

70576

OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DİFLUNİSALİN DEĞİŞİK DOZLARININ,
SIÇAN KARACİĞER, BÖBREK VE KANINDA; KATALAZ
AKTİVİTESİ VE MALONDİALDEHİT DÜZEYLERİNE ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ

Ayşe Gaye TOMATIR

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Ayşe BAŞARAN

1998

KABUL VE ONAY SAYFASI

A. Gaye TOMATIR'ın DOKTORA tezi olarak hazırladığı "Disflunisalin Değişik Dozlarının, Sıçan Karaciğer, Böbrek ve Kanında; Katalaz Aktivitesi ve Malondialdehit Düzeylerine Etkisi" başlıklı bu çalışma, jürimizce Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

14 MAYIS 1998

Üye: Prof. Dr. Ayşe BAŞARAN

Üye: Prof. Dr. Ergin AÇIKALIN

Üye: Doç. Dr. Hasan Veyisi GÜNEŞ

Üye: Prof. Dr. Sevdâ Menevşe

Üye: Prof. Dr. Nedret KILIC

Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 14.1.05/1998 gün ve 417/1001... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Neş'e T. DANCEL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Bazı ilaçlar, antiinflamatuvar etkilerini, hem siklooksijenaz enzimi inhibisyonuyla hem de reaktif oksijen radikallerini inhibe ya da inaktive ederek gösterirler. Antiinflamatuvar analjeziklerden diflunisalin de, yalnızca siklooksijenaz enzimini inhibe etmekle kalmayıp, serbest oksijen radikallerini de inaktive ettiği bildirilmektedir. Bu çalışmada, diflunisalin değişik dozlarının, sıçan karaciğer, böbrek ve kanında katalaz (CAT) aktivitesi ve malondialdehit (MDA) düzeyleri üzerine etkisini incelemeyi amaçladık.

Deney hayvanı olarak, *Rattus norvegicus* türü 40 adet, 2-3 aylık, 170-200 g ağırlığında erkek albino sıçanlar kullanıldı ve 4 gruba ayrıldı. I. gruba (kontrol) 0.5 cc. serum fizyolojik, II. gruba 3.5 mg/kg/gün, III. gruba 7 mg/kg/gün, IV. gruba 14 mg/kg/gün diflunisalin günde iki kez, 12 saatte bir, intraperitoneal olarak bir hafta süresince verildi. Bu süre sonunda, karaciğer, böbrek dokusu ve serum örneklerinde antioksidan enzimlerden biri olan katalaz aktivitesiyle, lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit düzeyleri ölçüldü. Ayrıca, ışık mikroskopunda karaciğer ve böbrek histolojisi de değerlendirildi.

Elde edilen bulgulara göre; 3.5 mg/kg/gün diflunisalin dozunun, bütün dokularda ve serumda, CAT aktivitesi ve MDA düzeyleri üzerine önemli bir etkisi olmadığı, 7 mg/kg/gün diflunisalin dozunun serbest oksijen radikali oluşumunu arttırmasının yanında, karaciğer dokusunda belirgin, böbrek dokusunda ise hafif hasara neden olduğu, 14

mg/kg/gün diflunisal dozunun ise serbest oksijen radikallerini inaktive ettiği ve önemli bir doku hasarına yol açmadığı saptandı.

Sonuç olarak, diflunisalin ancak yüksek terapötik dozda (14 mg/kg/gün) serbest oksijen radikallerini inaktive edebildiği kanısına varıldı.

Anahtar Sözcükler: Böbrek, diflunisal, hidrojen peroksit, karaciğer, katalaz, malondialdehit, serum, sıçan.



SUMMARY

The Effects of Different Doses of Diflunisal on Catalase Activity and Malondialdehyde Levels in Liver, Kidney and Blood of Rat

Some drugs show their antiinflammatory effects, by both inhibiting the cyclooxygenase enzyme and inhibiting or inactivating the reactive oxygen species. It is reported that diflunisal, one of the antiinflammatory analgesics, shows its effects by not only inhibiting the cyclooxygenase enzyme activity but also inactivating free oxygen radicals. In the present study, we aimed to investigate the effects of different doses of diflunisal on catalase activity (CAT) and malondialdehyde (MDA) levels in liver, kidney and blood of rat.

Forty albino male rats (*Rattus norvegicus*), aged 2-3 months and weighed 170-200 g, were divided into 4 groups. While the 1st group served as control and received only 0.5 ml physiologic saline intraperitoneally (i.p.), the 2nd, 3rd and 4th groups were given i.p. injections of 3.5, 7 and 14 mg/kg/day of diflunisal doses respectively, in every 12 hours (twice a day), for 7 days. At the end of this period, the activity of CAT which is one of the antioxidant enzymes, and the levels of MDA which is the final product of lipid peroxidation were measured in liver and kidney tissues, and serum. In addition, liver and kidney histologies were also evaluated under the light microscope.

The results showed that 3.5 mg/kg/day dose of diflunisal did not alter the tissue and serum catalase activities and MDA levels, significantly. 7 mg/kg/day doses of diflunisal increased the production of free oxygen radicals, and caused heavy tissue damage in liver and slight damage in kidney. 14 mg/kg/day dose of diflunisal inactivated free oxygen radicals and did not cause a significant tissue damage.

We concluded that the only high therapeutic dose (14 mg/kg/day) of diflunisal can inactivate free oxygen radicals.

Key Words: Catalase, diflunisal, hydrogen peroxide, kidney, liver, malondialdehyde, rat, serum.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında benden ilgi ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Ayşe BAŞARAN'a, gereç ve yöntem konusunda yardımlarını gördüğüm değerli hocam Prof. Dr. Nurettin BAŞARAN'a, Doç. Dr. Hasan V. GÜNEŞ'e, histolojik çalışmalarımda yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Erinç ARAL'a, ayrıca emeği geçen bütün çalışma arkadaşlarıma ve her konuda benden desteklerini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET	i
SUMMARY	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. ANTIENFLAMATUVAR ANALJEZİK İLAÇLAR VE DİFLUNİSALİN ÖZELLİKLERİ	4
2.1.1. Diflunisalin Farmakolojik Özellikleri	9
2.2. KSENOBİYOTİKLERİN TOKSİK ETKİLERİ	11
2.3. SERBEST RADİKALLER VE BİYOLOJİK KAYNAKLARI	12
2.3.1. Küçük Moleküllerin Otooksidasyonu	16
2.3.2. Çözünebilir Enzimler ve Proteinler	16
2.3.3. Mitokondriyal Elektron Transportu	17
2.3.4. Endoplazmik Retikulum ve Nükleer Membran Transport Sistemleri	17
2.3.5. Peroksizomlar	18
2.3.6. Plazma Membranları	18

2.4. SERBEST RADİKALLERİN REAKSİYONLARI	20
2.4.1. Serbest Radikal Harabiyeti Altındaki Hücresel Komponentler ..	21
2.4.1.1. Proteinler	21
2.4.1.2. Nükleik Asitler ve DNA	21
2.4.1.3. Membran Lipitleri	21
2.5. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİNE KARŞI SAVUNMA SİSTEMLERİ	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	31
3.1. GEREÇ	31
3.1.1. Deney Hayvanları	31
3.1.2. Kimyasal Maddeler	31
3.1.3. Aygıtlar	32
3.2. YÖNTEM	33
3.2.1. Doz Miktarları ve Deney Grupları	33
3.2.2. Deney Hayvanlarından Çalışılacak Örneklerin Alınması ve Saklanması	34
3.2.3. Dokuların Homojenizasyonu ve Santrifüjü	34
3.2.4. Katalaz Aktivitesi Ölçümü	35
3.2.5. Total Protein Ölçümü	37
3.2.6. Malondialdehit Düzeyi Ölçümü.....	38
3.2.7. Karaciğer ve Böbrek Dokularından Histolojik Preparatların Hazırlanışı	39
4. BULGULAR	42
4.1. KARACİĞER DOKUSUNA AİT BULGULAR VE İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME	42
4.2. BÖBREK DOKUSUNA AİT BULGULAR VE İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME	44
4.3. SERUMA AİT BULGULAR VE İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME	46

4.4. HİSTOLOJİK BULGULAR	47
4.4.1. Karaciğer Dokusuna Ait Işık Mikroskopisi Bulguları	47
4.4.2. Böbrek Dokusuna Ait Işık Mikroskopisi Bulguları	51
5. TARTIŞMA	54
6. SONUÇ	59
KAYNAKLAR DİZİNİ	61
EK 1	71
ÖZGEÇMİŞ	



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa No</u>
2.1. Antienflamatuvar analjeziklerin temel etki mekanizması	7
2.2. Diflunisalin yapısal formülü	11
2.3. Doğal oksijenden türeyen oksidan moleküller	13
2.4. Oksijen radikallerinin oluşması	15
2.5. Lipid peroksidasyonu ve MDA'nın oluşması	23
3.1. MDA standart eğrisi	39
4.1. Karaciğer dokusunda ölçülen CAT aktivitesi ve MDA düzeylerinin grafiği	43
4.2. Böbrek dokusunda ölçülen CAT aktivitesi ve MDA düzeylerinin grafiği	45
4.3. Serumda ölçülen CAT aktivitesi ve MDA düzeylerinin grafiği	47
4.4. Kontrol grubuna ait karaciğer doku kesiti. Orijinal büyütme H.E. x 132.	48
4.5. II. gruba ait karaciğer doku kesitinde, minimal sinüzoidal konjesyon. Orijinal büyütme H.E x 132.	49
4.6. III. gruba ait karaciğer doku kesitinde, fokal infiltrasyon odakları. Orijinal büyütme H.E. x 132.	49
4.7. III. gruba ait karaciğer doku kesitinde, hepatositlerde yaygın hidropik dejenerasyon. Orijinal büyütme H.E. x 132	50
4.8. IV. gruba ait karaciğer doku kesitinde, minimal hücre infiltrasyonu. Orijinal büyütme H.E. x 132.	50

4.9. Kontrol grubuna ait böbrek doku kesiti. Orijinal büyütme H.E. x 132 ..	51
4.10. II. gruba ait böbrek doku kesitinde, intertübüler alanlarda hiperemi. Orijinal büyütme H.E. x 132.	52
4.11. III. gruba ait böbrek doku kesitinde, proksimal tübülüs hücrelerinde hidropik dejenerasyon. Orijinal büyütme H.E. x 330	52
4.12. III. gruba ait böbrek doku kesitinde, korteks bölgesinde intertübüler alanlarda yaygın hiperemi. Orijinal büyütme H.E. x 132.....	53
4.13. IV. gruba ait böbrek doku kesitinde, korteks bölgesinde normale yakın görünümde tübülüsler, glomerül ve çevresi. Orijinal büyütme H.E. x132	53

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa No</u>
2.1. Bazı Önemli Serbest Radikaller	12
2.2. Oksidanların Kaynakları	14
2.3. Antioksidanlar	25
2.4. Reaktif Oksijen Partikülleri (Oksidanlar) ..	27
2.5. Major Antioksidanlar ve Özellikleri	29
2.6. Aktif Oksijen Türevlerinin Rol Aldığı İleri Sürülen Bazı Klinik ve Patolojik Durumlar	30
4.1. Karaciğer Dokusunda Ölçülen CAT aktivitesi ve MDA düzeylerinin ortalama değerleri ve istatistiksel anlamı	42
4.2. Böbrek Dokusunda Ölçülen CAT aktivitesi ve MDA düzeylerinin ortalama değerleri ve istatistiksel anlamı	44
4.3. Serumda Ölçülen CAT aktivitesi ve MDA düzeylerinin ortalama değerleri ve istatistiksel anlamı	46

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve Kısaltmalar: Açıklama

ACTH	: Adrenokortiko tropik hormon (Adrenocorticotropic hormone)
ADP	: Adenozin difosfat (Adenosine diphosphate)
ATP	: Adenozin trifosfat (Adenosine triphosphate)
CAT	: Katalaz (Catalase)
DF	: Diflunisal
DNA	: Deoksiribonükleik asit (Deoxyribonucleic acid)
ER	: Endoplazmik retikulum
GSH	: Redükte glutatyon
GSSG	: Okside glutatyon
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
KCl	: Potasyum klorür
KU/g protein	: Kilo Ünite/gram protein
MDA	: Malondialdehit (Malondialdehyde)
NADP	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
nmol/g yaş doku	: nanomol/gram yaş doku
n.s.	: Normal sınırlarda
PGE ₂	: Prostaglandin E ₂
PGG ₂	: Prostaglandin G ₂

PMNL	: Polimorfonükleer lökositler (Polymorphonuclear leucocytes)
sAMP	: Siklik adenzin monofosfat (Cyclic adenosine monophosphate)
SF	: Serum fizyolojik
SOD	: Superoksit dismutaz (Superoxide dismutase)
SSS	: Santral Sinir Sistemi
TBA	: Tiyobarbitürik asit (Thiobarbituric acid)
U/L	: Ünite/litre



1. GİRİŞ

İlaçlar ya da çevresel kaynaklı maddeler (ksenobiyotikler), organizmaya girdikleri andan itibaren, çeşitli enzimlerle birtakım değişikliklere uğratılırlar. Bu değişime “biyotransformasyon” adı verilir. İlaç ya da ksenobiyotiklerin biyotransformasyonu sırasında, bazı toksik ara metabolitlerin oluştuğu, bunların önemli hücresel yapıları etkilediği ve membran lipid peroksidasyonuna neden olduğu bilinmektedir (15, 33).

Antienflamatuvar analjeziklerden diflunisal, ülkemizde yeni kullanıma girmiş bir ilaçtır. Bu ilacın etki mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, etkisini periferel hücrelerde prostaglandinlerin sentezini, siklooksijenaz enzimi düzeyinde inhibe ederek gösterdiği düşünülmektedir. Ayrıca, sekonder olarak serbest oksijen radikallerini de etkilediği ileri sürülmektedir (10,17,58).

Oksijen radikalleri, moleküler oksijeni metabolize eden bütün canlı hücrelerinde oluşur. Ayrıca; iskemi, reperfüzyon, enflamasyon gibi bazı patolojik durumlarla, ilaçlar, ksenobiyotikler ve radyasyon gibi çevresel etkenler serbest radikal oluşumunu artırırılar. Canlılarda moleküler oksijenin indirgenmesinden sırasıyla süperoksit (O_2^-) anyonu, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (HO^*) oluşur (4,6,8,13,35, 38).

Oksijen radikalleri oluşur oluşmaz, toksik etkiler meydana getireceklerinden ortamdaki anında uzaklaştırılmaları gerekir. Hücrede oksijenin reaktif ve toksik ürünlerine karşı ilk olarak koruyucu fonksiyon gören enzim süperoksit dismutaz (SOD) enzimi olup,

bu enzim iki süperoksit radikali arasındaki tepkimeyi katalizler. Daha sonra oluşan hidrojen peroksitin (H_2O_2) parçalanmasında antioksidan olarak katalaz enzimi ve glutatyon (GSH), α - tokoferol (E vitamini) gibi non - enzimatik radikal yakalayıcıları da reaktif oksijen ürünlerini ortadan kaldırmada görev alırlar (12,29,32,34,42,44).

Bu çalışmada; ülkemizde yeni kullanıma girmiş bir ilaç olan diflunisalin değişik dozlarının, serbest oksijen radikalleri ile ilişkisini ve lipid peroksidasyonu üzerine olan etkisini incelemeyi amaçladık. Bunun için; sıçan karaciğer, böbrek ve kanında, antioksidan enzimlerden katalaz (CAT) aktivitesiyle, lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit (MDA) miktarını ölçtük. Ayrıca karaciğer ve böbrek histolojisini de değerlendirdik.

2. GENEL BİLGİLER

Memelilerde ilaçlar ve çevresel kaynaklı kimyasal maddelerin (ksenobiyotikler) çoğu atılmadan önce büyük ölçüde biyotransformasyona uğrarlar. Biyotransformasyon sonucu ilaçlar daha az etkili ya da etkisiz bileşikler (metabolit) haline dönüştürülür. Bazı durumlarda, biyotransformasyon sonucu daha toksik bileşikler oluşabildiği gibi, hiçbir değişikliğe uğramadan atılım da mümkündür. Biyotransformasyonun oranı, boyutu ve oluşan ürünlerin kimyasal yapısı, türler ve aynı türün bireyleri arasındaki değişiklikler kısmen de olsa genetik olarak belirlenir. Çünkü, genetik potansiyel, ilaç metabolize edici enzim yelpazesini oluşturur (33,48).

Biyotransformasyon ile lipitte çözünebilir yapıların sudaki çözünürlükleri artarak, vücuttan atılmaları kolaylaşmaktadır. Ancak, çok hidrofobik olan ksenobiyotikler, yağ (adipoz) dokuda birikebilmektedir (33,44).

İlaç biyotransformasyonu ile ilgili çoğu bilgi, başlıca metabolizma organı olan karaciğer üzerindeki çalışmalardan elde edilmiştir. Ancak ksenobiyotikleri metabolize etme yeteneği, az da olsa böbrek, akciğer ve gastrointestinal epitel gibi dokularda da bulunmaktadır. Her ne kadar non-hepatik dokulardaki ilaç biyotransformasyonu mekanizmaları, karaciğere göre bazı farklılıklar göstermekteyse de, temel olaylar bütün dokularda geçerlidir (15,33).

İlaç biyotransformasyonunun iki fazda oluştuğu ileri sürülmektedir:

Faz I 'de; hidrofobik substratlar, polar grupların girmesiyle suda çözünür polar metabolitler haline gelir.

Faz II ' de; birinci fazda oluşan polar metabolitler daha da polar hale geçer ve birçok sentez reaksiyonu görülür. Bazı ilaçlar sadece birinci faz reaksiyonlarına girerek atılırlar; ancak, ilaçların çoğu peşpeşe birinci ve ikinci faz reaksiyonlarına katılarak metabolize edilirler. Bu nedenle belirli bir kimyasal maddenin biyotransformasyonu sonucu değişik tipte ve oranda birçok metabolit oluşur (33).

2.1. ANTİENFLAMATUVAR ANALJEZİK İLAÇLAR VE DİFLUNİSALİN ÖZELLİKLERİ

Narkotik ve steroid olmayan antiinflamatuvar (iltihabı önleyici) ve analjezik (ağrı kesici) etkili ilaçlar grubuna “non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar” ya da kısaca “antiinflamatuvar analjezikler” adı verilir. Bu grup analjeziklerin antiinflamatuvar etkinliği, en güçlü antiinflamatuvar steroid ilaçlar olan glukokortikoidlerinkine göre daha zayıftır (33).

Narkotik olmayan analjezikler, yüzeysel yapıların ağrılarında, özellikle ağrı hafif veya orta derecede ve künt nitelikte ise yeterli bir analjezi yaparlar. Baş ağrısı, kas ağrısı (miyalji), eklem ağrısı (artralji), diş ağrısı gibi genellikle lokal iltihabi reaksiyona bağlı olan ağrı çeşitlerinde kullanılırlar. Narkotik analjezikler ise düz kaslı organlardan kaynak alan kolik biçimindeki ağrılarda, kemik kırığı, yaralanma ve yanık gibi travmalara bağlı ya da infarktüs ağrısı şeklindeki şiddetli ağrılarda tercih edilir (31,33).

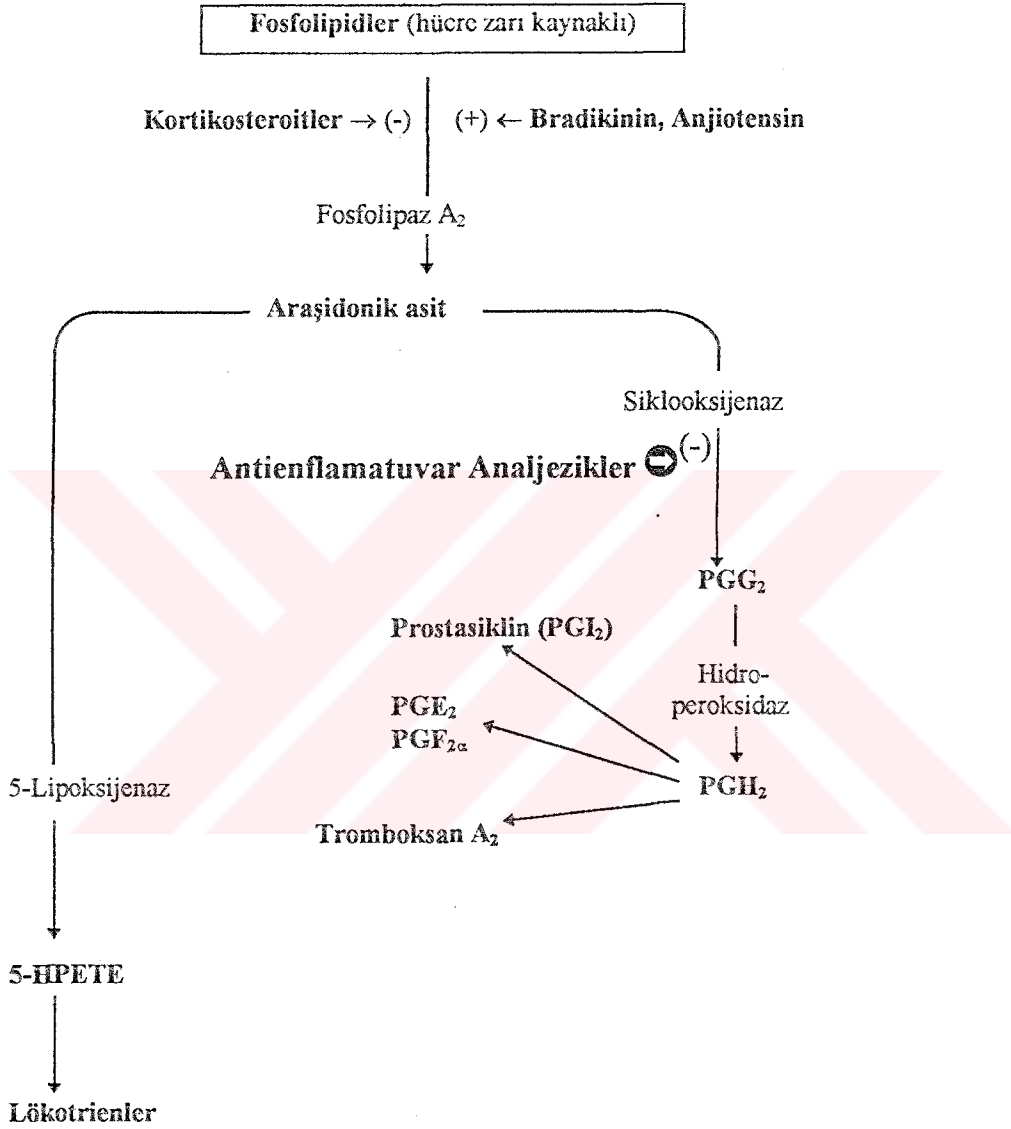
Bu gruptaki ilaçların büyük bir kısmında analjezik etkiye ilave olarak antipiretik (ateş düşürücü) etki de bulunur. Bunlara antipiretik analjezik ilaçlar adı da verilir. Bu ilaçlar antiinflamatuvar etkileri nedeniyle, iltihabın 4 ana belirtisi olan ağrı, ödem, kızarıklık ve sıcaklık artması gibi lokal olayları giderebilirler. Ayrıca narkotik olmayan analjezik ilaçların çoğu, hem analjezik, hem antipiretik ve hem de antiinflamatuvar etkiye sahiptir (33).

Sıçanlarda yapılan incelemelerde, enflamatuvar reaksiyona bağlı ağrının, iki ayrı tipte ağrı mediyatörü tarafından duyuşal sinir uçlarının stimülasyonuna bağlı olduğu gösterilmiştir. Ağrı mediyatörlerinin birinci tipi, sinir ucunu doğrudan doğruya stimüle eder, bunlar “aljezik mediyatörler” adını alır, örnek olarak; bradikinin, histamin, serotonin ve anjiyotensin verilebilir. Ağrı mediyatörlerinin ikinci tipi ise; tek başlarına ağrı oluşturmazlar, fakat duyuşal sinir uçlarının aljezik etkenlere karşı duyarlılığını arttırlar ve onların ağrı yapıcı etkilerini güçlendirirler; bu ikinci tip mediyatörlere de “hiperaljezik ağrı mediyatörleri” denir. Bunlara örnek olarak özellikle, araşidonik asitten oluşan prostasiklin ve prostaglandinler (özellikle PGE₂) verilebilir (33,45).

Hormonal, allerjik, enflamatuvar, immunolojik ya da mekanik bir etkiyle hücre zarında fosfolipaz A₂ aktive olur ve fosfolipidlerden araşidonik asit gibi yirmi karbonlu yağ asitleri meydana gelir. Bu yağ asitlerinin de siklooksijenaz, lipoksijenaz, sitokrom P-450 monooksidaz enzimleriyle etkileşmesi sonucu araşidonik asit metabolitleri (Eikozanoidler) oluşur. Siklooksijenaz enziminin ürünleri; prostaglandinler, prostosiklinler ve tromboksanlardır. Üçüne birden prostanoidler genel adı verilir. Prostaglandinler; E, F, D, A, B ve C şeklinde gruplandırılırlar ve primer prostaglandinler

olan E (PGE₁, PGE₂, PGE₃) ve F (PGF_{1α}, PGF_{2α}, PGF_{3α}) grubunun sentez edilmediği doku yok gibidir. Prostaglandin D'ler sadece trombositlerde ve mast hücrelerinde bulunur. A, B, ve C'ler ise E grubu prostaglandinlerden türetilir ve biyolojik bir önem taşımazlar. Prostaglandinlerin çoğu, birbirlerine zıt çalışırlar. Örneğin, PGE₂; damar düz kaslarını gevşetirken, PGF_{2α} barsak ve uterus gibi yapıların düz kaslarını kasar. Prostaglandinler damar çeperi hücrelerinde yapılan, çeperde pıhtı (trombus) oluşmasını engelleyen önemli etkenlerdir ve prostaglandin I₂ (PGI₂) adıyla da belirtilirler. Tromboksanlar, trombositlerde sentez edilirler. En güçlü doğal damar daraltıcı (vazokonstriktör) ve bronş daraltıcı (bronkokonstriktör) maddelerden biridir. Hücre ve lizozom membranına yıkıcı etkisi vardır. Ayrıca dokularda prostaglandinler, prostasiklinler, tromboksanların prekürsörleri olan prostaglandin G₂ (PGG₂) ve prostaglandin H₂ (PGH₂) bulunur ve bunlar oluştuklara yere göre prostaglandinlere, prostasiklinlere ya da tromboksanlara dönüşüp, etkilerini gösterirler. Lipoksijenaz (5-lökosit, 12-trombosit, 15-mast hücreleri lipoksijenazları) enziminin ürünleri ise lökotrienler olup, araşidonik asitten önce hidroperoksi türevi (HPETE) ve hidroksi türevi (HETE) gibi ara ürünler oluşur, daha sonra lökotrienler (A₄, B₄, C₄, D₄, E₄, F₄) meydana gelir. Bu maddelerin oluşumu, sadece lökositler, trombositler ve mast hücrelerinde gösterilebilmiştir. Sitokrom P-450 ürünleri ise araşidonik asidin sitokrom P-450 içeren enzimlerle metabolize olması sonucu oluşur. Metabolitlerinden, HETE ler, epoksieikozatrienoik asitler ve 19-,20- hidroksiaraşidonatlar bilinmektedir. Ancak fizyolojik önemleri ve patolojik olaylara katkıları anlaşılması değildir. Hepsinin ortak özelliği, az miktarlarda güçlü ve etkili biyolojik maddeler olması ve vücutta depolanmamalarıdır. Narkotik olmayan analjezikler bu maddelerin sentezini inhibe

ederek, yani hiperaljezik komponenti baskı altına alarak ağrı kesici etki yaparlar (Şekil 2.1.) (33,45).



Şekil 2.1. Antiinflamatuvar analjeziklerin temel etki mekanizması (45)

Hiperajzezik etkenlerin, hücresel düzeyde, duyuşal sinir uçlarında adenilat siklazı aktive ederek sAMP düzeyini yükselttikleri ve sinir ucuna Ca^{++} girişini artırdıkları saptanmıştır (33).

Narkotik olmayan analjezik ilaçların, antiinflamatuvar etkileri ile ilgili olarak öne sürülen başlıca mekanizmalar aşağıdaki şekilde sıralanabilir (33);

1. İltihap oluşumunda prostaglandin oluşumu ve siklooksijenaz enziminin inhibisyonu,
2. Nötrofil lökositlerin (PMNL) çeşitli uyarılar tarafından aktivasyonunun inhibisyonu,
3. Aktif oksijen radikallerinin bağlanması,
4. Lizozom membranının stabilizasyonu,
5. ACTH ve kortikosteroidlerle etkileşme.

Sonuç olarak; bu konuda vurgulanması gereken önemli bir nokta, akut veya kronik olsun, iltihap olayının kompleks bir olay olduğudur. Prostaglandin, prostasiklin ve diğer prostanoidler bu olayda önemli ve kısmen çelişkili gibi gözükten roller oynarlar. Ancak iltihap oluşumunda bunlardan başka bilinen ya da bilinmeyen diğer endojen maddelerin katkısından da söz edilmektedir. Örneğin; prostaglandin hipotezinin yanısıra, aktif oksijen radikallerinin meydana gelişini destekleyen deneysel bulgular da bildirilmektedir. Bu bulgulara göre; araşidonik asitin siklik endoperoksitleri olan PGG₂ nin PGH₂ ye dönüşümü sırasında ve ayrıca araşidonik asitten lipoksijenaz aracılığı ile lipid peroksitler oluşurken, aktif oksijen radikalleri olan superoksit anyonu (O₂⁻) ve serbest hidroksil radikali (OH) meydana gelir. Bu nedenlerle antiinflamatuvar ilaçların etkisini tek bir varsayım ile açıklamak mümkün değildir (31,33,45).

Steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçların en önemli kullanım yerleri değişik artrit şekilleridir. Bunlar; romatoid artrit, ankilozan spondilit, osteoartrit, psöriyatik artrit,

Reiter sendromu, romatizmal ateş ve iskelet - kas sistemi ile ilgili diğer lezyonlardır. Ayrıca, enfeksiyon hastalıklarında ateş düşürülmesinde, kardiyovasküler hastalıklarda ve genitouriner hastalıklarda kullanılırlar (31,33).

Steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlar kimyasal yapılarına göre 8 gruba ayrılırlar; 1. Salisilatlar, 2. Para - aminofenol türevleri, 3. Pirazolan türevleri, 4. Profenler (fenilpropiyonik asit türevleri), 5. Fenilasetik asit türevleri, 6. İndol türevleri, 7. Fenamik asit türevleri, 8. Diğerleri. Antiinflamatuvar etkisi olmayan ikinci gruptaki ilaçlar dışında diğer yedi gruptaki ilaçların her biri antiinflamatuvar, analjezik ve antipiretik etkiye sahiptir (33).

Bu çalışmada kullanılan diflunisal, antiinflamatuvar analjeziklerin salisilatlar grubundan olup, aşağıdaki farmakolojik özellikleri gösterir.

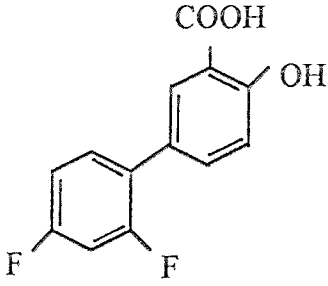
2.1.1. Diflunisalin Farmakolojik Özellikleri

Salisilik asidin bir difluorofenil türevidir; vücutta salisilata dönüşmediği için de salisilat zehirlenmesine (salisilizme) neden olmaz. Bazı kaynaklarda, diflunisalin aynı miktardaki aspirin ya da asetaminofen ile eşit etkinlik gösterdiği belirtilmektedir. Ayrıca aspirine göre antiplatelet ve gastrointestinal etkileri daha az görülmektedir; diflunisalin işitme kaybı gibi bir etkisi de yoktur. Prostaglandin E sentezini inhibe ettiği ve siklooksijenaz enzimine reversibl olarak bağlandığı saptanmıştır. Analjezik ve antiinflamatuvar etkilerinin yanında ürikozürük etkisi de vardır. Bütün bu özelliklerine karşın, diflunisalin yok denebilecek kadar az, zayıf bir antipiretik etkisi vardır. Bunun nedeni ilacın santral sinir sistemine tam olarak nüfuz edememesi olabilir. Bu ilaç,

öncelikle, iskelet kası burkulmalarında ve osteoartritin tedavisinde analjezik olarak kullanılmaktadır; bu özelliğiyle aspirinden üç ya da dört kez daha güçlüdür (3,16,17,26,31,33,63).

Oral uygulamadan sonra diflunisalin hemen hemen tamamı absorbe olur ve 2 - 3 saat içinde, plazma konsantrasyonu pik yapar ve 48 saat içinde plazmadan uzaklaşır. Diflunisal, yaklaşık % 98-99 oranında plazma proteinlerine bağlanır (3,18,39,40,63). Diflunisalin % 90 ı karaciğerde glukuronik asitle konjuge edilerek metabolize edilir; çok azı değişmeden, büyük bir kısmı ise glukronit içeren iki metabolit şeklinde idrarla, % 4'ü de feçesle atılır. Ayrıca metabolizma sırasında molekül yapısındaki (Şekil 2.2.) fluorine atomlarının kaybı da söz konusu değildir. Eliminasyon, doza bağımlı kinetik gösterir. Analjezik dozun (500 - 750 mg günlük doz) plazmada yarılanma ömrü 8 - 12 saat arasındadır. Uzun yarılanma ömrü kısmen de olsa yüksek oranda plazma proteinlerine (% 98 - 99) bağlanmasıyla ilişkili olabilir. Diflunisal emziren kadınların sütünde gözlenmiştir. Santral sinir sistemine etkisi konusunda yeterli bilgi yoktur (17,33,63,69).

Diflunisal, 250 ve 500 mg'lık tabletler şeklinde piyasaya sunulmuştur; orta dereceli yavaş gelişen bir ağrı için, başlangıçtaki kullanım dozu, 500 - 1000 mg şeklindedir, bunu her 8 - 12 saatte bir 250 ya da 500 mg'lık dozlar izler. Romatoid artrit ve osteoartrit için, günde iki kez 250 ile 500 mg'lık uygulamalar vardır; günde 1.5 g'lık dozu aşmamaya dikkat edilmelidir (17). Diflunisalin en sık görülen yan etkileri bulantı, dispepsi, karın ağrısı ve diyare gibi gastrointestinal bozukluklardır. Zayıf da olsa nefrotoksik ve hepatoksik etki potansiyeli vardır (33).



Şekil 2.2. Diflunisalin yapısal formülü (63)

2.2. KSENOBİYOTİKLERİN TOKSİK ETKİLERİ

İlaç ya da ksenobiyotiklerin, toksik etkilerinin en fazla görüldüğü organ karaciğerdir. Çünkü biyotransformasyonla ilgili enzimlerin en yoğun olduğu organdır. Karaciğerde oluşan kısa ömürlü reaktif metabolitler sadece karaciğere zarar verebilir. Daha uzun ömürlü olanlar ise dolaşım ile taşınarak diğer organları etkiler (33).

İlaç veya metabolitlerin fazlaca etkilediği diğer önemli bir organ böbrektir. İlaç ya da metabolitler eğer karaciğerde metabolize olmazlarsa yoğun olarak böbreğe gelirler; dolayısıyla böbrek tübülüs ve toplayıcı kanal hücreleri vücudun diğer hücrelerine göre daha çok ksenobiyotiğe maruz kalırlar. Bunun sonucunda, tübülüs hücrelerine ait enzimlerin metabolize edici etkisiyle yeni reaktif metabolitler oluşabilir (33).

Ksenobiyotikler, önemli metabolik yolları bozarak, patolojik hasara yol açarlar. Bu hasar ksenobiyotiğin kendisi tarafından oluşturulabileceği gibi metabolitlerinin hücresel makromoleküllere kovalent olarak bağlanmasıyla da meydana gelebilir. Örneğin; bir proteine bağlanarak hücrenin, antijenik özelliklerini, dolayısıyla immunolojik mekanizmasını bozarak hücresel hasar oluşturabilirler. Ayrıca hasar bölgesinde; enzim inhibisyonu, DNA farklılaşması ve lipid yapısında değişiklikler de görülebilir (14,33,68).

Bazı ksenobiyotiklerin biyotransformasyonlarının da, serbest radikal oluşumuna neden olduğu ve radikallerin hücrede toksik etkilere yol açtığı bildirilmektedir (33,44).

2.3. SERBEST RADİKALLER VE BİYOLOJİK KAYNAKLARI

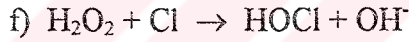
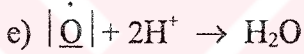
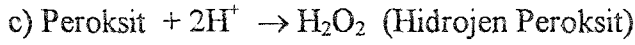
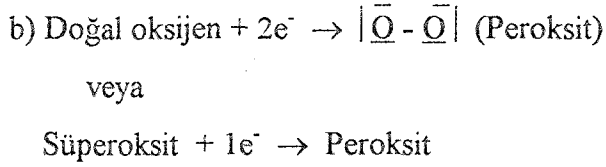
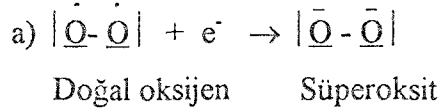
Serbest radikal biyolojisi, son yıllarda dikkatleri üzerinde toplayan bir konudur (2,9,12,22). Serbest radikaller, dış orbitallerinde 1,3,5... gibi tek sayıda elektron bulunduran atom ya da moleküller olup, hem organik hem de inorganik moleküller halinde bulunurlar (Çizelge 2.1.) (32,34,65).

Çizelge 2.1. Bazı önemli serbest radikaller (65)

Radikalın tipi	Örnek
Hidrojen merkezli	Hidrojen atomu (1 proton, 1 elektron)
Karbon merkezli	Triklorometil radikali
Kükürt merkezli	(R - S) radikali
Azot merkezli	Fenildiazin radikali (C ₆ H ₅ N = N)
Oksijen merkezli	a) İnorganik Süperoksit +Hidroksil radikali (HO [•]) b) Organik Alkoksi radikali Peroxsi radikali
Geçiş Metal İyonları	Cu ⁺ / Cu ²⁺ Fe ²⁺ / Fe ³⁺ Ti (III) / Ti (IV)

Oksijen, aerobik organizmaların yaşamlarını sürdürebilmeleri için gerekli olmasına karşın, potansiyel olarak toksik bir moleküldür. Serbest radikaller, moleküler oksijeni metabolize eden bütün canlılar tarafından üretilirler (Şekil 2.3.). Canlılarda oluşan ilk ve

temel oksijen radikali süperoksit radikalidir (süperoksit anyonu, O_2^-). Bu radikal, moleküler oksijenin tek elektron ile indirgenmesinden oluşur (21,34,37,65).



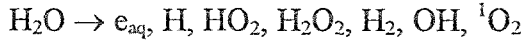
Şekil 2.3. Doğal oksijenden türeyen oksidan moleküller (50)

Süperoksit radikali;

- a) Hem, flavin ya da demir - sülfür merkezleri içeren proteinler olmak üzere pek çok enzimatik tepkimelerde,
- b) Bazı oksidaz ve hidroksilaz tepkimelerinde,
- c) Mitokondride elektron transportu sırasında,
- d) Çeşitli biyolojik moleküllerin otooksidasyonunda,
- e) Fagositoz

gibi fizyolojik olaylarda üretilebilen bir oksijen metabolitidir (34).

Süperoksit radikal oluşumu bazı çevresel etkenlerle de olabilir. Bunların başında; bazı kimyasal bileşikler, ilaçlar ve yüksek enerjili ışınlar (radyasyon) gelir. Yüksek enerjili ışınların sulu ortamdan geçmesi, suyun radyolitik parçalanmasına ve aşağıdaki radyolitik ürünlerin oluşumuna neden olur (34).



Hidrate elektron (e_{aq}) ve hidrojen atomu, oksijenli ortamda elektronu oksijene vererek süperoksit oluştururlar. Yukarıdaki radyolitik ürünlerden hidroperoksit radikali (HO_2), hidroksil radikali (OH) ve singlet oksijen (${}^1\text{O}_2$) radyasyonun diğer reaktif ürünleridir. Radyasyon toksisitesi, bu radikallerin oluşması sonucudur (2,34).

Çizelge 2.2. Oksidanların kaynakları (50)

I. Normal Biyolojik İşlemler

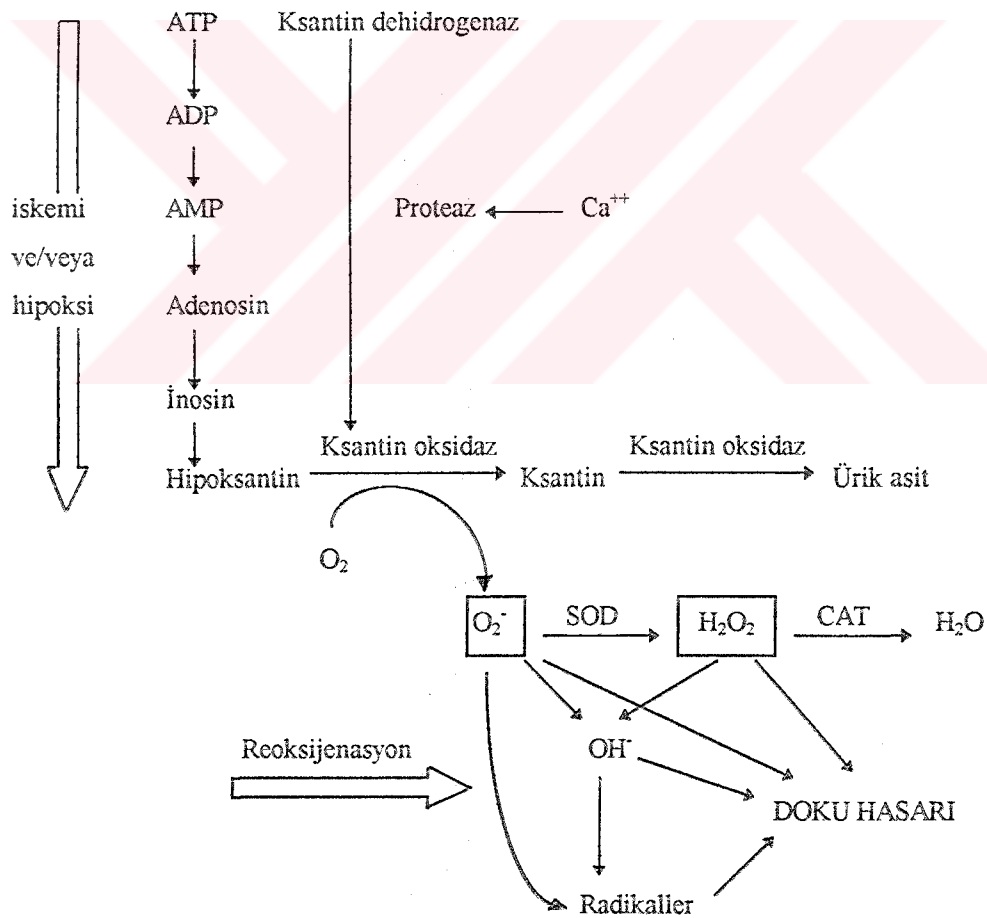
- Oksijenli Solunum
- Katabolik ve Anabolik İşlemler

II. Oksidatif Stress Yapıcı Durumlar

1. İskemi - Hemoraji - Travma Radyoaktivite
Entoksikasyon
2. Ksenobiyotik Maddelerin Etkisi
 - a. İnhale edilenler
 - b. Alışkanlık yapan maddeler
 - c. İlaçlar
3. Stres ile artan katekolaminlerin oksidasyonu
4. Fagositik enflamasyon hücrelerinden salgılanma
5. Uzun süreli metabolik hastalıklar
6. Diğer nedenler: Sıcak şoku, güneş ışını

III. Yaşlanma Süreci

Serbest radikallerin başlıca kaynağı, moleküler oksijendir (Çizelge 2.2). Organizmada meydana gelen birçok enzimatik olay ve biyolojik fonksiyonlar için serbest oksijen radikalleri gereklidir. Örneğin; sitokrom P-450 aracılığındaki oksidasyonlar, düz kas gerginliğinin düzenlenmesi ve mikroorganizmaların öldürülmesi gibi. Ancak, bazı patolojik durumlarda yapımı artan bu ürünler, hücresel makromoleküllerle reaksiyona girerek, hücre hasarı oluştururlar. Miyokart infarktüsü, iskemi, reperfüzyon ve enflamasyon gibi patolojik durumlarda serbest oksijen radikallerinin oluşumu artar (Şekil 2.4.) (4,21,32,35,38,55,60,62).



Şekil 2.4. Oksijen radikallerinin oluşması (8)

Klinik uygulamalarda kullandığımız birçok ajan da serbest oksijen radikali oluşumuna yol açar. Bunlar; özellikle antineoplastik ajanlar ve aktiviteleri için quonoid gruplar ya da bazı metallere gereksinim duyan antibiyotiklerdir. Klinik uygulamada kullanılan ajanlardan başka; radyasyon, fotokimyasal hava kirleri, hiperoksi, sigara dumanı, anestetikler ve aromatik hidrokarbonlar gibi çevresel ajanlar da oksijenin serbest radikallerini açığa çıkarabilirler (32,33,34,59,65).

2.3.1. Küçük Moleküllerin Otoksidasyonu

Çözünabilir özelliği olan ve nötral sıvı ortamda oksidasyon - redüksiyon reaksiyonlarına girebilen hücre komponentlerinden çoğu, intraselüler olarak serbest radikalleri açığa çıkarırlar. Bunlar arasında; tiyoller, hidrokinoonlar, katekolaminler, flavinler ve tetrahidropterinler bulunur. Bu maddelerin tümü dioksijenin redüksiyonunu sağlarken primer olarak süperoksit radikallerinin meydana gelmesine neden olurlar, süperoksit radikallerinin spontan ya da enzimatik dismutasyonu ise ikinci bir ürünü yani hidrojen peroksiti açığa çıkarır. Böylece, süperoksit radikalini veren hücreyel olaylar, dismutasyon nedeni ile hidrojen peroksiti de meydana getirmiş olurlar (4,21,32,42).

2.3.2. Çözünabilir Enzimler ve Proteinler

Katalitik siklusları sırasında, birçok enzim serbest radikallerin açığa çıkışını sağlar. Bunlardan üzerinde en çok çalışılan ksantin oksidaz olup, oksijenin hidrojen peroksite redüksiyonu sırasında süperoksit radikalini meydana getirir. In vivo iskemi, ksantin oksidazı dehidrogenaz formundan oksidaz formuna dönüştürürken süperoksit radikalini

açığa çıkarır (Şekil 2.4.). Benzer şekilde serbest radikal oluşturan diğere enzimler, flavoprotein dehidrogenaz, triptofan dioksijenazdır (4,8,21,32).

2.3.3. Mitokondriyal Elektron Transportu

Mitokondriyal hidrojen peroksit yapımı ilk kez 1966'da Jensen (32) tarafından saptandı. Bundan sonra yapılan çalışmalarda, mitokondriyal hidrojen peroksidin, tamamı değilse bile çoğunun, süperoksit radikallerinin dismutasyonundan meydana geldiği gösterildi (32).

İzole mitokondri ve submitokondriyal partiküllerle yapılan çalışmalarda, mitokondriyal serbest radikallerin kaynağının, iç mitokondriyal membranda yer alan elektron transport zinciri olduğu anlaşılmıştır. Başta süperoksit radikali olmak üzere, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit mitokondri içinde meydana gelir. Normalde süperoksit ve hidrojen peroksit yapımı, mitokondriyal oksijen sarfinin yaklaşık % 1-2'sini oluşturur. Sağlam mitokondri, hidrojen peroksiti sitoplazmaya verebilirken süperoksit radikali için durum farklıdır, çünkü mitokondriyal süperoksit dismutaz, intramitokondriyal süperoksit radikalini çok düşük ve sabit konsantrasyonlarda tutar (32).

2.3.4. Endoplazmik Retikulum ve Nüklear Membran Transport Sistemleri

ER ve nüklear membranda serbest radikaller, membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan meydana gelirler. Oluşan serbest radikaller hem intraorganel ve hem de sitozolik reaksiyonları başlatabilirler. Nüklear membrandan açığa çıkmış olan radikallerin varlığında özellikle DNA serbest radikal harabiyetine maruz kalabilecektir (4,14,21,32).

ER ve nüklear membranlar aynı elementleri; örneğin sitokrom P-450 ve b5'i içerdikleri için ansatüre yağ asitlerini, ksenobiyotikleri okside edebilir ve dioksijeni indirgeyebilirler. Ayrıca flavoprotein içeren sitokrom redüktazlar otooksidasyonla süperoksit radikali ve hidrojen peroksit oluştururlar. Mikrozomal ve nüklear membran sitokromları da hidrojen peroksit meydana getirebilirler. Sıçan karaciğer mikrozomlarında da hidroksil radikalinin yapıldığı belirlenmiştir (32,44,65).

2.3.5. Peroksizomlar

Peroksizomlar, güçlü hücrel hidrojen peroksit kaynağıdır. Bu yapılar, D-amino asit oksidaz, urat oksidaz, L - alfa hidroksiasit oksidazdan çok zengin olup bu enzimler hidrojen peroksit açığa çıkarıcı özelliğe sahiptirler (5,32,44).

2.3.6. Plazma Membranları

Ekstraselüler olarak açığa çıkan serbest radikaller, hücrenin diğer kısımları ile reaksiyona girebilmek için ya önce plazma membranını geçmelidir ya da toksik reaksiyonları membranda başlatmalıdır. Membranda bulunan fosfolipitler, glikolipitler, gliseritler, steroller gibi doymamış yağ asitleri ve kolay okside olabilen amino asitleri içeren transmembran proteinleri serbest radikal harabiyetine açıktır. Ayrıca, serbest radikallerin başlattığı lipit peroksidasyonu ya da yapısal öneme sahip proteinlerin oksidasyonu, transmembran iyon gradiyentinin bozulmasına, sekreter fonksiyonların kaybına ve selüler metabolik olayların inhibisyonuna yol açabilir. Bu nedenlerle plazma membranı, serbest radikal reaksiyonları için kritik bir yerdir (4,21,32).

Oksijenin metabolize edilmesi sırasında oluşan H_2O_2 , membranları su kadar kolay geçebilir ve güçlü bir hidroksil radikali kaynağıdır. Ayrıca süperoksit radikali de membranları geçebilir ve transmembran anyon kanalları yolu ile hücre içine ulaşır. Son yıllarda bakteriyel membranlarla yapılan çalışmalar, süperoksit sisteminden gelen reaktif radikallerin, membranı harab ederek bakteriyi öldürdüğü gösterilmiştir. Bakteriyel membranlar, çok düşük konsantrasyonda poliansatüre yağ asidi içerirler, bu nedenle burada etkili olan radikal hidrojen peroksitten çok, hidroksil radikalidir. Çünkü hidroksil radikali her tip organik molekülle yüksek bir hızda reaksiyona girer (4,21,32).

Bu konuda, dikkatleri çeken bir başka nokta da lipoksijenaz ve siklooksijenaz gibi mikrozomal ve plazma membranına bağlı enzimlerin serbest radikal açığa çıkarmalarıdır. Bu enzimlerin predominant substratı olan araşidonik asitin biyolojik olarak güçlü ürünlere dönüşümü sırasında bu radikaller meydana gelir. Membrana bağlı siklooksijenaz tarafından araşidonik asitin enzimatik oksidasyonu ile bir karbon merkezli serbest radikal açığa çıkar. Yine siklooksijenazın katalize ettiği araşidonik asit metabolizması sırasında, bir oksijen merkezli radikal meydana gelir ki bu radikalın hidroksil radikali olduğu ve PGG_2 üzerindeki hidroperoksinin parçalanması sonucu açığa çıktığı ileri sürülmektedir. Hidroksil radikali ya da diğer radikal türlerinin, prostaglandin sentezi sırasında açığa çıkışı siklooksijenazın feedback regülasyonuna yol açabilir, prostaglandin sentezinin hem hızını hem de miktarını modüle edebilir (32,33).

Serbest radikallerin etki derecesini, substratın çözünebilirliği ve difüzyon mesafesi gibi faktörler belirler. Örneğin, hidroksil radikali, çok fazla uzağa diffüze olmadan, olduğu hücre bölümünde derhal reaksiyona girer. Süperoksit radikali ise hidroksil

radikalinden daha az reaktiftir; bu yüzden açığa çıktığı hücre bölümünden daha uzak noktalara rahatlıkla diffüze olabilir. Ancak, bu difüzyon hücre içindeki süperoksit dismutazın (SOD) yüksek konsantrasyonları ile sınırlanır. Bu enzim yardımıyla, hücre içindeki süperoksit anyonunun konsantrasyonu 10^{-11} - 10^{-12} M arasında tutulur. Hidrojen peroksit; mitokondri, peroksizom ve plazma membranından kolaylıkla diffüze olur. Bu nedenle toksik etkisi meydana geldiği noktadan çok daha uzak hücrelerde güçlü bir şekilde görülebilir (4,21,32).

2.4. SERBEST RADİKALLERİN REAKSİYONLARI

Serbest radikallerin biyolojik reaksiyonlarını genel bir başlık altında incelemek oldukça güçtür. Çünkü organizmanın yaşamı boyunca karşılaştığı radikal türleri sürekli değişir. Radikaller hücrede oluşuktan sonra, radikal reaksiyon dizileri başlar. Bu reaksiyonlar atom transferleri ya da doymamış bağlara radikal eklenmesini içerir. Serbest radikal reaksiyonları ilerleyerek hücrel harabiyetle sonuçlanabilir (32).

Serbest radikal reaksiyonları, serbest radikal yakalayıcı bazı bileşiklerle sona erebilir; bu bileşiklerin bir kısmı, hücrel bütünlük için temel olan ve etkinlikleri azaldığı takdirde sitotoksositeye yol açabilen bileşiklerdir. Diğer serbest radikal temizleyiciler antioksidan savunma yapan bileşikler olarak adlandırılır ve serbest radikallerin zararlı etkilerine maruz kalan organizmanın canlılığını sürdürmesine yardımcı olurlar (25,32).

2.4.1. Serbest Radikal Harabiyeti Altındaki Hücresel Komponentler

2.4.1.1. Proteinler

Doymamış ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğu için triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi aminoasitleri içeren proteinler serbest radikallerden kolayca etkilenirler (32).

Papain ve gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz gibi yukarıdaki aminoasitleri içeren enzimler serbest radikallere maruz kaldıklarında inhibe olurlar (32).

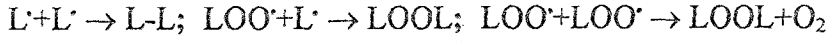
2.4.1.2. Nükleik Asitler ve DNA

Radyasyonla hücre içinde enerji depolanması sonucu; iyonlar, serbest radikaller ve aktif moleküller meydana gelir. İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyon ve ölüme yol açarlar (14,32,34).

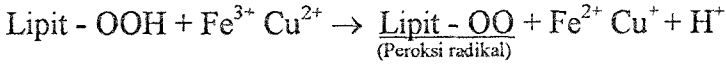
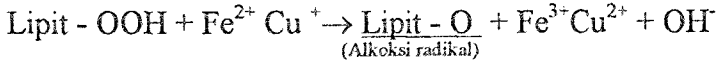
2.4.1.3. Membran Lipitleri

Membrana ait kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle reaksiyona girerek peroksidasyon oluştururlar. Organizmada en çok görülen radikal hasarı lipit peroksidasyonu şeklinde olup, membranlarda ansatüre yağ asitlerinden 1 hidrojenin çıkmasıyla L' (lipit) radikali meydana gelmektedir ($LH - H \rightarrow L'$). Lipit radikali, lipitlerin radyasyon ya da çeşitli radikallerle etkileşimi ile oluşmaktadır. Oluşan lipit radikali O_2 ile birleşince ($L' + O_2 \rightarrow LOO'$) lipit peroksi radikali, onun da diğer lipitlerle zincir reaksiyonu sonucu tekrar lipit radikalleri ve lipit hidroperoksitleri meydana gelmektedir ($LOO' + LH \rightarrow LOOH + L'$). Lipid peroksidasyonunda L' oluşumu başlangıç,

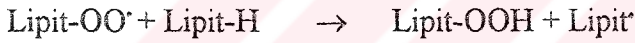
LOOH oluşumu gelişim basamağını oluşturur. Bu reaksiyonların sonlanmaları aşağıdaki şekilde olur.



Ayrıca gelişim basamağında oluşan lipit hidroperoksitleri ısı, radyasyon ya da metal iyonları aracılığı ile alkoksi ($LO \cdot$) ve peroksi ($LOO \cdot$) radikal yapılarına dönüşmektedir (13,21,23,32,37,43,50,56).



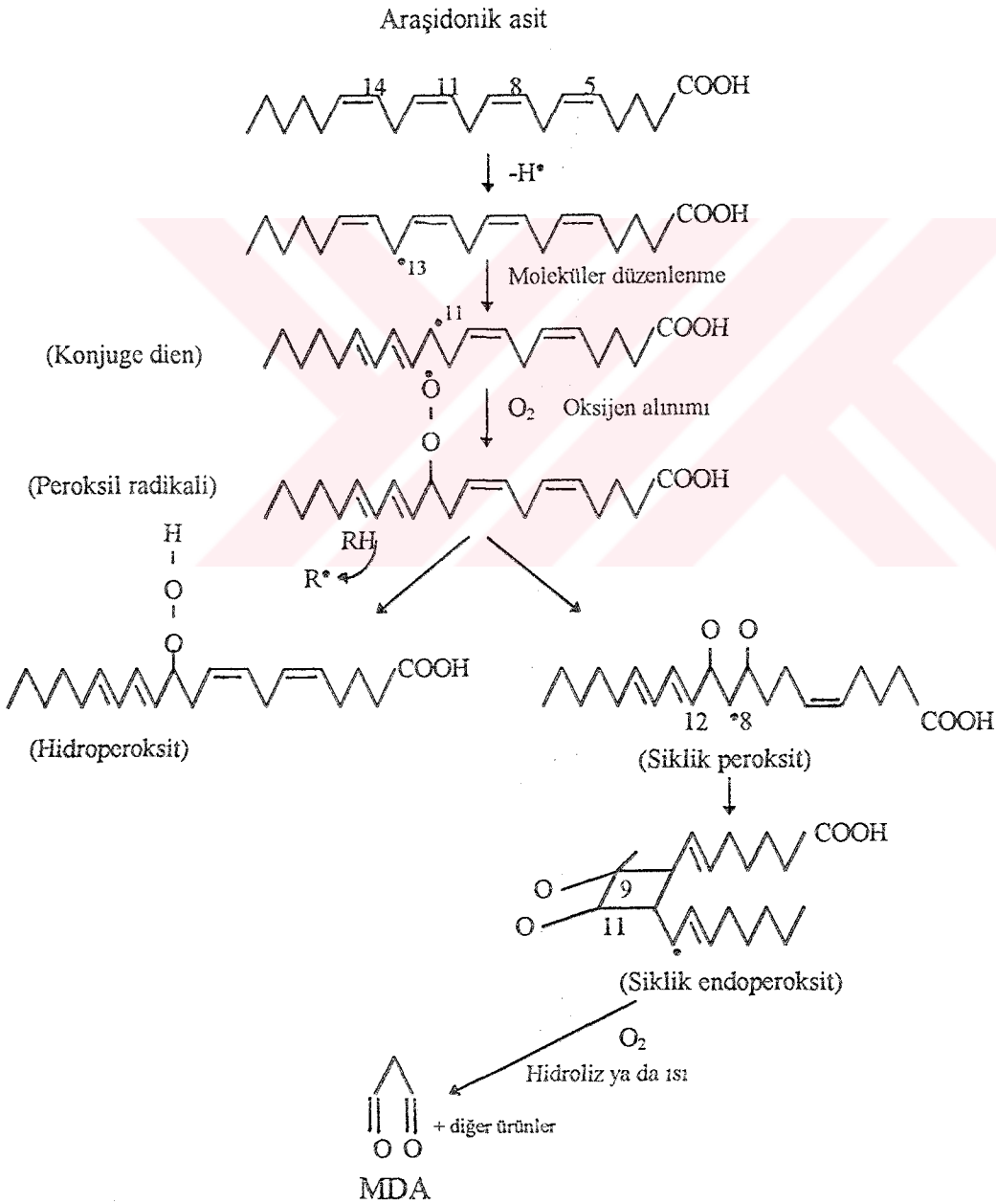
Oluşan alkoksi radikali de ya yeniden aşağıdaki gibi zincir reaksiyonlar başlatmakta;



ya da yeni sitotoksik ürünler olan aldehitleri ve etan, pentan gibi hidrokarbon gazlarını meydana getirmektedir (21). Bu toksik ürünlerin en son basamağında yer alan malondialdehit ise lipit peroksidasyonunun saptanmasında kullanılmaktadır (Şekil 2.5.) (1,7,47,57).

Lipit peroksidasyonuna uğrayan membrandaki, poliansatüre yağ asitleri membran yapısını değiştirerek permeabilitenin artmasına ve böylece transport fonksiyonlarının bozulmasına yol açar. Bunun yanında mitokondri membranının geçirgenliğindeki değişim, hücre oksidatif fosforilasyonunun bozulmasına, lizozomal membranlardaki geçirgenliğin bozulması da hidrolitik enzimlerin lizozom dışına çıkmasıyla hücre hasarına yol açar. Membran üzerindeki peroksidatif hasar hücre içi ve dışı iyon dengelerinde değişime neden

olur. Örneğin, intraselüler Ca^{2+} konsantrasyonu artışı, hücre içinde kalmoduline bağlı intraselüler proteazların aktive olmasına neden olur. Bu yolla hem ksantin dehidrogenazın, ksantin oksidaza dönüşümü hem de fosfolipaz A' nin aktive olmasıyla membran lipitlerinden araşidonik asit salınımı gerçekleşir. Bu yolla prostaglandin metabolizması dolayısı ile siklooksijenaz ve lipoksijenaz sentez yolları da aktivite kazanır (21,33,50).



Şekil 2.5. Lipid peroksidasyonu ve MDA oluşması (23)

2.5. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİNE KARŞI SAVUNMA SİSTEMLERİ

Hücreler, oksidatif harabiyeti önleyen, sınırlayan ya da kısmen tamir eden koruyucu mekanizmalara sahiptirler (4,21,50).

Hücrede oluşan radikallerin detoksifikasyonu, öncelikle enzimatik yollarla yapılır (intraselüler enzimatik antioksidan savunma). Antioksidan savunmanın önemli bir kesimini, süperoksiti ve hidrojen peroksiti (H_2O_2) temizleyen spesifik enzimler oluşturur. Bunlar süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPX) enzimleridir (4,21,32,43).

Antioksidan savunmada, enzimlerden başka, hücre içindeki makro ve mikromoleküller de görev yapar. Oksijen türevlerine karşı savunma sağlayan moleküller ve enzim sistemleri, serbest radikallerin hücrede düşük ve sabit konsantrasyonlarda kalmalarını sağlarlar (25,50). Antioksidanları, doğal antioksidanlar ve ilaçlar olarak başlıca 2 ana grupta toplayabiliriz (Çizelge 2.3.).

Antioksidanlar, farklı etki mekanizmalarına sahiptirler (50), bunlar:

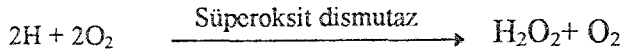
1. SÜPÜRÜCÜ (scavenging) ETKİ; Oksidan moleküllerin tutulup daha zayıf bir molekül haline getirilerek etkisizleştirilmesidir. Örnek olarak, doğal antioksidanlardan; enzimler, trakeobronşial mukus ve küçük moleküller bu tip etki gösterirler.
2. BASTIRICI (quencer) ETKİ; Oksidanlara bir hidrojen aktararak inaktif hale getirilmesidir. Vitaminler, flavonoidler, trimeteidin, mannitol ve antosiyanidinler böyle bir etkiye sahiptirler.

3. ONARICI (repair) ETKİ; Molekülde oluşan bozukluk onarılarak oksidan etkisinin ortadan kaldırılmasıdır. Örneğin askorbat, vitamin E radikalini onararak etkisiz hale getirir.
4. ZİNCİR KIRICI (chain-breaking) ETKİ; Hemoglobin, seruloplazmin ve bazı mineraller oksidanları kendilerine bağlayarak, yapılarındaki kimyasal zincirleri kırarlar ve bu şekilde antioksidan etki gösterirler.

Çizelge 2.3. Antioksidanlar (50)

A- Doğal Antioksidanlar	B- İlaçlar
I- Süperoksit dismutaz (SOD)	-Rekombinant h - SOD
- Glutasyon peroksidaz (Gpx)	-Ebselen
- Glutasyon reduktaz (GSSGR)	-21- Aminosteroidler
- Hidroperoksidaz	-Demir şelatörleri:
- Sitokrom-C oksidaz	Phenanthroline, Desferrithionin,
II- Makromoleküller	Desferoxamine, Dimethylthiourea,
- Seruloplazmin	Alfa-Ketohydroxipiridine
-Transferrin	-Sitokinler: TNF ve Interlökin-1
- Ferritin	-Ksantin oksidaz inhibitörleri
- Hemoglobin	Allopurinol, Oksipurinol, Tungsten
III- Mikromoleküller	-Mannitol
-E vitamini ve analogları	-Flavonoitler
-C vitamini	-Trimetazidin
-Thiol içerenler:	-Indamapide
Glutasyon N asetil sistein	
Metiyonin	
Kaptopril	
-A vitamini -Beta karoten	
-Urat -Ürik asit	
-Ubikinon	
-Glikoz	
-Bilirubin	

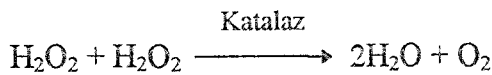
Hücrede oksijenin reaktif ve toksik ürünlerine karşı doğrudan koruyucu fonksiyon gören ilk ve tek enzim SÜPEROKSİT DİSMUTAZ'dır. Bu enzim, iki süperoksit radikali arasındaki tepkimeyi katalizler (4,32,34,43,61).



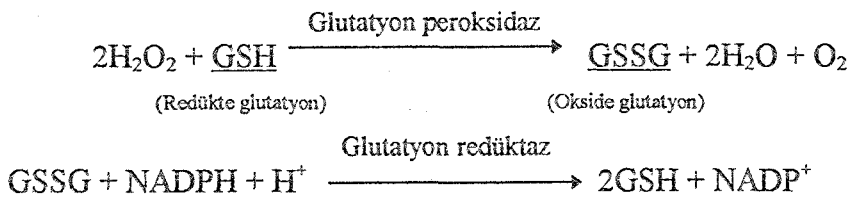
Süperoksit dismutaz enzimi hücrede birkaç değişik yapıda bulunur. Bunlardan sitozolik enzim, herbiri içinde bir ekivalan Cu^{2+} ve Zn^{2+} taşıyan birbirine benzer 2 alt üniteden meydana gelir. Mitokondriyal enzim ise, bakterilerde bulunana benzer şekilde sadece Mn^{2+} içerir. Bunların dışında, *E. coli* B'nin periplazmik bölgesinde, Mn - SOD'a benzeyen Fe - SOD tanımlanmıştır (32,34,52,64,70).

Hücredeki diğer antioksidan enzimler KATALAZ ve GLUTATYON PEROKSİDAZ olup, bu enzimler H_2O_2 'i parçalarlar (4,18,30,32,44).

Katalaz (CAT), 4 "hem" grubu içeren bir hemoproteindir. Bu enzim, bir molekül H_2O_2 'i elektron verici bir substrat olarak, diğerini de oksidan veya elektron alıcısı olarak kullanabilir. İn vivo bir çok durumda, katalazın peroksidaz aktivitesi tercih ediliyor gibi görünmektedir. Katalaz, bu dokulardaki hücrelerin mikrozomlarında ya da peroksizomlarındadır (11,44).

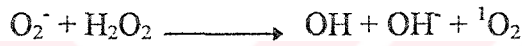


Eritrositlerde ve diğer dokularda, prostetik grup olarak selenyum içeren "Glutatyon peroksidaz" enzimi ise, indirgenmiş glutatyon tarafından H_2O_2 ve lipid - peroksidlerinin parçalanmasını katalize eder, böylece membran lipidlerini ve hemoglobini, peroksidlerin oksidasyonuna karşı korur (44,53).



Süperoksit radikali sulu ortamda önemli ölçüde birikmez ve kendiliğinden dismutasyon tepkimesi ile H_2O_2 oluşturabilir. Fakat SOD ile katalizlenen reaksiyon, kendiliğinden oluşan reaksiyondan 10^9 kez daha hızlıdır (34).

SOD bulunmayan bir ortamda süperoksit üretilirse, kısa süre için bile olsa süperoksit birikimi olur ve kendi dismutasyon ürünü olan H_2O_2 ile tepkimeye girerek hidroksil radikali ve singlet oksijenin üretimine neden olur (Haber - Weiss tepkimesi) (34,43,44):



Hidroksil radikali, biyolojik sistemlerde oluşabilen en reaktif ve en toksik bileşiktir. Bu radikalin in vivo olarak da üretilebileceği gösterilmiştir (34). Singlet oksijen ve hidroksil radikali çok reaktif olup çok düşük derişimlerde bile bütün canlılar için toksik etki gösterirler. Süperoksit radikali, genel olarak zincirleme radikalik tepkimeleri başlatır ve hidroksil radikali, singlet oksijen ve organik radikallerinin oluşumuna neden olur (Çizelge 2.4.) (34,44).

Çizelge 2.4. Reaktif oksijen partikülleri (Oksidanlar) (50)

I. Radikaller	II. Non-Radikaller
-Süperoksit Radikal (O_2^-)	-Hidrojen Peroksit (H_2O_2)
-Hidroksil Radikal (OH^\cdot)	-Lipit Hidroperoksit (LOOH)
-Alkoksil Radikal (LO^\cdot)	-Hipoklorus (HOCl)
-Peroksil Radikal (LOO^\cdot)	

Antioksidan savunmada görev yapan major antioksidanlar (Çizelge 2.5.), **lipofilik** ve **sitozolik** olmak üzere 2 grup altında toplanmıştır (32,50):

Lipofilik olanlar; serbest radikali daha az toksik forma indirger. Örneğin vitamin E; süperoksit, hidroksil ve lipit peroksit radikallerini etkiler. Askorbat; bir radikal temizleyici olup, ayrıca tokoferoller de indirgenmiş formda tutar. β -karoten; lipit peroksidasyonunu önler ve radikalleri ortadan kaldırır. Ayrıca β -karoten ve vitamin E singlet oksijen temizleyicisi olarak da görev yaparlar. Şekerler, doymamış aminoasitler, sülfür içeren aminoasitler, doymamış yağ asitleri de serbest radikallerle reaksiyona girerler ve bu nedenle hücrede serbest radikalleri temizleyici moleküller olarak kabul edilirler (29,32,42,50,65,66).

Sitozolik olanlar; bunlardan temizleyici "glutasyon" (GSH); hidrojen ve lipit peroksitleri, disülfidleri, askorbat ve serbest radikalleri indirger (52,68). Ayrıca plazmada yaklaşık 300 mM kadar bulunabilen ürik asit; hemoglobini peroksit oksidasyonundan, eritrositleri de lipit peroksidasyonundan korur, bu özellikleri nedeniyle ürik asit serbest radikal temizleyici olarak kabul edilebilir (32,50,65).

Antioksidan savunmanın diğer bir kesimini de; Haber-Weiss reaksiyonlarını katalize ederek metalleri bağlayan bileşikler oluşturur. Bunlar başlıca seruloplazmin, transferrin, haptoglobin ve albumin olup ekstraselüler antioksidanlar olarak da adlandırılırlar. İnsanda, plazma antioksidan aktivitesinin büyük kısmı seruloplazmine bağlıdır. Seruloplazmin; demirin transferine bağlanmasını kolaylaştırır ve ekstraselüler SOD gibi davranarak antioksidan etkinlik gösterir. Transferrin; demiri, haptoglobin; demir gibi

davranabilen serbest hemoglobini, albumin; bakırı bağlayarak antioksidan fonksiyon yapar (Çizelge 2.5.) (24,32,44,50).

Çizelge 2.5. Major antioksidanlar ve özellikleri (50)

Antioksidan	Yapısı	Yeri	Etkisi
Süperoksit	CuZn -SOD	Sitozol-nukleus	
Dismutaz	Mn- SOD Cu - SOD	Mitokondri Plazma	O ₂ 'nin H ₂ O ₂ 'e dismutasyonunu katalize eder.
Katalaz	Tetramerik Hemoprotein	Peroksizomlar	H ₂ O ₂ 'nin H ₂ O ya redüksiyonunu katalize eder.
GSH Peroksidaz	Selenoprotein	Sitozol-mitokondri	H ₂ O ₂ 'in ve lipit peroksitlerin redüksiyonunu katalize eder.
GSH Reduktaz	Dimerik Protein	Sitozol-mitokondri	GSSG'ı GSH' a dönüştürür.
Vitamin E	Yağda eriyen vit.	Lipit membranlar, Ekstraselüler sıvılar	Lipit peroksidleri inaktive eder, lipit peroksidasyon zincirini kırar.
Vitamin C	Suda eriyen vit.	Hücre içi-dışı sıvılar	O ₂ ve OH' in direkt scavengeri, vit. E nin rejenarasyonu
Beta karoten	Vit A metabolit prokürsörü	Membranlarda	O ₂ scavenger, Direkt peroksidlere etki
Bilirubin	Hemoprotein Metabolizma ürünü	Kan ve doku	Reaksiyon zincirini kırar, LOO'yu inaktive eder.
Ürik asit	Ksantin oksidasyonu	Yaygındır	O ₂ , OH ve peroksid scavengeri, vit C' nin oksidasyonunu engeller.
Glukoz	Karbohidrat	Yaygındır	OH scavengeri
Sistein	Amino asit	Yaygındır	Elektron vererek organik molekülleri indirger.
GSH	Tripeptid	Hücre içi alveoller	O ₂ , OH' e direkt etki, enzimler için substrattır.
Taurin	Beta amino asit	Radikal salgılayan hücrelerde	HOCl ile reaksiyon, ksenobiyotiklere bağlanma
Trakeobronşiyal mukus	Protein ve glikoprotein	Üst solunum yolları	İnhale edilen oksidanları scavenger
Albumin	Protein	Yaygın	Transisyon metalleri bağlar.

Ayrıca serbest oksijen radikallerinin; bazı hastalıklarda, kanser, yaşlanma gibi biyolojik süreçlerde de rol aldığı ve sorumlu olduğu ileri sürülmektedir (Çizelge 2.6.) (9,12,21,22,34,35,38,43,50,55).

Çizelge 2.6. Aktif oksijen türevlerinin rol aldığı ileri sürülen bazı klinik ve patolojik durumlar (65)

<i>Enflamasyon- immün sistem hasarı</i>	<i>İskemi</i>
Glomerülonefrit (idiyopatik membranöz)	Miyokart infarktüsü
Vaskülit (virüs ve ilaçlarla oluşan)	Organ transplantasyonu
Otoimmün hastalıklar	<i>Alkolizm</i>
Romatoid Artrit	<i>Radyasyon hasarı</i>
<i>Kırmızı kan hücreleri</i>	<i>Yaşlanma</i>
Fenilhidrazin	Erken yaşlanma
Primakin ve benzeri ilaçlar	<i>Akciğerler</i>
Kurşun zehirlenmesi	Sigara dumanının etkileri
Protoporfirin fotooksidasyonu	Amfizem
Malarya	Hiperoksi
Orak hücreli anemi	Bronkopulmoner displazi
Favizm	Ozon (O ₃)
Fankoni anemisi	Yetişkin solunum sistemi rahatsızlığı sendromu (ARDS)
<i>Kalp ve kardiyovasküler sistem</i>	Mineral toz pnömokonyozu
Alkol kardiyomyopatisi	Bleomisin toksisitesi
Keşan hastalığı (Se eksikliğine bağlı)	SO ₂ toksisitesi
Ateroskleroz	<i>Böbrek</i>
Adriyamin kardiyotoksitesisi	Otoimmün nefrotik sendrom
<i>Gastrointestinal kanal</i>	Amino glikozit nefrotoksitesisi
Endotoksin karaciğer hasarı	Ağır metal nefrotoksitesisi
Halojenli hidrokarbonların neden olduğu karaciğer hasarı	<i>Göz</i>
Pankreatit	Kataraktojenaz
İlaçların diyabetojenik etkisi	Oküler hemoraji
Oral demir zehirlenmesi	Dejeneratif retinal hasar
Steroid olmayan antiinflamatuar ilaçların gastrointestinal kanalda oluşturduğu lezyonlar	<i>Cilt</i>
<i>Beyin-Sinir sistemi-Nöromusküler hastalıklar</i>	Termal hasar
Multipl Skleroz (MS)	Porfiryra
Hiperbarik oksijen	Kontakt dermatit
Vit. E eksikliği	<i>İlaç ve toksinlerle oluşan reaksiyonlar</i>
Nörotoksinler	Aşırı demir yüklemesi
Parkinson hastalığı	İdiyopatik hemakromatoz
Hipertansif serebrovasküler hasar	Diyetle aşırı demir alınımı
Alerjik ensefalomyelit ve diğer demiyelinize hast.	<i>Beslenme yetersizliği (Kuşaşıorkor hastalığı)</i>
Alüminyum yüklemesi	
Travmatik hasar	
Kas distrofisi	

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı hayvan laboratuvarımızda üretilen 40 adet, 2-3 aylık, yaklaşık 170 - 200 g. ağırlıklarında, erkek, *Rattus norvegicus* türü albino sıçan kullanıldı. Havalandırma ve diğer temizlik kurallarına dikkat edilerek üretilen sıçanlara deney süresince yeterince standart kapsül fare yemi ve musluk suyu verildi.

3.1.2. Kimyasal Maddeler

- Diflunisal (Dolphin, Sanovel İlaç San. ve Tic. A.Ş.)
- Na₂HPO₄
- KH₂PO₄
- KCl
- H₂O₂ (Sigma)
- Amonyum molibdat (Sigma)
- TBA (Merck) Tiyobarbitürik asit
- 1,1,3,3 Tetraetoksipropane (Sigma)
- Fosforik asit (Merck)
- Total Protein Kiti (Bio - clinica)
- Serum fizyolojik

-Distile su

3.1.3. Ayytflar

-pH metre

-Derin dondurucu (Caravel 8831) (-20 °C)

-Spektrofotometre (Spectronic 20D)

-Santrifüj (Nüve)

-Homojenizatör (Ultra-Turrax T25)

-Işık mikroskobu (Olympus)

-Kronometre

-Lab. saati

-Vorteks mikser

-Mikser

-Hassas Terazi

-Otomatik pipetler

-Pipet uçları (1000'lik, 100'lük)

-Pipet (10 ml'lik)

-Mezür (100'lük, 500'lük, 1000'lik)

-Şişe (350 ml'lik, 500 ml'lik, 1000 ml'lik)

-Santrifüj deney tüpleri

-Spektrofotometre deney tüpleri

-Vial

-Fotoğraf makinesi

-Fotoğraf filmi

-Cam kalemi

-Tüplük

-Eldiven

-Parafilm

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Doz Miktarları ve Deney Grupları

Diffunisal dozları, insanlara uygulanmakta olan 250 mg/gün, 500 mg/gün, 1000 mg/gün terapötik dozlara uygun olacak şekilde, sırasıyla 3.5 mg/kg/gün, 7mg/kg/gün, 14 mg/kg/gün olarak ayarlandı ve serum fizyolojik içinde çözündürüldü. Deneye alınan 40 adet sıçan dört eşit gruba ayrıldıktan sonra;

I. Gruba (Kontrol) 0.5 ml serum fizyolojik,

II. Gruba 3.5 mg/kg/gün diflunisal,

III. Gruba 7 mg/kg/gün diflunisal

IV. Gruba 14 mg/kg/gün diflunisal,

12 saatte bir, günde iki kez intraperitoneal enjeksiyon şeklinde, yedi gün süreyle, hergün aynı saatte verildi.

3.2.2. Deney Hayvanlarından Çalışılacak Örneklerin Alınması ve Saklanması

Eter anestezisi ile bayıltilan deney hayvanlarından, katalaz (CAT), malondialdehit (MDA) ölçümü için karaciğer ve böbrek doku örnekleri ile kalp kanı alındı. Kalp kanı, EDTA'sız santrifüj tübüne aktarıldı. Oda ısısında iki saat bekletilen kan örnekleri, 5000 devirde 10 dk. santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Karaciğer ve böbrekten alınan doku örnekleri, serum fizyolojikte 3 kez yıkandı ve cam şişeler içinde, serumlarla birlikte ölçüm anına kadar -20 °C'lik derin dondurucuda saklandı. Ayrıca karaciğer ve böbrekten, histolojik inceleme amacıyla %10 nötral formaldehit içine her hayvandan doku örnekleri alındı.

3.2.3. Dokuların Homojenizasyonu ve Santrifüjü

Karaciğerin uç kısımlarından, böbrek dokusunun ise korteks ve medulla bölgesinden yaklaşık 0.4 g. ağırlığında alınan örnekler CAT ölçümü için sodyum-potasyum-fosfat tamponu ile homojenize edildi. Sodyum-potasyum-fosfat tamponu hazırlamak için;

1. KH_2PO_4 tan 9.08 g. alındı ve 1litre distile su içinde çözüldü (A),
2. Na_2HPO_4 tan 11.88 g. alındı ve 1 litre distile su içinde çözüldü (B),
3. Daha sonra 3.3 ml A çözeltisinden alınarak B çözeltisi ile 100' e tamamlandı ve pH 8 olacak şekilde pHmetrede ayarlandı.

MDA ölçümü için ise yine 0.4 g ağırlığındaki karaciğer ve böbrek dokusu örnekleri %1 KCl çözeltisi kullanılarak homojenize edildi.

Homojenizasyon Ultra-Turrax T25 homojenizatörde 8000 devirde, 10 vuru da gerçekleştirildi. Daha sonra Hermle ZK 510 soğutmalı santrifüj de 4000 rpm’de 15 dakika santrifüj edildi.

3.2.4. Katalaz Aktivitesi Ölçümü

Katalaz aktivitesi, amonyum molibdatla stabil bir kompleks oluşturan hidrojen peroksitin spektrofotometrik olarak değerlendirilmesi temeline dayanan L. Goth’un yöntemine göre belirlendi (19). Buna göre;

1. Substrat hazırlandı. Bunun için; % 30 H₂O₂ den 8.11 ml alınıp, fosfat tamponu ile 1000 ml ye tamamlandı (pH 7.4).
2. 32.4 mmol/l amonyum molibdat [(NH₄)₆ Mo₇ O₂₄.4H₂O] çözeltilisi hazırlandı. Bunun için, 8 g amonyum molibdat 200 ml distile suda çözü lerek her zaman taze hazırlandı ve kısa süreli bekle melerde çökelti oluşmuşsa vorteksten geçirildi.
3. Tampon çözeltili hazırlandı:
 - A) 4.08 g. KH₂PO₄ alınarak 500 ml distile suda çözüldü.
 - B) 8.04 g Na₂HPO₄ alınıp, 500 ml distile suda çözüldü.Daha sonra (A) çözeltilisinden 3.3 ml alınarak (B) çözeltilisi ile 100 ml ye tamamlandı ve pH’ sı pHmetrede 7.4 olarak ayarlandı.
4. Her bir örnek tüpü için bir kör tüpü (blank 1) hazırlandı ve tüpler numaralandırıldı.

5. Kör (B₁) tüplerine; 37 °C lik sıcak su banyosu içinde 1 ml substrat ve 0.2 ml örnek ilave edildikten sonra 1 ml amonyum molibdat çözeltisi ilavesiyle reaksiyon hemen durduruldu. Örnek tüplerinde ise; 1 ml substrat ve 0.2 ml örnek, 37 °C de 60 saniye inkübe edildikten sonra, 1 ml amonyum molibdat çözeltisi ilave edilerek durduruldu. (Bu koşullar altında bir ünite katalaz 1 µmol hidrojen peroksiti dekompoze etmektedir)
6. Örnek tüplerinin inkübasyonu için 60 saniyelik bekleme süresi içinde blank 2 (B₂) ve blank 3 (B₃) tüpleri hazırlandı.
- Blank 2 tüpüne; 1 ml substrat, 1 ml molibdat ve 0.2 ml tampon,
 - Blank 3 tüpüne; 1 ml tampon, 1 ml molibdat ve 0.2 ml tampon, ilave edildi.
7. Molibdat ile hidrojen peroksitin sarı kompleksi, spektrofotometrede 405 nm de B₂ ve B₃ ölçüldükten hemen sonra, önce kör (B₁) tüpü ve arkasından köre ait örnek tüpü okunarak, blank 3' e karşı değerlendirildi.
8. Spektrofotometrede okunan değerler, aşağıdaki formüle uygulandı ve sonuçlar; karaciğer ve böbrek dokularında total protein miktarları da ölçülerek KU/g protein (20), serumda ise U/l cinsinden verildi.

$$\text{Katalaz aktivitesi} = \frac{\text{örnek} - \text{blank 1}}{\text{blank 2} - \text{blank 3}} \times 271$$

3.2.5. Total Protein Ölçümü

Dokuların protein miktarı Biüret yöntemine (28) göre hazırlanmış total protein kiti (bio-clinica) ile ölçüldü. Biüret reaksiyonu peptid, polipeptid ve proteinler için spesifiktir. İki değerlikli bakır iyonu, alkali ortamda peptid bağlarıyla mor renkli bir kompleks oluşturur. Total protein kiti reaktifi 18 mmol/l bakır sülfat, 30 mmol/l potasyum iyodür, 32 mmol/l potasyum-sodyum tartarat, 200 mmol/l sodyum hidroksit içeriyordu. Örnekler spektrofotometrede reaktif körüne karşı okundu. Çalışma için;

1. Bir kör tüpü, bir standart tüpü ve örnek sayısı kadar da test tüpü hazırlandı ve numaralandırıldı.
2. Kör tüpüne; 1000µl reaktif. Standart tüpüne; 20µl standart ve 1000µl reaktif. Test tüpüne, 20µl örnek ve 1000µl reaktif ilave edildi.
3. Tüpler karıştırıldı ve 20 - 25 °C de 5 dakika beklendi.
4. 546 nm de absorbanslar okundu.
5. Örneklerin, total protein konsantrasyonu aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$C \text{ örnek} = \frac{A \text{ örnek}}{A \text{ standart}} \times C \text{ standart (g/dl)}$$

C = Konsantrasyon

Total protein ölçümü dışındaki bütün sonuçlar; istatistiksel olarak t testi ve korelasyon analizi ile değerlendirildi (49). Total protein değerleri CAT aktivitesinin

hesaplanmasında kullanıldığı için istatistiksel değerlendirilmesi yapılmadı ve ölçülen değerler Ek-1 de çizelge olarak verildi.

3.2.6. Malondialdehit Düzeyi Ölçümü

Uchiama ve Mihara'nın yöntemi kullanılarak ölçüldü (67).

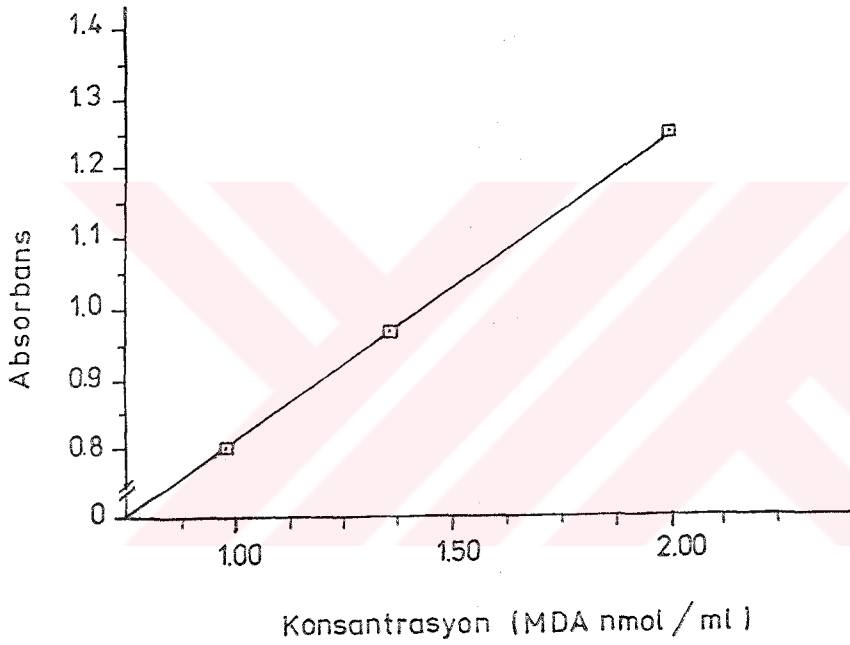
Yöntem, lipit peroksidasyonu son ürünlerinden bir tanesi olan MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile verdiği renk reaksiyonuna dayanmaktadır. Ölçüm için:

1. %1 fosforik asit ve %0.6 TBA hazırlandı. TBA çözeltisi beklediğinde eğer içinde kristaller oluşmuşsa vorteksten geçirilerek çözdürüldü.
2. Her ölçümde bir kör ve örnek tüpleri hazırlandı.
3. Kör tüpüne; 0.5 ml distile su, 3 ml fosforik asit, 1 ml TBA, örnek tüpüne; 0.5 ml serum, 3 ml fosforik asit, 1 ml TBA ilave edildi.
4. Kör ve örnek tüpleri bir beherde su içinde 45 dakika kaynatıldı.
5. Tüpler soğuduktan sonra içlerine 4 ml butanol ilave edildi.
6. 532 nm'de kör ve örnek tüplerinin absorbansları okundu.
7. Konsantrasyonların belirlenebilmesi için; lipit peroksit standartı, 1.1.3.3. tetraetoksipropan, kullanılarak standart eğrisi çizildi (Şekil 3.1.).
8. Standart eğrisinin hazırlanması:

-Kör tüpüne; 0.5 ml distile su, 3 ml fosforik asit, 1 ml TBA,

-Standart tüplerine; 0.5 ml farklı konsantrasyonlarda standart, 3 ml fosforik asit, 1 ml TBA ilave edildi ve 532 nm'de absorbansları okundu. Okunan absorbanslarla, konsantrasyon değerleri milimetrik kağıt üzerinde karşılaştırılarak standart eğrisi çizildi.

MDA sonuçları, serumda nmol/ml, dokuda ise nmol/g yaş doku olarak verildi.



Şekil 3.1. MDA Standart Eğrisi

3.2.7. Karaciğer ve Böbrek Dokularından Histolojik Preparatların Hazırlanışı

Histolojik çalışma için ;

A. Takip metodu (51):

1. Karaciğer ve böbrek dokuları %10 nötral formalinde 24 saat tespit edildi.

2. Dokular 3 saat çeşme suyunda yıkandı.

3. Daha sonra dokular sırasıyla, derecesi artan alkol serisinden geçirildi.

70° - 1 saat,

80° -1 saat,

90° (I) - 1 saat,

90° (II) - 1 saat,

96° (I) - 1 saat,

96° (II) - 1 saat,

100° - 1 saat.

4. Ksilol (I) - 1 saat,

Ksilol (II) -1 saat bekletildi.

5. Parafin (I) - 3 saat,

Parafin (II) - 3 saat,

Parafin (III) - 3 saat gömüldü.

6. Dokulardan, 5 µ kesitler alınarak 65 °C'deki etüvde 30 dk, oda ısısında 2 dk bekletildikten sonra, dokuların deparafinize olması için ksilolde 45 dk beklendi ve hematoksilen-eosin ile boyamaya geçildi.

B. Boyama metodu (51):

1. Dokular 45 dk ksilolde bekletildi.

2. Daha sonra azalan dereceli alkol serisinden geçirilerek rehidre edildi.

100° - 5 dk,

96°(I) - 3 dk,

96°(II) - 3 dk,

90° - 3 dk,

80° - 3 dk,

70° - 3 dk,

Distile su (I-II) - 5 dk.

3. Hematoksilende -3 dk,

Akan çeşme suyunda - 1 dk,

Eozinde - 5 dk,

Akan çeşme suyunda - 1 dk yıkandı.

4. Artan dereceli alkol serisinde dehidre edildi. Sırasıyla 70°-80°-90°-96°(I)-96°(II) alkollerden hızla çalkalanıp geçirilerek, 100°alkolde 2 dk bekletildi.

5. Ksilol (I) ve (II) de toplam 45 dk bekletildikten sonra hazırlanan preparatlar entellan ile kapatıldı.

6. Kesitlerin tümü ışık mikroskopunda incelenerek, Olympus PM10-ADS fotomikroskopla görüntülendi.

4. BULGULAR

4.1. KARACİĞER DOKUSUNA AİT BULGULAR VE İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Katalaz aktivitesi bakımından; gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, II. deney grubunda (3.5 mg/kg/gün DF) kontrole göre istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmadı ($p>0.05$). Ancak III. (7 mg/kg/gün DF) ve IV. (14 mg/kg/gün DF) deney gruplarında kontrole göre önemli derecede bir azalma gözlemlendi ($p<0.05$) (Çizelge 4.1., Şekil 4.1.)

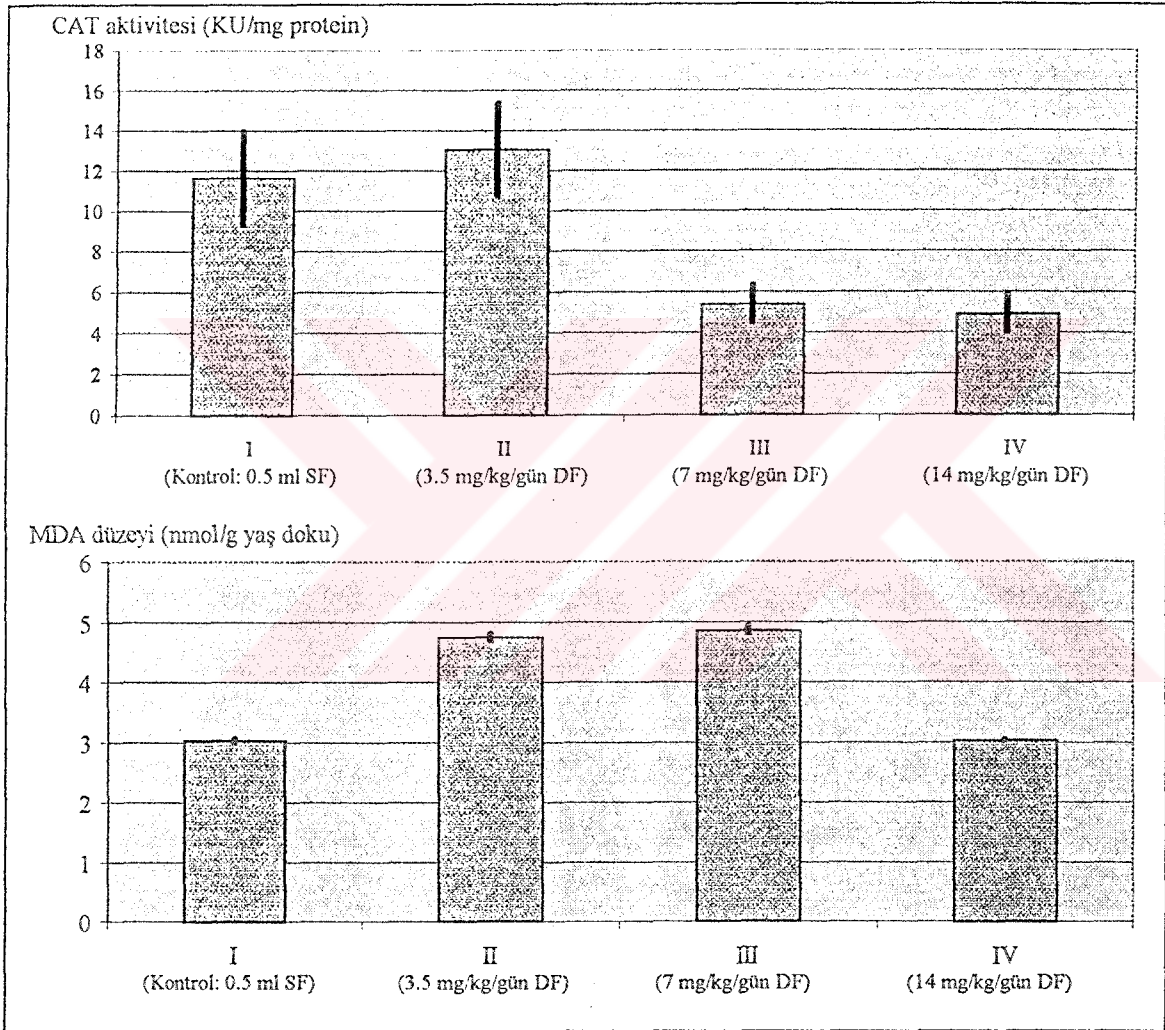
Çizelge 4.1. Karaciğer dokusunda ölçülen CAT aktivitesi ve MDA düzeylerinin ortalama değerleri ve istatistiksel anlamı

Grup	n	CAT aktivitesi (KU/mg protein)	MDA düzeyi (nmol/g yaş doku)
I (Kontrol: 0.5 ml SF)	10	11.62±2.33	3.03±0.02
II (3.5 mg/kg/gün DF)	10	13.04±2.31	4.75±0.05
III (7 mg/kg/gün DF)	10	5.39±0.91	4.86±0.06
IV (14 mg/kg/gün DF)	10	4.91±0.90	3.03±0.01

I. - II.	n.s.	***
I. - III.	*	***
I. - IV.	*	n.s.
II. - III.	**	n.s.
II. - IV.	***	**
III. - IV.	n.s.	**

n.s. $p>0.05$ * $p<0.05$ ** $p<0.01$ *** $p<0.001$

Katalaz (CAT) aktivitesi bakımından deney grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise, II. gruba göre, III. ve IV. deney gruplarında katalaz değerlerinde önemli bir azalma saptandı (sırasıyla $p<0.01$, $p<0.001$). Ancak III. ve IV. gruplar arasında önemli bir fark bulunmadı ($p>0.05$).



Şekil 4.1. Karaciğerde ölçülen CAT aktivitesi ve MDA düzeylerinin grafiği

MDA değerleri bakımından; gruplar kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, II. ve III. deney gruplarında, önemli bir artış gözlemlendi ($p<0.001$). IV. deney grubunda ise önemli bir fark bulunmadı ($p>0.05$) (Çizelge 4.1., Şekil 4.1.)

MDA değerleri bakımından deney grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise, II. grup ve III. grup arasında önemli bir artış saptanmazken, bunlara göre IV. grupta önemli bir azalma bulundu ($p<0.001$).

4.2. BÖBREK DOKUSUNA AİT BULGULAR VE İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

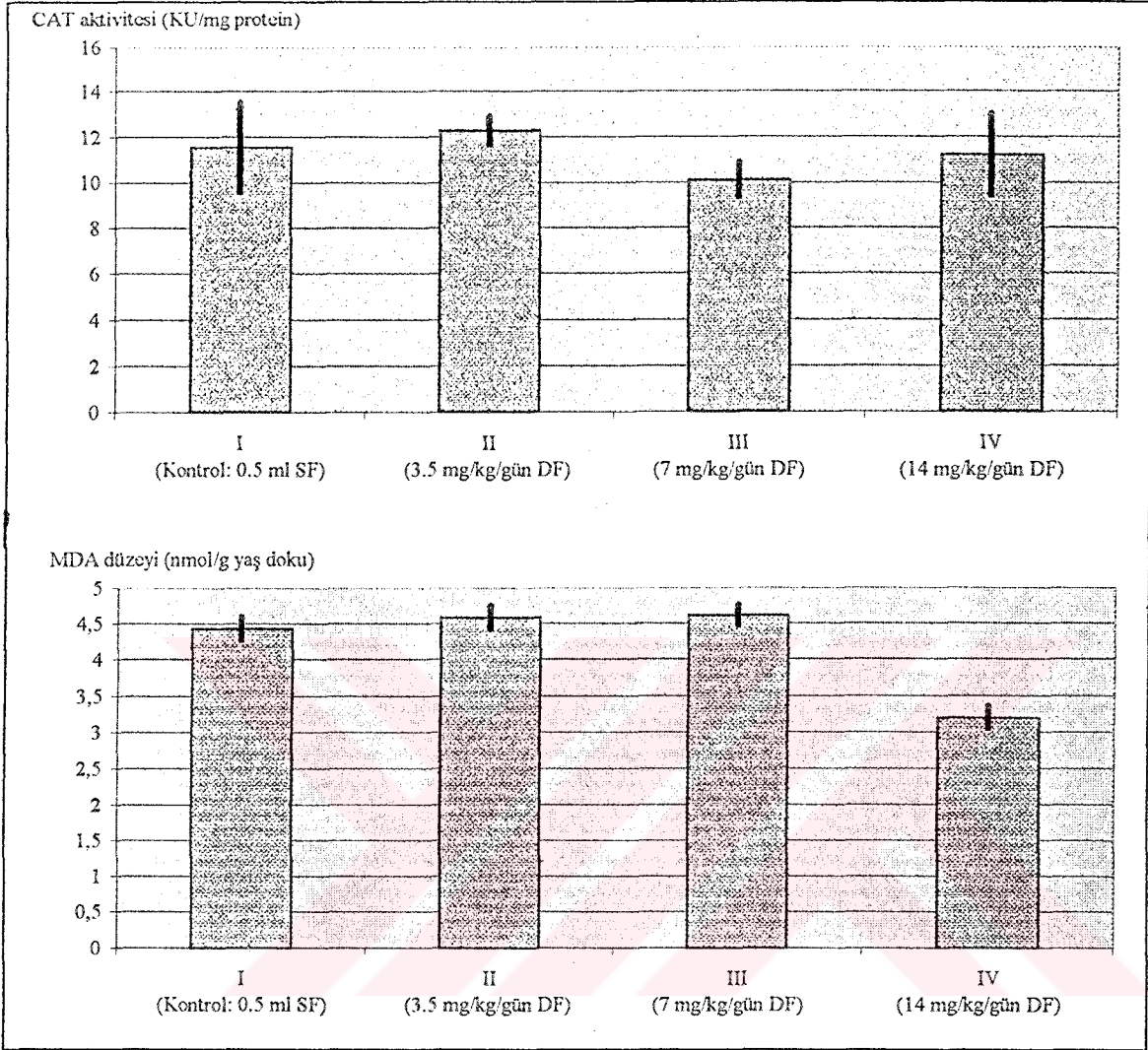
Katalaz aktivitesinde, kontrole göre, II., III. ve IV. deney gruplarında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmadı ($p>0.05$) (Çizelge 4.2., Şekil 4.2.).

Çizelge 4.2. Böbrek dokusunda ölçülen CAT aktivitesi ve MDA düzeylerinin ortalama değerleri ve istatistiksel anlamı

Grup	n	CAT aktivitesi (KU/mg protein)	MDA düzeyi (nmol/g yaş doku)
I (Kontrol: 0.5 ml SF)	10	11.53±1.96	4.43±0.16
II (3.5 mg/kg/gün DF)	10	12.27±0.60	4.58±0.16
III (7 mg/kg/gün DF)	10	10.08±0.75	4.61±0.14
IV (14 mg/kg/gün DF)	10	11.20±1.78	3.20±0.16

I. - II.	n.s.	n.s.
I. - III.	n.s.	n.s.
I. - IV.	n.s.	***
II. - III.	*	n.s.
II. - IV.	n.s.	***
III. - IV.	n.s.	***

n.s. $p>0.05$ * $p<0.05$ ** $p<0.01$ *** $p<0.001$



Şekil 4.2 Böbrek dokusunda ölçülen CAT aktivitesi ve MDA düzeylerinin grafiği

Katalaz aktivitesi bakımından, deney grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise, III. grupta II. gruba göre istatistiksel olarak önemli bir azalma görüldü ($p < 0.05$), IV. grup değerleri II. grup değerlerine göre önemsiz bulundu ($p > 0.05$).

MDA değerlerinde, kontrol grubuna göre, sadece IV. deney grubunda önemli bir azalma saptandı ($p < 0.01$) (Çizelge 4.2., Şekil 4.2.)

MDA değerleri bakımından deney grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise, sadece IV. grupta II. ve III. gruba göre önemli bir azalma görüldü ($p < 0.001$).

4.3. SERUMA AİT BULGULAR VE İSTATİSTİKSEL DEğERLENDİRME

CAT aktivitesi kontrole göre diğer gruplarla karşılaştırıldığında, II. ve IV. gruplarla kontrol arasında önemli bir fark saptanmadı ($p > 0.05$). Ancak III. deney grubunda önemli bir artış bulundu ($p < 0.01$) (Çizelge 4.3., Şekil 4.3.).

Çizelge 4.3. Serumda ölçülen CAT aktivitesi ve MDA düzeylerinin ortalama değerleri ve istatistiksel anlamı

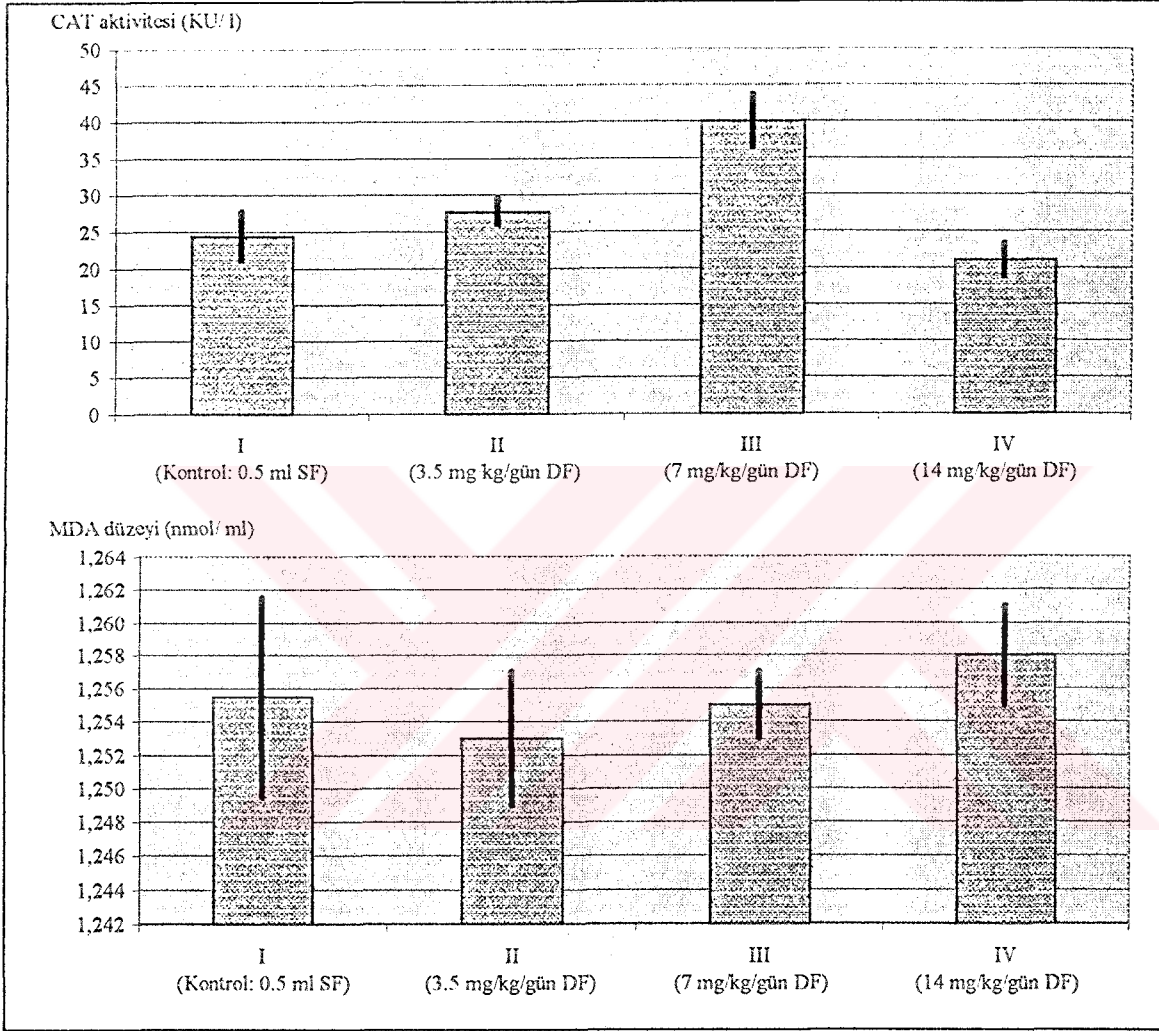
Grup	n	CAT aktivitesi (KU/l)	MDA düzeyi (nmol/ml)
I (Kontrol: 0.5 ml SF)	10	24.4±3.34	1.2555±0.006
II (3.5 mg/kg/gün DF)	10	27.7±1.72	1.2530±0.004
III (7 mg/kg/gün DF)	10	39.99±3.56	1.2550±0.002
IV (14 mg/kg/gün DF)	10	21.02±2.32	1.2580±0.003

I. - II.	n.s.	n.s.
I. - III.	**	n.s.
I. - IV.	n.s.	n.s.
II. - III.	**	n.s.
II. - IV.	n.s.	n.s.
III. - IV.	***	n.s.

n.s. $p > 0.05$ * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

Katalaz aktivitesi bakımından, deney grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise, III. grupta II. ve IV. gruba göre önemli bir artış ($p < 0.01$), görülürken, II. ve IV. grup değerleri arasında bir fark bulunmadı ($p > 0.05$).

MDA değerlerinde, hiçbir deney grubunda kontrole göre önemli bir fark saptanmadı ($p>0.05$) (Çizelge 4.3., Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. Serumda ölçülen CAT aktivitesi ve MDA düzeylerinin grafiği

4.4. HİSTOLOJİK BULGULAR

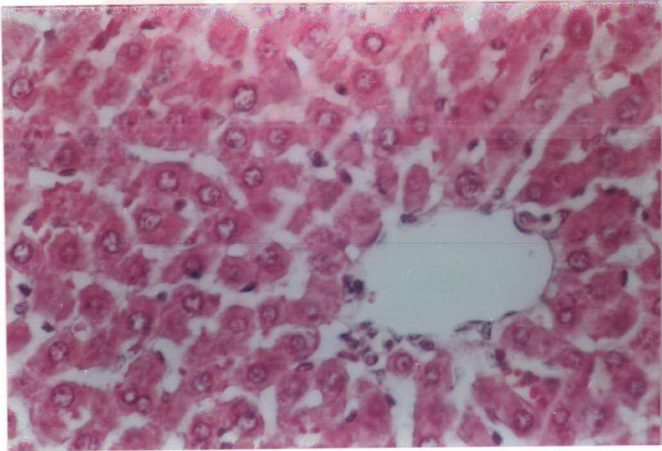
4.4.1. Karaciğer Dokusuna Ait Işık Mikroskopisi Bulguları

Kontrol grubuna (0.5 ml SF) ait 10 hayvanın karaciğer doku kesitlerinde portal alan ve lobül yapısı gözlemlendi (Şekil 4.4)

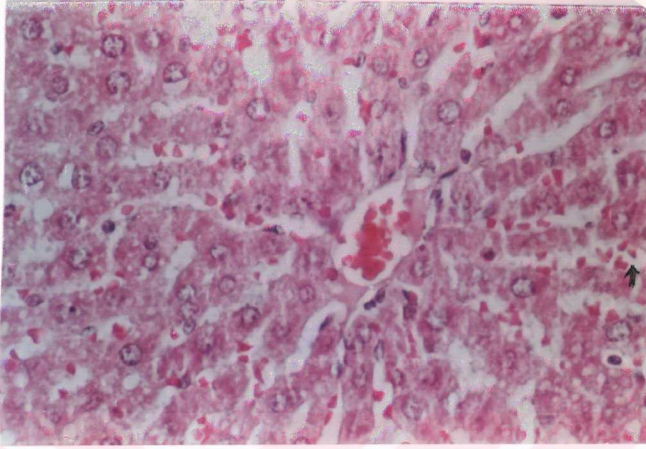
3.5 mg/kg/gün diflunisal verilen II. gruba ait karaciğer dokusu örneklerinde; hücre infiltrasyonu, hiperemi ve hepatosit sitoplazmalarında hafif düzeyde hidropik dejenerasyon ve minimal derecede de sinüzoidal konjesyon gözlemlendi (Şekil 4.5.).

7 mg/kg/gün diflunisal verilen III. gruba ait karaciğer dokusu örneklerinin histolojik incelemesinde , fokal odaklar şeklinde mononükleer ve polimorfonükleer hücre infiltrasyonu ile birlikte bir önceki gruba göre artan hiperemi, hepatositlerde yaygın hidropik dejenerasyon ve diğer gruplara göre daha fazla karaciğer dokusu hasarı gözlemlendi (Şekil 4.6. ve 4.7.).

14 mg/kg/gün diflunisal verilen IV. gruba ait karaciğer doku örneklerinde hücre infiltrasyonu , sinüzoidal konjesyon ve hidropik dejenerasyon minimal derecede gözlemlendi (Şekil 4.8.).

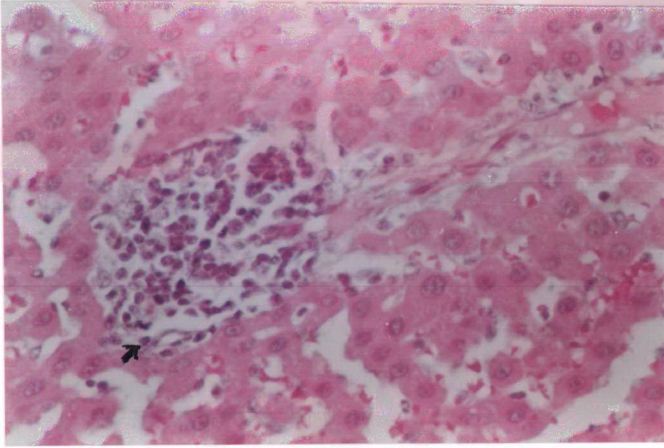


Şekil 4.4. Kontrol grubuna ait karaciğer doku kesiti. Orijinal büyütme H.E. x 132.



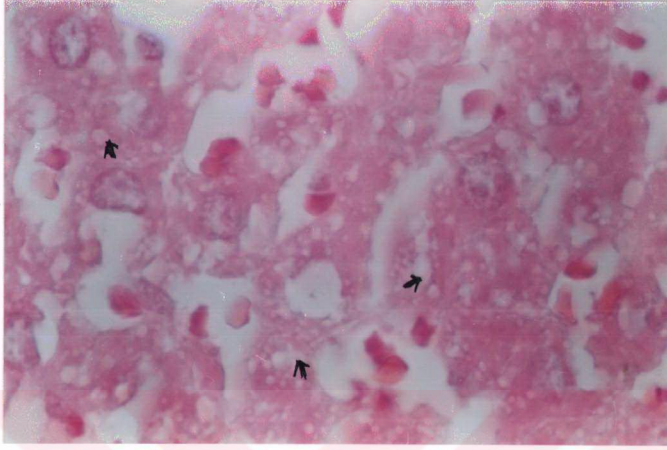
Şekil 4.5. II. gruba ait karaciğer doku kesitinde, minimal sinüzoidal konjesyon.

Orijinal büyütme H.E. x 132.



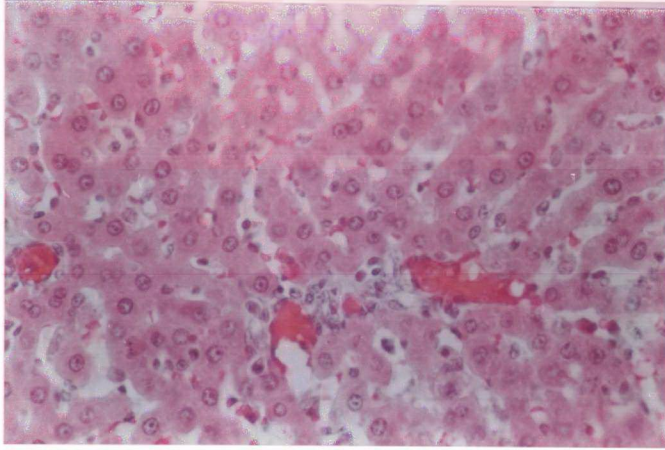
Şekil 4.6. III. gruba ait karaciğer doku kesitinde, fokal infiltrasyon odakları.

Orijinal büyütme H.E. x 132.



ekil 4.7. III. gruba ait karaciğer doku kesitinde, yaygın hidropik dejenerasyon.

Orijinal büyütme H.E. x 330.



ekil 4.8. IV. gruba ait karaciğer doku kesitinde, minimal hücre infiltrasyonu.

Orijinal büyütme H.E.x 132.

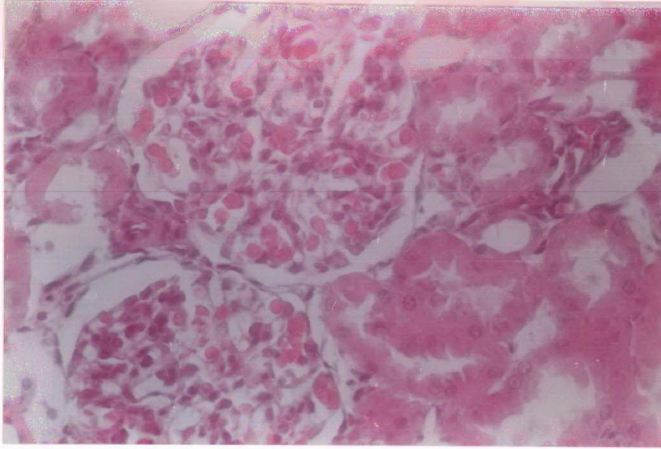
4.4.2. Böbrek Dokusuna Ait Işık Mikroskopisi Bulguları

Kontrol grubu böbrek dokularına ait kesitlerde normal böbrek dokusu yapısı gözlemlendi (Şekil 4.9.).

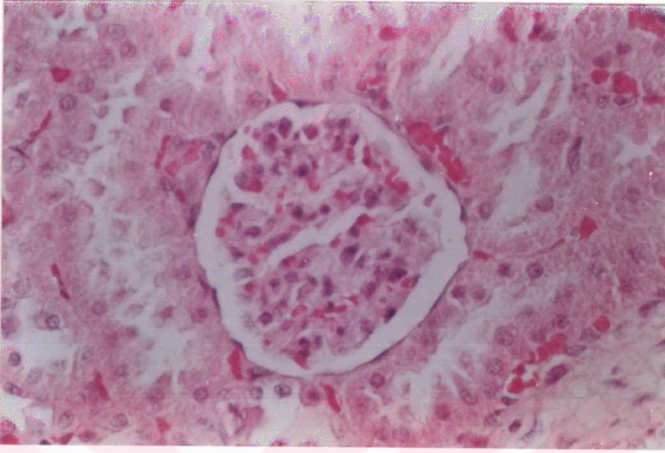
II. gruba ait böbrek dokusu örneklerinde, kontrol grubuna oranla, medulla ve glomerül çevresinde hafif hiperemi gözlemlendi (Şekil 4.10.).

III. gruba ait böbrek doku örneklerinde, intertübüler alanlarda hiperemi, tübüler dilatasyon ve bazı tübül hücrelerinde hidropik dejenerasyona rastlandı (Şekil 4.11. ve 4.12.).

Yüksek doz diflunisal kullanılan IV. grubun böbrek dokusuna ait kesitlerde tübül hücrelerinde hafif hidropik dejenerasyon, glomerül ve çevresinde hiperemi olmakla birlikte III. grup doku örneklerine göre böbrek dokusu hasarının daha hafif düzeyde ve hatta kontrol grubuna yakın denebilecek kadar az olduğu gözlemlendi. (Şekil 4.13.).

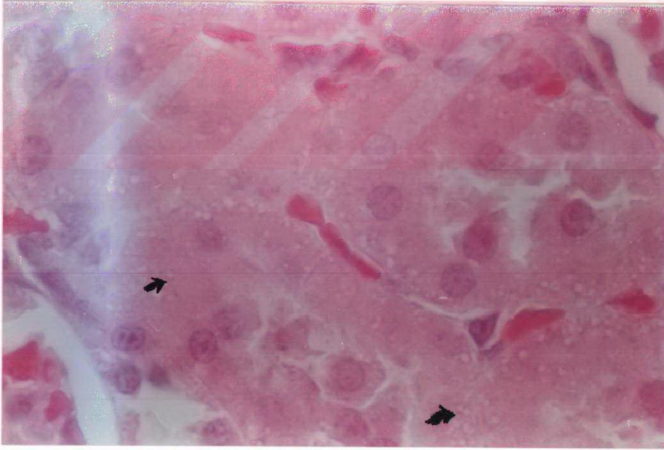


Şekil 4.9. Kontrol grubuna ait böbrek doku kesiti. Orijinal büyütme H.E. x 132.



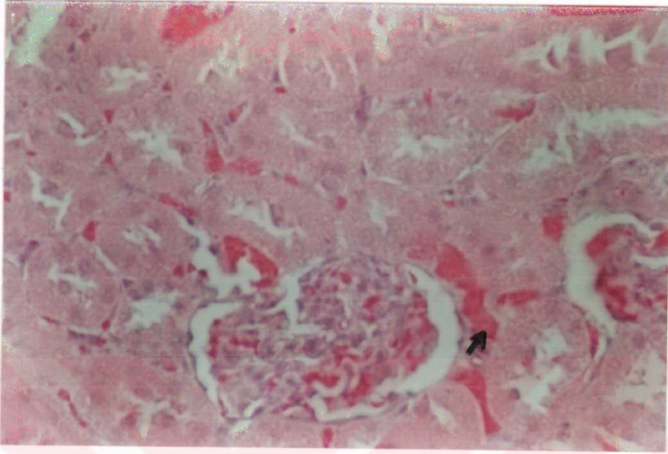
Şekil 4.10. II. gruba ait böbrek doku kesitinde, intertübüler alanlarda hiperemi.

Orijinal büyütme H.E. x 132.

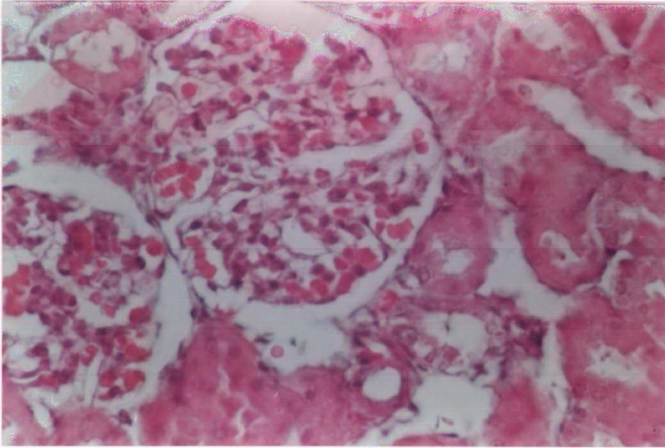


Şekil 4.11. III. gruba ait böbrek doku kesitinde, proksimal tübüls hücrelerinde hidropik

dejenerasyon. Orijinal büyütme H.E. x 330.



Şekil 4.12. III. gruba ait böbrek doku kesitinde, korteks bölgesinde intertübüler alanlarda yaygın hiperemi. Orijinal büyütme H.E. x 132.



Şekil 4.13. IV. gruba ait böbrek doku kesitinde, korteks bölgesinde normale yakın görünümde tübülsler, glomerül ve çevresi. Orijinal büyütme H.E. x 132.

5. TARTIŞMA

Sodyum salisilat, indometasin, fenilbutazon, sulindak, diklofenak, meklofenamat, azapropazon gibi bazı ilaçlar antiinflamatuvar etkilerini, kısmen de olsa, aktif oksijen radikallerini inhibe ederek ya da oluşan radikalleri bağlayıp inaktive ederek göstermektedir (10,27,33,41,46).

Diflunisalin de antiinflamatuvar etki mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber, siklooksijenaz enzimini inhibe etmesine yanısıra aktif oksijen radikallerini de inaktive ettiği bildirilmektedir (58).

Bu çalışmada, diflunisalin serbest radikallerle olan ilişkisini ve lipid peroksidasyonu üzerine bir etkisi olup olmadığını incelemek amacıyla, sıçan; karaciğer, böbrek ve serumunda CAT aktivitesiyle MDA düzeyleri değerlendirildi. Ayrıca karaciğer ve böbrek dokularının histolojisi de incelendi.

Karaciğerde; CAT aktivitesi bakımından kontrol grubu, diğer gruplar ile karşılaştırıldığında, II. deney grubunda (3.5 mg/kg/gün DF) istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmadı ($p>0.05$). Ancak III. (7 mg/kg/gün DF) ve IV. (14 mg/kg/gün DF) deney gruplarında kontrole göre önemli derecede bir azalma gözlemlendi ($p<0.05$). Ayrıca deney grupları CAT aktivitesi bakımından kendi aralarında karşılaştırıldığında, II. gruba göre, III. ve IV. deney gruplarında CAT değerlerinde önemli bir azalma saptandı (sırasıyla $p<0.01$, $p<0.001$). Ancak III. ve IV. gruplar arasında önemli bir fark bulunmadı

($p>0.05$). MDA değerleri, kontrole karşılaştırıldığında, II. ve III. deney grupları, kontrole göre önemli bir artış gösterdi. ($p<0.001$). IV. deney grubuyla kontrol grubu arasında ise önemli bir fark bulunmadı ($p>0.05$). Deney grupları MDA değerleri bakımından kendi aralarında karşılaştırıldığında ise, II. grup ve III. grup arasında önemli bir artış saptanmazken, bunlara göre IV. grupta önemli bir azalma bulundu ($p<0.001$).

Diflunisalin %90'ının karaciğerde metabolize olmasına (63) bağlı olarak, bulduğumuz CAT ve MDA değerleri ile histolojik değişiklikler diflunisalin en fazla karaciğeri etkilediğini doğrulamaktadır. Karaciğerde CAT aktivitesi 3.5 mg/kg/gün dozda değişmezken, 7 ve 14 mg/kg/gün dozlarda kontrole göre anlamlı düzeyde (sırasıyla $p<0.01$ ve $p<0.001$) azalmıştır. Karaciğer dokusundaki, MDA düzeyinin 7 mg/kg/gün doz grubunda kontrol grubuna göre önemli düzeyde artması ($p<0.001$) ve 14 mg/kg/gün diflunisal dozunda kontrol grubundan farksız bulunması ise ilacın 7 mg/kg/gün dozunun, serbest radikal hasarını engelleyemediği ve bunun lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA artışına yol açtığı, oysa 14 mg/kg/gün dozda serbest radikal hasarının engellendiği ve bu nedenle MDA düzeyinin artmadığını düşündürmektedir. Ayrıca histolojik incelemelerde de, 14 mg/kg/gün diflunisal verilen IV. grupta kontrole benzer bulunmuştur. Bu nedenle hem MDA düzeyleri ve hem de histolojik incelemeler diflunisalin 14 mg/kg/gün dozunun serbest radikalleri inaktive edici etkisi olduğunu düşündürmektedir. Bilindiği gibi analjezik ve antiinflamatuvar ilaçlar, antiinflamatuvar etkilerini, analjezik etkilerinden daha yüksek dozda gösterebilmektedirler (33). Diflunisalin de serbest radikal inaktive edici etkisi, 14 mg/kg/gün dozunda hem karaciğerde hem de böbrekte özellikle MDA düzeyinin azalmasıyla ortaya çıkmaktadır ve

histolojik incelemeler de bu sonucu destekler niteliktedir. Bu bulgular, benzer konuda yapılan bir çalışmaya rastlanamadığı için tartışılmadı.

Böbrekte; CAT aktivitesinde, kontrole göre II. III. ve IV. deney gruplarında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmadı ($p>0.05$). Ayrıca böbrek dokusuna ait katalaz aktivitesinde, deney grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, III. grupta II. gruba göre istatistiksel olarak önemli bir azalma görüldü ($p<0.05$), IV. grup değerleri II. grup değerlerine göre önemsiz bulundu ($p>0.05$). Böbrekteki MDA değerlerinde; kontrole göre sadece IV. deney grubunda önemli bir azalma saptandı ($p<0.01$). Ayrıca MDA değerleri bakımından deney grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında; sadece IV. grupta II. ve III. gruba göre önemli bir azalma görüldü ($p<0.001$).

Böbrek dokusunda göze çarpan en önemli bulgu, 14 mg/kg/gün DF verilen IV. deney grubunda MDA değerinin kontrole göre önemli derecede azalması ($p<0.01$) ve histolojik incelemelerde de IV. grup böbrek dokusu örneklerinin kontrol grubuna benzer bulunmasıdır.

Serumdaki; CAT aktivitesi kontrole göre diğer gruplarla karşılaştırıldığında, II. ve IV. gruplarla kontrol arasında önemli bir fark saptanmadı ($p>0.05$). Ancak III. deney grubunda önemli bir artış bulundu ($p<0.01$). Deney grupları serumdaki CAT aktivitesi bakımından kendi aralarında karşılaştırıldığında, III. grupta II. ve IV. gruba göre önemli bir artış ($p<0.01$).görüldürken, II. ve IV. grup değerleri arasında bir fark bulunmadı ($p>0.05$). MDA değerlerinde, hiçbir deney grubunda kontrole göre önemli bir fark saptanmadı ($p>0.05$).

Serum örneklerinde, sadece 7 mg/kg/gün DF verilen grupta CAT aktivitesinde kontrole göre önemli bir artış ($p<0.01$) gözlenmesi dikkat çekici olarak değerlendirildi.

Histolojik olarak karaciğerde; kontrol grubu (0.5 ml SF) doku örneklerinde normal portal alan ve lobül yapısına ait bulgular gözlemlendi. 3.5 mg/kg/gün diflunisal verilen II. gruba ait doku örneklerinde; hafif düzeyde hücre infiltrasyonu yer yer hiperemi ve hidropik dejenerasyon, 7 mg/kg/gün diflunisal verilen III. gruba ait doku örneklerinde mononükleer ve polimorfonükleer hücre infiltrasyonu ve belirgin hiperemi, 14 mg/kg/gün diflunisal verilen IV. gruba ait doku örneklerinde fokal odaklar şeklinde hücre infiltrasyonu ve hafif sinüzoidal konjesyon gözlemlendi. Bütün bunlardan sonra III. gruba ait bulgular diğer gruplara göre karaciğer doku hasarı açısından önemli kabul edildi.

Histolojik olarak kontrol grubu böbrek dokusunda normal böbrek korteksi ve medullası gözlemlendi. II. gruba ait böbrek dokusu örneklerinde, medulla ve glomerül çevresinde sadece hiperemi, III. gruba ait böbrek doku örneklerinde, yaygın hiperemi, tübüler dilatasyon, bazı tübül hücrelerinde vakuoler dejenerasyon gözlemlendi. Yüksek doz diflunisal kullanılan IV. grubun böbrek dokusunda hücrelerde hafif hidropik dejenerasyon, glomerül ve çevresinde hiperemi olmakla birlikte kontrol grubuna yakın görünümdeydi. Tübüler dejenerasyon bulgularına rastlanmadı.

Bütün bu bulgulara göre; diflunisalin serbest oksijen radikallerine bağlı olarak özellikle karaciğerde ve kısmen de böbrekte birtakım biyokimyasal ve histolojik değişikliklerle birlikte hasara neden olduğu, ancak bu değişikliklerin 14 mg/kg/gün diflunisal verilen dördüncü grupta azaldığı belirlendi. Diflunisalin karaciğerde gösterdiği

etkilerin böbrektekine göre çok daha fazla olması ise, ilacın primer olarak karaciğerde metabolize olmasına bağlandı.

Antienflamatuvar analjezik ilaçların etkisini tek bir mekanizmayla açıklamak mümkün değildir. Çünkü bu ilaçların, antienflamatuvar etkilerini gösterirken öncelikle siklooksijenaz inhibisyonuna neden olmalarının yanında, sekonder olarak, aktif oksijen radikallerini de inaktive ve/veya inhibe ettikleri ileri sürülmektedir (31,33,45). Bu literatür bilgileri ışığında, bizim çalışmamızda yer alan antienflamatuvar analjeziklerden diflunisalin de bir çelişkiymiş gibi görünen 7 mg/kg/gün düşük dozunun daha fazla hasar verirken, 14 mg/kg/gün yüksek dozunun daha olumlu etki göstermesinin nedeni; diflunisalin 7 mg/kg/gün dozunun siklooksijenaz enzimini yeterince inhibe edememesi, dolayısıyla serbest radikal oluşumunu ve daha önceki kademelerde oluşan radikallerin neden olduğu hasarı yeteri kadar önleyememesi, 14 mg/kg/gün dozunun ise enzim inhibisyonunu yeterince gerçekleştirmesi sebebiyle serbest radikallerin oluşumunu engellemesi ve radikal hasarının önüne geçmesi olabilir.

6. SONUÇ

Bu çalışmada; antiinflamatuvar analjeziklerden diflunisalin terapötik dozlarının, sıçan karaciğer, böbrek, serum CAT aktivitesine, MDA düzeylerine ve karaciğer - böbrek histolojisine etkileri değerlendirilerek şu sonuçlara varıldı:

1. CAT aktivitesi, karaciğer dokusunda 7 ve 14 mg/kg/gün diflunisal doz gruplarında önemli düzeyde azaldı. Bu sonuç, ilacın metabolize olduğu primer organın karaciğer olması nedeniyle, CAT enzimi inhibisyonuna, hidrojen peroksite ve dolayısıyla serbest oksijen radikallerinin dışında, oluşan metabolitlerin de katkısı olabileceği şeklinde yorumlandı.
2. MDA düzeylerinin karaciğer dokusunda 7 mg/kg/gün diflunisal ile artmasına karşın 14 mg/kg/gün diflunisal ile kontrole yakın bulunması; 7 mg/kg/gün diflunisal dozunda serbest radikal hasarının engellenemediğini, 14 mg/kg/gün diflunisal dozunda ise serbest radikal hasarının engellendiğini düşündürdü.
3. Böbrek dokusunda ve serumda CAT aktivitesi ve MDA düzeyinde gözlenen değişiklikler karaciğer dokusundakine oranla çok daha az olup, karaciğerdeki metabolik değişikliklerin bir yansıması olarak kabul edildi.
4. Histolojik incelemelerde 7 mg/kg/gün diflunisal dozunda karaciğer dokusunda belirgin, böbrek dokusunda hafif hasar görülmesi, 14 mg/kg/gün diflunisal dozunda

ise karaciğerde çok hafif böbrekte de önemli bir doku hasarına rastlanmaması, özellikle MDA düzeylerindeki değişikliklerle uyumlu bulundu.

Bu sonuçlara göre, diflunisalin, serbest oksijen radikallerini ancak yüksek terapötik dozda (14 mg/kg/gün) inaktive edebildiği kanısına varıldı.

KAYNAKLAR DİZİNİ

1. AKGÜR, M.F., KILINÇ, K., AKTUĞ, T., OLGUNER, M.: The effect of allopurinol pretreatment before detorting testicular torsion. *The Journal of Urology*, 151: 1-3, (1994)
2. ANDERSON, D.: Antioxidant defenses against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutat. Res.*, 350 (1): 103-8, (1996).
3. ARIAS, J., FERNANDEZ, R., M., MORAL, A., GARCIA, M., A., SENENT. C., J.: Selective adverse reactions of diflunisal. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 74 (2): 160-2, (1995).
4. BAST, A., HAENEN, G.R.M., DOELMAN, C.J.A.: Oxidants and antioxidants: state of the art. *The American Journal of Medicine*, 91 (3):, 1-13, (1991).
5. BAŞARAN, A.: *Tıbbi Biyoloji Ders Kitabı*. Üçüncü baskı, Bilim Teknik Yayınevi, İstanbul, s. 216, (1991).
6. BELL, D., JACKSON, M., NICOLL, J.J., MILLAR, A., DAWES, J., MUIR, A.L.: Inflammatory response, neutrophil activation, and free radical production after acute myocardial infarction: effect of thrombolytic treatment. *Br. Heart J.*, 63: 82-7, (1990).

7. BENZIE, I., F.: Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 47 (3): 233-61, (1996).
8. BULKLEY, G.B.: Free radical-mediated reperfusion injury: a selective review. *Br. J. Cancer*, 55 (8): 66-73, (1987).
9. BURING, J.E., HENNEKENS, C.H. : Antioxidant vitamins and cardiovascular disease. *Nutrition Reviews*, 55 (1): 53-60, (1997).
10. CERLETTI, C., LIVIO, M., GAETANO, G.D.: Non-steroidal anti-inflammatory drugs react with two sites on platelet cyclooxygenase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 714: 122-128, (1981).
11. COHEN, G., DEMBIEC, D., MARCUS, J.: Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Analytical Biochemistry*, 34: 30-38, (1970).
12. CONNER, E.M., GRISHAM, M.B.: Inflammation, free radicals and antioxidants. *Nutrition*, 12:274-277, (1996).
13. EVAN, C.R., HALLIWELL, B., LUNT, G.G.: Free radicals and oxidative stress: environment, drugs and food additives. *Portland Press, London*, pp 120-129, (1995).
14. FISHER, G.R., PATTERSON, L.H.: DNA strand breakage by peroxidase activated mitoxantrone. *J. Pharmacol.*, 43: 65-68, (1991).

15. FUJIE, K., ITO, Y., MAEDE, S.: Acute cytogenetic effect of benzene on rat bone marrow cells in vivo and the effect of inducers or inhibitors of drug-metabolizing enzymes. *Mutation Research*, 298: 81-90, (1992).
16. GILLIES, H.C., ROGERS, H. J., SPECTOR, R.,G., TROUNCE, J.R.: *A Textbook of Clinical Pharmacology*. Second Edition, Athenaum Press Ltd., London, p. 298, (1989).
17. GILMAN, A.G., RALL, T.W., NIES, A.S., TAYLOR, P.: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Eight ed., Pergamon Press, New York, pp. 336-7, 653-4, (1990).
18. GOIN, J., GIBSON, D.D., Mc COY, P.B., CODENAS, E.: Glutathionyl and hydroxyl radical formation coupled to the redox transitions of 1,4-naphthoquinone bioreductive alkylating agents during glutathione two-electron reductive addition. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 288: 386-96, (1991).
19. GOTH, L.: A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chemica Acta*, 196: 143-152, (1991).
20. GÜNER, G., İŞLEKEL, H., ÖXTEKİN, O., HAZAN, E., AÇIKEL, Ü.: Evaluation of some antioxidant enzymes in lung carcinoma tissue. *Cancer Letters*, 103: 233-239, (1996).
21. HALLIWELL, B.: Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *The American Journal of Medicine*, 91: 14-22, (1991).

22. HALLIWELL, B.: Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutrition Reviews*, 55 (1): 44-49, (1997).
23. HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J., M., C.: Free radicals in biology and medicine. Second Edition, Clarendon Press, Oxford, pp 196-200, (1995).
24. HALLIWELL, B., MURCIA, M.A., CHIRICO, S., ARUOMA, O.I.: Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 35(1-2): 7-20, (1995).
25. HALLIWELL, B., AESCHBACH, R., LOLIGER, J., ARUOMA, O.I.: The characterization of antioxidants. *Food Chem. Toxicol.*, 33(7): 601-17, (1995).
26. HARWEY, R.A., CHAMPE P.C.: *Pharmacology*, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, p 366, (1992).
27. HILLER, K.O., HADD, P.L., WILSON R.L.: Antiinflammatory drugs: protection of a bacterial virus as on in vitro biological measure of free radical activity. *Chem. Biol. Interactions*, 47: 293-305, (1983).
28. İMREN, A.H., TURAN, O.: *Klinik Tanıda Laboratuvar. Üçüncü Baskı, Sermet Matbaası, İstanbul*, s. 708-709, (1988).
29. JACOB, R., A., BURRI, B. J.: Oxidative damage and defense. *Am. J. Clin. Nutr.*, 63(6): 985-990, (1996).

30. JOHANSSON, L.H., BORG, L.A.H.: A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Analytical Biochemistry*. 174: 331-336, (1983).
31. KATZUNG, B.G.: *Basic and Clinical Pharmacology*. Fourth ed., Appleton and Lange, New Jersey, p. 438, (1989).
32. KAVAS, G.Ö.: Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri. *Türkiye Klinikleri*, 9 (1): 1-6, (1989).
33. KAYAALP, O.: *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. Altıncı baskı, Feryal Matbaacılık, Ankara, Cilt. 1, s. 91-126, 1965-2023, (1991).
34. KILINÇ, K.: Kanserde oksijen radikalleri ve superoksit dismutaz. *Biokimya Dergisi*, 11: 3, 59-76, (1986).
35. KILGORE, K.S., LUCCHESI, B.R.: Reperfusion injury after myocardial infarction: the role of free radicals and the inflammatory response. *Clin. Biochem.*, 26: 359-370, (1993).
36. LAURENCE, D., R., BENNETT, P., N.: *Clinical Pharmacology*. Sixth Edition, Longman Singapore Publishers (Pte) Ltd., Singapore, p. 286, (1990).
37. LEE, M.H., PARK, J.W.: Lipid peroxidation products mediate damage of superoxide Dismutase. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 35 (5): 1093-102, (1995).

38. LEE, S.M., CLEMENS, M.G.: Effect of α -tocopherol on hepatic mixed function oxidases in hepatic ischemia reperfusion. *Hepatology*, 15 (2): 270-91, (1992).
39. LIN, J.H., HOOKE, F.K., YEH, K.C., DUGGON, D.E.: Dose-dependent pharmacokinetics of diflunisal in rats: dual effects of protein binding and metabolism. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 235: 2, 402-406, (1985).
40. MACDONALD, J. I., WALLECE, S., M., HERMAN, R., J., VERBEECK, R.,K.: Effect of probenecid on the formation and elimination kinetics of the sulphate and glucuronide conjugates of diflunisal. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 47 (6): 519-23, (1995).
41. MAFFEI FACINO, R.M., CARINI, M., SAIBENE, L.: Scavenging of free radicals by tenoxicam: a participating mechanism in the antirheumatic/antiinflammatory efficacy of the drug. *Arch. Pharm. Weinheim.*, 329 (10): 457-63, (1996).
42. MASCIIO, P.D., MURPHY, M.E., SIES, H.: Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am. J. Clin. Nutr.*, 53: 1945-2005, (1991).
43. Mc CORD, J.M.: Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clin. Biochem*, 26: 351-357, (1993).
44. MURRAY, R.K., MAYES, P.A., GRANNER, D.K., RODWELL, V.W.: Harper'in Biyokimyası.(Çev. G. Mentеш ve B. Ersöz), Barış Kitabevi, İstanbul, s. 136-44, (1993).

45. MYCEK, M.J., HARVEY, R.A., CHAMPE, P.C., FISHER B.D., COOPER, M.: Lippincot's Illustrated Reviews: Pharmacology, Lippincot - Raven Publishers, Philadelphia, p 403, (1997).
46. NAITO, Y., YOHKAWA, T., MATSUYAMA, K., NIHIMURA, S., YAGI, N., KONDO, M.: Effects of free radical scavengers on indomethacin- induced aggravation of gastric ulcer in rats. *Dig. Dis. Sci.*, 40(9): 2019-21, (1995).
47. OHKAWA, H., OHISHI, N., YAGI, K.: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95: 351-358, (1979).
48. OKEY, A.B., ROBERTS, E.A., HARPER, P.A., DENISAN, M.S.: Induction of drug-metabolizing enzymes: mechanisms and consequences. *Clinical Biochemistry*, 19: 132-41, (1986).
49. ÖZDAMAR, K.: Biyoistatistik. İkinci Baskı, Bilim ve Teknik Yayınevi, Eskişehir, s. 263, 405, (1986).
50. ÖZDEMİR G.: Reaktif Oksijen Partikülleri (ROP); (Oksidan Moleküller, Serbest Radikaller). Roche Bilimsel Eserler Serisi, İstanbul, s. 20-26, (1993).
51. PROPHET, E.B., MILLS, B., ARRINGTON, J.B., SOBIN, L.H.: *Laboratory Methods in Histotechnology*. American Registry of Pathology, Washington, pp. 25-31, 53-57, (1992).

52. SUN, Y., PETERSON, T.E., Mc CORMICK, M.L., OBERLEY, L.W., OSBORNE, J.V.: Proved superoxide dismutase assay for clinical use. *Clinical Chemistry*, 35 (6): 1265-6, (1989).
53. PAGLIA, D.E., VALENTINE, W.N.: Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.*, 70 (1): 158-169, (1967)
54. PARDINI, R.S.: Toxicity of oxygen from naturally occurring redox- active pro-oxidants. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, 29 (2): 101-18, (1995).
55. PARKS, D.A., GRANGER, D.N.: Ischemia-reperfusion injury: a radical view. *hepatology*, 8 (3): 680-682, (1988).
56. PORTER, N.A., CALDWELL, S.E., MILLS, K.A.: Mechanism of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids* 30 (4): 277-90, (1995).
57. SAIJO, A., SCALESE, M., LANZA, M., MARZULLO, D., BONINA, F., CASTELLI, F.: Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Radic. Biol. Med.*, 19 (4): 481-6, (1995).
58. SHEN, T.Y.: Chemical and pharmacological properties of diflunisal. *Pharmacotherapy*, 3 : 3-8, (1983).
59. SIES, H.: Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine*, 51: 30-1, (1991).

60. SLATER, T.F.: Free radicals and tissue injury: fact and fiction. *Br. J. Cancer*, 55 (8): 5-10, (1987).
61. SPITZ, D.R., OBERLEY, L.W.: An assay for superoxide dismutase activity in mammalia tissue homogenates. *Analytical Biochemistry*, 179: 8-18, (1989).
62. SOUTHORN, P.A., POWIS, G.: Free radicals in medicine II. involvement in human disease. *Mayo Clin. Proc.*, 63: 390-408, (1988).
63. STEELMAN, S.L., CIRILLO, V.J., TEMPERO, K.F.: The chemistry, pharmacology and clinical pharmacology of diflunisal. *Curr. Med. Res. Opin.*, 5: 506, (1978).
64. SUN, Y., OBERLEY, L.W., LI, Y.: A Simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin. Chem.*, 34: 3, 497-500, (1988).
65. ŞAHİN, G.: Serbest radikaller ve önemi. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 11 (2): 57-69, (1991).
66. TSUCHIHASHI, H., KIGOSHI, M., IWATSUKI, M., NIKI, E.: Action of beta-carotene as an antioxidant against lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 323 (1): 137-47, (1995).
67. UCHIYAMA, M., MIHARA, M. : Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry*, 86: 279-286 (1978)

68. UEHLEKE, H.: Critical review of evaluation of toxicological data biochemical parameters. Proceeding of the International Colloguium, Luxembourg, Pergamon Press, New York, pp 125-49, (1976)
69. WILLIAMS, A., M., WORRAL, S., DE - JERSEY, J., DICKINSON, R., G.: Studies on the reactivity of acyl glucuronides VII. Generation of on antiserum for the detection of diflunisal - modified proteins in diflunisal - dosed rats. *Biochem. Pharmacol.*, 49 (2) : 209 -17, (1995).
70. YAVUZER, S.: Hiperoksi ve eritrosit superoksit dismutaz (SOD) aktivitesi. *Ankara Tıp Bülteni*, 5: 47-56, (1983).

EK 1 : Total protein değerleri

Grup	Örnek No	Karaciğer T. Pro. (g/l)	Böbrek T. Pro. (g/l)
I	1	7.21	9.6
	2	7.14	11.16
	3	8.63	12.20
	4	6.17	6.84
	5	6.25	5.35
	6	9.37	5.65
	7	8.93	5.43
	8	9.97	5.43
	9	6.25	4.39
	10	8.03	6.10
II	1	10.67	14.79
	2	14.66	3.18
	3	12.58	9.56
	4	9.08	8.92
	5	7.64	5.89
	6	10.83	7.17
	7	7.80	9.24
	8	8.76	8.76
	9	8.92	15.29
	10	11.79	10.19
III	1	23.87	8.44
	2	16.90	14.79
	3	19.62	13.13
	4	20.71	13.58
	5	22.94	14.79
	6	23.54	13.13
	7	18.11	13.88
	8	22.03	11.92
	9	24.75	16.00
	10	21.73	14.79
IV	1	14.62	5.20
	2	15.53	8.29
	3	13.72	8.17
	4	13.88	6.58
	5	15.24	5.60
	6	19.67	11.70
	7	16.82	9.75
	8	17.08	9.75
	9	18.12	7.92
	10	17.86	6.95

ÖZGEÇMİŞ

1964 yılında İzmir ili Bergama ilçesinde doğdu. İlköğrenimini 1975, ortaöğrenimini de 1981 yılında İzmir ili Dikili ilçesinde tamamladı. 1981 yılında girdiği Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 1985 yılında Biyolog ünvanıyla mezun oldu. 1986'da Diyarbakır ili Çermik ilçesinde lise biyoloji öğretmeni olarak göreve başladı. 1987'de Sakarya ili Akyazı ilçesi İmam Hatip Lisesi'ne, 1988'de ise Eskişehir Atatürk Lisesi'ne atandı. 1989 - 1991 yıllarında Anadolu Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimini tamamladıktan sonra Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na Araştırma Görevlisi olarak atandı ve Doktora eğitimine başladı. Eylül 1996'dan itibaren Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.