



**„DKARACIĞER KARSİNOMA HÜCRELERİNDE
OLUŞTURULAN PARASETAMOL TOKSİTESİ ÜZERİNE
RESVERATROL'ÜN İN VİTRO ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Alpgiray TURGUT

Veteriner Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Mesut Bünyami Halıcı

Yüksek Lisans Tezi-2016

**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KARACİĞER KARSİNOMA HÜCRELERİNDE
OLUŞTURULAN PARASETAMOL TOKSİSİTESİ
ÜZERİNE RESVERATROL'ÜN İN VİTRO ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Alpgiray TURGUT

**Veteriner Biyokimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Mesut Bünyami HALICI**

**ERZURUM
2016**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**KARACİĞER KARSİNOMA HÜCRELERİNDE OLUŞTURULAN
PARASETAMOL TOKSİSİTESİ ÜZERİNE RESVERATROL'ÜN İN
VİTRO ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Alpgiray TURGUT

Tez Savunma Tarihi :22/07/2016

Tez Danışmanı : Doç.Dr. Mesut Bünyami HALICI (Atatürk Üniversitesi)



Jüri Üyesi : Doç.Dr. Özgür KAYNAR (Atatürk Üniversitesi)



Jüri Üyesi : Yrd.Doç. Dr. Murat KARAMEŞE (Kafkas Üniversitesi)



Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.



Prof.Dr. Yavuz Selim Sağlam
Enstitü Müdürü

Yüksek Lisans Tezi
ERZURUM-2016

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Parasetamol.....	2
2.1.1. Parasetamol'ün Tarihçesi.....	2
2.1.2. Parasetamol'ün Yapısı ve Özellikleri	2
2.1.3. Parasetamol'ün Etki Mekanizması	2
2.1.4. Parasetamol'ün Metabolizması.....	3
2.1.5. Parasetamol'ün Yan Etkileri.....	4
2.1.6. Parasetamol'ün Toksikite ve Patofizyolojisi.....	4
2.2. Hepatotoksikite İlaç ile uyarılmış hepatotoksikite	5
2.3. Hücre Kültürü	6
2.4. Oksidatif Stres.....	7
2.5. Antioksidan Sistemler.....	7
2.5.1. Enzim Olan Antioksidanlar	8
2.5.1.1. Süperoksit Dismutaz	8
2.5.1.2. Katalaz	8
2.5.1.3. Glutasyon (GSH).....	8
2.6. Biyokimyasal Parametreler.....	9

2.6.1. Aspartat Aminotransferaz (AST).....	9
2.6.2. Alanin Aminotransferaz (ALT)	9
2.7. İnflamasyon	10
2.7.1. İnflamasyonun Tanımı.....	10
2.7.2. İnflamasyonun Tarihçesi.....	10
2.7.3. Akut İnflamasyon ve Patofizyolojisi	11
2.7.4. İnflamasyon Gelişmesinde Görevli Sitokinler.....	12
2.7.4.1. Tümör Nekrozis Faktör- α (TNF- α).....	13
2.7.4.2. İnterlökin-6 (IL-6).....	14
2.8. Resveratrol	15
2.8.1. Resveratrolin Tarihçesi	16
2.8.2. Resveratrol'ün Biyosentezi.....	16
2.8.3. Resveratrolün Biyolojik Etkileri.....	16
3. MATERYAL VE METOT.....	19
3.1. Materyal	19
3.1.1. Kullanılan Maddeler ve Kitler	19
3.1.2. Kullanılan Gereçler.....	20
3.2. Yöntem.....	20
3.2.1. Deney Grupları	20
3.2.2. Hücre Kültürü	21
3.2.2.1. Hücre Soylarının Başlatılması	21
3.2.2.2. Hücrelerin Büyütülmesi	21
3.2.2.3. Hücrelerin Pasajlanması	22
3.2.2.4. Hücre Sayımı	22
3.2.2.5. Hücrelerin Dondurulması	22

3.2.3. Resveratrol ve Parasetamol Dozlarının Uygulanması	23
3.2.4. MTT Hücresel Canlılık Analiz Deneyi.....	24
3.2.5. Biyokimyasal Analizler	25
3.2.5.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini.....	25
3.2.5.2. Katalaz (CAT) Aktivite Tayini	25
3.2.5.3. Total Glutasyon (GSH) Miktar Tayini	25
3.2.6. RNA İzolasyonu	26
3.2.7. cDNA Sentezi	27
3.2.8. Kantitatif PCR (Q-PCR)	27
3.2.9. İstatistiksel Yöntem	28
4. BULGULAR.....	29
4.1. Resveratrol ve Parasetamol'ün Karaciğer Enzimleri Üzerine Olan Etkisi	29
4.2. Resveratrol ve Parasetamol'ün Hep3B Hücrelerine <i>invitro</i> Etkisi	30
4.3. Resveratrol Uygulamasının SOD Aktivitesi Üzerine Olan Etkileri	32
4.4. Resveratrol Uygulamasının KAT Aktivitesi Üzerine Olan Etkileri	33
4.5. Resveratrol Uygulamasının GSH Seviyesi Üzerine Olan Etkileri.....	34
4.6. Resveratrol Uygulamasının Pro-İnflamatuvar Sitokinler Üzerine Olan Etkileri.....	36
5. TARTIŞMA.....	39
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	45
KAYNAKLAR	46
EKLER	59
EK 1. ÖZGEÇMİŞ.....	59
EK 2. ETİK KURUL ONAY FORMU	60

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum bu çalıŐmayı, değerli bilgi ve katkıları ile yöneten, tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Doç.Dr. Mesut Bünyami HALICI'ya en derin saygı ve Őükranlarımı sunarım.

ÇalıŐmalarım sürecinde maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Bünyami ÜNAL'a, Yrd. Doç. Dr. Selina AKSAK KARAMEŞE , Yrd. Doç. Dr. Murat KARAMEŞE'ye, Doç. Dr. Özgür KAYNAR, Yrd. Doç. Dr. Hüseyin SERKAN EROL, Uzman doktor Metin YILDIZ, ArŐ. Gör. Hamza EGE, ve ArŐ. Gör. İbrahim ARİF YURDGÜLÜ'ne ve hayatım boyunca destekleriyle her an yanımda bulunan aileme teşekkür ederim.

Alpgiray TURGUT

ÖZET

Karaciğer Karsinoma Hücrelerinde Oluşturulan Parasetamol Toksisitesi Üzerine Resveratrol'ün İn Vitro Etkilerinin Araştırılması

Amaç: Mevcut çalışmada, asetamonifen ve muhtemel koruyucu etkisinin olabileceğini düşündüğümüz resveratrol'ün uygulandığı Hep3B insan hepatoma hücrelerinde oluşturulmuş asetaminofen kaynaklı hepatotoksisitenin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada özellikle bazı proinflamatuvar parametrelerin rolü ve asetaminofen-aracılı sitotoksisitenin muhtemel sebeplerinden biri olan oksidatif stres araştırılmıştır.

Materyal ve Metot: Bu çalışma için Hep3B insan hepatoma hücre hattı kullanılmıştır. İn vitro çalışmalar (GSH, SOD, KAT, AST, ALT, TNF-alfa, IL-6 ve canlılık analiz testi), Biyokimyasal analizatör, ELISA, Real-Time PCR ve MTT gibi farklı metotlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Asetaminofen ve resveratrol, hücelere farklı doz ve zamanlarda uygulanmıştır.

Bulgular: Hep3B hücrelerinde yalnızca asetaminofen uygulanan gruplarda SOD, KAT ve GSH seviyelerinde azalma tespit edilirken, asetaminofen ve resveratrol'ün beraber uygulandığı gruplarda bu enzimlere ait seviyeleri yükselmiştir. Diğer yandan, asetaminofen ve beraberinde yapılan resveratrol uygulamaları (özellikle 160 µM resveratrol dozu) TNF-alfa ve IL-6 seviyesinde ciddi bir artışa sebep olmuştur.

Sonuç: Mevcut çalışmada, asetaminofen'in karaciğer toksisitesine sebep olduğunu ve ilginç bir şekilde resveratrol uygulamaları yukarıda belirtilen parametrelerin seviyelerini ciddi derecede etkilediği gösterilmiştir. Yalnızca asetaminofen uygulaması pro-inflamatuvar sitokin seviyelerinde ve anti-oksidant enzim seviyelerinde anormal artış ve/veya azalışlara sebep olmuştur. Buna ilaveten asetaminofen ile beraber yapılan yüksek doz resveratrol uygulaması inflamasyon ve oksidatif stres oluşumuna öncülük etmiştir. Bu sonuçlar, resveratrol'ün hepatik hasarın önlenmesi ve tedavisinde oldukça etkili bir ajan olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Asetaminofen, Hepatotoksisite, Hep3B, Oksidatif stres, Resveratrol, Sitokinle

ABSTRACT

The Examination of The In vitro Effects of Resveratrol on Paracetamol toxicity Occurred in Liver Carcinoma Cell Line

Aim: We therefore wanted to investigate acetaminophen hepatotoxicity by using Hep3B human hepatoma cells exposed to acetaminophen and resveratrol, used as a protective agent. Specifically, we studied the role of some proinflammatory markers and oxidative damage as possible mechanisms of acetaminophen-associated cytotoxicity.

Materials and Method: The Hep3B human hepatoma cell line was used for this study. In vitro studies (GSH, SOD, CAT, AST, ALT, TNF-alpha, IL-6 and cell viability) were performed by using different methods such as Biochemical analyzer, RT-PCR, ELISA and MTT. Acetaminophen and resveratrol were applied to cells in a different time and doses.

Results: Only acetaminophen treatment decreased SOD, CAT and GSH levels in Hep3B cells whereas acetaminophen and resveratrol co-treatment increased these enzymes levels. On the other hand, acetaminophen and resveratrol co-treatment (especially 160 μ M dose of resveratrol) lead a severe increase in TNF-alpha and IL-6 levels.

Conclusion: It is shown that acetaminophen has caused hepatotoxicity but interestingly but resveratrol treatment effects the related parameters mentioned above. Only, acetaminophen administration may cause abnormal decreases and/or increases in antioxidant enzymes and proinflammatory cytokines levels. Additionally, acetaminophen and high dose resveratrol co-treatment triggered the inflammation and oxidative stress. These results showed that resveratrol have a potential to be an effective agent on the treatment and protection of hepatic damage.

Key Words: Acetaminophen, Hepatotoxicity, Hep3B, Oxidative stress, Resveratrol, Cytokines

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALT	: Alanin Aminotrenferaz
AMPK	: AMP-activated protein kinase
APAP	: Asetaminofen
ASK	: Apoptosis signal-regulating kinase
ATP	: Adenozintrifosfat
B-Amiloidin	: B-Amyloid-Induced Neuronal Apoptosis
BC₃	: Reverse transkripsiyon tamponu
Ca⁺²	: Kalsiyum
CO₂	: Karbondioksit
COX	: Siklooksijenaz
Cu	: Bakır
CYP₄₅₀	: Sitokrom P450
DMEM	: Dulbecco's Modification of Eagles. Medium
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Dimetilsülfoksit
FAM	: Fluorescein
FBS	: Fetal Bovine Serum
GPOX	: Glutasyon Peroksidaz
GR	: Glutasyon Reduktaz
GSH-PX	: Glutasyon Peroksidaz
GST	: Glutasyon-S-transferaz
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
IC50	: Baskılayıcı konsantrasyon

IGF-I	: Insulin-like growth factor-1
IL-1	: İnterlökin-1
IL-10	: İnterlökin-10
IL-13	: İnterlökin-13
IL-4	: İnterlökin-4
IL-6	: İnterlökin-6
IL-8	: İnterlökin-8
INF-α	: İnterferon-alfa
INF-β	: İnterferon-beta
JNK	: Jun-N-Terminal Kinaz
KAT	: Katalaz
LPS	: Lipopolisakkarit
MN-SOD	: Mangan Süperoksit dismutaz
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
MTT	: Hücresel Canlılık Analizi
NAPQI	: N-Acetyl-p-benzoquinone imine
NO	: Nitrik oksit
NSAI	: Non-Steroid Anti-Inflamatuar
O₂⁻	: Oksijen
P₄₅₀	: Sitokrom enzim sistemi
P₄₅₀ - MFO	: Mixed-function oxidase
PAI-1	: Plasminogen activator inhibitor-1
PBS	: Fosfat Tampon Solüsyonu
RE₃	: Reverse transkripsiyon enzim karışımı
RLT	: Beta-merkaptolanol içeren tampon

RNT	: Reaktif Nitrojen
ROT	: Reaktif Oksijen
SIRT1	: Mammalian sirtuins-1
SOD	: Süper Oksit Dismutaz
TNF – α	: Tümör Nekroz Faktör - Alfa
TNFR₁	: Tümör Nekroz Faktör Alfa Reseptör-1
TNFR₂	: Tümör Nekroz Faktör Alfa Reseptör-2
Z	: Çinko
α	: Alfa
β	: Beta

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Parasetamol'ün yapısı.....	3
Şekil 2.2. Parasetamol'ün yapısı.....	3
Şekil 2.3. İnflamasyon sürecindeki lökosit olayları	12
Şekil 2.4. IL-6'nın kaynakları ve etkileri	15
Şekil 4.1. Resveratrol ve Parasetamol'ün AST ve ALT seviyeleri üzerine olan etkileri	30
Şekil 4.2. Tüm deney gruplarına ait canlılık analiz test sonuçları.....	31
Şekil 4.3. Parasetamol ve Resveratrol uygulamalarının SOD aktivitesi üzerine olan etkileri.....	33
Şekil 4.4. Parasetamol ve Resveratrol uygulamalarının KAT aktivitesi üzerine olan etkileri.....	34
Şekil 4.5. Parasetamol ve Resveratrol uygulamalarının GSH aktivitesi üzerine olan etkileri.....	35
Şekil 4.6. Parasetamol ve Resveratrol uygulamalarının TNF-alfa ve IL-6 üzerine olan etkileri.....	37

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1. PCR çalışması için kullanılan primer dizileri	28
Tablo 4.2. Tüm deney gruplarına ait 24 ve 48 saatlik canlılık analiz testi sayısal verileri	31
Tablo 4.3. Deney gruplarına ait SOD aktivitesinin sayısal verileri	32
Tablo 4.4. Deney gruplarına ait KAT aktivitesinin sayısal verileri	34
Tablo 4.5. Deney gruplarına ait GSH aktivitesinin sayısal verileri	35
Tablo 4.6. Tüm deney gruplarının TNF-alfa ve IL-6 ekspresyon seviyelerine ait kat artışı.....	38

1. GİRİŞ

Son yıllarda yapılan tedavi kökenli bilimsel çalışmalar genellikle alternatif etken maddeler üzerine yoğunlaşmaktadır. Birçok biyolojik aktiviteye sahip olan, günümüzde elde edilmesi gayet kolay olan ve doğal bir polifenol bileşik olan resveratrol'de bu etken maddelerden sadece bir tanesidir. Birçok bilimsel çalışmada, resveratrol'ün anti-karsinojenik, anti-diyabetik, apoptotik, anti-anjiyogenik, anti-mikrobiyal, anti-viral, anti-nörotoksik ve benzeri birçok etkiye sahip olduğunu göstermiştir.¹⁻⁶ Bu alanda hem in-vivo hem de in-vitro çalışmalar gerçekleştirilmiştir, ancak parasetamol toksisitesi ile resveratrol etkinliğini in-vitro olarak değerlendiren literatüre rastlanmamıştır. Mevcut çalışmada, asetamonifen ve muhtemel koruyucu etkisinin olabileceğini düşündüğümüz resveratrol'ün uygulandığı Hep3B insan hepatoma hücrelerinde oluşturulmuş asetaminofen kaynaklı hepatotoksitenin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada özellikle bazı proinflamatuvar parametrelerin rolü ve asetaminofen-aracılı sitotoksitenin muhtemel sebeplerinden biri olan oksidatif stres araştırılmıştır. Elde edilen veriler, bu hedefe ulaşıldığının bir kanıtı olarak karşımızda durmaktadır. İn vitro olarak gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada; hem anti-oksidant sistem hem de inflamatuvar süreçle ilgili resveratrol'ün ciddi derecede etkili olduğu kanısına varılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Parasetamol

2.1.1. Parasetamol'ün Tarihçesi

Başta söğüt ağacı kabuğu ve kına kına ağacı kabukları olmak üzere çeşitli bitkilerden ilk çağlarda ve orta çağda ağrı kesici ve ateş düşürücü olarak faydalanılmıştır.¹⁻³ 19. yüzyılda kına kına ağacının zor bulunur hale gelmesi insanları yeni ilaçlar aramaya itmiş ve 1873 yılında Harmon Northrop Morse tarafından parasetamol sentezlenmiştir.⁴ 1887de geliştirilen fenasetinden daha toksik olduğu düşünülen parasetamol uzun süre klinikte kullanılmadı. Parasetamolun asetinilid gibi zararlı etkileri olmadığını Brodie ve Axelrod 1948 yılında yaptıkları çalışmalarda bildirdiler.⁵ 1955 yılında ilk kez Amerika Birleşik Devletleri'nde 'Tylenol' adıyla satışa sunulan parasetamol İngiltere'de 'Panadol' ticari adı ile 1956da piyasaya sürüldü. Küçük bir yan etkiye sahip analjezik olarak giderek önem kazandı.

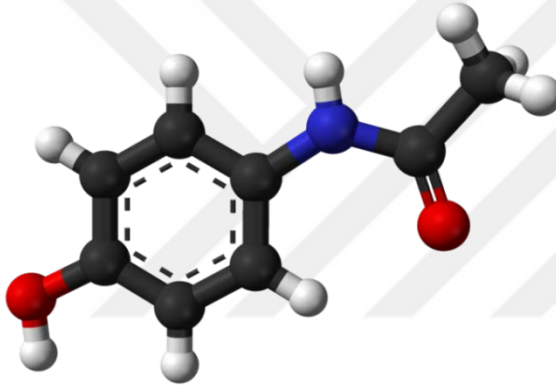
2.1.2. Parasetamol'ün Yapısı ve Özellikleri

Parasetamol (Asetaminofen, N-asetil-*p*-aminofenol; APAP) analjezik (ağrı kesici)ve antipiretik (ateş düşürücü) etkiye sahip bir ilaçtır. Molekül formülünün $C_8H_9NO_2$ olmasından dolayı asetaminofen olarak adlandırılır. Sistemik adı sistemik adı *N*-(4-hydroxyphenyl) acetamide'dir. Moleküler ağırlığı 151,2 g/mol dür ve suda az çözünen sentetik yapıda bir bileşiktir. Zayıf bir asit olması nedeniyle fizyolojik pH'da anyonize şekilde bulunur.⁶ Acımsı bir tadı olan parasetamol kokusuz, beyaz, kristal toz bir yapıdadır.⁷

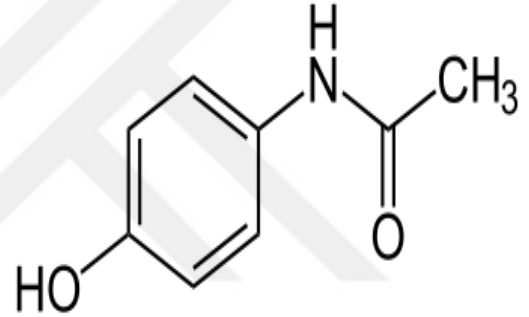
2.1.3. Parasetamol'ün Etki Mekanizması

Parasetamol'ün kimyasal yapısının asetilsalisilik aside benzemesinden dolayı siklooksijenaz (COX) enzimini inhibe ederek ve prostaglandin üretimini baskılayarak etki ettiği düşünülürdü.⁸ Parasetamolün pıhtılaşma üzerine etkisi olmamasına karşılık

asetilsalisilik asit tromboksanların üretiminde görevli olan siklooksijenazı inhibe ettiği için kanın pıhtılaşmasını azaltır. İnflamasyona sebep olan prostaglandin sentezini etkilemediği için NSAİ (Non-Steroid Anti-Inflamatuvar) olarak düşünülmemektedir.^{9,10} Parasetamolün etki mekanizması tam olarak anlaşılamamış olmakla beraber, yapılan çalışmalarda merkezi sinir sistemi (MSS) üzerinde santral COX inhibisyonu ve serotoninergic sistemle İndirekt etkileşim yoluyla etki ettiği gösterilmiştir⁸. 2002 yılında yapılan bir çalışmada parasetamol tarafından selektif olarak inhibe edilen, bilinen COX-1 ve COX-2'den farklı bir COX enzim varyantı bildirilmiş ve COX-3 olarak adlandırılmıştır.¹¹



Şekil 2.1. Parasetamol'ün yapısı



Şekil 2.2. Parasetamol'ün yapısı

2.1.4. Parasetamol'ün Metabolizması

Parasetamol (Asetaminofen, APAP) başta karaciğer olmak üzere böbrek ve bağırsakta metabolize olur. APAP metabolizmasındaki üç temel mekanizma glukuronid konjugasyonu, sitokrom CYP450'ye bağlı mikrozomal oksidasyon ve sülfat konjugasyonudur¹². Asetaminofen terapötik dozlarda uygulandığında, % 80-85'i glukuronid-sülfat konjugasyonu ile, % 10'u CYP450 enzim sistemi aracılığıyla metabolize edilmekte olup, %5'i ise değişmeden idrarla atılarak uzaklaştırılmaktadır.^{13,14} CYP450 parasetamol metabolizmasında işlev gören en önemli

enzimdir. Toksik dozlarda CYP2E1 ve CYP1A2, terapötik dozlarda ise CYP3A4 enzimleri görev yapar.¹⁵

2.1.5. Parasetamol'ün Yan Etkileri

Parasetamol terapötik dozlarda genellikle iyi tolere edilebilmektedir. Nadiren alerjik cilt reaksiyonları (kızarıklık, ürtiker), hipoglisemi, alerjik ilaç ateşi, hematolojik yetmezlik ve böbrek yetmezliği görülebilir.¹⁶ Yüksek dozlarında dezoryantasyon, baş dönmesi ve huzursuzluğa yol açsa da en ciddi yan etkisi toksik dozlarında hepatik nekrozdur.¹⁷ Hepatotoksik etkisi karaciğer hastalığı, malnütrisyon ve kronik alkol kullanımıyla artabilir. Epidemiyolojik çalışmalarda parasetamol kullanımıyla astım, gastrointestinal problemler ve renal hastalıklar arasında ilişki olduğu gösterilmiştir.¹⁰ Parasetamol'ün asit-baz dengesi üzerine, kardiyovasküler sistem ve solunum sistemine belirgin bir etkisi görülmemiştir.

2.1.6. Parasetamol'ün Toksikite ve Patofizyolojisi

Parasetamol'ün erişkinlerdeki tedavi dozu oral 500-1000 mg'dır. Gerekli görüldüğünde 4-6 saat aralıklarla tekrarlanabilir. Günlük maksimum doz 4 g olarak kabul edilir. Bir defada 150mg/kg'dan yüksek dozlar toksik kabul edilirken 300mg/kg üzerindeki tek seferlik dozlar ölümcül kabul edilir.^{11,18,19} Tedavi dozlarında glukuronid ve sulfat konjugatları şeklinde karaciğerde inaktive olan parasetamolün yaklaşık %8 oranında toksik ara metabolitleri de oluşur. CYP450 enzim sistemi ile oksidasyona uğrayan parasetamolün toksisiteye neden olan metaboliti *N-asetil-pbenzoquinoneimine* (NAPQI) dir. Biyolojik yarı ömrü kısa olan NAPQI glutatyona bağlanarak detoksifiye edilir. Terapötik dozların aşımı açığa NAPQI miktarını da artırır ve glutatyonun NAPQI bağlama kapasitesini aşmasıyla serbest haldeki NAPQI karaciğerde moleküllerle kovalent bağ yapıp hepatik nekroza kadar gidebilen karaciğer hasarına neden olur.²⁰ Bu hasarın karaciğer hücrelerinde hücre içi dengenin bozulmasıyla ortaya

çıktığı düşünülmektedir.²¹ Histolojik olarak hepatik nekrozun en fazla P450-MFO (karma fonksiyonlu oksidaz sistemi) aktivitesinin görüldüğü sentrilobüler bölgede olduğu bildirilmiştir.²² Hücre içi dengenin bozulmasıyla hücre içerisinde biriken Ca^{+2} hücre ölümüne sebep olan katabolik enzimlerin sayısını artmasına sebep olur. Apoptosis, nitrik oksit, reaktif oksijen türleri ve lipid peroksidasyonunun da karaciğerde toksisiteye neden olduğu bilinir.²³

2.2. Hepatotoksisite İlaç ile uyarılmış hepatotoksisite

Karaciğer sistemik dögünün ve emilimin yapıldığı, yabancı maddelerin elemine edildiği ve metabolizmanın merkezi denilebilecek özelliğe sahip bir organdır. İlaça bağlı hepatotoksisite, tüm dünyada sağlık alanında gittikçe artan ciddi sağlık sorunu haline gelmiştir. ABD’de yapılan bazı çalışmalar, yüksek doz ilaca bağlı hepatotoksisiteyi de içeren karaciğer yetmezliği %50’den daha fazla olduğunu göstermektedir. Geçmişte, ilaca bağlı hepatotoksisite ile ilişkili olarak meydana gelen hastalık ve ölümlerden dolayı birçok ilaç piyasadan çekilmiştir.^{24,25,26}

Karaciğer hasarına sebep olan maddeler hepatotoksin olarak adlandırılırlar. Hepatotoksinler iki şekilde sınıflandırılır: “intrinsik” ve “idiosentratik”. İntrinsik hepatotoksinler doza bağlı tarzda etki gösterir ve bu yolla meydana gelen hepatotoksisite intrinsik hepatotoksisite olarak isimlendirilir. Doza bağlı olmayan tarzda etki gösteren hepatotoksinler idisentratiktir. Karaciğer yetmezliğine büyük oranda neden olan hepatotoksisite intrinsiktir ve buna en güzel örnek olarak asetaminofen (APAP ya da parasetamol) verilmektedir. İdiosentratik hepatotoksinlere maruz kalan hasta sayısı 10000’de 1’dir. 1000’den fazla ilaç ve bitkisel ürünler ise idiosentratik hepatotoksiktir ve akut karaciğer yetmezliğinin %10’undan fazlasını oluşturur.^{24,27}

2.3. Hücre Kültürü

İn vitro çalışmalar olarak da adlandırılan hücre kültürleri, hücrelerin tek hücreyi dahi kapsayabilecek şekilde, doku olarak düzenlenmeden çoğalabilmeleridir. Organizmadan direkt olarak alınan organ, doku veya hücrelerden üretilen kültürler primer kültürler olarak adlandırılırlar. Primer hücre kültürlerine bazı özel kimyasal ve medyumların uygulanması sayesinde bazı spesifik özellikleri olan hücreler elde edilir. Bu hücrelerin kültürde yaşamları süresince belirleyici özellikleri devam eder; hücrelerin pasaj yapılmış olması, onların belirleyici özelliklerini etkilemez. Hücre suşları ve hücre soyları diploid veya heteraploid olabilirler, hücrelerin heteraploid oluşları onların habis hücreler oldukları veya in vitro çoğalmalarının sınırsız olduğu anlamına gelmez. Hücre kültürlerinde sınırsız çoğalan hücre soy veya suşları, devamlı hücre soyları şeklinde tanımlanarak, yaşam süreleri sınırlı diploid veya heteraploid hücre soylarından ayrılırlar.²⁸

Genel kanı olarak günümüzde, hücre kültürleri esas olarak iki yolla üretilmektedir: Tek tabak hücre kültürleri (Mono layer) ve süspansiyon halinde hücre kültürleri. Tek tabaka hücre kültürleri, cam veya plastik zemine sahip olan özel flasklar üzerine tutunarak yaşayan ve üreyen hücrelerdir. Süspansiyon halindeki hücre kültürlerinde, hücreler hayatsal işlev ve üremelerini süspansiyon halinde buldukları ortamda sürdürebilir. Doku kültürü ve yöntemleri kullanarak, hücre yapısı, fizyolojisi, patojen hücre ilişkileri, iyonlaştırıcı ışınların hücre düzeyinde incelenmesi ve çeşitli radyobiyojik problemlere bağlı olarak tümör büyümesinin açıklığa kavuşturulmasına çalışılır. Hücre kültürlerinde, in vivo şartlarda mümkün olmayan, kısa zaman aralığında gerçekleştirilmesi istenen fiziksel ve kimyasal etkenler incelenebilir.²⁸

2.4. Oksidatif Stres

Reaktif oksijen (ROT) ve reaktif nitrojen (RNT) türleri organizmadaki birtakım metabolik reaksiyonlar sonucu endojen veya ekzojen olarak meydana gelebilmektedirler. ksantin oksidaz enzimlerinin aktiviteleri, nötrofil ve makrofaj stimülasyonu, solunum zinciri reaksiyonları ve sitokrom P450 gibi mekanizmaları kapsayan etmenler endojen kaynaklı etmenler olarak bilinirler. Ekzojen kaynaklı etmenlere ise endüstriyel kimyasallar, ilaçlar, radyasyon, bağımlılık yapan maddeler, stres, hava kirliliği, sigara gibi indükleyiciler girmektedir.^{29,30,31} Birtakım hücrel cevapların oluşmasında düşük konsantrasyonlardaki serbest radikallerin önemli bir yeri vardır. Bununla birlikte, ROT ve RNT oluşumlarının aşırı artışı, oksidan/antioksidan dengenin bozulmasına yol açmaktadır. Eğer, artan ROT ve RNT oluşumları, antioksidant savunma sistemleri tarafından hızlı bir şekilde uzaklaştırılmazsa oksidatif stres meydana gelmektedir.³² Oksidatif stres DNA, protein, lipid ve karbonhidratlar üzerinde hasarlara yol açarak tümör oluşumlarına ve kansere neden olabilmektedir.³³

2.5. Antioksidan Sistemler

Hücreler serbest radikallerin hasarlarına karşı pek çok savunma mekanizması geliştirmişlerdir. Bunların başında antioksidan enzimler gelir. Hücre içinde enzim olmayan antioksidanlar da hücreleri oksidatif hasara karşı savunmada görev yapar. Antioksidanlar, “endojen antioksidanlar ve “ekzojen antioksidanlar olmak üzere ikiye ayrılırlar (tez). Endojen antioksidanlar da kendi içinde “enzim olanlar” ve “enzim olmayanlar” şeklinde iki alt kategoriye ayrılırlar. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), Glutasyon-S-transferaz (GST), hidroperoksidaz ve mitokondriyal sitokrom oksidaz enzimleri enzimatik endojen antioksidanlara verilebilecek örneklerdir.³⁴

2.5.1. Enzim Olan Antioksidanlar

2.5.1.1. Süperoksit Dismutaz

Bütün aerobik hücrelerde bulunan bu enzim süperoksit anyonlarını (O_2^-) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene dönüşümünü katalize ederek bu radikallerin hücrelerdeki toksik etkilerini azaltır.³⁴

SOD aktivitesi yaş ilerledikçe artar. SOD enzimi hem sitozolde hem de mitokondride bulunur. Memelilerde, metal iyonlarına göre sitozolik dimerik bakır/çinko süperoksit dismutaz (Cu/Zn-SOD) ve mitokondriyal tetramerik (mangan süperoksit dismutaz) Mn-SOD olarak adlandırılan 3 tip SOD enzimi mevcuttur.³⁵ Serbest radikallerin oluşturduğu yıkıcı etkiyi önlemede, SOD enziminin katalaz enzimi ile beraber incelenmesi gerektiği düşünülmektedir. Çünkü SOD ile katalizlenen tepkime sonunda oluşan hidrojen peroksit, oksijenin toksik türlerinden biridir ve katalaz tarafından mevcut birikim önlenmektedir.³⁶

2.5.1.2. Katalaz

Katalaz (CAT), molekül ağırlığı 248 kDa olan ve yapısında kovalent olmayan bağ ile bağlı dört protoporfirin içeren bir enzimdir. Katalaz esas olarak peroksizomlarda bulunur. Hemen hemen bütün dokularda bulunmasına rağmen en yüksek aktivite peroksizomların yüksek oranda bulunduğu karaciğer, böbrek ve eritrositlerde görülür. Katalaz, hidrojen peroksitin suya dönüşümünü katalizler. Hidrojen peroksit bir radikal olmamasına rağmen Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarına girerek oldukça toksik olan $OH\cdot$ radikalini oluşturur. Bu nedenle hidrojen peroksitin ortadan kaldırılması gerekmektedir.³⁴

2.5.1.3. Glutatyon (GSH)

Glutatyon (GSH) karaciğerde genetik bilgiye gerekduymadan glisin, sistein ve glutamat amino asitlerinden sentezlenebilen bir tripeptittir. Glutatyon (GSH) ciddi

öneme sahip bir antioksidandır, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde rol alır. Ayrıca proteinlerdeki sülfhidril (-SH) gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur, böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller.¹⁴⁴ Glutasyon (GSH) yabancı bileşiklerin detoksifikasyonu ve amino asitlerin membranlardan transportunu da sağlar. Glutasyon (GSH) eritrositleri, lökositleri ve göz lensini oksidatif strese karşı korumada çok ciddi öneme sahiptir.³⁷

2.6. Biyokimyasal Parametreler

2.6.1. Aspartat Aminotransferaz (AST)

Aspartat aminotransferaz veya serum glütamik oksalasetik transaminaz (AST) organa spesifik olmayan bir enzimdir. Hepatositlerde, kalp kasında, iskelet kaslarında, böbrek dokusunda ve plasentada bulunur. Bu dokularda nekroz geliştiğinde serum AST konsantrasyonun'da artış görülür. Hepatositlerin içinde bulunan aspartat aminotransferazın % 60-80'i mitokondri içinde bulunurken diğer bölümü çözünür formda sitoplazma içinde bulunur. AST'nin mitokondriyel formunun salınımı için membran permeabilitesinde değişime neden olan harabiyetten daha şiddetli bir bozukluğun olması gereklidir. Bunun sonucu olarak AST aktivitesindeki artış, alanin aminotransferazın artışından daha geç gerçekleşir. AST'nin konsantrasyonun'daki artış en yaygın olarak hepatoselüler hastalıklarda görülür.^{38,39}

2.6.2. Alanin Aminotransferaz (ALT)

Alanin aminotransferaz veya serum glütamik pirüvik asit transaminaz (ALT) sitoplazmik bir enzimdir. Hepatoselüler membran permeabilitesinin artışında hücre dışına salınımı artar. Yüksek serum alanin aminotransferaz seviyesi hepatoselüler hasarın şiddetli olduğunu gösterir. ALT transferazlar grubunda yer alır ve albumin

metabolizmasında aspartat aminotransferaz ile birlikte görev alır. Alanin aminotransferaz, hücre sitoplazmasında L-alanin ve L-ketoglutarat'ın piruvat ve glutamata geri dönüşümlü transaminasyonunu katalize eder. Piridoksal 5'-fosfat, ALT ve pek çok aminotransferazlara sıkı şekilde bağlanan bir kofaktördür ve ASTde olduğu gibi B6 vitamininin alınımındaki yetersizlik enzim aktivitesinde azalmaya sebep olur. Serum ve spinal sıvıda ALT aktivitesi olmasına rağmen, çok düşük renal spesifik aktivitesi nedeniyle idrarda ALT aktivitesi yoktur. AST ve ALT'nin serumdaki yükselmiş aktiviteleri genellikle klinik pratikte ve sağlık taramalarında karaciğer hastalıklarının belirteci olarak kullanılır. Bu bozukluklar yüksek alkol alımı ve hepatitis virüsü enfeksiyonu olmadan rastlanan alkolik olmayan karaciğer yağlanması tanımında önemlidir.⁴⁰

2.7. İnflamasyon

2.7.1. İnflamasyonun Tanımı

İnflamasyon, endojen veya eksojen birçok uyarının hücre ve dokularda meydana getirdiği hasara karşı oluşan kompleks bir yanıttır. Bu uyarılar, inflamasyonu başlatmak için plazmada bulunan ve hücrelerden serbestleşen bazı kimyasal mediyatörleri tetikler. Toksinler ve bakteri ürünleri eksojen mediyatörler olup; endojen mediyatörlerin salınımını tetikler.⁴¹ Çoğu hastalığın patolojisinden kaynaklanan sistemik ya da lokal etkiyle oluşan hasarlara karşı organizmanın savunucu mekanizması olarak işlev görürken; dokularınıyleşme sürecinde de başlangıçtır.⁴² Bunlarla birlikte vücuda zarar veren etkenlere karşı organizmanın direncini artırır.⁴³ İnflamasyon akut ve kronik olmak üzere iki farklı grupta sınıflandırılmaktadır.

2.7.2. İnflamasyonun Tarihçesi

İnflamasyonun ilk tanımı M.S. 1.yy'a dayanmaktadır. Dokunun hasara verdiği yanıt yani inflamasyon; dolor(ağrı), rubor(kızarıklık), calor(ısı artışı), tumor(şişlik)

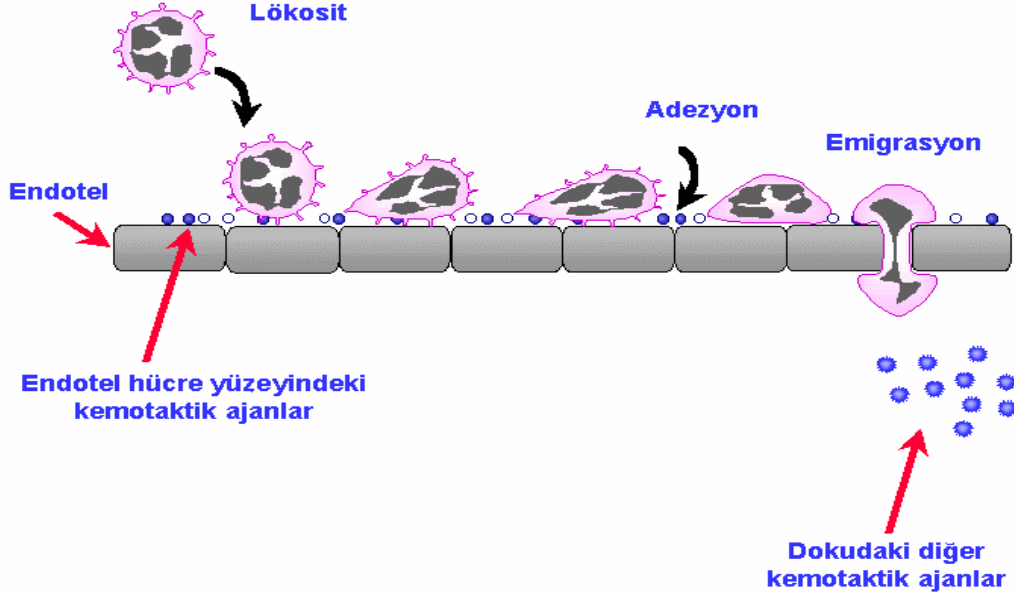
olarak M.S. 1.yy'da Celsus tarafından tanımlanmıştır.1850'lerde ise "organ disfonksiyonu" nu da inflamasyon belirtilerine ekleyen Rudolf Virchow inflamasyonun karakteristik beşinci özelliğini belirlemiştir.⁴⁴

2.7.3. Akut İnflamasyon ve Patofizyolojisi

Akut inflamasyon, organizmanın oluşan hasara karşı verdiği yanıtın çok hızlı ve kısa zamanda olmasıdır. Bu süreçte ilk olarak inflamasyon bölgesinin kan akımında artış ve vazodilatasyon oluşur.^{43,45} Daha sonra ödem gelişimi ve lökositlerin inflamasyon bölgesine göçü gerçekleşir.^{46,47} Kan hücrelerinin göçü ile zararın olduğu bölgedeki etkileşim ve aktivasyonları inflamasyon seyrinde esastır.⁴⁸ Hücrelerin hasarlanmasından sonra önce kısa süreli vazokonstriksiyon daha sonra vazodilatasyon oluşur. Salınan mediyatörlerin etkisiyle meydana gelen vazodilatasyon; kızarıklık, ısı artışı ve intersitisyuma transuda sızmasına neden olur. Bunun sonucunda oluşan vasküler permeabilite artışı damar dışına proteinden zengin sıvı çıkmasına ve interstisyel sıvı ile vasküler osmotik basınçta azalmayla ödem oluşmasına yol açar.

Lökositlerdeki hücresel olaylar oluşan bu vasküler değişikliklerle birlikte şekillenir. Lökositlerin vasküler lümeninden ekstravasküler boşluğa çıkmaları sonucunda fagositoz ve degranülasyon faaliyetleri başlar.^{47,49,50} Lökositlerin ekstravasküler boşluğa çıkmaları interlökin-1 (IL-1) ve interlökin-8 (IL-8) gibi sitokinlerin etkisiyle olur. Lökositler fagositoz özelliğiyle zararlı maddelerin hücre içine alınarak sindirilmesinde rol oynar. Lökositlerin yaptığı fagositoz sonucunda zararlı etkenler yok edilirken kısmi bir doku hasarı da oluşur.^{47,50} Lökositler fagositoz sürecinde glukoz kullanır. Bunun sonucunda fosfolipidlerin yıkım ve yapımında ve laktik asit üretiminde bir artış olur. İnflamasyon sürecinin sonunda hasar oluşan dokuda lökositlerin de bir kısmı ölür. Dokudaki nekrotik kalıntılar ile ölü lökositler, içinde doku sıvısı bulunan bir kavite oluşturur. İnflamasyon bittiğinde ise nekroza uğrayan doku ve ölü lökositler çevre

dokular tarafından yok edilirler.⁴³ Birçok kimyasal mediyatör ve bazı sitokinler bu vasküler ve hücrel olayların gelişmesinde rol oynar.



Şekil 2.3. İnflamasyon sürecindeki lökosit olayları

2.7.4. İnflamasyon Gelişmesinde Görevli Sitokinler

Sitokinlerin immün cevabın programlanması ve yönetilmesinde önemli görevleri vardır. Bu maddeler immün sistem hücreleri arasında veya immün sistem ile diğer organlar arasındaki iletişim ağında haberci görevi görürler.⁵¹ İnflamatuvar süreçte etkili olan en önemli sitokinler interlökinler (özellikle IL-1, IL-6 ve IL-8) ve tümör nekroz faktör-alfadır (TNF- α).⁵² Sitokinler anti-inflamatuvar ve pro-inflamatuvar olarak ikiye ayrılır;

Anti-inflamatuvar sitokinler (IL-4, IL-10, IL-13) inflamatuvar reaksiyonları baskımlarken; Pro-inflamatuvar sitokinler (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- α , IFN- β) ise inflamatuvar reaksiyonları arttırmırlar.⁵¹ TNF- α ; pro-inflamatuvar etkisinin yanında hücrelerin büyüme ve çoğalması içinde önemlidir. Yapılan çalışmalar da tümör immünitesi ve akut inflamasyonda da etkili olduğu gösterilmiştir.⁵² Sitokinler aktive makrofaj ve T lenfositlerden üretilir ancak yapılan çalışmalarda yağ hücrelerinden de

salgılandığı gösterilmiştir. Ekstraselüler sıvıya sitokin salgılayan hücrelerden biri de yağ hücreleridir. Leptin, resistin, TNF- α , adiponektin, adiposin, IL-6, PAI-1, transforme edici büyüme faktörü- α , anjiotensinojen, açılasyon stimüle edici protein ve IGF-I (İnsüline benzer büyüme faktörü-1) gibi mediatörlerin yağ hücresinden salgılandığı tespit edilmiştir.⁵³

2.7.4.1. Tümör Nekrozis Faktör- α (TNF- α)

TNF- α , enfeksiyon varlığında sentezlenen, inflamatuvar fonksiyonları olan ve endojen immün yanıtta rol oynayan pro-inflamatuar bir sitokindir.^{54,55} TNF- α 'nın İnflamasyon dışında hücrenin farklılaşması, proliferasyonu ve apoptozis gibi görevleri de vardır. TNF- α 'nın inflamasyon ve bakteriyel kaynaklı toksinlere karşı verdiği yanıt farklıdır. Yapılan çalışmalar da TNF- α artışı insülin direnci ile birlikte obez insanlarda gösterilirken; kilo kaybıyla beraber TNF- α plazma seviyesinde azalma olduğu da belirtilmiştir.^{56,57} Kandaki TNF- α miktarı aşırı yükseldiğinde septik şok, çoklu organ hasarı ve ölüm gibi sonuçlar olabilmektedir.⁵⁸

TNF- α en çok makrofajlardan sentezlenir. Bunun yanında T-lenfositlerden, Natural Killer hücrelerinden, düz kas, sinir, epidermal hücreler ve mast hücreleri gibi normal hücrelerin yanında bazı malign hücreler tarafından da sentezlenmektedir. Gram negatif bakterilerin hücre membranında bulunan LPS; TNF- α sentezlenmesinin en güçlü uyarıcısıdır. LPS'nin yanında bazı immün kompleksler, C5a, virüsler, iskemi reperfüzyon hasarı ve TNF- α 'nın kendisi de TNF- α sentezini uyaramaktadır. 6. kromozomun kısa kolunda bulunan TNF- α geni pro-hormon şeklinde sentezlenir daha sonra 17 KDa ağırlığındaki olgun protein ortaya çıkar.^{57,58}

Akut durumlarda TNF- α üretilmesi; enfeksiyon olan bölgeye makrofaj ve nötrofillerin gitmesine izin vererek faydalı rol bir oynar. Aynı zamanda ölü hücre kalıntılarının temizlenmesi için fagositleri uyarır.⁵⁵ Fakat yapılan çalışmalarda uzun

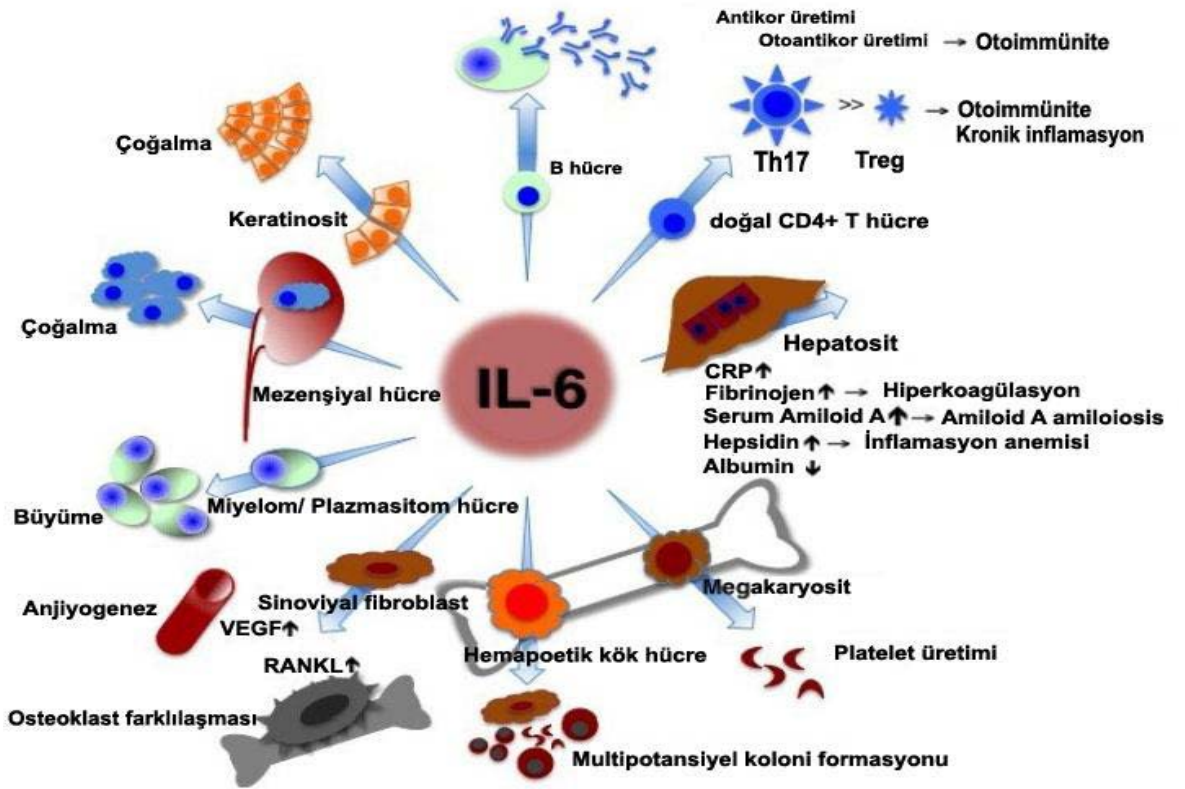
süren TNF- α maruziyeti sonucu oluşan kandaki TNF- α yüksekliği; travma ve toksik şok hastalarında metabolizma bozulmasıyla ilişkili bulunmuştur.⁵⁹ TNF- α 'nın yüksek dozda lokal olarak uygulanması tümör kan damarlarını tahrip ederek anti-tümör aktivitesi gösterir. Ancak düzensiz bir şekilde fazla üretilmesinin de kansere yol açtığı belirtilmiştir.⁶⁰Yapılan bazı çalışmalar sonucunda da TNF- α 'nın lipoprotein lipaz aktivitesini inhibe ederek lipogenik enzimlerin ekspresyonunu azalttığı söylenmiştir.⁶¹ Bunun yanında adipositlerde meydana gelen apoptozisi de arttırabileceği söylenmiştir.⁵⁴

İnsan ve hayvanlarda yapılan tedavi çalışmalarında insüline duyarlı maddeler kullanılıp TNF- α konsantrasyonun azaltılmasıyla karaciğer yağlanması önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir.⁶²TNF- α fonksiyonlarını TNFR1 ve TNFR2 reseptörleri aracılığıyla yerine getirmektedir. TNFR1' in TNF- α fonksiyonları TNFR2' den baskın olmasına rağmen TNFR2' nin TNF- α 'ya bağlanma afinitesi daha yüksektir.^{58,60,61,62} TNFR1, apoptozis signal-regulating kinase (ASK) ve c-Jun N-terminal kinase (JNK) aktivasyonu ile apoptozise, TNFR2 ise epitelyal tirozin kinazı uyararak hücre proliferasyonuna neden olur.⁶⁶

2.7.4.2. İnterlökin-6 (IL-6)

İnterlökin-6 immunglobulin salgılatan pleitropik bir sitokindir. 22-28 kD ağırlığındaki IL-6 184 aminoasit olgun kısmı ve 28 aminoasit sinyal dizisi olarak toplam 212 aminoasitli bir öncül protein olarak sentezlenmektedir.⁶⁷ IL-6'nın hepatositler ve B lenfositler üzerine de önemli etkileri vardır. Akut faz yanıtında rol oynayan plazma proteinlerinin birçoğunun hepatositler tarafından sentezlenmesinde önemli rol oynarlar.⁶⁸ IL-6; T hücre aktivasyonu, IL-2 yapımının uyarılması, hepatosit aktivasyonu(akut faz proteinlerinin sentezi), B hücrelerinden Ig yapımının uyarılması, hematopoetik koloni stimülasyonu, ateş, prolaktin, büyüme hormonu ve luteinizan hormonun salınmasında stimülatör etki, osteoklast aktivasyonu, glukokortikoid

sentezinin uyarılması, keratinosit büyümesinin stimülasyonu ve infeksiyonlara karşı nonspesifik direnç oluşması gibi olaylarda biyolojik etki gösterir.^{69,70} IL-6; T ve B lenfositler, fibroblastlar, monosit ve makrofajlar, epitelyal ve endotelyalhücreler, keratinositler, astrositler, mezenşimal hücreler, dentritik hücreler, osteoblastlar, nöronal hücreler, mikroglia, epidermal langerhans hücreleri ve mast hücreleri gibi birçok hücre tarafından üretilmektedir.^{71,72}



Şekil 2.4.IL-6'nın kaynakları ve etkileri

2.8. Resveratrol

3, 4', 5 trihidroksistilben ya da 3, 4', 5 stilbenetriol olarak adlandırılan resveratrol patojenik saldırı ve çevresel şartlara yanıt olarak üzüm, karadut ve yer fıstığından üretilmiştir. Polifenik yapıda bir fitoaleksinin olan resveratrol'ün geometrik olarak cis ve trans olmak üzere 2 formu vardır. Her ne kadar başlangıçta cis izomeri için aktif değil densede her iki izomerinde biyolojik aktiviteye sahip olduğu kanıtlanmıştır. Sadece

termodinamik etkilerden kaynaklanan doğal sebeplerle trans formunun daha yaygın olduğu belirlenmiştir.⁷³

2.8.1. Resveratrolin Tarihçesi

4500 yıla yakın bir tarihi olan resveratrol'ün tarihte ilk olarak Hintliler tarafından kırmızı üzüm suyundan elde edildiği bilinmektedir. Çin ve Japonya da yetiştirilen *Polygonum cuspidatum* bitkisinin kurutulmuş kökleri resveratrol'ün en önemli kaynağıdır. Birçok İnflamatuvar hastalık, ateroskleroz, hiperlipidemi gibi hastalıklarda *Polygonum cuspidatum* kullanılmıştır. Langcake ve Pryce tarafından 1976 yılında yapılan çalışmalarla ilk kez üzümde fitoaleksinin olarak resveratrol bulunmuştur.⁷³

2.8.2. Resveratrol'ün Biyosentezi

Bitkilerin yaprak çiçek dokuları ve tanelerinde, fitoaleksinin olarak sentezlenmektedir. Biyosentezi stilben sentaz enziminin katalizörlüğünde gerçekleşmektedir. Bitkiler tarafından strese bağlı olarak sentezlenmekte olana resveratrol normal zamanlarda çok az miktarda bulunmaktadır. İncelemeler sonucunda bitkilerin diğer yapılarında da resverastole rastlanmış ve bu yapıları çürüme gibi durumlara karşı koruduğu tespit edilmiştir.⁷³

2.8.3. Resveratrolün Biyolojik Etkileri

Doğal anti oksidan etkileri arasında reaktif oksijen türevlerinin (ROS) artışını sınırlama, mitokondrilerde oluşan süperoksit radikallerini temizleme ve fenton reaksiyonu sonucunda oluşan ürünlerin indüklediği lipid peroksidasyonunun inhibe edilmesinden oluşan 3 farklı durum vardır. Güçlü antioksidan etkiye sahip olan resveratrol Hem serbest radikalleri temizler hemde bu radikallerin sebep olduğu hasarları engeller. OH radikalının neden olduğu lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği belirlenen resveratrol OH ve H₂O₂ nin neden olduğu DNA hasarını da önlemektedir.⁷⁴

Resveratrol başlıca bakır iyonlarının şelasyonunu etkileyerek lipid peroksidasyonunu inhibe eder. Resveratrolun her iki geometrik izomeride lipid peroksidasyonunu inhibe ederken cis izomeri bu inhibisyonu trans izomerine göre 2 kat daha kuvvetli yapar. Serbest radikali vücuttan temizleme etkileri ise aynıdır. Resveratrol bu etkilenin yanında membran lipitlerinin oksidasyonunda inhibe etmektedir. Hücre membran yapısının koruyan resveratrol, canlı hücrelerdeki oksidatif stres etkiside azaltmaktadır.^{75,76}

Resveratrol inflamasyona sebep olan maddelerin oluşumunu inhibe ederek anti-inflamatuvar özellik gösteren bir maddedir. Resveratrol'un anti inflamatuvar etkisinin NO ya bağımlı olduğu yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Resveratrol un COX-2 transkripsiyonunu ve ornitin dekarboksilazı inhibe ederek kanser gelişimini ve ilerlemesini azalttığı bildirilmiştir.⁷⁸ Resveratrol salisilik asitin uzun süre kullanılması durumunda mide duvarında oluşan kronik inflamasyonun tedavisinde de kullanılmaktadır.⁷⁹ Makrofajlar ve epitel hücreleri ile dendritik ve myeloid hücrelerde NF-kappa B'nin inhibisyonu ile antiinflamatuvar etki oluşturduğu bildirilmiştir.⁸⁰

Bunların yanında resveratrol lipopolisakkarit kaynaklı hava yolu inflamasyonunu, kronik gelişen ödemi ve kemik iltihabını önemli derecede azaltmaktadır.⁸¹ Resveratrol aynı zamanda anti-inflamatuvar özelliği sayesinde iskemik kalpte kardiyoprotektif etkiye sahiptir. Yapılan çalışmalarda kontrol grubu ile resveratrol verilen grup karşılaştırıldığında resveratrol'un miyokardiyal enfarktı azalttığı ve iskemi sonrası ventriküllerde gözlenebilen iyileşmelere sebep olduğu belirlenmiştir.⁸²

Tüm bunlara ilaveten, birçok sinyal yolağı üzerinden resveratrol'un kardiyoprotektif etkisi vardır. SIRT1 ve AMPK aktivasyonu ve fosfodiesteraz inhibisyonu ile damar fonksiyonunu düzenler ve ateroskleroz, oksidatif stres ve apoptozu azaltarak kardiyak hipertrofi ve kalp yetmezliğinde iyileştirici etki gösterir.

Öte yandan RES SIRT1 aktivasyonu ile anjiyogenez gelişimini sağlayarak, NO üretimini artırarak ve oksidatif stresi azaltarak iskemi/reperfüzyon hasarını hafifletir.⁸³ Resveratrol'ün, Alzheimer, Parkinson, Huntington ve epilepsi hastalıklarındaki antioksidan özelliği ve SIRT1 aktivasyonu yolu ile nöroprotektif etkisi deneysel hayvanlar ve insalarda yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.⁸⁴ Aynı zamanda resveratrol'ün sıçanlar'da medulla spinalis hasarının nöronlarda neden olduğu proapoptotik Bax protein artışını inhibe ettiği ve antiapoptotik Bcl-2 protein ekspresyonunu artırdığı belirtilmiştir.⁸⁵ İn vitro bir çalışmada ise resveratrol'ün PC12 hücrelerinde β -amiloidin neden olduğu apoptozu SIRT1 aktivasyonu yolu ile inhibe ettiği gösterilmiştir.⁸⁶

3. MATERYAL VE METOT

Bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen in vitro ve moleküler metotlar Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Doku ve Hücre Kültürü Laboratuvarında, biyokimyasal metotlar ise Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Maddeler ve Kitler

- Hep3B Human Hepatoma Cell line (ATCC-HB-8064)
- FetalBovine Serum, Heatinactivated (Sigma)
- Dulbecco'sModifiedEagleMedium (BiologicalIndustries)
- L-glutamin (BiologicalIndustries)
- Trypsin EDTA (BiologicalIndustries)
- Trypan Blue (BiologicalIndustries)
- DMSO, dimethylsulfoxide (Sigma)
- Penisiline/Streptomycin Solüsyonu (Sigma)
- MTT Hücresel Canlılık Analiz Kiti (Sigma)
- Resveratrol (Sigma)
- Parasetamol, Asetaminofen, APAP (Laboratories UPSA)
- Glutathioneperoxidase (GSH) ELISA Kiti (Elabscience)
- SuperoxideDismutase (SOD) Assay ELISA Kiti (Elabscience)
- Catalase (CAT) Assay ELISA Kit (Elabscience)
- Human TNF-alfa PCR primer-Taqmanprobe seti (Primer Design)
- Human IL-6 PCR primer-Taqmanprobe seti (Primer Design)
- Human Beta-actin PCR primer-Taqmanprobe seti (Primer Design)
- RNeasy Mini Kit (Qiagen)

- Q-PCR Master Mix (Qiagen)
- RT² First StrandcDNASynthesis Kit (Qiagen)

3.1.2. Kullanılan Gereçler

- Karbondioksitli İnkübatör (Nüve)
- Laminar Akım Kabini (Nüve)
- Su Banyosu (Memmert)
- Otoklav (Nüve)
- İnvirt Mikroskop (Optika)
- Soğutmalı Santrifüj (Nüve)
- Derin Dondurucu (Nüve)
- Buzdolabı (Ariston)
- Şarjlı pipet (Ependorf)
- Saf su Cihazı (Millipore)
- UV VisibleSpektrofotometre (Epoch)
- Real-Time PCR (Roche)
- Hassas Terazı (Sartorius)
- Sıvı Nitrojen Tankı (Arpege)
- Mikropipetler (Eppendorf)

3.2. Yöntem

3.2.1. Deney Grupları

1. Kontrol grubu
2. 160 µl Resveratrol uygulanan grup (R160)
3. 80 µl Resveratrol uygulanan grup (R80)
4. 40 µl Resveratrol uygulanan grup (R40)
5. 20 µl Resveratrol uygulanan grup (R20)

6. 20 µl APAP +160 µl Resveratrol uygulanan grup (APAP+R160)
7. 20 µl APAP + 80 µl Resveratrol uygulanan grup (APAP+R80)
8. 20 µl APAP + 40 µl Resveratrol uygulanan grup (APAP+R40)
9. 20 µl APAP + 20 µl Resveratrol uygulanan grup (APAP+R20)
10. 20 µl APAP uygulanan grup

3.2.2. Hücre Kültürü

Mevcut çalışmada Amerikan Hücre Kültür Koleksiyonu (ATCC) hücre bankasından ticari yollar ile temin edilen Hep3B (ATCC-HB-8064) Human hepatoma hücre hattı kullanılmıştır. Hep3B hepatosellülerkarsinoma hücreleri için besi ortamı, inaktive edilmiş %10 FBS, 100 IU/ml penisilin/Streptomycin solüsyonu içeren DMEM medyumunu kullanılmıştır. Hücreler bu besi ortamını içeren 75 cm²'lik hücre flaklarında, %5 CO₂ ve nem içeren inkübatörde 37°C'de bekletildi ve 2 günde bir rutin pasajlar yapılarak üretildi.

3.2.2.1. Hücre Soylarının Başlatılması

Sıvı azot içerisinde bekletilen hücrelerin içinde bulunduğu vial'ler çözünme işlemi gerçekleşinceye dek 37°C'ye kadar ısıtılmış benmari içerisinde tutuldu. Çözünen hücreler %10'luk FBS içeren medyuma alındı ve 1500 rpm'de 3 dksantrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, oluşan pelet medyum ile çözülerek flaklara ekimler yapıldı. Flaklar üzerine gerekli bilgiler kaydedildikten sonra inkübasyon amacıyla %5 CO₂ içeren inkübatörler içerisinde yerleştirildi.

3.2.2.2. Hücrelerin Büyütülmesi

Hücreler, 5ml medyumda 25 cm²flaklarda, içerisinde 0,2 mM L-glutamin ve %10 FBS içeren DMEM medyumunu içerisinde %80 konfluense ulaştıklarında haftada 2 kez olmak kaydıyla rutin olarak pasajlandı.

3.2.2.3. Hücrelerin Pasajlanması

Flasklar içerisindeki hücreler %80 konfluent olduğunda pasajlama işlemlerine geçildi ve flastaki medyum uzaklaştırıldı. Ardından, pasteur pipeti ile 2-3 ml steril PBS alınarak flaska aktarıldı ve hücreler yıkandı. PBS uzaklaştırıldıktan sonra yine pasteur pipeti yardımıyla yüzeyi kaplayacak kadar Trypsin-EDTA flaska ilave edildi ve 3 dk süreyle CO₂ inkübatöründe bekletildi. Mikroskopta hücrelerin ayrılması izlendikten sonra Trypsin-EDTA üzerine 2-3 ml medyum ilave edilerek tripsinin etkisi bloke edildi ve 15 ml'lik santrifüj tüpüne süspansiyon halinde toplanan hücreler 1500 rpm'de 3 dk santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Son olarak 5 ml medyumla süspansiyon edilen hücreler 5 ayrı flaska 1'er ml olacak şekilde dağıtıldı ve toplam hacim DMEM ile 5 ml'ye tamamlanarak CO₂ inkübatörüne yerleştirildi. Medyum değiştirme haftada 2 kez yapıldı.

3.2.2.4. Hücre Sayımı

Toplam hücre süspansiyonunun mililitresindeki hücre sayısını hesaplamak için, Thoma lamları kullanılmıştır. Canlı ve ölü hücreleri ayırt etmek için 10 ul hücre süspansiyonu 10 ul trypanblue (1:1 dilüsyon oranında) ile 3 dk oda ısısında inkübe edildi. Ölü hücreler mavi renge boyanırken, canlı hücreler renksiz olarak görüldü. Süspansiyon mililitresindeki toplam hücre sayısı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Toplam hücre sayısı} = \frac{\text{Ortalama sayılan Hücre sayısı} \times \text{Lamin büyütme Seyreltme oranı}}{\text{oranı}}$$

4

3.2.2.5. Hücrelerin Dondurulması

Hücreler %80 konfluent olduklarında, içerisindeki medyum uzaklaştırıldı. Pasteur pipeti yardımıyla 2-3 ml PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildi ve yüzeyi kaplayacak kadar Trypsin-EDTA eklenerek 3 dk inkübatörde bekletildi. Mikroskopta hücrelerin yüzeyden kalktıkları gözlemlendikten sonra tripsinin etkisini bloke etmek

amacıyla medyum eklendi ve süspansiyon 15 ml'lik santrifüj tüpüne toplanarak 1500 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılıp üzerine %20 DMSO ve %40 FBS içeren freze-medyum eklendi. Saklama tüpleri ilk olarak bir gece -20 °C'de ve 1 gece -80 °C'de bekletildikten sonra sıvı nitrojen içerisine alındılar. Tüpteki son konsantrasyonlar $2,5 \times 10^6$ hücre/ml olarak hesaplanarak dondurma işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. Resveratrol ve Parasetamol Dozlarının Uygulanması

Hücrelerin toplanması aşamasında flasklardaki medyum döküldü ve üzerine Trypsin-EDTA eklenerek 3 dk inkübatörde bekletildi. Mikroskopta hücrelerin yüzeyden kalkışları tespit edildikten sonra tripsinin etkisini bloke etmek amacıyla 2-3 ml medyum eklendi. Ardından, 15 ml'lik santrifüj tüplerine toplanan hücre süspansiyonu 1500 rpm'de 3dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Hücrelerin üzerine taze medyum eklenerek sayım işlemlerinin gerçekleştirilmesinin ardından 6 kuyucuklu kültür kaplarına (6-well plate) her kuyucuğa tamamı canlı 1.000.000 Hep3B hücresi ekildi. Ticari olarak temin edilen asetaminofen (APAP-Parasetamol) medyum içerisinde çözdürülerek 20 µl olacak şekilde kontrol kuyucuğu hariç tüm deney gruplarına ilave edilmiştir. 1 saatlik inkübasyonun ardından, doğal bir polifenol bileşik olan resveratrol, 20; 40; 80; 160 µM konsantrasyonlar'da olacak şekilde medyum içerisinde çözdürülmüş taze çözeltileri 100'er µl'lik eşit hacimlerde hücrelere verilmiştir. Her bir resveratrol dozu için 3 farklı kuyucuğa ekim işlemleri gerçekleştirilmiştir. Tüm gruplar için 24 ve 48 saatlik ekimler yapılarak hücreler takip edildi. Ekimleri takip eden 24. ve 48. Saatlerde kuyucuklarda bulunan hücreler tekrar trypsin ile muamele edilerek toplandı ve santrifüjlendi. Süpernatant atıldıktan sonra 1 ml medyum ile süspansiyon haline getirilerek sayım işlemleri gerçekleştirildi.

3.2.4. MTT Hücresel Canlılık Analiz Deneyi

MTT Hücresel Canlılık Analiz Deneyin'de Sarı tetrazolium tuzu canlı hücrelerin mitokondrilerindeki dehidrogenaz enzimleri aracılığı ile tetrazolium halkasının kırılması sonucu formazan kristallerine dönüştürülür. Oluşan formazan kristalleri izopropanol ve DMSO gibi çözücülerde çözülmesi sonucu ortamda oluşan renk, spektrofotometrik yöntemle ölçülür ve ölçülen değer canlı hücrelerin sayısı ile ilişkilidir.

Bir falkon tüpe 2 ml %10 FBS içeren DMEM koyuldu ve üzerine 100.000/ml hücre eklendi. İyi bir şekilde pipetaj yapıldıktan sonra 96 kuyucuklukmikroplağın 20 kuyucuğunun her birine bu süspansiyondan 100 µl eklendi. Mikroplak 37°C' de %5 CO₂'li inkübatörde 48 saat kültüre olması için inkübasyona bırakıldı.

48 saat boyunca her 24 saatte bir kültürün yüzey kaplaması mikroskopta bakılarak gözlemlendi. 48 saatlik inkübasyon sonucunda önce parasetamol ve takiben farklı konsantrasyonlardaki resveratrol maddesi kuyucuklara eklendi. Hücresiz olarak medyum ile ilacın etkileşiminin değerlendirilebilmesi için, yine 20 kuyucuğa medyum ile parasetamol ve farklı konsantrasyonlardaki resveratrol miktarları eklendi. Aynı şekilde hücresizmikroplak da 37°C' de %5 CO₂'li inkübatörde 48 saat inkübasyona bırakıldı. Mikroplağın 24 saatlik inkübasyonundan sonra, 25 µg MTT/50 µl hazırlandı ve hücreli ve hücresiz olarak her kuyucuğa hazırlanan MTT solüsyonundan 50 µl eklendi. Mikroplak tekrar 37 °C' de %5 CO₂'li inkübatörde 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda mikroskobik olarak hücreler üzerinde meydana gelen formazan kristallerinin oluşumuna bakıldı. Hücrelerde oluşan formazan kristalleri, hücreli ve hücresiz her bir kuyucuğa 150 µl DMSO eklenerek oda sıcaklığında pipetaj yapılarak çözüldü. DMSO ile kristaller çözüldükten sonra mikroplak ELISA ile 570 nm'de okutuldu. Microsoft Excel programı yardımı ile uygulanan doz ve % hücre

viabilite eğrisi belirlenerek %50 baskılayıcı konsantrasyon (IC50) değeri logaritmik eğim grafiği ile hesaplandı.

3.2.5. Biyokimyasal Analizler

İnkübasyon işlemlerini takiben, hücre süspansiyonu 15 ml'lik santrifüj tüpüne toplanarak 1500 rpm'de 3 dk santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atıldı. 5 ml taze medyum ile sulandırılan hücre süspansiyonundan alaninaminotransferaz (ALT) ve aspartataminotransferaz (AST) karaciğer enzim seviyeleri otomatik biyoanalizör cihaz tarafından ölçüldü.

3.2.5.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini

SOD enzim aktivitesi Sun ve Oberley'in⁸⁴ geliştirdiği yöntemin modifiye edilmesi sonucu yapıldı. Bu metod, ksantin-ksantin oksidaz ile oluşan süperoksitlerin SOD tarafından kullanılarak, nitroblue tetrazolium (NBT)'dan mor renkli formazan boyası oluşumunun engellenmesi esasına dayanır. Ortamdaki SOD aktivitesi ne kadar yüksek ise ortamdaki o kadar çok süperoksit radikali kaldırılacağı için reaksiyondan sonra oluşan rengin şiddetinde azalma gözlenir. Reaksiyon sonucu oluşan renkli bileşiğin absorbansı 560 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür. Hesaplamalara göre % inhibisyon cinsinden yapıldı.

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{A_{Kör} - A_{numune}}{A_{Kör}} \times 100$$

3.2.5.2. Katalaz (CAT) Aktivite Tayini

CAT enzim aktivitesini belirlemede Aebi⁸⁵ yöntemi modifiye ederek kullanıldı. Bu yöntemin temeli H₂O₂'nin enzimatik bozulması sonucu 240 nm'de absorbanstaki düşüşün takip edilmesine dayanır.

Ölçümlerde lineer olarak absorbans azalması olan aralıktan dakika başına absorbans azalması hesaplandı. Işık yolu (b)= 10mm, azalma katsayısı ($\epsilon_{H_2O_2}$), 0,00394 ($\text{mmol}^{-1} \times \text{mm}^{-1}$) alınarak $A = \epsilon \cdot b \cdot c$ formülünden 240 nm'de, dakikada 1 mmol H₂O₂'nin

harcanmasını sağlayan enzim miktarı (=EÜ) hesaplandı. Bütün aktiviteler bu formülde yerine konulan absorbans değerlerinden hesaplandı. CAT aktivitesi, dilüsyon faktörleri dikkate alınarak mmol/dakika/mg doku olarak tarif edildi. Deneyler 3 paralel tekrar halinde yapıldı.

3.2.5.3. Total Glutatyon (GSH) Miktar Tayini

Hep3B hücre kültürü süpernatantlarında bulunan GSH miktarının belirlenebilmesi amacıyla ticari olarak temin edilen ELISA kiti (Elabscience) kullanıldı. Üretici firma protokolleri doğrultusunda gerçekleştirilen deneylerin ardından, ELISA pleyti ELISA okuyucusunda 560nm dalga boyunda okutularak absorbans değerleri elde edildi. Ölçülen absorbans değerlerinin analizleri gerçekleştirilerek tüm gruplara ait GSH miktarları belirlendi ve ilgili grafikler Microsoft Excel yardımı ile çizildi.

3.2.6. RNA İzolasyonu

- Total RNA İzolasyonu RNeasy Mini Kit (Qiagen) kullanılarak gerçekleştirildi.
- Medyum uzaklaştırıldıktan sonra, 3 ml PBS ile hücreler yıkandı ve ardından PBS pasteur pipetleri yardımıyla ortamdaki uzaklaştırıldı.
- Hücrelerin üzerine 350 µl RLT (10 µl/ml Beta-merkaptotanol içeren) tamponu pipetlendi ve hücre kazıyıcı ile hücreler toplanarak 1.5 ml tüpe alındı.
- Hücre süspansiyonu 20 gauge (0.9 ml çaplı) enjektörden 5-6 kez geçirilerek homojenize edildi.
- Ardından, 350 µl %70 etanol eklendi ve pipetlenerek karıştırıldıktan hemen sonra kolona transfer edildi. 700 µl RW1 tamponu eklendi, 8000 rpm'de 15 sn santrifüjlendi ve sıvı kısım uzaklaştırıldı.
- Kolon yeni bir toplama tüpüne aktarıldı ve maksimum hızda (12.000 rpm) 1 dk santrifüjlendi.

- Kolon 1.5 l tüpe aktarıldı ve 40 µl RNase-free su, pipetin ucu kolondaki membrana temas ettirilmeden eklendi, 1 dk beklendi ve 8000 rpm'de 1 dksantrifüjlendi.
- RNA konsantrasyonu ve saflığı ThermoNano-Drop yardımı ile spektrofotometrik olarak ölçüldü (A_{260}/A_{230} ve A_{260}/A_{280}).

3.2.7. cDNA Sentezi

- Her bir RNA örneği için genomik DNA eliminasyonu karışımı hazırlandı ve 42°C'de 5 dkinkübe edildikten sonra hemen buz üzerine alınarak 1 dk bekletildi.

○ Karışım:	RNA	: 2 µg
	GE Tamponu	: 2 µl
	Su	: değişken
	Toplam hacim	: 10 µl

- Ters transkriptaz karışımı hazırlandı.

○ Karışım (1 reaksiyon için):	5x BC3 tamponu	: 4 µl
	Control P2	: 1 µl
	RE3 ters transkripsiyon tamponu	: 2 µl
	RNase-free su	: 3 µl
	Toplam hacim	: 10 µl

- 10 µl GE karışımın üzerine 10 µl ters transkriptaz karışımı eklendi ve pipetlenerek karıştırıldı.
- 42°C'de 15 dakika inkübe edildikten sonra reaksiyon 95°C'de 5 dkinkübasyon ile durduruldu ve örnekler buz üzerine alındı.

3.2.8. Kantitatif PCR (Q-PCR)

- Reaksiyon karışımı hazırlandı.

○ Karışım:	Primer	: 1 µl
-------------------	--------	--------

RNase-free su	: 7 µl
cDNA	: 2 µl
Hidroliz probe enzimi:	10 µl
Toplam hacim	: 20 µl

- Çalışmada kullanılan gen bölgelerine ait primer diziler Tablo3.1'de detaylı şekilde verilmiştir.
- Reaksiyon koşulları:
 - Pre-inkübasyon : (1 siklus) 95°C'de 10 dk
 - Amplifikasyon : (45 siklus) 95°C'de 10 sn
 - 60°C'de 30 sn
 - 72°C'de 1 sn (FAM)
 - Cooling : (1 siklus) 40°C'de 30 sn

Tablo 3.1. PCR çalışması için kullanılan primer dizileri

Primerler	Forward	Reverse
TF-alfa	5'-CCAGGAGAAAGTCAGCCTCCT-3'	5'-TCATACCAGGGCTTGAGCTCA-3'
IL-6	5'-CGAAAGTCAACTCCATCTGCC-3'	5'-GGCAACTGGCTGGAAGTCTCT-3'
β-aktin	5'- GCAAGCAGGAGTATGACGAG -3'	5'- CAAATAAAGCCATGCCAATC-3'

3.2.9. İstatistiksel Yöntem

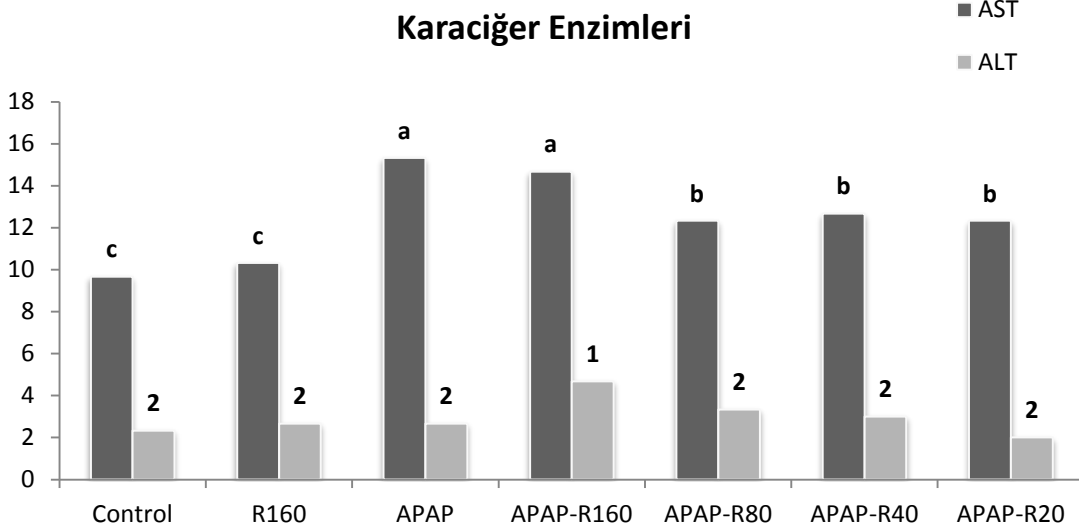
Yapılan deneylerden elde edilen verileri değerlendirmede SPSS 20.0 (IBM, New York, ABD) istatistik programı kullanıldı. Gruplar arası farkın anlamlılığını değerlendirmede one-way ANOVA, Tukey ve Duncan's Multiplerange analiz testleri kullanıldı. Anlamlılık sınırı $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 Resveratrol ve Parasetamol'ün Karaciğer Enzimleri Üzerine Olan Etkisi

Çalışmamızda yer alan deney gruplarında uygulanan parasetamol ve resveratrol maddelerinin Hep3B hücrelerinde AST ve ALT enzim aktiviteleri üzerine olan etkilerini araştırılmıştır. Elde edilecek veriler ile parasetamol'ün karaciğer enzimlerinde artışa sebep olarak karaciğer hasarına sebep olup olmadığı, resveratrol 'ün ise bu aktiviteler üzerinde değişiklik oluşturup oluşturmadığı araştırılmıştır.

Elde edilen veriler incelendiğinde, Şekil 4.1.'de de görüldüğü üzere ALT enzimi aktivitesinde gruplar arasında farklılık saptanmamıştır. Kontrol grubu ile mukayese edildiğinde diğer deney gruplarına ait ALT aktiviteleri (APAP+R160 grubu hariç) arasında istatistiksel açıdan bir fark tespit edilememiştir ($p>0.05$). Ancak APAP+R160 grubuna ait karaciğer ALT aktivitesi ile diğer tüm gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık ortaya çıkmıştır ($p<0.05$). Diğer taraftan, karaciğer AST aktiviteleri bu fikri biraz daha doğrulamaktadır. Kontrol grubu, R160 grubu, APAP+R80 grubu, APAP+R40 ve APAP+R20 grupları AST enzim aktivitesi bakımından birbirleri ile karşılaştırıldıklarında anlamlı farklılık olmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$). Ancak parasetamol uygulamasının karaciğerde AST enzim aktivitesinde yükselmeye sebep olduğu ve buna ilaveten yüksek doz resveratrol uygulamasında aynı şekilde AST aktivitesinde ciddi yükselmeye sebep olduğu tespit edilmiştir ($p>0.05$). Şekilde yer alan harf ve rakamlar gruplar arasındaki anlamlılığı ifade etmektedir.

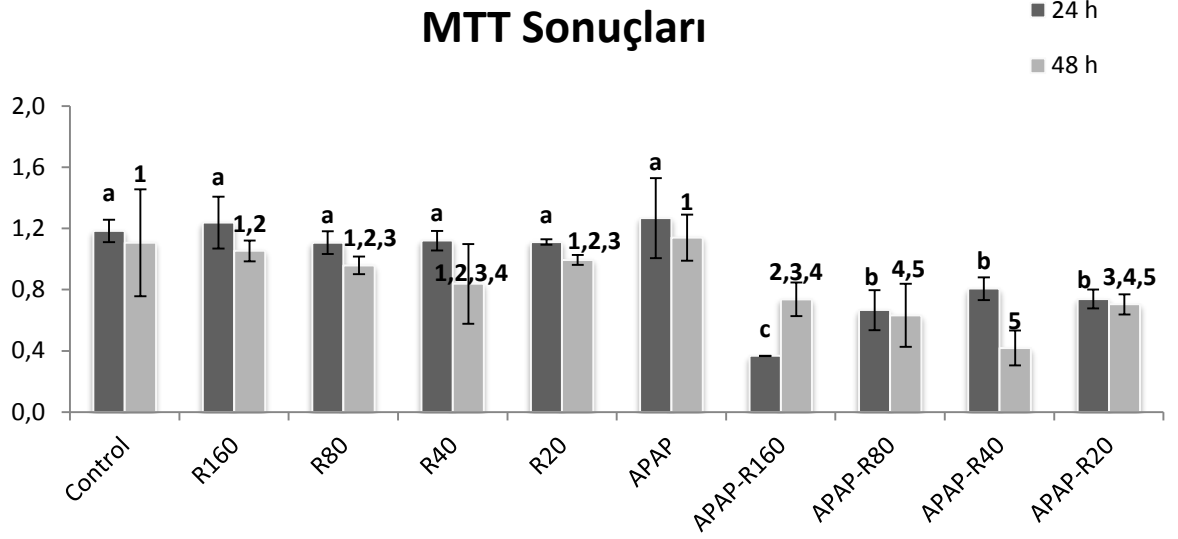


Şekil 4.1. Resveratrol ve Parasetamol'ün AST ve ALT aktiviteleri üzerine olan etkileri

4.2. Resveratrol ve Parasetamol'ün Hep3B Hücrelerine *invitro* Etkisi

Gerçekleştirdiğimiz hücre kültürü çalışmalarından elde edilen hüresel canlılık analiz sonuçları detaylı şekilde Tablo 4.2'de ve Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde deney grupları arasında hücre canlılıkları bakımından istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler tespit edilmiştir. 24 saatlik MTT test sonuçlarına göre; Kontrol grubuna ait canlılık analiz sonuçları ile yalnızca resveratrol uygulanan gruplara ait canlılık analiz sonuçları arasında anlamlı fark görülmemiştir ($p>0.05$). Diğer deney gruplarına göz atıldığında, parasetamol uygulamasının canlı hücre sayısında kontrol ve yalnızca resveratrol uygulanan gruplarına kıyasla ciddi derecede azalmaya sebep olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). Buna ilaveten; parasetamol ile beraber resveratrol uygulanan gruplardaki canlı hücre sayısı kontrol grubuna kıyasla daha az olarak tespit edildi. Şekil 5 ve Tablo 2'de de karaciğer enzim sonuçları verilmiştir. Parasetamol uygulanan grupların içerisinde en az canlı hücre APAP+R160 grubunda tespit edilmiştir. Bu durumda, yüksek doz (160 μ M) resveratrol canlı hücre sayısı üzerine ciddi derecede etki etmiş ve kontrol ve diğer tüm deney grupları ile

kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı derecede canlı hücre sayısını azaltmıştır ($p<0.05$).



Şekil 4.2. Tüm deney gruplarına ait canlılık analiz test sonuçları

MTT hücre canlılık analiz testinden elde edilen 48 saatlik veriler değerlendirildiğinde; 24 saatlik verilere paralel sonuçlar tespit edilmiştir. Kontrol grubu ile resveratrol uygulanan gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmazken($p>0.05$), parasetamol-resveratrol uygulanan gruplar ile kontrol grubu arasında anlamlı bir azalma tespit edilmiştir ($p<0.05$). Sonuç olarak, parasetamol'ün canlı hücreler üzerinde toksik etki yaratmasının yanı sıra yüksek doz resveratrol uygulaması da aynı şekilde canlı hücre sayısında ciddi azalmalara sebebiyet vermektedir.

Tablo 4.2. Tüm deney gruplarına ait 24 ve 48 saatlik canlılık analiz testi sayısal verileri

	24 saat			48 saat		
	Ortalama	SD	Grup	Ortalama	SD	Grup
Kontrol	1,184	0,074	a	1,106	0,349	1
R160	1,238	0,170	a	1,053	0,068	1,2
R80	1,107	0,074	a	0,958	0,058	1,2,3
R40	1,121	0,064	a	0,838	0,260	1,2,3,4
R20	1,111	0,018	a	0,994	0,033	1,2,3
APAP	1,267	0,261	a	1,140	0,150	1
APAP-R160	0,367	0,002	c	0,737	0,110	2,3,4
APAP-R80	0,667	0,131	b	0,632	0,206	4,5
APAP-R40	0,807	0,074	b	0,418	0,114	5
APAP-R20	0,739	0,061	b	0,704	0,065	3,4,5

a-c; 24 saatlik MTT sonuçları arasındaki istatistiksel farkı gösterir.

1-5; 48 saatlik MTT sonuçları arasındaki istatistiksel farkı gösterir.

4.3. Resveratrol Uygulamasının SOD Aktivitesi Üzerine Olan Etkileri

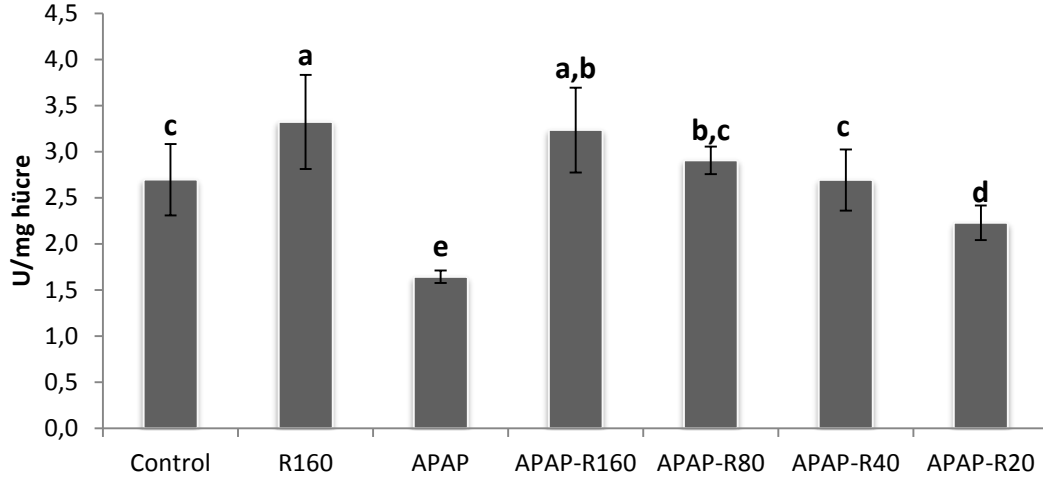
Tüm deney gruplarına ait süper oksit dismutaz (SOD) aktivite sonuçları incelendiğinde, bazı gruplar arasında anlamlı artış ve azalışların olduğu tespit edilmiştir. Parasetamol uygulanan deney grubuna ait SOD aktivitesi tüm deney gruplarından anlamlı derecede farklı ve en düşük düzeyde seyretmekteydi ($p<0.05$). Bu durumun aksine, yüksek doz resveratrol uygulanan gruba ait SOD aktivitesinde ise kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı derecede artış tespit edilmiştir ($p<0.05$). Parasetamol uygulaması ile azalan SOD aktivitesini, farklı dozlarda uygulanan resveratrol'ün yükselttiği tespit edilmiştir (Şekil 4.3). Resveratrol'ün 20, 40, 80 ve 160 μM 'lık dozları, parasetamol ile en düşük seviyesinde bulunan SOD aktivitesini kademeli ve anlamlı olarak yükseltmiştir (Tablo 4.3) ($p<0.05$).

Tablo 4.3. Deney gruplarına ait SOD aktivitesinin sayısal verileri

	Değer	SD	SE
Kontrol	2,697	0,386	0,158
APAP	1,644	0,067	0,027
APAP+R20	2,229	0,188	0,077
APAP+R40	2,693	0,330	0,135
APAP+R80	2,907	0,148	0,060
APAP+R160	3,236	0,461	0,188
R160	3,324	0,510	0,208

Tüm verilere ilaveten, yalnızca yüksek doz uygulanan resveratrol grubu ile APAP ile beraber uygulanan yüksek doz resveratrol grubuna ait SOD aktivitesi bakımından anlamlı farklılık tespit edilmemiştir. Ancak bu iki grubun, kontrol grubu ile kıyaslandıklarında istatistiksel olarak önemli bir artışa sahip oldukları tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Hep3B hücrelerinde SOD Aktivitesi



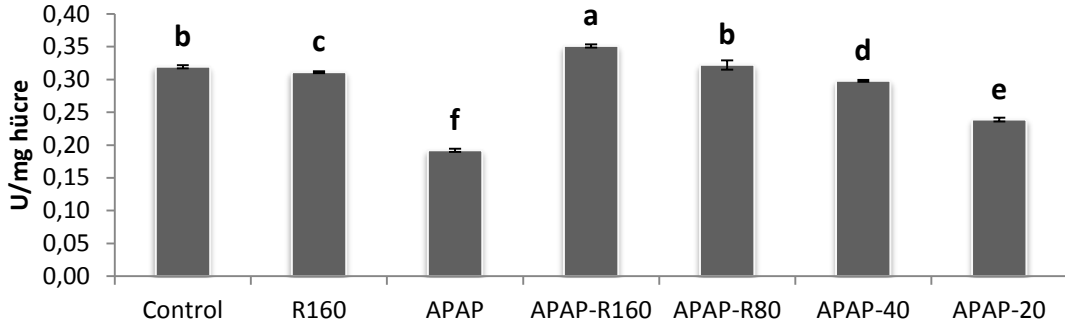
Şekil 4.3. Parasetamol ve Resveratrol uygulamalarının SOD aktivitesi üzerine olan etkileri

a-e; Tüm deney grupları arasındaki SOD Aktivitesi bakımından istatistiksel farkı gösterir.

4.4 Resveratrol Uygulamasının KAT Aktivitesi Üzerine Olan Etkileri

Tüm deney gruplarına ait katalaz (KAT) aktivite sonuçları incelendiğinde, yine SOD verilerine benzer şekilde bazı gruplar arasında anlamlı artış ve azalışların olduğu tespit edilmiştir. Parasetamol uygulanan deney grubuna ait KAT aktivitesi tüm deney gruplarından anlamlı derecede farklı ve en düşük düzeyde seyretmekteydi ($p<0.05$). Parasetamol uygulanan gruba ait katalaz aktivitesi kontrol grubuna ait aktivitenin neredeyse yarısı kadar azalmıştır ($p<0.05$). Ancak, diğer deney grupları incelendiğinde, resveratrol uygulanan gruplara ait katalaz aktivite değerlerinde doza bağımlı olarak ve istatistiksel açıdan anlamlı derecede artış tespit edilmiştir (Şekil 4.3) ($p<0.05$). En ciddi artış yüksek doz (160 μ M) resveratrol uygulanan grupta saptanırken, en düşük artış düşük doz (20 μ M) resveratrol uygulanan grupta saptanmıştır. Tüm deney gruplarına ait katalaz aktivitesi değerleri, standart hata ve sapmalar Tablo 4.4'de ayrıntılı şekilde verilmiştir.

Hep3B hücrelerinde KAT Aktivitesi



Şekil 4.4. Parasetamol ve Resveratrol uygulamalarının KAT aktivitesi üzerine olan etkileri

a-e; Tüm deney grupları arasındaki KAT Aktivitesi bakımından istatistiksel farkı gösterir.

Deney gruplarından yalnızca Kontrol grubu ve APAP+R80 arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Ancak, bunun dışındaki tüm deney grupları hem kendi içinde hem de kontrol grubu ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel olarak anlamlı derecede artmış veya azalmıştır.

Tablo 4.4. Deney gruplarına ait KAT aktivitesinin sayısal verileri

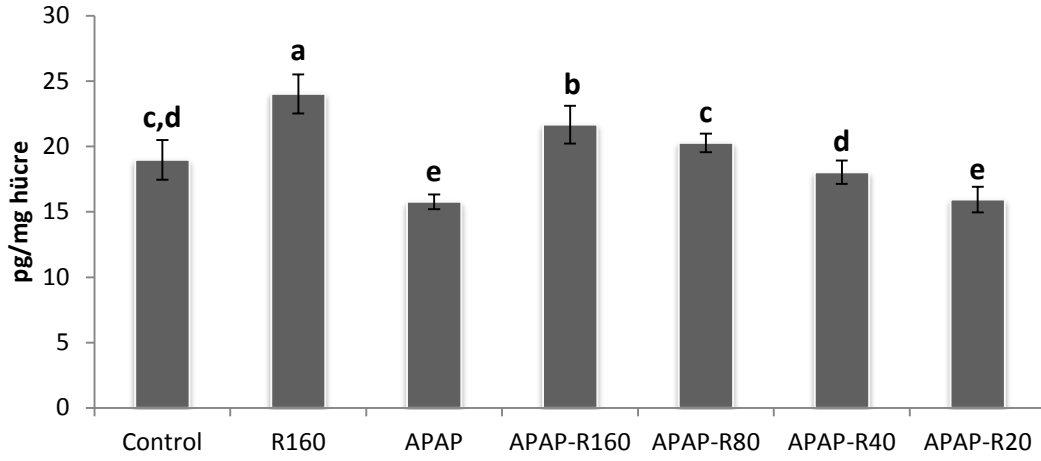
	Değer	SD	SE
Kontrol	0,3195	0,0024	0,0010
APAP	0,1920	0,0025	0,0010
APAP+R20	0,2390	0,0030	0,0012
APAP+R40	0,2982	0,0015	0,0006
APAP+R80	0,3223	0,0071	0,0029
APAP+R160	0,3510	0,0025	0,0010
R160	0,3112	0,0016	0,0007

4.5. Resveratrol Uygulamasının Total Glutasyon (GSH) Miktarı Üzerine Olan Etkileri

Parasetamol ile indüklenmiş karaciğer toksisitesinde GSH miktarı üzerine resveratrol'ün etkilerini değerlendirdiğimizde, yine SOD ve KAT aktivitelerinde olduğu şekilde APAP uygulaması yapılan gruba ait değerler kontrol grubu ile kıyaslandığında ciddi derecede azaldığını tespit ettik (Şekil 4.5) ($p<0.05$). SOD ve KAT sonuçlarından

elde edilen verilerin aksine resveratrol uygulanan toksisite gruplarındaki GSH seviyelerinde doza bağlı bir artış tespit edilmemiştir. APAP+R20 grubuna ait GSH değeri ile yalnızca APAP uygulanan grup arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ($p>0.05$). Bunun yanı sıra kontrol grubu ile APAP+R40 ve APAP+R80 arasında da anlamlı bir artış veya azalış tespit edilmemiştir ($p>0.05$). Ancak, parasetamol uygulanan gruba ait GSH seviyeleri kontrol grubu ile kıyaslandığında ciddi derecede düşük bulunmuştur ($p<0.05$).

Hep3B hücrelerinde GSH Aktivitesi



Şekil 4.5. Parasetamol ve Resveratrol uygulamalarının GSH aktivitesi üzerine olan etkileri

a-e; Tüm deney grupları arasındaki GSHAktivitesi bakımından istatistiksel farkı gösterir.

GSH seviyesi en yüksek R160 uygulanan grubunda, en düşük ise APAP uygulanan grupta tespit edilmiştir. Doza bağlı bir artış olmasa da APAP+R20 uygulanan grup dışında ki resveratrol gruplarının (R40, R80 ve R160) GSH düzeylerinde APAP grubuna kıyasla anlamlı derecede yükselme tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Tablo 4.5. Deney gruplarına ait GSH seviyesinin sayısal verileri

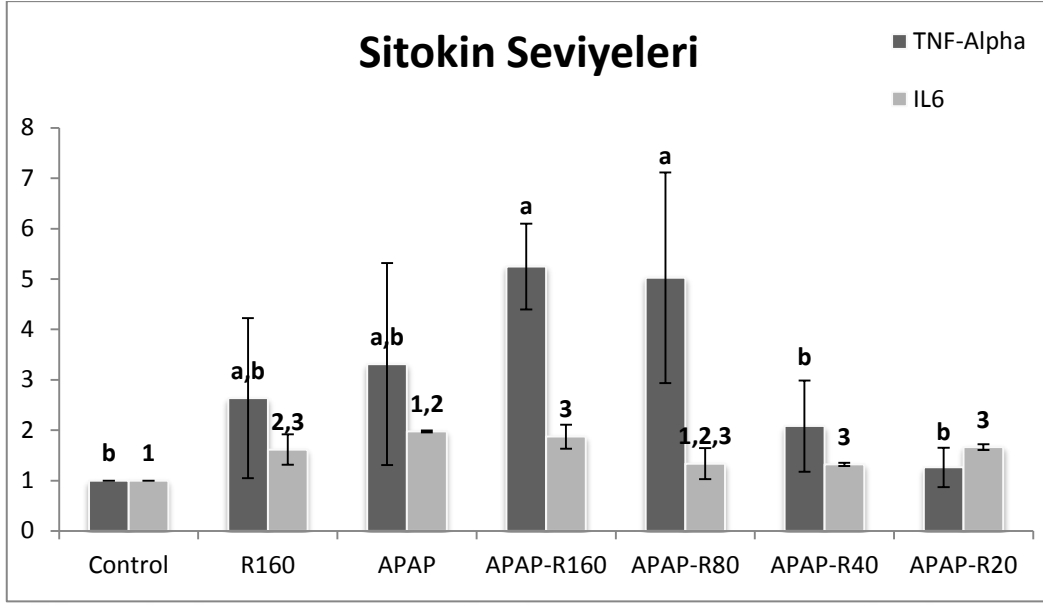
	Değer	SD	SE
Kontrol	18,971	1,517	0,619
APAP	15,773	0,560	0,229
APAP+R20	15,948	0,979	0,400
APAP+R40	18,034	0,901	0,368
APAP+R80	20,270	0,711	0,290

APAP+R160	21,676	1,444	0,589
R160	24,032	1,497	0,611

4.6. Resveratrol Uygulamasının Pro-İnflamatuvar Sitokinler Üzerine Olan

Etkileri

Mevcut çalışmada resveratrol'ün parasetamol ile indüklenmiş karaciğer toksisitesi üzerine olan anti-inflamatuvar etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu bağlamda pro-inflamatuvar sitokinler olan TNF-alfa ve IL-6 sitokinlerine ait ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır. Real-time PCR metodu uygulanarak elde edilen veriler sonucunda kontrol grubuna ait veriler 1 olarak değerlendirilmiş ve diğer deney grupları kontrol grubu ile kıyaslanarak kat artış grafiği çıkarılmıştır. TNF-alfa sonuçları değerlendirildiğinde, kontrol grubu ile parasetamol uygulanan grup arasında yaklaşık 3 kat artış tespit edilmiştir. APAP grubunda, kontrol grubundan 3 kat daha fazla eksprese olan TNF-alfa; en yüksek ekspresyon seviyesine APAP+R160 grubunda ulaşmıştır. Tüm deney grupları, kontrol grubu ile kıyaslandığında TNF-alfa ekspresyon seviyesi bakımından ciddi bir artışa sahiptir (Şekil 9). Yüksek doz resveratrol uygulaması da APAP uygulaması gibi TNF-alfa miktarını anlamlı derecede artırmıştır (**p<0.05**). Parasetamol ile beraber uygulanan yüksek doz resveratrol TNF-alfa miktarını daha da artırarak inflamasyon olayını ciddi derecede tetiklemiştir. Ancak diğer resveratrol dozları TNF-alfa miktarını APAP uygulanan gruplarda azaltsa da, kontrol grubuna ait seviyeye indirememiştir. Sonuç olarak, TNF-alfa miktarı yüksek doz resveratrol grubunda ve APAP+R160 grubunda ciddi derecede artarken, diğer resveratrol dozları bu artışı bir nebze geriletebilmiştir. (Şekil 4.6.ve Tablo 4.6.)



Şekil 4.6. Parasetamol ve Resveratrol uygulamalarının TNF-alfa ve IL-6 üzerine olan etkileri
a-b; TNF-alfa yönünden deney grupları arasındaki istatistiksel farkı gösterir.
1-3; IL-6 yönünden deney grupları arasındaki istatistiksel farkı gösterir.

Diğer bir pro-inflamatuvar sitokin olan IL-6'ya ait ekspresyon seviyeleri TNF-alfa ile benzerlik göstermekteydi. Kontrol grubu IL-6 ekspresyon seviyesi bakımından 1 olarak kabul edildiğinde, en yüksek kat artışı hem parasetamol hem de yüksek doz resveratrol uygulanan grupta tespit edilmiştir. Deney grupları birbirleri ile kıyaslandığında da anlamlı derecede artış ve azalışlar tespit edilmiştir. Parasetamol uygulanan grupta beklendiği üzere, kontrol grubuna kıyasla ciddi bir artış tespit edilmiştir ($p<0.05$). Bununla paralel olarak yüksek doz resveratrol uygulaması diğer tüm parametrelerde olduğu gibi IL-6 seviyesinde de toksik etkiye sebebiyet verecek değişikliğe sebep olmuş ve anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$). Hem parasetamol hem de yüksek doz resveratrol uygulanan gruba ait IL-6 ekspresyon seviyesi de diğer iki grup gibi artmıştır. Diğer tüm resveratrol dozlarının uygulandığı gruplar IL-6 seviyesini geriletmiş ancak kontrol grubu seviyesine indirememiştir. Sonuç olarak, yüksek doz resveratrol ve parasetamol IL-6 seviyesini artırır iken, R80, R40 ve R20 uygulanan gruplar IL-6 seviyesini düşürmüştür (Şekil 4.6ve Tablo 4.6).

Tablo 4.6.Tüm deney gruplarının TNF-alfa ve IL-6 ekspresyon seviyelerine ait kat artışı

		Mean	Std. Dev.	DUNCAN
TNF - α	Kontrol	1,0000	0,0000	b
	R160	2,6353	1,5886	a,b
	APAP	3,3125	2,0027	a,b
	APAP-R160	5,2487	0,8499	a
	APAP-R80	5,0259	2,0930	a
	APAP-R40	2,0810	0,9057	b
	APAP-R20	1,2621	0,3908	b
	IL6	Kontrol	1,0000	0,0000
R160		1,6168	0,3005	2,3
APAP		1,9765	0,0204	1,2
APAP-R160		1,8711	0,2360	3
APAP-R80		1,3356	0,3094	1,2,3
APAP-R40		1,3212	0,0309	3
APAP-R20		1,6647	0,0546	3

5. TARTIŞMA

Mevcut çalışmada, parasetamol ile indüklenmiş in vitro hepatotoksisite modelinde ortaya çıkan inflamatuvar ve oksidatif stres parametreleri üzerine, doğal bir polifenol bileşik olan resveratrol'ün önleyici etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, Hep3B insan hepatoma hücrelerinde yüksek doz parasetamol ile karaciğer hasarı oluşturulmuş ve ardından resveratrol uygulaması ile bu hasarda devreye giren TNF-alfa, IL-6, SOD, KAT ve GSH gibi immünolojik ve biyokimyasal parametrelerdeki değişiklikler tespit edilmiştir.

Parasetamol uygun dozlarda alındığında çok az yan etkileri olan, ülkemizde ve dünya çapında yaygın olarak kullanılan analjezik ve antipiretik bir ilaçtır.⁸⁹ Parasetamol'ün kişi başına düşen yıllık tüketim miktarının 8 gramdan az olmasının önerilmesine rağmen bazı ülkelerde (ABD, İngiltere, Kanada, Avustralya ve Yeni Zelanda) bu oran kişi başı 20 gramın üzerine çıkabilmektedir.^{90,91} Tüketim miktarının yüksek olması ve kolay erişilebilir bir ilaç olması nedeniyle organ toksisitesi oluşma riski de oldukça yüksektir. Uygun ve tedavi edici dozlarda tüketildiğinde gayet ideal bir ilaç profiline sahiptir, fakat supratherapötik dozlarda kullanıldığında ciddi hepatotoksisiteye ve hatta ölümcül karaciğer yetmezliğine neden olabilmektedir. Terapötik dozlarda parasetamol, glukronil transferaz enzimi tarafından glukuronik aside çevrilir (%60), sülfonil transferaz enzimi tarafından ise sülfirik aside çevrilir (%35) veya sisteine dönüştürülüp idrar ile atılır.⁹² Vücuda alınan parasetamol'ün %2'si ise idrarla değişmeden atılır. Yine de küçük bir miktar parasetamol sitokrom P-450 enzimi tarafından N-Acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI)'ya metabolize olur. Bu metabolit ilk olarak GSH'yı tüketir ardından mitokondriyal proteinleri de içeren bir takım hücresel proteinlere bağlanır ve bu bağlanmalar da karaciğer hasarını başlatır.⁹³ Bu hücresel olayların sonucunda, ATP'nin tüketimi ve mitokondriyal oksidatif stres

olayları gözlemlenmektedir. ATP tüketimi hepatositler ve sinüzoidal endotelial hücrelerde, selülonkotik nekroza yol açar.¹¹

Genelde yüksek doz parasetamol alınınsan sonra fulminan karaciğer toksisitesi meydana gelmektedir. Bu hasarın göstergesi olarak, karaciğer transaminazlarının (AST ve ALT) yüksekliği gösterilebilir. Bu enzimlere ait değerlerin yükselmesi parasetamol ile indüklenmiş karaciğer hasarının gösterilme anlamına gelmektedir. Aynı zamanda bu yükselme, hücre zarının fonksiyonel bütünlüğünün bozulduğunu göstermektedir.⁹⁴ Yapılan konu ile alakalı diğer bilimsel çalışmalarda da parasetamol'un karaciğer AST ve ALT enzim aktivitelerinde yükselmelere sebep olduğunu göstermiştir.^{95,96} Hem deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda hem de invitro çalışmalarda parasetamol'un karaciğer enzim aktivitelerinde anlamlı seviyelerde yükselmelere sebep olduğu tespit edilmiştir.⁹⁷ Mevcut çalışmamızda da, parasetamol uygulamasının karaciğer hücreleri üzerinde toksik etkiye sebep olup olmadıklarını anlayabilmek için karaciğer AST ve ALT enzim aktiviteleri araştırılmıştır. Elde edilen veriler, parasetamol uygulanan gruplarda kontrol grubuna nazaran istatistiksel olarak daha yüksek olduğunu göstermekteydi ve bu durum da çalışmamızda planladığımız hepatotoksisite modelinin oluştuğunu bize göstermekteydi. Bulgular kısmında da belirtildiği gibi, resveratrol uygulaması yapılan gruplarda ki AST ve ALT seviyelerinin parasetamol uygulanan gruba nazaran gerilediği ve kontrol grubuna yaklaştığı mevcut çalışmada tespit edilmiştir. Sonuç olarak, AST ve ALT aktivitelerindeki bu artış parasetamol'un toksik dozunun P-450'ye bağlı hepatotoksisiteye sebep olduğunun bir işaretidir.⁹⁸ Bu enzimlerin aktivitelerindeki artışı önlemesi resveratrol'un enzimatik düzeyde hepatoprotektif etkisinin primer kanıtıdır. Bununla paralel olarak Anundi ve arkadaşları⁹⁹, yüksek doz parasetamol uygulaması ile hücre kültüründe periportal ve perivenöz hepatotoksisiteyi görmüşlerdir.

Parasetamol ile indüklenen hepatoksisitede önemli rolü olduğu bilinen mekanizmalardan birisi de oksidatif strestir. Normal koşullarda serbest radikaller ile vücuttaki antioksidan savunma mekanizmaları bir denge halindedir, fakat serbest radikal hasarına karşı koymak üzere mevcut antioksidanlar kullanılabilir durumda değilse veya radikal oluşumu baş edilemeyecek kadar fazla ise, oksidan-antioksidan dengesi oksidanlar lehine bozulur ve oksidatif stres ortaya çıkar.¹⁰⁰

Reaktif toksik bileşiklere ya da oksidatif strese karşı hücrel savunmada rol oynayan çok önemli moleküllerden biri GSH'dır. Glutasyon hücre içinde okside ve redükte olmak üzere iki formda bulunmakta ve iki form arasında bir denge mevcuttur. Redükte formunda, sisteininthiol grubu reaktif oksijen ürünleri gibi stabil olmayan moleküllere, indirgeyici ekuvalanları verebilme yeteneğindedir. Bu mekanizma, hidrojen peroksit ve süperoksit radikalleri gibi serbest radikal türlerini uzaklaştırarak doku hasarını önleyebilmektedir. Parasetamol'un yeterli derecede yüksek dozlarında oksidatif stresin bir mediatörü olarak NAPQI'nın, GSH düzeylerinde azalmaya ve bu azalmaya bağlı olarak lipit peroksidasyonunda artmaya yol açtığı bilinmektedir.¹⁰¹ Mevcut çalışmamızda GSH değerleri, bilinen literatür bilgisine paralel olarak tespit edilmiştir. Parasetamol uygulanan gruplarda düşük olarak gözlemlenirken, resveratrol uygulanan gruplarda ciddi artışlar gözlemlenmiştir. Farklı etken maddelerin terapötik ajan olarak kullanıldığı bazı bilimsel çalışmalarda mevcut verilerimizi desteklemektedir. Manda ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada; GSH değerleri parasetamol ile indüklenmiş karaciğer toksisitesi oluşturulan grupta, kontrol grubuna kıyasla azaldığı tespit edilmiş ve uygulanan beta-karoten tedavisi ile bu değerlerde artış belirlenmiştir.¹⁰² Aynı şekilde bir başka çalışmada da parasetamol toksisitesi grubunda GSH seviyesi düşük bulunurken, L-karnitin uygulanan grupta GSH seviyesinde yükselme görülmüştür.¹⁰³

Parasetamol toksisitesinde ortaya çıkan oksidatif stresten sorumlu parametrelerden biri de süperoksit radikalidir ve bu radikaller süperoksitin oksijen ve hidrojen peroksida dismutasyonunu katalizleyen bir enzim ailesidir. Oksijeni metabolize eden hücreleri, süperoksit serbest radikalinin zararlı etkilerine karşı korur. Bu nedenle oksijene maruz kalan neredeyse tüm hücrelerde önemli bir antioksidan savunma mekanizmasıdır.¹⁰⁴ Bazı çalışmalar, serbest oksijen radikallerinin artmasına sebep olan mekanizmaların hepsinde süperoksit seviyesinin artmasının oksidatif stres oluşmasında oldukça önemli bir göreve sahip olduğundan bahsetmiştir.^{105,106,107} SOD gibi antioksidan enzimler lipid peroksidazlar ya da reaktif oksijen ürünleri tarafından kolayca inaktive olurlar ve bu nedenle parasetamol toksisitesinde bu enzim aktivitelerinde azalmalar saptanır. Mevcut çalışmamızda da parasetamol uygulaması yapılan gruplarda SOD aktivitesinin anlamlı derecede azaldığı tespit edilmiştir. Buna ilaveten, resveratrol uygulaması bu gruplara ait SOD aktivitelerini doza bağlı olarak artırmıştır. Literatür taraması yapıldığında, benzer mekanizmaya sahip bilimsel çalışmalar olduğu saptanmaktadır. Bu çalışmalardan birinde, parasetamol ile oluşturulmuş akut karaciğer toksisitesinde SOD seviyeleri düşük çıkmış, ancak artan dozlarda verilen Picroside II deney gruplarındaki SOD seviyelerinin yükselmesine sebep olmuştur.¹⁰⁸ Yine buna benzer bir çalışmada aynı şekilde toksisite grubunda SOD miktarı azalırken, tedavi grubunda SOD seviyesinin arttığı gözlemlenmiştir.¹⁰⁹ Aynı şekilde, benzer etkilere sahip birçok bilimsel çalışma gerçekleştirilmiş ve SOD aktivitesinin akut karaciğer hasarında azaldığı gösterilmiştir.^{110,111}

Katalaz enzimi prokaryotik ve ökaryotik bütün canlılarda yaygın bir şekilde bulunan antioksidan bir enzimdir. Katalaz güçlü ve kararlı bir yükseltgen olan hidrojen peroksitin su ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler. SOD, glutatyonperoksidaz (GPOX), ve glutatyonreduktaz (GR) gibi önemli antioksidan enzimler de olduğu gibi

katalaz enzimi de oksidatif streten etkilenmektedir. Katalaz ve SOD gibi antioksidan enzimler lipit peroksidazlar ya da reaktif oksijen ürünleri tarafından kolayca inaktive olurlar ve bu nedenle parasetamol toksisitesinde bu enzim aktivitelerinde azalmalar saptanır.¹¹² Çalışmamızda da, bu bilgilere paralel olarak parasetamol grubunda KAT seviyesi azalmış olarak tespit edilmiş ve resveratrol tedavisi sonrasında KAT miktarlarında istatistiksel açıdan anlamlı yükselişler gözlemlenmiştir. Yapılan diğer bilimsel çalışmalarda tıpkı diğer antioksidan enzimlerde olduğu gibi mevcut bulgularımızla uyum içerisindeydi. Awolde ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada parasetamol ile indüklenmiş akut karaciğer toksisitesinde KAT aktivitesinin azaldığı, ancak Carica papaya Linn uygulamasının KAT seviyesinde artışa sebep olduğu gösterilmiştir.¹¹³ Benzer şekilde ülkemizde gerçekleştirilen bir başka çalışmada yine parasetamol ile oluşturulmuş hepatotoksisite modelinde KAT seviyelerinin azaldığı, ancak thiamine pyrophosphate uygulamasının bu seviyelerde düzelmelere sebep olduğu belirtilmiştir.¹¹⁴

Kendi çalışmamıza ait veriler ve mevcut literatür hesaba katıldığında, resveratrol'ün karaciğer hücrelerinde meydana gelen oksidatif stresi azalttığı ve hepatik antioksidan enzim aktivitelerini arttırdığını söyleyebiliriz.

Parasetamol toksisitesine bağlı akut karaciğer hasarında oksidatif stresin yanı sıra inflamasyon olayının öncüleri olan ve pro-inflamatuvar sitokinlerden olan TNF-alfa ve IL-6'nın rolü son yapılan bilimsel çalışmalarda ortaya koyulmuştur. TNF-alfa çoğunlukla karaciğerdeki makrofajlardan üretilen bir proinflamatuvar sitokindir. Sistemik toksisitenin ve karaciğer hasarının primer mediyatörüdür. İskemireperfüzyon ve fulminan hepatik yetmezlik de dahil olmak üzere karaciğer hasarının birçok formunda TNF-alfa'nın önemli bir rolü olduğu bilinmektedir.¹¹⁵ TNF-alfa aşırı agresif inflamatuvar süreci başlatarak hücre hasarını daha da kötüleştirebildiği gibi apoptozisi

ve hücre proliferasyonunu uyararak da doku onarımına yardım eden santral bir regülatördür. Bu konu ile ilgili literatür incelemesi yapıldığında parasetamol ile indüklenmiş akut karaciğer toksisitesinde TNF-alfa ekspresyon seviyesinin ciddi derecede yükseldiği görülmüştür.^{116,117} Yapılan çalışmalar, benzer şekilde inflamasyon olayının başlangıcında rol alan TNF-alfanın hepatotoksitede anlamlı derecede arttığını ve anti-inflamatuvar özelliğe sahip ajanların kullanımı ile bu seviyelerin ise ciddi derecede azaldığı gösterilmiştir.¹¹⁸ Bizim çalışmamızda da mevcut literatüre paralel olarak parasetamol uygulanan gruba ait TNF-alfa miktarı kontrol grubuna kıyasla 3 kat artış olarak bulunmuşken, resveratrol uygulanan gruplarda ise istatistiksel açıdan anlamlı derecede azalmalar tespit edilmiştir.

Yine benzer şekilde bir pro-inflamatuvar olan İnterlökin-6'nın karaciğer hasarında koruyucu bir etkisi vardır, bu koruyucu etki; mitokondriyal işlev bozukluğunun önlenmesi ve oksidatif stresin baskılanması üzerinden ortaya çıkmaktadır.¹¹⁹ Yine benzer şekilde, son yıllarda gerçekleştirilen bilimsel çalışmalar parasetamol ile indüklenmiş akut karaciğer toksisitesinde IL-6 seviyesinin arttığını ve bunu takiben uygulanan terapötik ajanların IL-6 seviyesini geriletliğini göstermiştir.^{120,121} Mevcut çalışmada da, benzer olarak parasetamol grubunun IL-6 seviyesinde artışa sebep olduğu ancak resveratrol uygulamasının TNF-alfa'da olduğu gibi farklı dozlarda bile etkinlik göstererek azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Son yıllarda yapılan tedavi kökenli bilimsel çalışmalar genellikle alternatif etken maddeler üzerine yoğunlaşmaktadır. Birçok biyolojik aktiviteye sahip olan resveratrol'de bu etken maddelerden sadece bir tanesidir. Birçok bilimsel çalışmada, resveratrol'ün anti-karsinojenik, anti-diyabetik, anti-mikrobiyal, anti-viral, anti-nörotoksik ve benzeri birçok etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Mevcut çalışma ile ulaşılmak istenen hedef, parasetamol ile oluşturulmuş karaciğer hasarında resveratrol'ün anti-oksidan ve anti-inflamatuar etkilerini gösterebilmektir. Elde edilen veriler, bu hedefe ulaşıldığının bir kanıtı olarak karşımızda durmaktadır. İn vitro olarak gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada;

Karaciğer hasarının önemli göstergesi olan serum ALT ve AST seviyelerinde resveratrol grubunda parasetamol grubuna göre daha iyi derecede düzelmeler gözlemlenmiştir.

Antioksidan sisteme ait önemli enzimlerden SOD ve KAT aktiviteleri ve GSH seviyeleri parasetamol grubunda düşük çıkmış, ancak resveratrol uygulanan gruplarda yeniden oldukları gözlemlenmiştir.

Bunlara ilaveten, parasetamol'ün TNF-alfa ve IL-6 ekspresyon seviyelerinde artışa sebep olduğu ve resveratrol'ün bu artışı geriletebildiği gösterilmiştir.

Bu sonuçlar, resveratrol'ün hepatik (karaciğer) hasarın önlenmesi ve tedavisinde oldukça etkili bir ajan olabileceğini göstermektedir. Bu bağlamda, resveratrol'ün hücre içi sinyal yolları ile ilişkili süreçlere olan etkilerinin daha kapsamlı ve moleküler metodlar ile incelenmesi ve bu koruyucu etkisinin hangi mekanizmalar aracılığıyla gerçekleştirildiğinin aydınlatılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Scherlock S DJ. Disease of the Liver and Miliary System. *Balckwell Scientific Publications*, Oxford 1997.
2. Davidson DG. Eastham WN. Acute liver necrosis following overdose of paracetamol. *British Med J*, 1966, 2: 497-499.
3. Oliver L. Acetaminophen. McGraw-Hill, New York 2004.
4. Morse HN. Ueber eine neue Darstellungsmethode der Acetylamidophenole. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 1878, 11: 232-233.
5. Brodie BB, Axelrod J. The fate of acetanilide in man. *J Pharma Exp Therapeutics*, 1948, 94: 29-38
6. Slattery JT, Levy G. Pharmacokinetic model of acetaminophen elimination. *Am J Hospital Pharmacy*, 1979, 36: 440-441.
7. Verschueren K. Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals. Van Nostrand Reinhold Co, New York 1996.
8. Clissold SP. Paracetamol and phenacetin. *Drugs*, 1986, 4: 46-47.
9. Bertolini A, Ferrari A, Ottani A, Guerzoni S, Tacchi R, Leone S. Paracetamol: *new vistas of an old drug*. *CNS Drug Rev*, 2006, 12: 250-275.
10. Kayaalp O. Rasyonel Tedavi Yöntünder Tıbbi Farmakoloji, Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd Şti, Ankara 2005.
11. Swierkosz TA, Jordan L, McBride M, McGough K, Devlin J, Botting RM. Actions of paracetamol on cyclooxygenases in tissue and cell homogenates of mouse and rabbit. *Med Sci Monit*, 2002, 8: 496-503.
12. Yapar K, Kart A, Karapehlivan M, Atakisi O, Tunca R, Erginsoy S, Cital M. Hepatoprotective effect of L-carnitine against acute acetaminophen toxicity in mice, *Exp Toxicol Pathol*, 2007, 59: 121-8

13. Benson GD, Koff RS, Tolman KG. *The therapeutic use of acetaminophen in patients with liver disease, Am J Ther*, 2005, 12: 133-141.
14. Gelotte CK, Auiler JF, Lynch JM, Temple AR, Slattery JT. Disposition of acetaminophen at 4, 6, and 8 g/day for 3 days in healthy young adults, *Clin Pharmacol Ther*, 2007, 81: 840-848.
15. Bessems JG, Vermeulen NP. Paracetamol (acetaminophen)-induced toxicity: *molecular and biochemical mechanisms, analogues and protective approaches. Crit Rev Toxicol*, 2001, 31: 55-138.
16. Graham GG, Scott KF, Day RO. Tolerability of paracetamol. *An International J Med Toxicol Drug Exp*, 2005, 28: 227-240.
17. Katzung BG. *Basic and Clinical Pharmacology*, McGraw Hill Companies Inc, New York 2007.
18. T.C. Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Hıfzıssıhha Mektebi Müdürlüğü. Birinci Basamağa Yönelik Zehirlenmeler Tanı ve Tedavi Rehberleri. Saha Uygulaması Çalışması 2006, 1-22: 69-73.
19. Potter DW, Hinson JA. Mechanisms of Acetaminophen Oxidation to N-Acetyl-P-benzoquinone Imine by Horseradish P eroxidase and Cytochrome P -450. *J Biol Chem*, 1987, 262: 966-973.
20. James LP, Mayeux PR, Hinson JA. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. Drug metabolism and disposition: *the biological fate of chemicals*, 2003, 31: 1499-1506.
21. Boobis AR, Seddon CE, Nasser-Sina P, Davies DS. Evidence for a direct role of intracellular calcium in paracetamol toxicity. *Biochem Pharmacol*, 1990, 39: 1277-1281.
22. Hung O, Nelson LS. Acetaminophen. In: Tintinalli JE, Kelen GD, Stapczynski S

- (eds). *Emergency Medicine A Comprehensive Study Guide*, Mc Graw Hill 2000.
23. Donnelly PJ, Walker RM, Racz WJ. Inhibition of mitochondrial respiration in vivo is an early event in acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Arch Toxicol*, 1994, 68: 110-118.
 24. Russmann S, Ublick AG, Grattagliano I. "Current concepts of mechanisms in drug-induced hepatotoxicity," *Curr Med Chem*, 2009, 16, 2041–3053.
 25. Mayhew MS. "Drug-Induced Liver Injury," *American College of Nurse Practitioners*, 2009, 5, 685–686.
 26. Eren M, Saltik Nİ, Koçak N. "İlaça bağlı hepatotoksisite," *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 2004, 47, 222–227.
 27. Castell JV., Jose M, Ponsoda X, Bort R. "In vitro investigation of the molecular mechanisms of hepatotoxicity," *In vitro Meth Pharma Res*, 1996, 13, 376-389.
 28. Ayla Ş. Parasetamol ve Resveratrol'ün MDAH-2774 insan over kanseri hücre kültürlerinde gemsitabin'le sitotoksiteleri ve proliferasyonu üzerine etkileri. Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi, İstanbul: İstanbul Üniversitesi, 2007.
 29. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*, 1997, 3: 92-95.
 30. Kumar S. Free Radicals and Antioxidants: Human and Food System. *Adv Appl Sci Res*, 2011, 2: 129-135.
 31. Sen S, Chakraborty R, Sridhar C, Reddy YSR, De B. Free Radicals, Antioxidants, Diseases And Phytomedicines: Current Status And Future Prospect. *Int J Pharma Sci Rev Res*, 2010, 3: 91-100.
 32. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacog Rev*, 2010, 4: 118-126

33. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *British Med Bull.* 1993, 49: 481-493
34. Tarhan S. E-Viniferinin tek başına ve kemoterapötik bir ajan ile birlikte HepG2 hücreleri üzerine antioksidan etkisinin incelenmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi. Eskişehir: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, 2013.
35. Nakazawa H, Genka C, Fujishima M. Pathological aspects of active oxygens/free radicals, *Jpn J Physiol*, 1996, 46: 15-32.
36. Mao GD, Thomas PD, Lopaschuk GD, Poznansky MJ. Superoxide dismutase (SOD)-catalase conjugates. Role of hydrogen peroxide and the Fenton reaction in SOD toxicity. *J Biol Chem*, 1993, 268: 416-420.
37. Yayla M. Bosentanın parasetamolle indüklenen akut karaciğer toksisitesi üzerine etkilerinin araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi. Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2012.
38. Gupta SK, Saxena A, Singh U, Arya DS. Bosentan, the mixed ETA-ETB endothelin receptor antagonist, attenuated oxidative stress after experimental myocardial ischemia and reperfusion. *Mol Cell Biochem*, 2005, 275: 67-74.
39. Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology*, 2006, 43: 31-44.
40. Luster MI, Simeonova PP, Gallucci RM, Bruccoleri A, Blazka ME, Yucesoy B, Matheson JM. The role of tumor necrosis factor alpha in chemical-induced hepatotoxicity. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, 919: 214-220.
41. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins pathologic basis of disease. In: Collins T, editors. Acute and chronic inflammation. WB Saunders Company, Philadelphia 1999.

42. Carrero JJ, Stenvinkel P. Persistent inflammation as a catalyst for other risk factors in chronic kidney disease: a hypothesis proposal. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2009, 4: 49-55
43. Ganong WF. Tıbbi Fizyoloji. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul 2002.
44. Libby P. Inflammatory mechanisms: *the molecular basis of inflammation and disease*. *Nutr Rev*, 2007, 65: 140-146
45. Neyzi O, Ertuğrul T. Pediatri Cilt 1. 3. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul 2002.
46. Deldar A, Naylor JM, Bloom JC. Effects of Escherichia Coli on Leukocyte and Platelet Counts, Fibrinogen Concentrations, and Blood Clotting in Colostrum-Fed and Colostrum Deficient Neonatal Calves. *Am J Vet Res*, 1984, 45: 670–677.
47. Kumar V, Cotran RZ, Robbins SL. Akut ve Kronik İnflamasyon, “Basic Pathology”. Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti., İstanbul 2000.
48. Libby P. Inflammatory mechanisms: *the molecular basis of inflammation and disease*. *Nutr Rev*, 2007, 65: 140-146.
49. Baron S, Lee C. General Pathology, Host response to injury, acute inflammatory response. Lange Pathology, New York 2006.
50. Cheville NF. Acute Inflammation, Introduction to Veterinary Pathology. Blackwell Publishing Ltd. Oxford 1999.
51. Elenkov IJ, Chrousos GP. Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, 966: 290-303.
52. Armstrong L, Jordan N, Millar A. Interleukin 10 (IL-10) regulation of tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) from human alveolar macrophages and peripheral blood monocytes. *Thorax*, 1996, 51: 143-149.

53. Guzik TJ, Mangalat D, Korbust R. Adipocytokines-novel link between inflammation and vascular function. *J Physiol and Pharmacol*, 2006, 57: 505-28.
54. Bařaranođlu M, Neuschwander-Tetri BA. Pathophysiology Of Nonalcoholic Steatohepatitis, Nova Science Publishers, New York 2009.
55. Barabara JA, Van ostade X, Lopez A. Tumour-necrosis factor-alpha (TNFalpha):the good, the bad and potentially very efective. *Immunol Cell Biol*, 1996, 1: 434-443.
56. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature*, 1997, 389: 610-614.
57. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*, 1995, 95: 2409- 2415.
58. Bemelmans MHA, van Tits LJH, Buurman WA. Tumor necrosis factor, release and clearance. *Crit Rev Immunol*, 1996, 16: 1-11.
59. Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, Merryweather J. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science*, 1989, 1: 470-474.
60. Balkwill F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? *Cytokine Growth Factor Rev*, 2002, 13: 135-141.
61. Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest*, 1995, 95: 2111-2119.
62. Lin HZ, Yang SQ, Chuckaree C, Kuhajda F, Ronnet G, Diehl AM. Metformin reverses fatty liver disease in obese, leptin-deficient mice. *Nat Med*, 2000, 6: 998-

- 1003.
63. Hierro LC, Lazo PS. Signal transduction by tumornecrosis factor receptors. *Cell Signaling*, 2012, 24: 1297-1305.
 64. Medvedev AE, Espevik T, Ranges G, Sundan A. Distinct Roles of the Two Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptors in Modulating TNF and Lymphotoxin a Effects. *J Biol Chemist*, 1996, 27: 9778-9784.
 65. Puimege L, Libert C, Hauwermeiren F. Regulation and Dysregulation of Tumor Necrosis Factor Receptor-1. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2014, 25: 285-300.
 66. Kishore R, Tkebuchava T, Sasi SP, Silver M, Gilbert H, Yoon Y, Park H, Thorne T, Losordo DW, Goukassian DA. Tumor necrosis factor- α signaling via TNFR1/p55 is deleterious whereas TNFR2/p75 signaling is protective in adult infarct myocardium. *Adv Exp Med Biol*, 2011, 691: 433-448.
 67. Pedersen BK, Steensberg A, Keller P, Keller C, Fischer C, Hiscock N, van Hall G, Plomgaard P, Febbraio MA. Muscle-derived interleukin-6: lipolytic, anti-inflammatory and immune regulatory effects. *Eur J Appl Physio*, 2003, 446: 9-16.
 68. Hirano T. The biology of interleukin-6. *Chem Immunol*, 1992, 51: 153-80
 69. Rier SE, Parsons AK, Becker JL. Altered interleukin-6 production by ertoneal leukocytes from patients with endometriosis. *Fertil Steril*, 1994, 61: 294-299.
 70. Braun DP, Gebel H, House R, Rana N, Dmowski NP. Spontaneous and induced synthesis of cytokines by perpheral blood monocytes in patients with endometriosis. *Fertil Steril*, 1996, 65: 1125-1129.
 71. Woodrofe MN, Cuzner ML. Cytokine mRNA expression in inflammatory MS lesions, detection by non-radioactive in situ hybridization. *Cytokine*, 1993, 5: 583-588.
 72. Licinio L, Kling M, Hauser P. Cytokines and brain function: relevance of

- interferon induced mood and cognitive changes. *Semin Oncol*, 1998, 25: 30-38.
73. Paul B, Masih I, Deopujari J, Charpentier C. Occurrence of resveratrol and pterostilbene in age-old darakchasava, *J Ethnopharmacol*, 1999, 68: 71–76.
74. de la Lastra CA ve Villegas I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Trans*, 2007, 35: 1156-1160.
75. Fremont L. Biological Effects of Resveratrol. *Life Sciences*, 1999, 66: 663-673.
76. Belguendouz L, Fermont L, Linard A. *Biochem. Pharmacol.* 1998, 53, 1347-1355.
77. Keskin N, Noyan T, Kunter B. Resveratrol ile üzümden gelen sağlık. *Türkiye klinikleri J Med. Sci*, 2009, 29: 1273-1279.
78. Karabulut, AB. Resveratrol ve Etkileri. *Türkiye klinikleri J Med Sci*, 2008, 28: 166-169.
79. Baur JA ve Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5: 493–506.
80. Kavita B ve ark. Curcumin, resveratrol and flavonoids as anti-inflammatory, cytoand DNA-protective dietary compounds. *Toxicology*, 2010, 278: 88-100.
81. Baur JA ve Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5: 493–506.
82. Csiszar A, Smith K, Labinskyy N. Resveratrol attenuates TNF- α induced activation of coronary arterial endothelial cells: role of NF-kB inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006, 291:1694-1699.
83. Wang H ve ark. Resveratrol in cardiovascular disease: what is known from current research? *Heart Fail Rev*, 2012, 17: 437-448.
84. Albani D ve ark. Neuroprotective properties of resveratrol in different neurodegenerative disorders. *Biofactors*, 2010, 36: 370-376.

85. Liu C ve ark. Resveratrol improves neuron protection and functional recovery in rat model of spinal cord injury. *Brain Res*, 2011, 1374: 100-109.
86. Feng X ve ark. Resveratrol Inhibits b-Amyloid-Induced Neuronal Apoptosis through Regulation of SIRT1-ROCK1 Signaling Pathway. *PLoS One*, 2013, 8: 59888.
87. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*, 1988, 34: 497.
88. Aebi HE. Catalase. *Methods of Enzymatics Analysis*. 1987; 3: 273-285.
89. Bernal W, Wendon J, Rela M, Heaton N, Williams R. Use and outcome of liver transplantation in acetaminophen-induced acute liver failure. *Hepatology*, 1998, 27: 1050-1055.
90. Spooner JB, Harvey JG. The history and usage of paracetamol. *J Int Med Res*, 1976, 4: 1-6.
91. Newson RB, Shaheen SO, Chinn S, Burney PG. Paracetamol sales and atopic disease in children and adults: an ecological analysis. *Eur Respir J*, 2000, 16: 817-823.
92. Larson AM. Acetaminophen hepatotoxicity. *Clin Liver Dis*, 2007, 11: 525-548.
93. Corcoran GB, Mitchell JR, Vaishnav YN, Horning EC. Evidence that acetaminophen and N-hydroxyacetaminophen form a common arylating intermediate, N-acetyl-p-benzoquinoneimine. *Mol Pharm*, 1980, 18: 536-542.
94. Drotman RB, Lawhorn GT. Serum enzymes as indicators of chemically induced liver damage. *Drug Chem Toxicol*, 1978, 1: 163-171.
95. Janbaz KH, Saeed SA, Gilani AH. Protective effect of rutin on paracetamol- and CCl₄-induced hepatotoxicity in rodents. *Fitoterapia*, 2002, 73: 557-563.
96. Ali BH, Bashir AK, Rasheed RA. Effect of the traditional medicinal plants

- Rhazya stricta, Balanitis aegyptiaca and Haplophyllum tuberculatum on paracetamol-induced hepatotoxicity in mice. *Phytotherapy Res*, 2001, 15: 598-603.
97. Rabinovitz M, Van Thiel DH. Hepatotoxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J gastroenterol*, 1992, 87: 1696-1704.
98. Hinson JA, Pohl LR, Monks TJ, Gillette JR, Guengerich FP. 3-Hydroxyacetaminophen: a microsomal metabolite of acetaminophen. Evidence against an epoxide as the reactive metabolite of acetaminophen. *Drug metab dispos*, 1980, 8: 289-294.
99. Anundi I, Lahteenmaki T, Rundgren M, Moldeus P, Lindros KO. Zonation of acetaminophen metabolism and cytochrome P450 2E1-mediated toxicity studied in isolated periportal and perivenous hepatocytes. *Biochem Pharmacol*, 1993, 45: 1251-1259.
100. Hinson JA, Roberts DW, James LP. Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. *Handb exp pharmacol*, 2010, 1: 369-405.
101. Atkuri KR, Mantovani JJ, Herzenberg LA. N-Acetylcysteine a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. *Curr Opin Pharmacol*, 2007, 7: 355-359.
102. Manda K BAL. Role of β -carotene against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Nutrition Res*, 2003, 23: 1097-1103.
103. Yapar K, Kart A, Karapehlivan M, Atakisi O, Tunca R, Erginsoy S, Citil M. Hepatoprotective effect of L-carnitine against acute acetaminophen toxicity in mice. *Exp Toxicol Pathol*, 2007, 59: 121-128.
104. Topic B, Tani E, Tsiakitzis K, Kourounakis PN, Dere E, Hasenohrl RU, Hacker R, Mattern CM, Huston JP. Enhanced maze performance and reduced oxidative stress by combined extracts of zingiber officinale and ginkgo biloba in the aged

- rat. *Neurobiol aging*, 2002, 23: 135-143.
105. Sies H, de Groot H. Role of reactive oxygen species in cell toxicity. *Toxicol Let*, 1992, 64: 547-551.
 106. Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, Pakay JL, Parker N. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free rad biol med*, 2004, 37: 755-767.
 107. Koop DR. Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1. *FASEB*, 1992, 6: 724-730.
 108. Gao H, Zhou YW. Anti-lipid peroxidation and protection of liver mitochondria against injuries by picoside II. *World J Gastroenterol*, 2005, 11: 3671-3674.
 109. Olaleye MT, Rocha BT. Acetaminophen-induced liver damage in mice: effects of some medicinal plants on the oxidative defense system. *Exp toxicol pathol*, 2008, 59: 319-327.
 110. Xu H, Lin L, Yuan WJ. Antiarrhythmic effect of endothelin-A receptor antagonist on acute ischemic arrhythmia in isolated rat heart. *Acta Pharmacol Sin*, 2003, 24: 37-44.
 111. Ozdemir R, Parlakpınar H, Polat A, Colak C, Ermis N, Acet A. Selective endothelin a (ETA) receptor antagonist (BQ-123) reduces both myocardial infarct size and oxidant injury. *Toxicology*, 2006, 219: 142-149.
 112. Chularojmontri L, Wattanapitayakul SK, Herunsalee A, Charuchongkolwongse S, Niumsukul S, Srichairat S. Antioxidative and cardioprotective effects of *Phyllanthus urinaria* L. on doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28: 1165-1171.
 113. Awodele O, Yemitan O, Ise PU, Ikumawoyi VO. Modulatory potentials of aqueous leaf and unripe fruit extracts of *Carica papaya* Linn. (Caricaceae) against

- carbontetrachloride and acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *J Intercult Ethnopharmacol.* 2016, 5: 27-35.
114. Uysal HB, Dağlı B, Yılmaz M, Kahyaoğlu F, Gökçimen A, Ömürlü İK, Demirci B. Biochemical and histological effects of thiamine pyrophosphate against acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2016, 118: 70-6.
115. Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology*, 2006, 43: 31-44.
116. Akerman P, Cote P, Yang SQ, McClain C, Nelson S, Bagby GJ, Diehl AM. Antibodies to tumor necrosis factor-alpha inhibit liver regeneration after partial hepatectomy. *Am J Physiol*, 1992, 263: 579-585.
117. Wu YL, Jiang YZ, Jin XJ, Lian LH, Piao JY, Wan Y, Jin HR, Joon Lee J, Nan JX. Acanthoic acid, a diterpene in *Acanthopanax koreanum*, protects acetaminophen-induced hepatic toxicity in mice. *Phytomedicine*, 2010, 17: 475-479.
118. Yan SL, Wu ST, Yin MC, Chen HT, Chen HC. Protective effects from carnosine and histidine on acetaminophen-induced liver injury. *J Food Sci*, 2009, 74: 259-265.
119. D. E. Cressman, L. E. Greenbaum, R. A. DeAngelis, et al., "Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice," *Science*. 1996, 1: 1379–1383.
120. Tai M, Zhang J, Song S, Miao R, Liu S, Pang Q, Wu Q, Liu C. Protective effects of luteolin against acetaminophen-induced acute liver failure in mouse. *Int Immunopharmacol.* 2015, 27: 164-170.
- 121.** Shoeib AM, Said E, Ammar EM. Cytoprotective potential of tiron and methyl palmitate against acetaminophen-induced acute liver injury. *Can J Physiol*

Pharmacol. 2015, 20: 1-8.



EKLER

EK 1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: Alpgiray TURGUT
Doğum tarihi: 11.06.1988
Doğum Yeri: Erzurum
Medeni Hali: Bekar
Uyruğu: T.C
Adres: Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya A.D 25240 Yakutiye / ERZURUM
Tel: 05320565085
Faks:
E-mail: agiraytrgt@gmail.com
Eğitim
Lise: Erzurum Lisesi
Lisans: Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans: Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı Öğrencisi 2013-2016
Doktora:
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce: Orta Seviye
Almanca:
Rusça:
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
İlgi Alanları ve Hobiler
Kitap okumak , İnternet , Müzik dinlemek , Doğa'da gezinmek




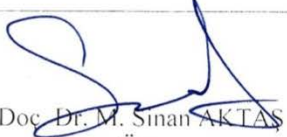

EK 2. ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ
ETİK ALT KURUL BAŞKANLIĞI
(AÜVFEAK)



ETİK KURUL KARARI

Karar Sayısı: 2015/8	Karar Tarihi: 13/07/2015
<p>Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Mesut Bünyamin Halıcı, Yrd. Doç. Dr. Murat Meşe, Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Serkan Erol ve Yük. Lis. Öğr. Alpgiray Turgut tarafından sunulan “Karaciğer karsinoma hücrelerinde oluşturulan parasetamol toksisitesi üzerine resveratrol’ün invitro etkilerinin araştırılması” adlı bilimsel teze ait başvuru formu etik kurulumuz tarafından değerlendirilmiştir.</p> <p>Çalışmada karaciğer kanseri hücrelerinde oluşturulacak olan parasetamol toksisitesi üzerine resveratrol’ün etkileri üzerine incelemeler yapılacaktır.</p> <p>Sunulan bilimsel tez çalışmasının Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi ilkelerine uygun olduğuna karar verilmiştir.</p>	
 Prof. Dr. Yunus Emre ÖZKANLAR Başkan	 Prof. Dr. Ömer UÇAR Başkan Yardımcısı
 Prof. Dr. Zekeriya ÖZÜDOĞRU Üye	 Doç. Dr. M. Sinan AKTAŞ Üye
 Doç. Dr. Emre KARAKUŞ Üye	