin, çeşitli karaciğer hastalıklarının patogenezi ve ilerlemesinde önemli rollerinin olduğu belirtilmiştir (124). [Cylwik](#) ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, hepatoselüler hasar da LSA ve TSA düzeylerinin artış gösterdiği ve LSA düzeylerindeki artışın TSA düzeylerindeki artışa neden olduğu ve hepatoselüler hasarın biyokimyasal parametreleri ile pozitif korelasyonlu olduğu belirtilmiştir (49).

Chrostek ve arkadaşları, LSA düzeyindeki artışın, lipoproteinlerin lipid parçalarındaki sializasyonda meydana gelen değişimlerden kaynaklandığı ve bu değişimlerin hastalığın patogenezi ve ilerleyişini etkileyebileceğini söylemişlerdir (43). Araştırmalarda, çeşitli karaciğer hastalıklarında, hücre membran glikolipitlerinin terminal uçlarında yerleşen sialik asitlerin salgılanmasının, muhtemel bir lipid peroksidasyonu ve hücre membranlarının yıkımı sonucunda meydana gelmiş olabileceği, TSA ve LSA artışı ile sonuçlanan bu salgılanmanın membranlardaki glikolipitlerin yapısal bütünlüğünü değiştirmesinden kaynaklanabileceği belirtilmiştir (233).

Çalışmamızda serum ve doku LSA düzeyleri, APAP grubunda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde yüksek bulunmuştur. Çalışma sonuçlarımıza göre, APAP ile indüklenen karaciğer hasarında artmış TSA ve LSA düzeylerinin, artmış lipid peroksidasyonundan ve oksidatif stres sonucu hücre membranlarının yıkımı sonucunda meydana gelmiş olabileceğini düşünmekteyiz.

Kitosanın doğada yaygın olarak bulunması ve toksik olmayan yapısından dolayı birçok metabolik hastalıkta pozitif etkilerinin olabileceği araştırmacılar tarafından öne sürülmüştür. Çeşitli metabolik hastalıklar üzerinde yapılan çalışmalar sonucu KOS'ın, bozulmuş lipid, glikoz ve antioksidan düzeylerinin iyileştirilmesi sonucu diyabete bağlı komplikasyonların önlenmesinde yararlı olabileceği (124), lökositler, sitotoksik T hücreleri ve natural killer hücreler gibi immün sistemle ilgili savunma araçlarını uyararak tümör üzerinde inhibe edici etkilerinin olduğu açıklanmıştır (67). Karaciğer hasarı üzerinde yapılan çalışmalarda varılan net sonuç CS'in lipid peroksidasyonunu engelleyerek, hücre membranının yapısının bozulmasını engellediği ve vücudun antioksidan savunma mekanizmasını güçlendirmesidir (227).

Çalışmamızda APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarında serum ve doku örneklerinin her ikisinde hem TSA hem de LSA düzeylerinde APAP grubuna göre önemli düzeyde azalma gözlenmiştir. Kitosan uygulaması bu gruplarımızın sialik asit düzeylerini kontrol grubu değerlerine yakın değerlere getirmiştir. Sağlıklı ratlara verdiğimiz CS'in TSA ve LSA düzeylerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Araştırmalarda, CS'in kationik yapısının fosfolipidlerdeki sialik asit kalıntılarına bağlanarak, hücre membranı geçirgenliğini koruduğu ve serbest radikal tutucu özelliği sonucu oksidatif hasarı engellediği belirtilmiştir (107,177).

Çalışma sonuçlarımızda CS'in, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarındaki sialik asit düzeylerini kontrol grubu seviyelerine indirmesini, lipid peroksidasyonunu inhibe ederek, endojen antioksidan savunma sistemini arttırmasından kaynaklandığını düşünüyöruz. Ayrıca literatürdeki bilgilerden yola çıkarak CS'in, hücre membranındaki sialik asit kalıntılarına bağlanarak, APAP'in indüklediği hasarı engellediğini söyleyebiliriz.

Çalışmamızda BB uygulaması yaptığımız APAP+BB grubunda TSA ile LSA düzeyleri kontrol grubuna göre önemli düzeyde azalmış ve kontrol grubu seviyelerine gelmiştir. Sağlıklı kontrol grubuna verdiğimiz BB'nin, TSA ve LSA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. BB ve sialik asit düzeylerini inceleyen bir çalışma literatürde mevcut değildir. Fakat yine berry cinsi bir meyve olan cranberry'nin sialik asit düzeylerindeki artışı inhibe ettiği belirtilmiştir (29).

Lu ve arkadaşları, BB'nin GSH düzeylerini arttırarak karaciğer hasarını önlediğini ve GSH düzeylerindeki bu artışın endojen antioksidan aktiviteyi arttırmasından kaynaklandığını belirtilmektedir (128). Literatürle uyumlu olan çalışma sonuçlarımız, TSA ve LSA düzeylerindeki azalmanın, antioksidan kapasitenin artışına bağlı olarak GSH düzeylerindeki artıştan kaynaklandığını göstermektedir.

Seruloplazmin, primer olarak karaciğerde sentez edilen, bakır içeren bir proteindir. Seruloplazminin, bakır transportu, koagülasyonun modülasyonu, biogenik aminlerin inaktivasyonu, ve oksidatif strese karşı savunma gibi çeşitli fonksiyonları vardır. Yapısının %7-8'lik karbonhidrat içeriğini sialik asit oluşturur (35). Seruloplazmin, serbest oksijen radikallerinin oluşumunu ve lipid peroksidasyonunu engelleyerek, dokularda ve plazmada bulunan serbest radikallerin zararlarını engellemektedir (210).

Uhlikova ve arkadaşları yaptıkları çalışmada seruloplazmin oksidaz enzim aktivitelerinin alkole bağlı karaciğer hasarında önemli düzeyde azaldığını, seruloplazminin yapısındaki bakır miktarının azalması sonucu enzim aktivitesinde azalma olduğunu belirtmişlerdir. Seruloplazmin oksidaz enzim aktivitesindeki düşüşün serbest oksijen radikallerinin artışına bağlı olarak gelişen oksidatif strese neden olduğu bildirilmiştir (204).

Ma ve arkadaşlarının yaptıkları deneysel çalışmada, ratlara oral gavaj yoluyla tek doz 300 mg/kg APAP uygulanmış ve seruloplazmin oksidaz düzeyleri kontrol grubuna göre önemli derecede düşük bulunmuştur (129). Salek ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları klinik çalışmada, APAP kullanımı sonucu akut karaciğer hasarı gelişmiş hastalarda seruloplazmin oksidaz enzim aktiviteleri, sağlıklı kontrol grubuna göre önemli düzeyde düşük bulunmuştur (172).

Çalışmamızda APAP grubunda seruloplazmin oksidaz enzim aktiviteleri, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır. Seruloplazmin, serbest radikallerin hücresel hasarını önlemek için, peroksidasyon zincir reaksiyonlarını engelleyerek lipid peroksidasyonunu ve hücre hasarını engeller. Araştırmalarda akut ve kronik karaciğer hasarında, seruloplazmin oksidaz aktiviteleri ile lipid peroksidasyonu ürünü olan MDA düzeyleri arasında ilişki olduğu belirtilmiştir (101,134).

Araştırmalarda seruloplazmin yetersizliğinin, artmış lipid peroksidasyonu, azalmış mitokondriyal enerji üretimi ve demir aracılı serbest radikallerin artması nedeniyle hücre hasarına yol açtığını bildirmektedir (138).

Çalışmamızda APAP grubunda, seruloplazmin oksidaz enzim aktiviteleri ile MDA düzeyleri arasında ($r = -0.706$, $p < 0.05$) negatif korelasyon bulunmuştur. Çalışma sonuçlarımız, seruloplazmin oksidaz enzim aktivitelerindeki azalmanın, karaciğerde meydana gelen hasar sonucu seruloplazmin sentezinin azalmasına bağlı geliştiğini ve bunun sonucu olarak lipid peroksidasyonunun arttırdığını göstermektedir.

Landes ve arkadaşlarının yaptıkları deneysel ve klinik çalışmalarda, diyetlerine CS eklenen insanların ve ratların seruloplazmin düzeylerinin, kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu ve CS'in karaciğer üzerinde herhangi bir toksik etkisinin olmadığı belirtilmiştir (119).

Çalışmamızda APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarının seruloplazmin oksidaz enzim aktiviteleri APAP grubuna göre istatistiksel olarak önemli derecede artarak kontrol grubunun düzeylerine gelmiştir. Her üç tedavi grubumuzda da seruloplazmin oksidaz aktiviteleri ile lipid peroksidasyonu arasında negatif korelasyon bulunmuştur. Gruplarımızdaki artmış seruloplazmin oksidaz aktivitelerinin, BB ve CS'in serbest radikalleri absorblama kapasitesinden kaynaklandığını düşünüyoruz. Oksidatif stresi azaltan BB ve CS, endojen antioksidan mekanizmayı kuvvetlendirerek karaciğer rejenerasyonunu sağlamıştır. Karaciğer hasarının azalması sonucu seruloplazmin düzeyleri kontrol düzeylerine yükselmiş ve bunun sonucu olarak da lipid peroksidasyonu azalmıştır.

On dokuzuncu yüzyıl ile birlikte hızlı gelişen sanayileşme sonucu, obezite yaygınlaşmaya başlamış ve insan sağlığını ciddi şekilde tehdit etmeye başlamıştır. Bu sebeple birçok hastalıkta ilaçlarla tedaviye destek olarak veya tek başına kullanılmakta olan fitoterapötiklere olan ilgi her geçen gün artmaktadır. Bir glikozamin polimeri olan CS, yağlara bağlanıp emilimi engelleyerek etki gösterdiği ve vücut ağırlığını azaltmak için diyet destekleyici olarak kullanılabilceği düşünülmektedir (241).

Zahorska-Markiewicz ve arkadaşlarının 50 obez kadın üzerinde yaptıkları çalışmada, kalori kısıtlaması ile birlikte günlük 750 mg kullanan CS tablet kullanan kadınların, obeziteye eşlik eden tansiyon ile birlikte vücut ağırlıklarının da istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı belirtilmiştir (240). Ni Mhurchu ve arkadaşları, kısa dönem CS kullanımının vücut ağırlığını azalttığını belirtmişlerdir (146). Sumiyoshi ve arkadaşlarının yaptıkları deneysel çalışmada, yağlı diyetle beslenen obez farelere günde iki kez 300 mg/kg CS uygulanmış, total kolesterol ve trigliserid düzeyleri ile vücut ağırlıklarında önemli düzeyde azalma olmuştur (192).

Araştırmalarda, hızlı bir şekilde çözünebilen CS'in şeker emilimini yavaşlatarak ve yağı absorplayarak kilo kontrolünde kullanılabilen fiberler olarak düşünölmüştür. Ylitalo ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, CS'in pozitif yüklü amino gruplarının, yağ asitlerinin anyonik karboksil grupları ile etkileşime geçtiği ve safra asitlerinin sindirilmeden sindirim sistemi içerisinden geçerek yağı absorpladığı belirtilmiştir (230).

Çalışmamızda, deneysel hayvanlarımızın ağırlıklarını hem çalışma başında hem de çalışma sonunda belirledik. 200 mg/kg oral yoldan CS uyguladığımız sağlıklı sıçan grubumuzun çalışma sonundaki ağırlıkları, çalışma başındaki ağırlıklarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Bu grubumuzun karaciğer enzim aktivitelerinde, hiçbir uygulama yapmadığımız sağlıklı kontrol grubuna istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Çalışma sonularımızıza göre CS'in karaciğer üzerinde toksik etkisi olmadan vücut ağırlığının azalmasına yardımcı olduğunu söyleyebiliriz.

Çalışmamızda, kontrol, BB ve CS gruplarında, histopatolojik olarak değerlendirdiğimiz bulgular olan yoğun hücrel dejenerasyon, sinüzoidal dilatasyon, vasköler konjesyon ve hücrel inflamasyon açısından herhangi bir patolojiye rastlanmadı. Buna ek olarak CS grubumuzda herhangibir histopatolojik bulguya rastlamamış olmamızdan dolayı, CS'in vücut ağırlığını azaltırken herhangibir toksik etkisinin olmadığını söyleyebiliriz.

Asetaminofen grubunda, kontrol grubuna göre ciddi şekilde yoğun hücrel dejenerasyon mevcuttu. Bu grubumuzda sinüzoidal dilatasyon, vasköler konjesyon ve hücrel inflamasyon düzeylerinin de kontrol grubuna göre ciddi derecede arttığını gözlemledik. Histolojik bulgularımız, APAP'in karaciğer üzerindeki toksik etkilerinin olduğunu göstermektedir.

Asetaminofen+Blueberry grubunda hücrel dejenerasyon bulguları, APAP grubuna göre değerlendirildiğinde önemli düzeyde azalma gözlenmiştir. Aynı zamanda kontrol grubuna göre karşılatırdığımızda hücrel dejenerasyonun hafif şiddette oluştuğunu söyleyebiliriz. Bu grubumuzda sinüzoidal dilatasyon, vasküler konjesyon ve hücrel inflamasyon bulguları, kontrol grubuna göre hafif şiddette artış göstermiştir. Bulgularımız APAP grubu ile karşılatırıldığında istatistiksel olarak önemli derecede azalma gözlenmiştir. Bu grubumuzun histolojik sonuçları, BB'nin APAP'in indüklediği karaciğer hasarı üzerinde koruyucu etkisinin olduğunu göstermektedir.

Histolojik bulgularımıza göre APAP+CS grubumuz da, hücrel dejenerasyon, sinüzoidal dilatasyon ve hücrel inflamasyon bulguları APAP+BB grubuna göre daha yüksek seviyede oluşmuştur fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu grubumuzda vasküler konjesyon bulguları, kontrol grubuna göre hafif şiddette artış göstermiştir. Hücrel dejenerasyon, sinüzoidal dilatasyon ve hücrel inflamasyon bulguları, APAP grubu ile karşılatırıldığında istatistiksel olarak önemli derecede azalma gözlenmiştir. Bu grubumuzun histolojik sonuçlarına göre CS'ın APAP'in indüklediği karaciğer hasarı üzerinde koruyucu etkisinin olduğunu söyleyebiliriz.

Asetaminofen+Bluberry+Kitosan grubumuzda hücrel dejenerasyon bulguları, APAP grubuna göre çok önemli düzeyde azalma gösterdi. Bu grubumuzda iyi korunmuş karaciğer parankimi ve hepatositlerin gözlenmiştir. Tedavi gruplarımız arasında hücrel dejenerasyon bulgusunun en az oluştuğu grup APAP+BB+CS grubudur. Bu grubumuzda sinüzoidal dilatasyon, vasküler konjesyon ve hücrel inflamasyon bulguları, kontrol grubuna göre hafif şiddette artış göstermiştir. Bulgularımız APAP grubu ile karşılatırıldığında istatistiksel olarak önemli derecede azalma gözlenmiştir. APAP+BB+CS grubumuzda, yoğun hücrel dejenerasyon, sinüzoidal dilatasyon, vasküler konjesyon ve hücrel inflamasyon bulguları APAP+BB ve APAP+CS gruplarına göre daha az düzeyde oluşmuş ve kontrol grubuna yakın seviyelere gelmiştir. Sonuçlarımız, BB+CS kombinasyonunun karaciğerde sinerjik etki oluşturarak histoloji bulguları kontrole yakın düzeylere getirdiğini göstermektedir.

Sonuç olarak, deneysel karaciğer hasarı oluşturmak için kullandığımız APAP, deney hayvanlarımızın karaciğerlerinde yoğun hücrel dejenerasyon, sinüzoidal dilatasyon, vasküler konjesyon ve hücrel inflamasyon bulgularının ciddi bir şekilde oluşumuna neden olmuştur. Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular, APAP hepatotoksisitesinin kaçınılmaz olduğunu ve toksisiteye karşı diyetle BB ve CS'ın alınmasının karaciğer için koruyucu rol oynayabileceğini göstermektedir. Çalışma verilerimize dayanarak, günlük hayatta analjezik ve antipiretik amaçlı yaygın olarak kullanılan APAP'e bağlı gelişen toksik etkilerin önlenmesinde, BB ve CS'ın tedavi protokolüne eklenmesinin yarar sağlayacağını düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Deneysel karaciğer hasarı modeli oluşturmak için kullandığımız APAP'ın karaciğerdeki etkilerine karşı BB ve CS'in koruyucu rolüne ait sonuçlar aşağıda belirtilmiştir.

Sağlıklı sıçanlara uyguladığımız BB ve CS, karaciğer üzerinde herhangi bir toksisite göstermemişlerdir. Kitosan verdiğimiz sağlıklı sıçanların vücut ağırlıklarında önemli derecede azalma gözlenmiştir.

Asetaminofen ile indüklenen karaciğer hasarı sonucu azalmış GSH düzeyleri, hücre içi serbest radikal düzeylerini sitotoksik düzeylere ulaştırarak, oksidatif stres aracılı lipid peroksidasyonunu stimüle etmiştir.

Asetaminofen toksisite tedavisinde kullandığımız BB ve CS'in mono ve kombine tedavileri uygulanan dozda herhangi bir hepatotoksisite göstermeden tedavi etkinliği göstermişlerdir. Hatta, histolojik incelemelerde BB ve CS kombine tedavisi karaciğer rejenerasyonunu mono tedavilere göre daha fazla sağlamıştır.

Asetaminofen, serbest oksijen radikallerini stimüle ederek arginaz enziminin up-regülasyonuna sebep olmaktadır. Arginaz enzim aktivitesinin artması, NOS enzimini baskılayarak üretimi ornitin lehine çevirir. Bu durum poliamin sentezini artırırken, NO üretiminin azaltır. NO düzeyinin azalması, hepatoselüler hasar sürecini hızlandırmaktadır.

Blueberry ve CS'in mono ve kombine tedavileri hepatositleri APAP toksisitesi sonucu oluşan oksidatif strese karşı koruyarak arginaz enzim aktivitelerini ve ornitin düzeylerini azaltmış ve reaksiyonun NO lehine çevrilmesi sonucu NO düzeylerinde artış olmuştur. Bozulan NO regülasyonunun APAP+BB, APAP+CS ve APAP+BB+CS gruplarında düzelmesi sonucu hepatoselüler hasar süreci yavaşlamıştır. BB ve KOS'ın kombine tedavileri NO düzeylerini mono tedavilere göre daha fazla arttırmış, ikili kombinasyon antioksidan savunma mekanizmasını daha fazla güçlendirmiştir.

Asetaminofen grubunda artan lipid peroksidasyonuna bağlı olarak sialik düzeyleri artmıştır. Blueberry ve CS'in mono ve kombine tedavileri, endojen antioksidan savunma mekanizmasını arttırarak, lipid peroksidasyonunu engellemiş ve buna bağlı olarak sialik asit düzeyleri azalmıştır. Polikasyonik yapıya sahip olan CS, sialik asit kalıntılarına bağlanarak, hücre membranı geçirgenliğini korumakta ve serbest radikal tutucu özelliği sonucu oksidatif hasarı engellemektedir.

Blueberry ve CS'in mono ve kombine tedavileri, seruloplazmin oksidaz enzim aktivitelerini arttırarak lipid peroksidasyonunu inhibe etmiştir. Tedavi gruplarımızdaki artmış seruloplazmin oksidaz aktivitelerinin, BB ve CS'in serbest radikalleri absorblama kapasitesinden kaynaklandığını düşünüyoruz. Oksidatif stresi azaltan BB ve CS, endojen antioksidan mekanizmayı kuvvetlendirerek karaciğer rejenerasyonunu sağlamıştır. Karaciğer hasarının azalması sonucu seruloplazmin oksidaz enzim aktiviteleri kontrol düzeylerine yükselmiş ve bunun sonucu olarak da lipid peroksidasyonu azalmıştır.

Çalışmamızda, kontrol, BB ve CS gruplarında, histopatolojik olarak değerlendirdiğimiz bulgular olan yoğun hüresel dejenerasyon, sinüzoidal dilatasyon, vaskler konjesyon ve hüresel inflamasyon açısından herhangi bir patolojiye rastlanmadı. Asetaminofen grubunda, kontrol grubuna göre ciddi şekilde yoğun hüresel dejenerasyon, sinüzoidal dilatasyon, vaskler konjesyon ve hüresel inflamasyon mevcuttu. Blueberry ve CS'in mono ve kombine tedavilerinin uygulandığı gruplarda histopatolojik bulgular hafif şiddette oluşmuştur. Blueberry ve CS kombine tedavisi, karaciğerde sinerjik etki oluşturarak histopatolojik bulguları kontrole yakın düzeylere getirmiştir.

Sonuçlarımız, BB ve CS'in mono ve kombine tedavilerinin, intraselüler antioksidan kapasiteyi arttırarak, APAP hepatotoksitesine karşı büyük oranda koruyucu rol oynadığını göstermektedir. İlaç toksitesini ve diğer nedenlerin indüklediği hepatotoksitesite modellerinde BB ve CS'in karaciğer hasarının azaltılmasında koruyucu etkisinin olabileceğini sorgulayan *in-vivo* hayvan modelleri, *in-vitro* hücre modelleri ve ileri moleküler çalışmaların yapılmasının yararlı olacağı düşünmektedir.

LİTERATÜRLER

1. Abdel-Misih, S.R., Bloomston, M., 2010, Liver anatomy, *Surg Clin North Am*, 90 (4), 643-53 p.
2. Abdel-Wahhab, M.A., Nada, S.A., Arbid, M.S., 1999, Ochratoxicosis: prevention of developmental toxicity by L- methionine in rats, *J Appl Toxicol*, 19 (1), 7-12 p.
3. Ajith, T.A., Hema, U., Aswathy, M.S., 2007, Zingiber officinale Roscoe prevents acetaminophen-induced acute hepatotoxicity by enhancing hepatic antioxidant status, *Food Chem Toxicol*, 45 (11), 2267-72 p.
4. Alderton, W.K., Cooper, C.E., Knowles, R.G., 2001, Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition, *Biochem J*, 357 (3), 593-615 p.
5. Ali, S.A., Faddah, L., Abdel-Baky, A., Bayoumi, A., 2010, Protective effect of L-carnitine and coenzyme Q10 on CCl₄-induced liver injury in rats, *Sci Pharm*, 78 (4), 881-96 p.
6. Altan, N., Dinçel, A.S., Koca, C., 2006, Diabetes Mellitus and Oxidative Stres, *Turk J Biochem*, 31 (2), 51–56 p.
7. Anderson, G.J., Vulpe, C.D., 2001, Regulation of intestinal iron transport, in: D. Templeton (Ed.), *Molecular and Cellular Iron Transport*, Marcel Dekker, New York, NY, 559– 596 p.
8. Anthony, B., Allen, J.T., Li, Y.S., McManus, D.P., 2010, Hepatic stellate cells and parasite-induced liver fibrosis, *Parasit Vectors*, 3 (1), 60 p.
9. Aouffen, M., Paquin, J., De Grandpré, E., Nadeau, R., Mateescu, M.A., 2001, Deglycosylated ceruloplasmin maintains its enzymatic, antioxidant, cardioprotective, and neuronoprotective properties, *Biochem Cell Biol*, 79 (4), 489-97 p.
10. Arıcı, S., 2008, Toxic Hepatitıs, *Pamukkale Medical Journal*, 1 (2), 113-119 s.
11. Arif, S., Najeeb-ul-Haq., Hanif, R., Khan, A.S., Jamil-ur-Rehman., Mufti, T.A., 2005, Variations of serum sialic acid level in liver cirrhosis, *J Ayub Med Coll Abbottabad*, 17 (3), 54-7 p.
12. Ash, D.E., 2004, Structure and function of arginases, *J Nutr*, 134 (10), 2760-2764 p.
13. Ashamiss, F., Wierzbicki, Z., Chrzanowska, A., Scibior, D., Pacholczyk, M., Kosieradzki, M., Lagiewska, B., Porembaska, Z., Rowiński, W., 2004, Clinical significance of arginase after liver transplantation, *Ann Transplant*, 9 (3), 58-60 p.
14. Aydin, S., Atukeren, P., Cakatay, U., Uzun, H., Altuğ, T., 2010, Gender-dependent oxidative variations in liver of aged rats, *Biogerontology*, 11 (3), 335-46 p.

15. Bansal, V., Ochoa, J.B., 2003, Arginine availability, arginase, and the immune response, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 6 (2), 223-8 p.
16. Bao, L., Yao, X.S., Yau, C.C., Tsi, D., Chia, C.S., Nagai, H., Kurihara, H., 2008, Protective effects of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract on restraint stress-induced liver damage in mice, *J Agric Food Chem*, 56 (17), 7803-7 p.
17. Bartlett, D., 2004, Acetaminophen toxicity, *J Emerg Nurs*, 30 (3), 281-3 p. PMID:15192687
18. Benson, G.D., Koff, R.S., Tolman, K.G., 2005, The therapeutic use of acetaminophen in patients with liver disease, *Am J Ther*, 12 (2), 133-41 p.
19. Berkowitz, D.E., White, R., Li, D., Minhas, K.M., Cernetich, A., Kim, S., Burke, S., Shoukas, A.A., Nyhan, D., Champion, H.C., Hare, J.M., 2003, Arginase reciprocally regulates nitric oxide synthase activity and contributes to endothelial dysfunction in aging blood vessels, *Circulation*, 108 (16), 2000-6 p.
20. Bessems, J.G., and Vermeulen. N.P., 2001, Paracetamol (acetaminophen)-induced toxicity: molecular and biochemical mechanisms, analogues and protective approaches, 31 (1), 55-138 p.
21. Bhadauria, M., 2010, Dose-dependent hepatoprotective effect of emodin against acetaminophen-induced acute damage in rats, *Exp Toxicol Pathol*, 62 (6), 627-35 p.
22. Bhadauria, M., Nirala, S.K., 2009, Reversal of acetaminophen induced subchronic hepatorenal injury by propolis extract in rats, *Environ Toxicol Pharmacol*, 27 (1), 17-25 p.
23. Blantz, R.C., Satriano, J., Gabbai, F., Kelly, C., 2000, Biological effects of arginine metabolites, *Acta Physiol Scand*, 168 (1), 21-5 p.
24. Boateng, J., Verghese, M., Shackelford, L., Walker, L.T., Khatiwada, J., Ogutu, S., Williams, D.S., Jones, J., Guyton, M., Asiamah, D., Henderson, F., Grant, L., DeBruce, M., Johnson, A., Washington, S., Chawan, C.B., 2007, Selected fruits reduce azoxymethane (AOM)-induced aberrant crypt foci (ACF) in Fisher 344 male rats, *Food Chem Toxicol*, 45 (5), 725-32 p.
25. Bossy-Wetzel, E., Lipton, S.A., 2003, Nitric oxide signaling regulates mitochondrial number and function, *Cell Death Differ*, 10 (7), 757-60 p.
26. Bradford, M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem*, 72, 248-54 p.
27. Bruckdorfer, R., 2005, The basics about nitric oxide, *Mol Aspects Med*, 26 (1-2), 3-31 p.
28. Buchwalow, I.B., Minin, E.A., Samoilova, V.E., Boecker, W., Wellner, M., Schmitz, W., Neumann, J., Punkt, K., 2005, Compartmentalization of NO signaling cascade in skeletal muscles, *Biochem Biophys Res Commun*, 330 (2), 615-21 p.

29. Burger, O., Ofek, I., Tabak, M., Weiss, E.I., Sharon, N., Neeman, I., 2000, A high molecular mass constituent of cranberry juice inhibits helicobacter pylori adhesion to human gastric mucus, *FEMS Immunol Med Microbiol*, 29 (4), 295-301 p.
30. Burtis, C.A., Ashwood, E.R., 1999, *Teietz Textbook of Clinical Chemistry*, W.B. Saunders Company 3, 1125-1177 p.
31. Byrne, B., Donohoe, G.G., O'Kennedy, R., 2007, Sialic acids: carbohydrate moieties that influence the biological and physical properties of biopharmaceutical proteins and living cells, *Drug Discov Today*, 12 (7-8), 319-26 p.
32. Cama, E., Colleluori, D.M., Emig, F.A., Shin, H., Kim, S.W., Kim, N.N., Traish, A.M., Ash, D.E., Christianson, D.W., 2003, Human arginase II: crystal structure and physiological role in male and female sexual arousal, *Biochemistry*, 42 (28), 8445-51 p.
33. Cama, E., Emig, F.A., Ash, D.E., Christianson, D.W., 2003, Structural and functional importance of first-shell metal ligands in the binuclear manganese cluster of arginase I, *Biochemistry*, 42 (25), 7748-58 p.
34. Cederbaum, S.D., Yu, H., Grody, W.W., Kern, R.M., Yoo, P., Iyer, R.K., 2004, Arginases I and II: do their functions overlap, *Mol Genet Metab*, 81 (1), 38-44 p.
35. Cemek, M., Aymelek, F., Büyükkuroğlu, M.E., Karaca, T., Büyükben, A., Yılmaz, F., 2010, Protective potential of Royal Jelly against carbon tetrachloride induced-toxicity and changes in the serum sialic acid levels, *Food Chem Toxicol*, 48 (10), 2827-32 p.
36. Ceydilek, B., Beyler, A.R., 2005, Transport proteins in bile production, *J Fac Med, Ankara Univ*, 58 (2), 68-72 s.
37. Chandra, S., Romero, M.J., Shatanawi, A., Alkilany, A.M., Caldwell, R.B., Caldwell, R.W., 2012, Oxidative species increase arginase activity in endothelial cells through the RhoA/Rho kinase pathway, *Br J Pharmacol*, 165 (2), 506-19 p.
38. Chen, Y., Johansson, E., Yang, Y., Miller, M.L., Shen, D., Orlicky, D.J., Shertzer, H.G., Vasiliou, V., Nebert, D.W., Dalton, T.P., 2010, Oral N-acetylcysteine rescues lethality of hepatocyte-specific Gclc-knockout mice, providing a model for hepatic cirrhosis, *J Hepatol*, 53 (6), 1085-94 p.
39. Chen, Y.H., Lin, F.Y., Liu, P.L., Huang, Y.T., Chiu, J.H., Chang, Y.C., Man, K.M., Hong, C.Y., Ho, Y.Y., Lai, M.T., 2009, Antioxidative and hepatoprotective effects of magnolol on acetaminophen-induced liver damage in rats, *Arch Pharm Res*, 32 (2), 221-8 p.
40. Chen, J., Sun, H., Sun, A., Lin, Q.H., Wang, Y., Tao, X., 2007, Studies of the protective effect and antioxidant mechanism of blueberry anthocyanins in a CCl₄-induced liver injury model in mice, *Food Agric Immunol*, 18 (3-4), 221-236
41. Chinard, F.P., 1952, Photometric estimation of proline and ornithine, *J Biol Chem*, 199 (1), 91-5 p.

42. Cho, Y.W., Cho, Y.N., Chung, S.H., Yoo, G., Ko, S.W., 1999, Water-soluble chitin as a wound healing accelerator, *Biomaterials*, 20 (22), 2139-45 p.
43. Chrostek, L., Cylwik, B., Panasiuk, A., Brodowska-Adamusiak, D., Gruszevska, E., 2011, Lipid-bound sialic acid (LSA) in liver diseases of different etiologies, *Ann Hepatol*, 10 (2), 150-4 p.
44. Chrzanowska, A., Gajewska, B., Barańczyk-Kuźma, A., 2009, Arginase isoenzymes in human cirrhotic liver, *Acta Biochim Pol*, 56 (3), 465-9 p.
45. Chrzanowska, A., Mielczarek-Putka, M., Skwarek, A., Krawczyk, M., Barańczyk-Kuźma, A., 2007, Serum arginase activity in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma, *Wiad Lek*, 60 (5-6), 215-8 p.
46. Chung, Y.C., Su, Y.P., Chen, C.C., Jia, G., Wang, H.L., Wu, J.C., Lin, J.G., 2004, Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall, 25 (7), 932-6 p.
47. Cortas, N.K., Wakid, N.W., 1990, Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method, *Clin Chem*, 36 (8 Pt 1), 1440-3 p.
48. Crook, M., 2004, Type 2 diabetes mellitus: a disease of the innate immune system? An update, *Diabet Med*, 21 (3), 203-7 p.
49. Cylwik, B., Chrostek, L., Krawiec, A., Supronowicz, Z., Koput, A., Szmitkowski, M., 2010, Lipid-bound sialic acid in alcoholics participates in increased level of total sialic acid, *Alcohol*, 44 (5), 457-62 p.
50. Dahnert, W., 1993, Liver, bile ducts, pancreas and spleen. In: Grayson TH Radiology review manual (2 nd ed), Wilkins Co, 417-462 p.
51. Dart, R.C., Erdman, A.R., Olson, K.R., Christianson, G., Manoguerra, A.S., Chyka, P.A., Caravati, E.M., Wax, P.M., Keyes, D.C., Woolf, A.D., Scharman, E.J., Booze, L.L., Troutman, W.G: American Association of Poison Control Centers., 2006, Acetaminophen poisoning: an evidence-based consensus guideline for out-of-hospital management, *Clin Toxicol (Phila)*, 44 (1), 1-18 p.
52. Dawson, T.M., Dawson, V.L., 1995, Review: Nitric Oxide: Actions and Pathological Roles, *Neuroscientist*, 1, 17-18 p.
53. Dembinska-Kiec, A., Mykkänen, O., Kiec-Wilk, B., Mykkänen, H., 2008, Antioxidant phytochemicals against type 2 diabetes, *Br J Nutr*, 99 (1), 109-17 p.
54. Dillard, C.J., and German, J.B., 2000, Phytochemicals: nutraceuticals and human health, *J Sci Food Agric*, 80, 1744-1756 p.
55. Du, J., Meledeo, M.A., Wang, Z., Khanna, H.S., Paruchuri, V.D., Yarema, K.J., 2009, Metabolic glycoengineering: sialic acid and beyond, *Glycobiology*, 19 (12), 1382-401 p.

56. Dulebohn, R.V., Yi, W., Srivastava, A., Akoh, C.C., Krewer, G., Fischer, J.G., 2008, Effects of blueberry (*Vaccinium ashei*) on DNA damage, lipid peroxidation, and phase II enzyme activities in rats, *J Agric Food Chem*, 56 (24), 11700-6 p.
57. Durante, W., Johnson, F.K., Johnson, R.A., 2007, Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function, *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 34 (9), 906-11 p.
58. Durgawale, P., Sontakke, A., Shukla, P.S., Durgawale, P., Chougule, P., 2011, Alterations in Total Sialic Acid (TSA), Total Proteins (TP) and TSA/TP ratio in cancer patients. *Biomedical Research*, 22 (4), 492-494p.
59. Duthie, S.J., 2007, Berry phytochemicals, genomic stability and cancer: evidence for chemoprotection at several stages in the carcinogenic process, *Mol Nutr Food Res*, 51 (6), 665-74 p.
60. Dündar, Y., 2001, Phytochemicals and Healthy Live, *Med Journ Kocatepe*, 2, 131-138 s.
61. Erbas, H., Erten, O., Daglar, A., Irfanoglu, M.E., 2006, Arginase Activity, Ornithine and Urea Levels in Breast Cyst Fluid, *Turk J Biochem*, 31 (3), 129–134 p.
62. Erbas, H., Aydogdu, N., Kaymak, K., 2004, Effects of N-acetylcysteine on arginase, ornithine and nitric oxide in renal ischemia-reperfusion injury, *Pharmacol Res*, 50 (5), 523-7 p.
63. Erisir, M., Ercel, E., Yilmaz, S., Ozan, S., 2005, Evaluation of optimal conditions for arginase activity in streptozotocin induced diabetic rats, *Vet Med Czech*, 50 (2), 69–76 p.
64. Floris, G., Medda, R., Padiglia, A., Musci, G., 2000, The physiopathological significance of ceruloplasmin. A possible therapeutic approach, *Biochem Pharmacol*, 60 (12), 1735-41 p.
65. Fox, P.L., Mazumder, B., Ehrenwald, E., Mukhopadhyay, C.K., 2000, Ceruloplasmin and cardiovascular disease, *Free Radic Biol Med*, 28 (12), 1735-44 p.
66. Freire, M.A., Guimarães, J.S., Leal, W.G., Pereira, A., 2009, Pain modulation by nitric oxide in the spinal cord, *Front Neurosci*, 3 (2), 175-81 p.
67. Fukumura, D., Kashiwagi, S., Jain, R.K., 2006, The role of nitric oxide in tumour progression, *Nat Rev Cancer*, 6 (7), 521-34 p.
68. Galeano, B., Klootwijk, R., Manoli, I., Sun, M., Ciccone, C., Darvish, D., Starost, M.F., Zervas, P.M., Hoffmann, V.J., Hoogstraten-Miller, S., Krasnewich, D.M., Gahl, W.A., Huizing, M., 2007, Mutation in the key enzyme of sialic acid biosynthesis causes severe glomerular proteinuria and is rescued by N-acetylmannosamine, *J Clin Invest*, 117 (6), 1585-94 p.
69. Gardner, C.R., Heck, D.E., Yang, C.S., Thomas, P.E., Zhang, X.J., DeGeorge, G.L., Laskin, J.D., Laskin, D.L., 1998, Role of nitric oxide in acetaminophen-induced hepatotoxicity in the rat, *Hepatology*, 27 (3), 748-54 p.
70. Gartner, L.P., Hiatt, J.L., 2007, *Color Textbook of Histology*, Third Ed., Saunders.

71. Gebhardt, R., Baldysiak-Figiel, A., Krügel, V., Ueberham, E., Gaunitz, F., 2007, Hepatocellular expression of glutamine synthetase: an indicator of morphogen actions as master regulators of zonation in adult liver, *Prog Histochem Cytochem*, 41 (4), 201-66 p.
72. Gelotte, C.K., Auiler, J.F., Lynch, J.M., Temple, A.R., Slattery, J.T., 2007, Disposition of acetaminophen at 4, 6, and 8 g/day for 3 days in healthy young adults, *Clin Pharmacol Ther*, 81 (6), 840-8 p.
73. George, S., Jyothi, M., Mathew, B., Shashidhar, S., 2003, Changes in glutathione, glutathione-linked enzymes and hexose monophosphate shunt enzymes in senile cataract, *Indian J Physiol Pharmacol*, 47 (2), 191-6 p.
74. Geyer, J.W., Dabich, D., 1971, Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates, *Anal Biochem*, 39 (2), 412-7 p.
75. Giannini, E.G., Testa, R., Savarino, V., 2005, Liver enzyme alteration: a guide for clinicians, *CMAJ*, 172 (3), 367-79 p.
76. Giannini, E., Risso, D., Botta, F., Chiarbonello, B., Fasoli, A., Malfatti, F., Romagnoli, P., Testa, E., Ceppa, P., Testa, R., 2003, Validity and clinical utility of the aspartate aminotransferase-alanine aminotransferase ratio in assessing disease severity and prognosis in patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease, *Arch Intern Med*, 163 (2), 218-24 p.
77. Gray, H., 2006, Hepatic segmentation. In: Gray H, ed. *Gray's anatomy*, 39th edn. London: Churchill Livingstone, 1797-8 p.
78. Griffith, O.W., 1999, Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis, *Free Radic Biol Med*, 27 (9-10), 922-35 p.
79. Grillo, M.A., Colombatto, S., 2004, Arginine revisited: minireview article, *Amino Acids*, 26 (4), 345-51 p.
80. Guibal, E., 2004, Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review, *Separation and Purification Tec*, 38, 43-74 p.
81. guweb2.gonzaga.edu/faculty/cronk/biochem/u-index.cfm?definition=urea_cycle
82. Guyton, A.C., Hall, J.E., 1996, *Textbook of medical physiology*, The liver as an organ, 9th ed, Philadelphia: WB Saunders company, 883-88 p.
83. Guzman, J., Saucedo, I., Revilla, J., Navarro, R., Guibal, E., 2003, Copper sorption by chitosan in the presence of citrate ions: influence of metal speciation on sorption mechanism and uptake capacities, *Int J Biol Macromol*, 33 (1-3), 57-65 p.
84. Heard, K.J., 2008, Acetylcysteine for acetaminophen poisoning, *N Engl J Med*, 359 (3), 285-92 p.
85. Hinson, J.A., Roberts, D.W., James, L.P., 2010, Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis, *Handb Exp Pharmacol*, 196, 369-405 p.

86. Ho, S.C., Tai, E.S., Eng, P.H., Tan, C.E., Fok, A.C., 2001, In the absence of dietary surveillance, chitosan does not reduce plasma lipids or obesity in hypercholesterolaemic obese Asian subjects, *Singapore Med J*, 42 (1), 6-10 p.
87. Holt, M.P., Ju, C., 2006, Mechanisms of drug-induced liver injury, *AAPS J*, 8 (1), 48-54 p.
88. Horowitz, S., Binion, D.G., Nelson, V.M., Kanaa, Y., Javadi, P., Lazarova, Z., Andrekopoulos, C., Kalyanaraman, B., Otterson, M.F., Rafiee, P., 2007, Increased arginase activity and endothelial dysfunction in human inflammatory bowel disease, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 292 (5), 1323-36 p.
89. Huang, R., Mendis, E., Kim, S.K., 2005, Factors affecting the free radical scavenging behavior of chitosan sulfate, *Int J Biol Macromol*, 36 (1-2), 120-7 p.
90. Ikemoto, M., Tsunekawa, S., Toda, Y., Totani, M., 2001, Liver-type arginase is a highly sensitive marker for hepatocellular damage in rats, *Clin Chem*, 47 (5), 946-8 p.
91. Ikemoto, M., Tsunekawa, S., Awane, M., Fukuda, Y., Murayama, H., Igarashi, M., Nagata, A., Kasai, Y., Totani, M., 2001, A useful ELISA system for human liver-type arginase, and its utility in diagnosis of liver diseases, *Clin Biochem*, 34 (6), 455-61 p.
92. Ikemoto, M., Tsunekawa, S., Tanaka, K., Tanaka, A., Yamaoka, Y., Ozawa, K., Fukuda, Y., Moriyasu, F., Totani, M., Kasai, Y., Mori, T., Ueda, K., 1998, Liver-type arginase in serum during and after liver transplantation: a novel index in monitoring conditions of the liver graft and its clinical significance, *Clin Chim Acta*, 271 (1), 11-23 p.
- 93-. Jaeschke, H., Gores, G.J., Cederbaum, A.I., Hinson, J.A., Pessayre, D., Lemasters, J.J., 2002, Mechanisms of hepatotoxicity, *Toxicol Sci*, 65 (2), 166-76 p.
94. Jaeschke, H., McGill, M.R., Williams, C.D., Ramachandran, A., 2011, Current issues with acetaminophen hepatotoxicity--a clinically relevant model to test the efficacy of natural products, *Life Sci*, 88 (17-18), 737-45 p.
95. James, L.P., Mayeux, P.R., Hinson, J.A., 2003, Acetaminophen-induced hepatotoxicity, *Drug Metab Dispos*, 31 (12), 1499-506 p.
96. Jeon, T.I., Hwang, S.G., Park, N.G., Jung, Y.R., Shin, S.I., Choi, S.D., Park, D.K., 2003, Antioxidative effect of chitosan on chronic carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats, *Toxicology*, 187 (1), 67-73 p.
96. Jeon, T.I., Hwang, S.G., Park, N.G., Jung, Y.R., Shin, S.I., Choi, S.D., Park, D.K., 2003, Antioxidative effect of chitosan on chronic carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats, *Toxicology*, 187 (1), 67-73 p.
97. Jeyabalan, G., Klune, J.R., Nakao, A., Martik, N., Wu, G., Tsung, A., Geller, D.A., 2008, Arginase blockade protects against hepatic damage in warm ischemia-reperfusion, *Nitric Oxide*, 19 (1), 29-35 p.

98. Jobgen, W.S., Fried, S.K., Fu, W.J., Meininger, C.J., Wu, G., 2006, Regulatory role for the arginine-nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates, *J Nutr Biochem*, 17 (9), 571-88 p.
99. Junqueira, L.C., Carneiro, J., Kelley, R.O., 1998, *Temel Histoloji*, (Çev.:Aytekin, Y.) 8. Baskı, Barış Kitapçılık.
100. Kamal, M.A., French, S.W., 2004, Drug-induced increased mitochondrial biogenesis in a liver biopsy, *Exp Mol Pathol*, 77 (3), 201-4 p.
101. Kanter, M., Coskun, O., Budancamanak, M., 2005, Hepatoprotective effects of *Nigella sativa* L and *Urtica dioica* L on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and liver enzymes in carbon tetrachloride-treated rats, *World J Gastroenterol*, 11 (42), 6684-8 p.
102. Karabay, G., Aldemir, D., Akin, E., Oğuş, E., Gür, G., Boyacıoğlu, S., Türkoğlu, S., 2005, The effect of melatonin treatment on oxidative and nitrosative stress in rats with thioacetamide-induced hepatic damage, *Hepatol Res*, 31 (3), 160-7 p.
103. Katopodis, N., Hirshaut, Y., Geller, N.L., Stock, C.C., 1982, Lipid-associated sialic acid test for the detection of human cancer, *Cancer Res*, 42 (12), 5270-5 p.
104. Katopodis, N., Stock, C.C., 1980, Improved method to determine lipid bound sialic acid in plasma or serum, *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 30 (1), 171-80 p.
105. Katzung, B.G., 2007, *Basic and Clinical Pharmacology* 10th Ed. New York: McGraw Hill Companies Inc, 591-2 p.
106. Kelm, M., Schrader, J., 1990, Control of coronary vascular tone by nitric oxide, *Circ Res*, 66 (6), 1561-75 p.
107. Keser, O., Bilal, T., 2010, The use of chitosan oligosaccharide in animal nutrition II-Antioxidative, antimicrobial and the other effects, *Lalahan Hay Araşt Enst Derg*, 50 (1), 41-52 s.
108. Kidd, P.M., 1997, Glutathione: Systemic Protectant Against Oxidative and Free Radical Damage, *Alt Med Rev*, 2 (3), 155-176 p.
109. Kierszenbaum, A.L., 2006, *Histoloji ve Hücre Biyolojisi*, *Patolojiye giriş*, (Çev.: Demir, R.), Palme Yayıncılık, Ankara.
110. Kim, P.K., Zamora, R., Petrosko, P., Billiar, T.R., 2001, The regulatory role of nitric oxide in apoptosis, *Int Immunopharmacol*, 1 (8), 1421-41.
111. Klasen, S., Hammermann, R., Fuhrmann, M., Lindemann, D., Beck, K.F., Pfeilschifter, J., Racké, K., 2001, Glucocorticoids inhibit lipopolysaccharide-induced up-regulation of arginase in rat alveolar macrophages, *Br J Pharmacol*, 132 (6), 1349-57 p.
112. Knekt, P., Jarvinen, R., Reunanen, A., Maatela, J., 1996, Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study, *BMJ*, 312 (7029), 478-81 p.

113. Knight, T.R., Fariss, M.W., Farhood, A., Jaeschke, H., 2003, Role of lipid peroxidation as a mechanism of liver injury after acetaminophen overdose in mice, *Toxicol Sci*, 76 (1), 229-36 p.
114. Kongtawelert, P., Tangkijvanich, P., Ong-Chi, S., Poovorawan, Y., 2003, Role of serum total sialic acid in differentiating cholangiocarcinoma from hepatocellular carcinoma, *World Gastroenterol*, 9, 2178–2181 p.
115. Kosman, D.J., 2002, FET3P, ceruloplasmin, and the role of copper in iron metabolism, *Adv Protein Chem*, 60, 221-69 p.
116. Krishnani, K.K., Ayyappan, S., 2006, Heavy metals remediation of water using plants and lignocellulosic agrowastes, *Rev Environ Contam Toxicol*, 188, 59-84 p.
117. Kuntz, E., Kuntz, H.D., 2006, *Hepatology Principles And Practice*, 2nd Edition, Springer Medizin Verlag Heidelberg, 906 p.
118. Lafortune, M., Denys, A., Sauvanet, A., Schmidt, S., 2007, Anatomy of the liver: what you need to know, *J Radiol*, 88 (7-8 Pt 2), 1020-35 p.
119. Landes, D.R., Bough, W.A., 1976 Effects of chitosan--a coagulating agent for food processing wastes--in the diets of rats on growth and liver and blood composition, *Bull Environ Contam Toxicol*, 15 (5), 555-63 p.
120. Larrey, D., Pageaux, G.P., 2005, Drug-induced acute liver failure, *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 17 (2), 141-3 p.
121. Larson, A.M., Polson, J., Fontana, R.J., Davern, T.J., Lalani, E., Hynan, L.S., Reisch, J.S., Schiødt, F.V., Ostapowicz, G., Shakil, A.O., Lee, W.M., 2005, Acute Liver Failure Study Group., Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study, *Hepatology*, 42 (6), 1364-72 p.
122. Lau, F., Joseph, J.A., McDonald, J.E., Kalt, W., 2009, Attenuation of iNOS and COX2 by blueberry polyphenols is mediated through the suppression of NF- κ B activation, *Journal of Functional Foods*, 1 (3), 274-283 p.
123. Lee, W.M., 2003, Drug-induced hepatotoxicity, *N Engl J Med*, 349 (5), 474-85 p.
124. Lee, H.W., Park, Y.S., Choi, J.W., Yi, S.Y., Shin, W.S., 2003, Antidiabetic effects of chitosan oligosaccharides in neonatal streptozotocin-induced noninsulin-dependent diabetes mellitus in rats, *Biol Pharm Bull*, 26 (8), 1100-3 p.
125. Liu, J., Waalkes, M.P., 2005, Nitric oxide and chemically induced hepatotoxicity: beneficial effects of the liver-selective nitric oxide donor, V-PYRRO/NO, *Toxicology*, 208 (2), 289-97 p.
126. Liu RH., Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J Nutr*. 2004 Dec;134(12 Suppl):3479S-3485S.

127. Lu, S., Cheng, M.L., Li, H., Wu, J., Wang, Y.P., 2012, Effects of blueberry on hepatic fibrosis and ultrastructural of hepatocytes in rats, *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 92 (13), 927-31 p.
128. Lu, S., Cheng, M.L., Li, H., Wu, J., Wang, Y.P., 2012, Effects of blueberry on hepatic fibrosis and ultrastructural of hepatocytes in rats, *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 92 (13), 927-31 p.
129. Ma, S., Hou, G., Dick, R., Brewer, G.J., 2004, Tetrathiomolybdate Protects Against Liver Injury from Acetaminophen in Mice, *The Journal of Applied Research*, 4 (3), 419 p.
130. Mainland, C.M., Tucker, J.W. Blueberry Health Information-Some New Mostly Review. Ed. R. F.Hepp, *Acta Hort*, 2002; 574: 39-43.
131. Mazza, G., Kay, C.D., Cottrell, T., Holub, B.J., 2002, Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects, *J Agric Food Chem*, 50 (26), 7731-7 p.
132. McAnulty, L.S., Nieman, D.C., Dumke, C.L., Shooter, L.A., Henson, D.A., Utter, A.C., Milne, G., McAnulty, S.R., 2011, Effect of blueberry ingestion on natural killer cell counts, oxidative stress, and inflammation prior to and after 2.5 h of running, *Appl Physiol Nutr Metab*, 36 (6), 976-84 p.
133. Mendis, E., Kim, M.M., Rajapakse, N., Kim, S.K., 2007, An in vitro cellular analysis of the radical scavenging efficacy of chito oligosaccharides, *Life Sci*, 80 (23), 2118-27 p.
134. Meral, I., Yener, Z., Kahraman, T., Mert, N., 2001, Effect of *Nigella sativa* on glucose concentration, lipid peroxidation, anti-oxidant defence system and liver damage in experimentally-induced diabetic rabbits, *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 48 (10), 593-9 p.
135. Mhurchu, C.N., Poppitt, S.D., McGill, A.T., Leahy, F.E., Bennett, D.A., Lin, R.B., Ormrod, D., Ward, L., Strik, C., Rodgers, A., 2004, The effect of the dietary supplement, Chitosan, on body weight: a randomised controlled trial in 250 overweight and obese adults, *Int J Obes Relat Metab Disord*, 28 (9), 1149-56 p.
136. Mielczarek, M., Chrzanowska, A., Scibior, D., Skwarek, A., Ashamiss, F., Lewandowska, K., Barańczyk-Kuźma, A., 2006, Arginase as a useful factor for the diagnosis of colorectal cancer liver metastases, *Int J Biol Markers*, 21 (1), 40-4 p.
137. Miyajima, H., Takahashi, Y., Kono, S., 2003, Aceruloplasminemia, an inherited disorder of iron metabolism, *Biometals*, 16 (1), 205-13 p.
138. Miyajima, H., Kono, S., Takahashi, Y., Sugimoto, M., 2002, Increased lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction in aceruloplasminemia brains, *Blood Cells Mol Dis*, 29 (3), 433-8 p.
139. Morris, S.M. Jr., Gao, T., Cooper, T.K., Kepka-Lenhart, D., Awad, A.S., 2011, Arginase-2 mediates diabetic renal injury, *Diabetes*, 60 (11), 3015-22 p.

140. Morsy, M.A., Ibrahim, S.A., Abdelwahab, S.A., Zedan, M.Z., Elbitar, H.I., 2010, Curative effects of hydrogen sulfide against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice, *Life Sci*, 87 (23-26), 692-8 p.
141. Moussa, M.A., Alsaeid, M., Refai, T.M., Abdella, N., Al-Sheikh, N., Gomez, J.E., 2004, Association of serum sialic acid with cardiovascular metabolic risk factors in Kuwaiti children and adolescents with type 1 diabetes, *Metabolism*, 53 (5), 638-43 p.
141. Moussa, M.A., Alsaeid, M., Refai, T.M., Abdella, N., Al-Sheikh, N., Gomez, J.E., 2004, Association of serum sialic acid with cardiovascular metabolic risk factors in Kuwaiti children and adolescents with type 1 diabetes, *Metabolism*, 53 (5), 638-43 p.
142. Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W., 2004, *Harper's Illustrated Biochemistry*. 24th ed, Lange Medical Books/McGraw-Hill Medical Publishing Division, 25, 176-370 p.
143. Münster-Kühnel, A.K., Tiralongo, J., Krapp, S., Weinhold, B., Ritz-Sedlacek, V., Jacob, U., Gerardy-Schahn, R., 2004, Structure and function of vertebrate CMP-sialic acid synthetases, *Glycobiology*, 14 (10), 43-51 p.
144. Neto, C.C., 2007, Cranberry and blueberry: evidence for protective effects against cancer and vascular diseases, *Mol Nutr Food Res*, 51 (6), 652-64 p.
145. Nigam, P.K., Narain, V.S., Ajay, K., 2006, *Ind J Clin Biochem*, 21 (1), 54-61 p.
146. Ni Mhurchu, C., Dunshea-Mooij, C.A., Bennett, D., Rodgers, A., 2005, Chitosan for overweight or obesity, *Cochrane Database Syst Rev*, (3), CD003892 p.
147. Novak, D., and Lewis, J.H., 2003, Drug-induced liver disease, 19 (3), 203-15 p.
148. Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979, Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal Biochem*, 95 (2), 351-8 p.
149. Olaleye, M.T., Rocha, B.T., 2008, Acetaminophen-induced liver damage in mice: effects of some medicinal plants on the oxidative defense system, *Exp Toxicol Pathol*, 59 (5), 319-27 p.
150. Olteanu, D., Filip, A., Mureșan, A., Nagy, A., Tabaran, F., Moldovan, R., Decea, N., Catoi, C., Clichici, S., 2012, The effects of chitosan and low dose dexamethasone on extrahepatic cholestasis after bile duct ligation in Wistar rats, *Acta Physiol Hung*, 99 (1), 61-73 p.
151. Osman, M., Fayed, S.A., Ghada I. Mahmoud and Romeilah, R.M., 2010, Protective Effects of Chitosan, Ascorbic Acid and *Gymnema Sylvestre* Against Hypercholesterolemia in Male Rats, *AJBAS*, 4 (1), 89-98 p.
152. Papandreou, M.A., Dimakopoulou, A., Linardaki, Z.I., Cordopatis, P., Klimis-Zacas, D., Margarity, M., Lamari, F.N., 2009, Effect of a polyphenol-rich wild blueberry extract on cognitive performance of mice, brain antioxidant markers and acetylcholinesterase activity, 198 (2), 352-8 p.

153. Paul, W., Sharma, C.P., 2004, Chitosan and Alginate Wound Dressings: A Short Review, *Trends Biomater Artif Organs*, 18 (1), 18-23 p.
154. Peng, C., Zuo, Y., Kwan, K.M., Liang, Y., Ma, K.Y., Chan, H.Y., Huang, Y., Yu, H., Chen, Z.Y., 2012, Blueberry extract prolongs lifespan of *Drosophila melanogaster*, *Exp Gerontol*, 47 (2), 170-8 p.
155. Pereira, N.R., Moss, M.B., Assumpção, C.R., Cardoso, C.B., Mann, G.E., Brunini, T.M.C., Mendes-Ribeiro, A.C., 2010, Oxidative stress, l-arginine-nitric oxide and arginase pathways in platelets from adolescents with anorexia nervosa, *Blood Cell Mol Dis*, 44 (3), 164-8 p.
156. Ping, W., Hong-mei, J., 2011, Blueberries extract supplementation improves physical performance and decreases oxidative stress in mice, *Afr J Biotechnol*, 10 (60), 12999-13003 p.
157. Porembaska, Z., Skwarek, A., Mielczarek, M., Barańczyk-Kuźma, A., 2002, Serum arginase activity in postsurgical monitoring of patients with colorectal carcinoma, *Cancer*, 94 (11), 2930-4 p.
158. Prior, R.L., 2003, Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage, *Am J Clin Nutr*, 78 (3), 570-578 p.
159. Puri, D., and Kaul, N., 1995, Further studies on serum arginase as indicator of hepatocellular damage, *Indian J Clin Biochem*, 10 (1), 42-44 p.
160. Qiao, Y., Bai, X.F., Du, Y.G., 2011, Chitosan oligosaccharides protect mice from LPS challenge by attenuation of inflammation and oxidative stress, *Int Immunopharmacol*, 11 (1), 121-7 p.
161. Rajaraman, G., Chen, J., Chang, T.K., 2006, Ginkgolide A contributes to the potentiation of acetaminophen toxicity by Ginkgo biloba extract in primary cultures of rat hepatocytes, *Toxicol Appl Pharmacol*, 217 (2), 225-33 p.
162. Rao, S.B., Sharma, C.P., 1997, Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential, *J Biomed Mater Res*, 34 (1), 21-8 p.
163. Reed, J.C., 2001, Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery, *Trends Mol Med*, 7 (7), 314-9 p.
164. Reen, R.K., Nines, R., Stoner, G.D., 2006, Modulation of N-nitrosomethylbenzylamine metabolism by black raspberries in the esophagus and liver of Fischer 344 rats, *Nutr Cancer*, 54 (1), 47-57 p.
165. Reid, A.B., Kurten, R.C., McCullough, S.S., Brock, R.W., Hinson, J.A., 2005, Mechanisms of acetaminophen-induced hepatotoxicity: role of oxidative stress and mitochondrial permeability transition in freshly isolated mouse hepatocytes, *J Pharmacol Exp Ther*, 312 (2), 509-16 p.

166. Rhazi, M., Desbrieres, J., Tolaimate, A., Rinaudo, M., Vottero, P., Alagui, A., 2002 Influence of the nature of the metal ions on the complexation with chitosan. Application to the treatment of liquid waste, *European Polymer Journal*, 38, 1523-1530 p.
167. Riso, P., Klimis-Zacas, D., Del, Bo' C., Martini, D., Campolo, J., Vendrame, S., Møller, P., Loft, S., De Maria, R., Porrini, M., 2012, Effect of a wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) drink intervention on markers of oxidative stress, inflammation and endothelial function in humans with cardiovascular risk factors, *Eur J Nutr*, [Basım aşamasında].
168. Robin, M.A., Le Roy, M., Descatoire, V., Pessayre, D., 1997, Plasma membrane cytochromes P450 as neoantigens and autoimmune targets in drug-induced hepatitis, *J Hepatol*, 26 (1), 23-30 p.
169. Ruepp, S.U., Tonge, R.P., Shaw, J., Wallis, N., Pognan, F., 2002, Genomics and proteomics analysis of acetaminophen toxicity in mouse liver, *Toxicol Sci*, 65 (1), 135-50 p.
170. Saito, C., Yan, H.M., Artigues, A., Villar, M.T., Farhood, A., Jaeschke, H., 2010, Mechanism of protection by metallothionein against acetaminophen hepatotoxicity, *Toxicol Appl Pharmacol*, 242 (2), 182-90 p.
171. Sajedianfard, J., Saeb, M., Edalatpisheh, M.R., 2009, Therapeutic effect of cimetidine on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rabbits, *Comparative Clinical Pathology*, 18 (3), 325-328 p.
172. Salek, J., Byrne, J., Box, T., Longo, N., Sussman, N., 2010, Recurrent liver failure in a 25-year-old female, *Liver Transpl*, 16 (9), 1049-53 p.
173. Samuel, T.K., Gitlin, J.D., 2006, Copper and nitric oxide meet in the plasma, *Nat Chem Biol*, 2 (9), 452-3 p.
174. Sankaralingam, S., Xu, H., Davidge, S.T., 2010, Arginase contributes to endothelial cell oxidative stress in response to plasma from women with preeclampsia, *Cardiovasc Res*, 85 (1), 194-203 p.
175. Santhosh, S., Sini, T.K., Anandan, R., Mathew, P.T., 2007, Hepatoprotective activity of chitosan against isoniazid and rifampicin-induced toxicity in experimental rats, *Eur J Pharmacol*, 572 (1), 69-73 p.
176. Santhosh, S., Sini, T.K., Anandan, R., Mathew, P.T., 2006, Effect of chitosan supplementation on antitubercular drugs-induced hepatotoxicity in rats, *Toxicology*, 219 (1-3), 53-9 p.
177. Sashiwa, H., Thompson, J.M., Das, S.K., Shigemasa, Y., Tripathy, S., Roy, R., 2000, Chemical modification of chitosan: preparation and lectin binding properties of alpha-galactosyl-chitosan conjugates. Potential inhibitors in acute rejection following xenotransplantation, *Biomacromolecules*, Fall, 1 (3), 303-5 p.
178. Schauer, R., 2000, Achievements and challenges of sialic acid research, *Glycoconj J*, 17 (7-9), 485-99 p.

179. Schmidt, B.M., Erdman, J.W.Jr., Lila, M.A., 2006, Differential effects of blueberry proanthocyanidins on androgen sensitive and insensitive human prostate cancer cell lines, *Cancer Lett*, 231 (2), 240-6 p.
180. Schmidt, B.M., Erdman, J.J.W., Lila, M.A., 2005, Effects of Food Processing on Blueberry Antiproliferation and Antioxidant Activity, *J Food Sci*, 70 (6), 389-394 p.
181. Schosinsky, K.H., Lehmann, H.P., Beeler, M.F., 1974, Measurement of ceruloplasmin from its oxidase activity in serum by use of o-dianisidine dihydrochloride, *Clin Chem*, 20 (12), 1556-63 p.
182. Schwarzkopf, M., Knobloch, K.P., Rohde, E., Hinderlich, S., Wiechens, N., Lucka, L., Horak, I., Reutter, W., Horstkorte, R., 2002, Sialylation is essential for early development in mice, *Proc Natl Acad Sci USA*, 99 (8), 5267-70 p.
183. Serbecic, N., Beutelspacher, S.C., 2005, Anti-oxidative vitamins prevent lipid-peroxidation and apoptosis in corneal endothelial cells, *Cell Tissue Res*, 320 (3), 465-75 p.
184. Shankar, K., Vaidya, V.S., Apte, U.M., Manautou, J.E., Ronis, M.J., Bucci, T.J., Mehendale, H.M., 2003, Type 1 diabetic mice are protected from acetaminophen hepatotoxicity, *Toxicol Sci*, 73 (2), 220-34 p.
185. Sharma, V., Ten Have, G.A., Ytrebo, L., Sen, S., Rose, C.F., Dalton, R.N., Turner, C., Revhaug, A., van-Eijk, H.M., Deutz, N.E., Jalan, R., Mookerjee, R.P., Davies, N.A., 2012, Nitric oxide and L-arginine metabolism in a devascularized porcine model of acute liver failure, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 303 (3), 435-41 p.
186. Shukla, N., Maher, J., Masters, J., Angelini, G.D., Jeremy, J.Y., 2006, Does oxidative stress change ceruloplasmin from a protective to a vasculopathic factor?, *Atherosclerosis*, 187 (2), 238-50 p.
187. Smith, D.L., Harris, A.D., Johnson, J.A., Silbergeld, E.K., Morris, J.G.Jr., 2002, Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria, *Proc Natl Acad Sci USA*, 99 (9), 6434-9 p.
188. Song, G.Q., Sink, K.C., 2006, Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L), *Methods Mol Biol*, 344, 263-72 p.
189. Srivastava, A., Akoh, C.C., Fischer, J., Krewer, G., 2007, Effect of anthocyanin fractions from selected cultivars of Georgia-grown blueberries on apoptosis and phase II enzymes, *J Agric Food Chem*, 55 (8), 3180-5 p.
190. Stehbens, W.E., 2003, Oxidative stress, toxic hepatitis, and antioxidants with particular emphasis on zinc, *Exp Mol Pathol*, 75 (3), 265-76 p.
191. Sumioka, I., Matura, T., Kai, M., Yamada, K., 2004, Potential roles of hepatic heat shock protein 25 and 70i in protection of mice against acetaminophen-induced liver injury, *Life Sci*, 74 (20), 2551-61 p.

192. Sumiyoshi, M., Kimura, Y.. 2006, Low molecular weight chitosan inhibits obesity induced by feeding a high-fat diet long-term in mice, *J Pharm Pharmacol*, 58 (2), 201-7 p.
193. Süer Gökmen, S., Kazezoğlu, C., Sunar, B., Özçelik, F., Güngör, O., Yorulmaz, F., Gülen, S., 2006, Relationship between serum sialic acids, sialic acid-rich inflammation-sensitive proteins and cell damage in patients with acute myocardial infarction, *Clin Chem Lab Med*, 44 (2), 199-206 p.
194. Sweeney, M.I., Kalt, W., MacKinnon, S.L., Ashby, J., Gottschall-Pass, K.T., 2002, Feeding rats diets enriched in lowbush blueberries for six weeks decreases ischemia-induced brain damage, *Nutr Neurosci*, 5 (6), 427-31 p.
195. Sydow, K., Münzel, T., 2003, ADMA and oxidative stres, *Atheroscler Suppl*, 4 (4), 41-51 p.
196. Sydow, G., 1985, A simplified quick method for determination of sialic acid in serum, *Biomed Biochim Acta*, 44 (11-12), 1721-3 p.
197. Tanner, M.E., 2005, The enzymes of sialic acid biosynthesis, *Bioorg Chem*, 33 (3), 216-28 p.
198. Tenenbein, M., 2004, Acetaminophen: the 150 mg/kg myth, *J Toxicol Clin Toxicol*, 42 (2), 145-8 p.
199. Thomas, D.D., Ridnour, L.A., Isenberg, J.S., Flores-Santana, W., Switzer, C.H., Donzelli, S., Hussain, P., Vecoli, C., Paolocci, N., Ambs, S., Colton, C.A., Harris, C..C, Roberts, D.D., Wink, D.A., 2008, The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling, *Free Radic Biol Med*, 45 (1), 18-31 p.
200. Toklu, H.Z., Sehirli, A.O., Velioglu-Oğünç, A., Cetinel, S., Sener, G., 2006, Acetaminophen-induced toxicity is prevented by beta-D-glucan treatment in mice, *Eur J Pharmacol*, 543 (1-3), 133-40 p.
201. Townsend, D.M., Tew, K.D., Tapiero, H., 2003, The importance of glutathione in human disease, *Biomed Pharmacother*, 57 (3-4), 145-55 p.
202. Trauner, M., Meier, P.J., Boyer, J.L., 1998, Molecular pathogenesis of cholestasis, *N Engl J Med*, 339 (17), 1217-27 p.
203. Traving, C., Schauer, R., 1998, Structure, function and metabolism of sialic acids, *Cell Mol Life Sci*, 54 (12), 1330-49 p.
204. Uhlikova, E., Kupcova, V., Szantova, M., Turecky, L., 2008, Plasma copper and ceruloplasmin in patients with alcoholic liver steatosis, *Bratisl Lek Listy*, 109 (10), 431-3 p.
205. Umesalma, S., Sudhandiran, G., 2011, Ellagic acid prevents rat colon carcinogenesis induced by 1, 2 dimethyl hydrazine through inhibition of AKT-phosphoinositide-3 kinase pathway, *Eur J Pharmacol*, 660 (2-3), 249-58 p.

206. Usami, Y., Okamoto, Y., Takayama, T., Shigemasa, Y., Minami, S., 1998, Chitin and chitosan stimulate canine polymorphonuclear cells to release leukotriene B4 and prostaglandin E2, *J Biomed Mater Res*, 42 (4), 517-22 p.
207. Varki, A., 2008, Sialic acids in human health and disease, *Trends Mol Med*, 14 (8). 351-60 p.
208. Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., Marth, J., 1999, *Essentials of Glycobiology*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor (NY), 1-13 p.
209. Varma, A.J., Desphande, S.V., Kennedy, J.F., 2004, Metal complexation by chitosan and its derivatives: a review, *Carbohydrate Polym*, 55, 77-93 p.
210. Vassiliev, V., Harris, Z.L., Zatta, P., 2005, Ceruloplasmin in neurodegenerative diseases, *Brain Res Brain Res Rev*, 49 (3), 633-40 p.
211. Vercelli, D., 2003, Arginase: marker, effector, or candidate gene for asthma, *J Clin Invest*, 111 (12), 1815-7 p.
212. Virit, O., Selek, S., Bulut, M., Savas, H.A., Celik, H., Erel, O., Herken, H., 2008, High ceruloplasmin levels are associated with obsessive compulsive disorder: a case control study, *Behav Brain Funct*, 18, 4:52 p.
213. Wang, Y.P., Cheng, M.L., Zhang, B.F., Mu, M., Wu, J., 2010, Effects of blueberry on hepatic fibrosis and transcription factor Nrf2 in rats, *World J Gastroenterol*, 16 (21), 2657-63 p.
214. Wang, Y., Chang, C.F., Chou, J., Chen, H.L., Deng, X., Harvey, B.K., Cadet, J.L., Bickford, P.C., 2005, Dietary supplementation with blueberries, spinach, or spirulina reduces ischemic brain damage, *Exp Neurol*, 193 (1):75-84 p.
215. Watanabe, T., Sagisaka, H., Arakawa, S., Shibaya, Y., Watanabe, M., Igarashi, I., Tanaka, K., Totsuka, S., Takasaki, W., Manabe, S., 2003, A novel model of continuous depletion of glutathione in mice treated with L-buthionine (S,R)-sulfoximine, *J Toxicol Sci*, 28 (5), 455-69 p.
216. Wheatley, D.N., Campbell, E., 2002, Arginine catabolism, liver extracts and cancer, *Pathol Oncol Res*, 8 (1), 18-25 p.
217. www.truehow.info/663-what-are-the-functions-of-a-liver-cell.html
218. www.intranet.tdmu.edu.te.ua/data/kafedra/internal/chemistry/classes_stud
219. www.drugdeliverytech.com
220. www.jaica.com/e/products_lipid_hel_kit.html
221. www.lansida.blogspot.com/2010/09/analisis-asetaminofen-paracetamol.html
222. www.themedicalbiochemistrypage.org/amino-acid-metabolism.php

223. www.webmd.com/digestive-disorders/picture-of-the-liver
224. Wu, K.Y., Wu, M., Fu, M.L., Li, H., Yang, Y., Zhang, H., Cheng, C., Wang, Z.Z., Wang, X.Y., Lu, X.B., Liu, D.G., Li, H., Gao, R., 2006, A novel chitosan CpG nanoparticle regulates cellular and humoral immunity of mice, *Biomed Environ Sci*, 19 (2), 87-95 p.
225. Wu, X., Cao, G., Prior, R.L., 2002, Absorption and metabolism of anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry or blueberry, *J Nutr*, 132 (7), 1865-71 p.
226. Xu, G., Huang, X., Qiu, L., Wu, J., Hu, Y., 2007, Mechanism study of chitosan on lipid metabolism in hyperlipidemic rats, *Asia Pac J Clin Nutr*, 16 (1), 313-7 p.
227. Yan, Y., Wanshun, L., Baoqin, H., Bing, L., Chenwei, F., 2006, Protective effects of chitosan oligosaccharide and its derivatives against carbon tetrachloride-induced liver damage in mice, *Hepatol Res*, 35 (3), 178-84 p.
228. Yang, Y., Harvey, S.A., Gandhi, C.R., 2003, Kupffer cells are a major source of increased platelet activating factor in the CCl₄-induced cirrhotic rat liver, *J Hepatol*, 39 (2), 200-7 p.
229. Yao, H.T., Luo, M.N., Hung, L.B., Chiang, M.T., Lin, J.H., Lii, C.K., Huang, C.Y., 2012, Effects of chitosan oligosaccharides on drug-metabolizing enzymes in rat liver and kidneys, *Food Chem Toxicol*, 50 (5), 1171-7 p.
230. Ylitalo, R., Lehtinen, S., Wuolijoki, E., Ylitalo, P., Lehtimäki, T., 2002, Cholesterol-lowering properties and safety of chitosan, *Arzneimittelforschung*, 52 (1), 1-7 p.
231. Yapar, K., Kart, A., Karapehlivan, M., Atakisi, O., Tunca, R., Erginsoy, S., Cital, M., 2007, Hepatoprotective effect of L-carnitine against acute acetaminophen toxicity in mice, *Exp Toxicol Pathol*, 59 (2), 121-8 p.
232. Yarsan, E., 1998, Lipid Peroxidation and Prevention Process, *YYU Vet Fak Derg*, 9 (1-2): 89-95 s.
233. Yasuda, J., Eguchi, H., Fujiwara, N., Ookawara, T., Kojima, S., Yamaguchi, Y., Nishimura, M., Fujimoto, J., Suzuki, K., 2006, Reactive oxygen species modify oligosaccharides of glycoproteins in vivo: a study of a spontaneous acute hepatitis model rat (LEC rat), *Biochem Biophys Res Commun*, 342 (1), 127-34 p.
234. Yen, F.L., Wu, T.H., Lin, L.T., Lin, C.C., 2007, Hepatoprotective and antioxidant effects of *Cuscuta chinensis* against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats, *J Ethnopharmacol*, 111 (1), 123-8 p.
235. Yilmaz, G., Surer, H., Inan, L.E., Coskun, O., Yucel, D., 2007, Increased nitrosative and oxidative stress in platelets of migraine patients, *Tohoku J Exp Med*, 211 (1), 23-30 p.
236. Yilmaz, E., 2004, Chitosan: a versatile biomaterial, *Adv Exp Med Biol*. 553, 59-68 p.
237. Youdim, K.A., McDonald, J., Kalt, W., Joseph, J.A., 2002, Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults (small star, filled), *J Nutr Biochem*, 13 (5), 282-288 p.

238. Youdim, K.A., Shukitt-Hale, B., MacKinnon, S., Kalt, W., Joseph, J.A., 2000, Polyphenolics enhance red blood cell resistance to oxidative stress: in vitro and in vivo, *Biochim Biophys Acta*, 1523 (1), 117-22 p.
239. Yousef, M.I., Omar, S.A., El-Guendi, M.I., Abdelmegid, L.A., 2010, Potential protective effects of quercetin and curcumin on paracetamol-induced histological changes, oxidative stress, impaired liver and kidney functions and haematotoxicity in rat, *Food Chem Toxicol*, 48 (11), 3246-61 p.
240. Zahorska-Markiewicz, B., Krotkiewski, M., Olszanecka-Glinianowicz, M., Zurakowski, A., 2002, Effect of chitosan in complex management of obesity, *Pol Merkur Lekarski*, 13 (74), 129-32 p.
241. Zhang, H.L., Zhong, X.B., Tao, Y., Wu, S.H., Su, Z.Q., 2012, Effects of chitosan and water-soluble chitosan micro- and nanoparticles in obese rats fed a high-fat diet, *Int J Nanomedicine*, 7, 4069-76 p.
242. Zheng, W., Wang, S.H., 2003, Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries and lingonberries, *J Agric Food Chem*, 51, 502-509 p.
243. Zheng, Y., Wang, C.Y., Wang, S.Y., Zheng, W., 2003, Effect of high-oxygen atmospheres on blueberry phenolics, anthocyanins, and antioxidant capacity, *J Agric Food Chem*, 51 (24), 7162-9 p.
244. Zimmerman, H.J., Ihsak, K.G., 2002, Hepatic injury due to drugs and toxins. In: MacSween, R.N.M., Burt, A., Portman, B. eds., *Pathology of the liver*, 4th ed, Philadelphia: Churchill Livingstone, 14, 622–709 p.

8. ÖZGEÇMİŞ

Bireysel bilgiler

Adı Soyadı : Eda ÖZÇELİK

Doğum Tarihi, Yeri : 10.05.1980, DÜZCE

Uyruğu : T.C.

Medeni Durumu : Bekar

Telefon : 0 542 781 5462

Email: : eda_ozcelik@yahoo.com

Eğitim Durumu

İlköğretim : 1986-1991, Düzce Namık Kemal İlköğretim Okulu

Ortaöğretim : 1991–1994, Düzce Atatürk İlköğretim Okulu

Lise : 1994–1998, Düzce Lisesi (Yabancı dil ağırlıklı lise)

Üniversite : 1998–2002, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
Kimya Mühendisliği Bölümü

Yüksek Lisans: : 2006-2009, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi
Biyokimya Ana Bilim Dalı

Doktora : 2009-2012, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi
Biyokimya Ana Bilim Dalı