



**T.C.**

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ**

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**RATLARDA TİOASETAMİD İLE OLUŞTURULAN TOKSİK HEPATİT  
MODELİNDE L-KARNİTİN VE MELATONİNİN KORUYUCU ROLÜ**

**DR.FATMA EBRU AKIN**

**UZMANLIK TEZİ**

**Tez danışmanı: Doç. Dr. Gürden GÜR**

**ANKARA, 2003**

T.C.  
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

RATLARDA TİOASETAMİD İLE OLUŞTURULAN TOKSİK HEPATİT  
MODELİNDE L-KARNİTİN VE MELATONİNİN KORUYUCU ROLÜ

DR.FATMA EBRU AKIN  
UZMANLIK TEZİ

Tez danışmanı: Doç. Dr. Gürden GÜR

ANKARA, 2003

## TEŐEKKÜR

İç Hastalıkları eğitimimi en iyi şekilde tamamlamış olmamı sağlamak için yapmış oldukları çok değerli katkılarından dolayı başta Başkent Üniversitesi Rektörü Sayın Prof. Dr. Mehmet Haberal olmak üzere, Başkent Üniversitesi Dekanı Sayın Prof. Dr. Nevzat Bilgin'e, Dahili Tıp Bilimleri Başkanı Sayın Prof. Dr. Haldun Müderrisoğlu'na, İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Sedat Boyacıoğlu'na Őukranlarımı sunarım.

Tezimin her aŐamasında büyük emeği olan tez danıŐmanım Sayın Doç. Dr. Gürden Gür'e teŐekkürlerimi sunarım. İç Hastalıkları eğitimimin başarı ile tamamlanmasında büyük katkıları olan İç Hastalıkları Ana Bilim Dalının tüm öğretim üyelerine, tezime yaptıkları katkıdan ötürü Biyokimya Ana Bilim Dalı Başkanı Sayın Doç. Dr. Suna Türkoğlu, Sayın Dr. Derya Aldemir ve Sayın Münire Turan'a, sevgi ve desteklerini hep yanımda hissettiğim eŐim Murat ve kızım Zeynep Naz'a çok teŐekkür ederim.

Dr. Fatma Ebru Akın

## İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ ve AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. TOKSİK HEPATİT .....	3
2.2. OKSİDATİF STRES .....	3
2.3. TİOASETAMİD .....	5
2.4. MELATONİN .....	6
2.5. L-KARNİTİN .....	9
3. MATERYAL ve METOD .....	12
3.1. ÇALIŞMA GRUPLARI .....	12
3.2. YÖNTEM .....	12
3.3. DOKULARIN HAZIRLANMASI ve TESTLER .....	13
3.4. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME .....	14
4. BULGULAR .....	15
4.1. SERUM BİYOKİMYASAL TESTLERİ .....	15
4.2. KARACİĞER DOKU MALONDİALDEHİD DÜZEYLERİ .....	16
4.3. KARACİĞER DOKU REDÜKTE GLUTATYON DÜZEYLERİ .....	17
5. TARTIŞMA .....	18
6. SONUÇLAR .....	27
7. ÖZET .....	28
8. TABLO ve ŞEKİLLER .....	30
9. KAYNAKLAR .....	37

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Hepatotoksisite, ilaçlar veya diğer kimyasal ajanlar ile oluşan karaciğer hasarıdır (1). Karaciğer hasarı, çeşitli kimyasal ve farmakolojik ajanların inhalasyon, parenteral veya enteral yolla alınmasıyla oluşabilir. Bunlar endüstriyel toksinler, mantar zehiri ve daha sıklıkla medikal tedavide kullanılan farmakolojik ajanlardır (2). Toksik ajanlara ve ilaçlara bağlı karaciğer hasarının ciddiyeti, hepatik yapı ve fonksiyonlardaki spesifik olmayan minör değişikliklerden fulminan karaciğer yetmezliği, siroz ve karaciğer kanserine kadar değişebilir (1). Toksik hepatit, özellikle yaşlı insanlardaki karaciğer hastalığında önemli bir sebeptir (1). Batı ülkelerinde 50 yaş üzerindeki hastalar arasında hepatitin % 43 sebebi ilaçlardır (1). Fulminan karaciğer yetmezliği, toksin ve ilaçlara bağlı karaciğer hasarının nadir ancak ciddi bir komplikasyonudur. Yüksek mortaliteye sahiptir. Bu durumun tedavisi için kullanılan farklı medikal tedavi metodları olmasına rağmen etkili tek tedavi acil karaciğer transplantasyonudur (3).

Tioasetamid, ratlarda toksik hepatit oluşturmakta kullanılan hepatotoksindir. Tioasetamid doz bağımlı hasar oluşturur. Tioasetamidin yüksek dozda verilmesini takiben massif karaciğer nekrozu, hızlı nörolojik kötüleşme, ciddi ensefalopati ve beyin ödemi oluşur (3).

Tioasetamid, karaciğer nekrozu yapıcı ve karsinojenik aktivitesi olan, thionosülfür içeren bir maddedir. Uygulamadan kısa süre sonra asetamid, tioasetamid-S-oksidi ve sülfene metabolize olur. Bu metabolitler polar ürünler içeren çok reaktif bileşiklerdir. Doku makromoleküllerine bağlanarak hepatik nekroza neden olurlar (3).

Oksidatif stres; asetaminofen toksisitesi, hemokromatozis, alkolik karaciğer hasarı, toksik maruziyetler ve viral hepatitler gibi çeşitli karaciğer hastalıklarının patogenezinde rol oynamaktadır (3). Reaktif oksijen metabolitleri ve oksidatif stresin, tioasetamid toksisitesinde de yeri olabileceğine dair bulgular mevcuttur.

Melatonin pineal bezden salgılanır. Güçlü bir radikal kurtarıcıdır (scavenger). Oksidatif hasara karşı melatoninin koruyucu etkisi çeşitli *invivo* ve *invitro* çalışmalar ile gösterilmiştir (4,5).

L-karnitin, uzun zincirli yağ asitlerinin oksidasyonunu kolaylaştırır, KoA ile KoA-SH'nın oranını düzenler, peroksizom ve mitokondride bulunan açıl rezidülerine katılır. Karnitin ayrıca dallı zincirli aminoasitlerin metabolizmasına katılır ve hücrel membranların stabilizasyonunu sağlar. Karnitin, serbest radikal kurtarıcı (scavenger) dir. Nükleer transkripsiyonun kontrolünde rol oynadığı düşünülmektedir (6).

Bu çalışmada; ratlarda tioasetamid ile oluşturulan akut toksik hepatit modelinde melatonin ve l-karnitinin olası koruyucu rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1.TOKSİK HEPATİT

Hepatotoksisite ilaçlar veya kimyasal maddeler ile oluşan karaciğer hasarıdır

(1). Kimyasal ve farmakolojik ajanlar inhalasyon, parenteral veya enteral olarak alınabilir. Bunlar endüstriyel toksinler (karbontetraklorür, trikloretilen vs.), mantar zehiri ve daha sıklıkla medikal tedavide kullanılan farmakolojik ajanlardır (2). İlaça bağlı karaciğer hasarının ciddiyeti, hepatik yapı ve fonksiyondaki spesifik olmayan minör değişikliklerden fulminan karaciğer yetmezliği, siroz ve karaciğer kanserine kadar değişebilir.

Hepatotoksisite, toplumdaki sarılık ve akut hepatitin % 5'inden daha azını oluşturur. Bununla birlikte hastaneye akut hepatit tanısıyla yatan hastaların %10-15'inin ilaca bağlı olduğu sanılmaktadır. Elli yaşın üzerinde bu oran %40'lara çıkmaktadır (1).

Hepatotoksik ajanlar mitokondri ve plazma membranı gibi önemli yapılarda geri dönüşümsüz hasara neden olur. Bu hasar enerji üretimini bozar, iyonik gradientleri dağıtır ve hücrelerin fizyolojik bütünlüğünü aksatır (1).

Toksik maddelerin oksidasyonu ile karbon kökenli radikaller, nitro radikaller ve serbest oksijen metabolitleri oluşur. Bu reaktif metabolitler hücresel moleküller ile birleşir. Özellikle thiol zengin proteinler ve nükleik asitler ile etkileşirler. Antioksidan-prooksidan arasındaki denge oksidatif stresin durumunu değerlendirmede önemlidir (1).

### 2.2 OKSİDATİF STRES

Karaciğer hastalıklarının birçok formunda, patogeneizde reaktif oksijen metabolitleri (ROM) rol oynar. Karaciğer hücreleri aşırı ROM'a maruz kaldığı zaman

oksidatif stres ortaya çıkar ve hücrel fonksiyonların çoğu etkilenir. Gen ekspresyonunda değişiklik olur. ROM; sitokinler, adezyon molekülleri, Fas ligandın artmasına neden olur. Mitokondride permeabilite değişikliğine neden olup ölümle sonuçlanabilir. Lipid peroksidasyonuna neden olduğu bilinmektedir. Protein oksidasyonu ve DNA oksidasyonu oksidatif stresin diğer sonuçlarıdır. ROM' un düşük seviyelerine maruz kalındığında apoptosis oluşurken, yüksek seviyede ROM'a maruziyet sonucu nekroz oluşur (7).

İntrasellüler seviyede tüm hücreler ROM üretme kapasitesine sahiptir. Hücre içinde ROM'un üretildiği başlıca yer mitokondridir (7). Mitokondri hücre fonksiyonu için gerekli olan enerji üretiminde vazgeçilmezdir. Bu görevin tamamlanmasında büyük miktarda moleküler oksijen gerekir. Oksijenin sürekli tüketimi ROM'un oluşumuna neden olur (8). Hepatosit mitokondrisinde oksijen tüketiminin % 2-5'i ROM'a dönüştür, geri kalanlar H<sub>2</sub>O'ya indirgenir (7). ROM'un üretimi süperoksit anyon oluşumu ile başlar. Süperoksit anyon, Mn-SOD ile hidrojenperoksite dönüştür. Hidroksil radikal ve diğer reaktif ürünler oluşur (şekil 1). Bunların yaşam süreleri kısa olmasına karşın lipid, protein ve DNA gibi hücrel elemanları yıkabilir (8). Mitokondride ROM'un üretimi TNF- $\alpha$ , seramid, safra asitleri, iskemi-reperfüzyon (7) ve tioasetamid (9) ile artar. Bu uyarıların tümü elektron transportunda blok yapar veya indirgenmiş ara ürünlerin oluşmasına yol açar. Bunlar oksitlenmeye neden olur. Hafif dereceli oksidatif stresde apoptosis oluşurken ciddi oksidatif stresde mitokondri membranında permeabilite değişikliğine bağlı litik nekroz oluşabilir (7).

Mitokondride oluşan oksidatif stresden korunmada mitokondriyal glutatyonun (GSH) önemli rolü olabilir. GSH, toksin ve serbest radikallere karşı savunma yapan protein olmayan thioldür (10). Yapılan çalışmalarda TNF- $\alpha$ 'nın uyardığı sitotoksisite, apoptosis, kronik etanol verilmesi (8), tioasetamid verilmesi (11) gibi mitokondride



oksidatif stresin neden olduğu doku hasarında mitokondriyal fonksiyonların korunması, hücre canlılığı, transkripsiyon faktör aktivasyonu ve gen regülasyonun sağlanmasında mitokondriyal GSH'nın önemli rol oynayabileceği gösterilmiştir (8).

Karaciğerdeki en önemli antioksidan glutatyon sistemidir. Glutatyon hepatositlerde yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Glutatyon, glutatyon peroksidazın kofaktörüdür. Glutatyon peroksidaz, organik peroksitler, serbest radikaller ve elektrofilik ilaç metabolitlerinin yok edilmesinde yüksek afiniteye sahiptir (şekil 2) (8).

### **2.3. TİOASETAMİD**

Tioasetamid (TAA), thiono-sülfür içeren bir bileşiktir. Ratlarda, kısa dönemde yüksek doz verildiğinde sentrilobüler hepatik nekroz yapan deneysel hepatotoksindir (12,13). Bunu hepatosellüler rejenerasyon takip eder. TAA'in uzun süreli ve düşük dozlarda oral verilmesi safra duktus proliferasyonu, karaciğer sirozu ve nodüler karaciğer tümörüne neden olur (12).

Karaciğer hasarı hepatotoksik ajanın mikrozomal FAD-monooksijenaz sistem ile biyotransformasyona uğramasıyla başlar (9,13). Serbest radikaller bu oksidatif yol ile meydana gelir (14).

TAA, ratlarda invivo olarak hızlıca sülfene, asetamid ve tioasetamid S-oksit (TASO)'e metabolize olur (12,13). TAA'in toksik etkisinden esas metaboliti olan TASO sorumludur (13). Asetamid metaboliti ratlarda karaciğer tümörüne neden olur. TAA'den, önce TASO oluşur. TASO daha sonra asetamid formuna dönüşür (12). TASO'nun bir kısmı sülfene, tioasetamid S-dioksit gibi çok reaktif bileşiklere dönüşür. Bu metabolitler doku makromoleküllerine bağlanarak karaciğer harabiyetine neden olur (3).

TAA biyotransformasyonundan sonra Őu olaylar oluşur;

- 1) Oksidatif stres
- 2) Lipid peroksidasyonu
- 3) Sitozolik kalsiyumda artma
- 4) Hücree siklusu DNA ploidy ve dağılımda deđiŐiklikler (9)
- 5) Apoptosis (15)

Lipid peroksidasyonu sonucu toksik oksijen ürünleri oluşur. Bu da karaciğer hasarına neden olur (16) (Şekil 3).

TAA, ratlara subletal dozlarda verildiğinde malondialdehitin hepatik konsantrasyonunda anlamlı artışa neden olur. Malondialdehit, lipid peroksidasyonu ve oksidatif stres ile iliŐkili bir metabolittir. Bunu glutasyon azalması takip eder (9,11,17). Carmen D. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, TAA verildikten 12 saat sonra glutasyon ve redükte glutasyon (GSH)/okside glutasyon (GSSG) oranında azalma görülmüştür (11). TAA maruziyetinden sonra GSSG seviyesindeki artış oksidatif hasar için önemli olmakla birlikte asıl önemli olan GSH seviyesindeki azalmadır (11) (Şekil 2).

## 2.4. MELATONİN

Melatonin (5-metohoxy-N-acetyltryptamine), serotonin derivesidir. İlk kez Aaron Lerner tarafından sığer pineal bezinden elde edilmiştir. Melatoninin pineal bezden salgılanması gece olur. Maksimum seviyeye gecenin ortasında ulaŐır. Çoğu organizmada gece seviyeleri, gündüz seviyelerini birkaç kat geçer.

Orijinal melatonin pineal bezde bulunur. Melatoninin pineal bez dıŐındaki kaynakları retina ve beslenme sistemidir (18).

Melatonin, yüksek lipofilik ve orta hidrofilik özelliklere sahip bir maddedir (5,19). Kolaylıkla hücre membranlarını geçer (18) ve subsellüler kompartmanlara girer (5). Plasenta ve kan-beyin bariyerine hızlıca penetre olur. Anne sütünden de salgılanır (18).

Melatonin hayvanlarda mevsimlik üreme kontrolü, sirkadyan ritmin regülasyonu ve uykunun normal seyrinin sürdürülmesi gibi çeşitli fizyolojik fonksiyonlara katılır. İnsan ve kemirgenlerde nöroimmünomodülasyonda rol oynayabilir (19).

Melatoninin şimdiye kadar saydığımız özellikleri spesifik membran reseptörleri tarafından düzenlenmektedir. Melatoninin reseptörden bağımsız yaptığı fonksiyonları da vardır. Melatonin, elektrondan zengin aromatik indol halkası içerir ve elektron donörü olarak görev yaparak elektrofilik radikalleri onarır. Melatonin bir serbest radikal tarafından okside edildiğinde nitrojen merkezli indol katyon radikali oluşur (şekil 4). Daha sonra indol radikal reaksiyona girer. Süperoksit anyon radikali, toksik olmayan forma okside olur. Sonuçta, stabil ürün 5-methoxy-N-formyl-kynuremanin oluşur. Bu işlemde melatonin oksijenin bir molekülünü tüketir. En son oluşan pirol halkası enzimatik olmayan yollarla geri dönüşümsüz olarak okside edilir.

Melatoninin hidroksil radikallerini ( $\cdot\text{OH}$ ) temizleme yeteneği 1993 yılında ortaya çıkmıştır. Hidroksil radikali, tüm serbest radikallerin en reaktif ve toksik olanıdır. Melatonin ile hidroksil radikalının etkileşim ürünü olan indol katyon radikali, oksijen radikalini ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) temizler (şekil 4).  $\text{O}_2^{\cdot-}$  tek başına çok toksik olmamasına rağmen hızlıca  $\cdot\text{OH}$ 'a indirgenebilir (şekil 1). Ayrıca,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  nitrik oksit ile reaksiyona girip peroksinitrit anyonu ( $\text{ONOO}^-$ ) oluşturabilir. Peroksinitrit anyon ( $\text{ONOO}^-$ ), radikal olmayan toksik bir üründür. Son zamanlarda,  $\text{ONOO}^-$ 'nin aynı zamanda melatonin tarafından temizlendiği gösterilmiştir (5,20).

Melatoninin peroksil radikalini ( $LOO^{\cdot}$ ) detoksifiye etmekte de etkili olduğu görülmüştür (5,20).

Melatoninin fizyolojik ve farmakolojik düzeyleri, major bir antioksidan enzim olan glutatyon peroksidazın (GPx) aktivitesini uyarır. GPx, hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve diğer peroksitlerin hücre içi seviyelerini azaltır. Melatonin, GPx'i uyararak, yüksek oranda toksik olan  $^{\cdot}OH$ 'a indirgenen reaktif oksijen ara ürününü ortadan kaldırmış olur. Böylece, GPx'in antioksidatif etkinliği dolaylı yoldan  $^{\cdot}OH$  üretimini azaltmasına bağlıdır. Ayrıca, melatonin glutatyon redüktaz aktivitesini (GRd) uyarır. Böylece, okside glutatyon geri dönüşüme uğrayarak redükte formuna dönüşür. Bunu da GRd için gerekli bir kofaktör olan NADPH'ı üreterek yapar. Melatonin, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PDH)'ı uyararak NADPH'nin yerini doldurur (şekil 2).

Melatonin, manganez süperoksit dismutaz (SOD) ve bakır-çinko SOD'ın mRNA seviyelerini yükseltir. Bu enzimler  $O_2^{\cdot-}$  'yi  $H_2O_2$  'ye dönüştürmede önemlidir (şekil 1).

Melatonin, prooksidatif enzim olan nitrik oksit sentetazı (NOS) da inhibe eder (5,20). Serebellum ve hipotalamusta NOS aktivitesini, dolayısıyla nitrik oksit üretimini azaltmak için fizyolojik düzeylerde melatonin bulunur. Bu serbest radikal ürünleri  $O_2^{\cdot-}$  ile reaksiyona girip  $ONOO^{\cdot}$ 'yu oluşturabilir.  $ONOO^{\cdot}$  radikal olmayan bir üründür.  $^{\cdot}OH$ 'a indirgenebilir. Melatonin böylece NOS'u inhibe ederek hücre içi makromoleküllere zarar veren radikallerin oluşumunu etkili bir şekilde azaltır (20).

Melatonin, intranükleer yüksek konsantrasyonlara ulaşmakta ve bu sayede DNA'yı oksidatif hasardan korumaktadır. Bir çok karsinojenik ajan, toksik serbest radikaller oluşturarak DNA da oksidatif hasara yol açmaktadır (5,20).

Melatonin hücre membranlarını stabilize ederek oksidatif hasara karşı dirençli hale getirir (5).

İyonize radyasyon, hücrelere zarar veren serbest radikaller oluşturarak moleküllerin parçalanmasına neden olan bir karsinojendir. Melatonin, radyasyon ile temastan önce alındığında iyonize radyasyonun yol açtığı DNA hasarını azaltmaktadır (20).

Lipid peroksidasyonu serbest radikaller tarafından başlatılabilir veya mevcut olan lipid peroksidasyonu serbest radikaller ile arttırılabilir. Lipid peroksidasyonu hücrelerin morfolojik ve fonksiyonel bütünlüğünü bozar. Melatonin yüksek lipofilik özelliğinden dolayı serbest radikallere bağlı yağ asidi oksidasyonunu önlemek amacıyla yağdan zengin membranlarda yüksek oranda bulunması beklenir. Melatonin lipid peroksidasyonunu başlatan radikalleri temizleme yeteneğine sahiptir. Aynı zamanda işlemi provake eden LOO' 'yu detoksifiye edebilir. Çeşitli çalışmalarda, bakteriyel lipopolisakkarit, karbon tetraklorid, potasyum siyanid, kainat, Fenton reaktifleri ( $\text{FeSO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$ ) ve L-sistein verilen hayvanlarda membran lipidlerine olan peroksidatif hasarı azaltmada melatonin değerli bulunmuştur. Ayrıca iskemi-reperfüzyon, alkol kullanımı, aşırı egzersiz, Alzheimer amiloid  $\beta$ -proteinin yol açtığı lipid hasarı melatoninle engellenebilir (20) (şekil 3).

Melatoninin, sürekli ışığa maruz kalan ratlarda GPx'in etkisini arttırarak hidroksil radikallerini ( $\cdot\text{OH}$ ) temizlediği görülmüştür (21).

## 2.5. L-KARNİTİN

L-karnitin ( $\beta$ -hidroksi- $\gamma$ -trimetilaminobutirik asit) memeli metabolizması için önemli olan suda çözünebilir bir moleküldür (21). L-karnitin 1905'de keşfedilmesine rağmen 1955'e kadar önemli rolü açıklanamamıştır (22). L-karnitin, karaciğerde lizin

ve methioninden sentezlenmektedir (22,23). Fakat L-karnitin gereksiniminin büyük kısmı özellikle kırmızı et ve süt ürünlerinden alınır (21).

L-karnitin, uzun zincirli yağ asitlerinin oksidasyonunu kolaylaştırır, KoA ile KoA-SH'nin oranını düzenler ve peroksizom ve mitokondriden yakalanan açıl rezidülerine katılır (6). Karnitin ayrıca dallı zincirli aminoasitlerin metabolizmasına ve hücrel membranların stabilizasyonuna katılır. Karnitin, serbest radikal kurtarıcı (scavenger) dır ve nükleer transkripsiyonun kontrolünde olası rol oynar (24).

L-karnitinin en iyi bilinen rolü, enerji üretiminde kullanılmak üzere mitokondri içine uzun zincirli yağ asitlerinin girişini kolaylaştırmaktır (23). Yağ asitleri, sitoplazmada yağ asit bağlayan proteine bağlanır. Bunu takiben açıl-KoA sentetaz ile uzun zincirli açıl-KoA'ya dönüşür. Hücrel membranlar uzun zincirli açıl-KoA'ya geçirgen olmadığından mitokondriyal uzun zincirli yağ asidi üç karnitin spesifik enzimin etkisiyle  $\beta$ -oksidasyona girebilir. Bu enzimlerin birincisi, karnitin palmitoiltransferaz-1 (KPT-1) mitokondri dışı membranında bulunur. Uzun zincirli açıl-KoA dan uzun zincirli açilkarnitin sentezlenmesini katalizler. İkinci enzim açilkarnitin-karnitin translokaz (KTL) mitokondri iç membranında bulunur. Uzun zincirli açilkarnitinden serbest karnitin oluşturur. Üçüncü enzim karnitin palmitoyiltransferaz-2 (KPT-2) dir. Mitokondri iç membranının matriks tarafında yer alır. KPT -1'in tersi reaksiyonu katalizler. Oluşan uzun zincirli açıl-KoA  $\beta$ -oksidasyona uğrayarak asetil KoA oluşur (şekil 5) (25).

L-karnitin, normal veya anormal metabolizma sonucu mitokondride biriken kısa ve orta zincirli yağ asitlerinin mitokondriden taşınmasını kolaylaştırır. Kısa ve orta zincirli asitler,  $\beta$ -oksidasyon veya diğer mitokondriyal olaylar sonucu oluşan açıl-KoA esterleri karnitin açıl transferazın etkisiyle karnitine transesterifiye olur. Bunu

takiben açıl karnitin esterleri, karnitin-açıl karnitintranslokaz ile mitokondrinin dışına taşınır (23).

L-karnitinin iskemik kalbi reperfüzyon hasarından koruduğu gösterilmiştir. Miyokard hücrelerinde oksijen radikallerinin oluşumunu ve bunu takip eden proteinlerin oksidatif hasarını önlediği gösterilmiştir. Bu etki serbest radikal kurtarıcı veya hidroksil radikal oluşumunu önleyici etkisiyle olabilir (23,24).

Karnitin verilmesi, üre siklus defekti, kronik valproik asit tedavisi, karaciğer yetmezliği, organik asidemiler ve Reye's sendromunu içeren amonyak metabolizması bozukluklarında anlamlı yarar sağlayabilir (23). Santral sinir sistemi dejeneratif hastalığı, beyin iskemisi, Alzheimer ve AIDS de karnitin verilmesinin yararlı olduğu görülmüştür. L-karnitinin hemodiyaliz hastalarında uzun süre verilmesinin eritrosit fonksiyonlarını düzelttiği görülmüştür (6).

### 3. MATERYAL ve METOD

#### 3.1. ÇALIŞMA GRUPLARI

Deneysel çalışma grupları toplam 55 adet erkek Wistar albino rat ile oluşturuldu. Daha önce başka araştırmalarda kullanılmamış, sağlıklı, ortalama ağırlıkları  $276\pm 29$  gr olan ratlar 4 gruba ayrıldılar.

**Grup 1:** 10 ratdan oluşturuldu. Kontrol grubu. Bu ratlara sadece intraperitoneal (İ.P) serum fizyolojik verildi.

**Grup 2:** 15 ratdan oluşturuldu. Tioasetamid (TAA) grubu. Bu ratlara İ.P TAA verildi.

**Grup 3:** 15 ratdan oluşturuldu. TAA + melatonin grubu. Bu ratlara İ.P TAA + melatonin verildi.

**Grup 4:** 15 ratdan oluşturuldu. TAA + karnitin grubu. Bu ratlara İ.P TAA + karnitin verildi.

#### 3.2. YÖNTEM

Tüm ratlar uygun şartlarda, ayrı kafeslerde, Başkent Üniversitesi deney hayvanları kurallarına uygun davranılarak takip edildiler. Tüm ratlar 12 saatlik aydınlık- karanlık siklusuna maruz bırakıldılar. Grup 1 deki ratlara 3 gün boyunca günde 1 kez İ.P serum fizyolojik verildi. Grup 2 deki ratlara, 1.gün İ.P serum fizyolojik verildi, 2 ve 3. gün 200mg/kg İ.P TAA (thioacetamide, Sigma) uygulandı. Grup 3 deki ratlara 1, 2 ve 3. günlerde hergün 10 mg/kg İ.P melatonin (melatonin, Sigma) verildi. 2 ve 3. günlerde melatoninden 30 dakika sonra 200mg/kg İ.P TAA uygulandı. Grup 4 deki ratlara 1,2 ve 3. günlerde hergün 400 mg/kg İ.P karnitin (carnitine, Santa Farma) verildi. 2 ve 3. günlerde karnitinden 30



dakika sonra 200mg/kg İ.P TAA uygulandı. Grup 2, 3 ve 4'deki ratlara destek tedavisi ( %5 dektroz + 20 mEq/lit potasyum içeren %0.9 NaCl ) verildi.

Tüm gruplardaki ratlardan, çalışmada kullanılan maddelerin son İ.P uygulanmasından 24 saat sonra kan ve doku örnekleri alındı. Tüm ratlara anestezi sırasında ketamin 50 mg/kg ve xylazine 10mg/kg İ.P uygulandı. Karın orta hat insizyon ile açılarak biyokimyasal testler için her rattan ortalama 3 cc kan örneği alındı. Ardından karaciğer çıkarılarak 5x5 mm boyutlarında parçalar halinde doku örnekleri alındı. Karaciğer doku örnekleri özel buzluk ile - 86<sup>0</sup> C sıcaklıkta saklanmak üzere derin dondurucuya taşındı.

### **3.3. DOKULARIN HAZIRLANMASI ve TESTLER**

Tüm doku örnekleri biyokimyasal analizler yapılncaya kadar -86°C'de saklandılar. Yapılan tüm biyokimyasal testler her hayvandan alınan iki farklı karaciğer örneğinde çift çalışma (toplam 4 çalışma) yapılarak elde edildi. Doku total protein çalışmaları Lowry'nin tariflediği teknikle yapıldı (26). Bir lipid peroksidasyonu ürünü olan malondialdehit (MDA) ve antioksidan redükte glutatyon (GSH) düzeyi tespitleri için karaciğer homojenatları 0,15 M KCl, buz soğuğu, içinde hazırlandılar. MDA, bir lipid peroksidasyonu ve serbest radikal aktivitesi markeri olarak Buege ve Aust'un tariflediği şekilde thiobarbiturik asit reaksiyonu ile hazırlanan karaciğer homojenatlarından çalışıldı (27). Bir hacim örnek, 2 hacim %15 trichloroasetik asid, %0,375 thiobarbiturik asid ve 0,25 N HCl içeren stok reagenti ile karıştırıldı. Hazırlanan örnekler 15 dakika kaynayan su içinde ısıtıldıktan sonra soğutulularak 10 dakika 1000 rpm ile santrifuj edildi. Elde olunan süpernatanın

absorbansı 535 nm'de ölçüldü. Katsayı  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  kullanılarak sonuçlar nmol MDA/gr doku olarak verildi.

Redükte GSH düzeyleri Ellman'ın tariflediği metod ile doku homojenatlarından çalışıldı (28). Örneklerin deproteinizasyonu sonrasında süpernatantlar doku sülfidril grupları ile reaksiyona giren Ellman'ın renkli reagenti ile karıştırıldı. Elde olunan renkli kompleks 412 nm'de ölçüldü. GSH kalibrasyon eğrisi kullanılarak sonuçlar nmol GSH/mg protein olarak verildi.

Ratlardan alınan kanlar 2500 rpm ile 10 dakika santrifuj edilerek serumları elde edildi. Taze olarak serum örneklerinden aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT) ve laktat dehidrogenaz (LDH) düzeyleri tespit edildi.

### **3.4. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME**

Sayısal değerler; normal dağılıma uyup uymadıklarına göre ortalama±standart deviasyon olarak verilmiştir. Data analizi one way ANOVA, post-hoc Duncan's test kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm testlerde gruplar arası farkın anlamlılığı  $p < 0,05$  olarak kabul edilmiştir. İstatistiksel değerlendirmeler SPSS for Windows, versiyon 10.0 kullanılarak yapılmıştır.

## 4. BULGULAR

Deney sırasında Grup 1’de (kontrol grubu) 1 ratın karaciğeri makroskopik olarak hasta görüldüğü için çalışılmamıştır. Diğer ratların hepsinden yeterli serum ve karaciğer doku örnekleri alınıp, biyokimyasal testler (AST, ALT, LDH) ve tüm doku testleri başarı ile sonuçlandırılmıştır (n=9). Grup 2’de tüm ratlardan yeterli serum ve karaciğer doku örnekleri alınıp, biyokimyasal kan testleri başarı ile sonuçlandırılmıştır (n=15). Bu grupta 2 ratın doku homojenatının hazırlanmasında sorun olması nedeniyle MDA ve GSH testleri başarılı olamamıştır, bu nedenle bu iki ratın sonuçları çalışmaya alınmamıştır. Grup 3’deki ratların 2’si deney sırasında kaybedilmiş, diğer ratların biyokimyasal sonuçları başarı ile çalışılmıştır (n=13). Grup 4’deki ratların 1’i deney sırasında kaybedilmiş, diğer 14 ratın kan ve doku örnekleri başarı ile alınmıştır. Bu grupta 1 ratın doku homojenatının hazırlanmasında sorun olması nedeniyle doku MDA ve GSH testleri başarılı olamamıştır. Sonuçta, Grup 4’de 13 ratın sonuçları çalışmaya alınmıştır.

### 4.1. SERUM BİYOKİMYASAL TESTLERİ

Grup 1’de biyokimyasal testleri yapılan 9 ratın serum AST ortalaması  $165\pm 39$  U/L, ALT ortalaması  $51\pm 16$  U/L, LDH ortalaması  $2824\pm 1340$  U/L olarak tespit edilmiştir. Grup 2’de biyokimyasal testleri yapılan 15 ratın serum AST ortalaması  $6328\pm 2756$  U/L, ALT ortalaması  $4903\pm 1670$  U/L, LDH ortalaması  $5300\pm 2734$  U/L olarak tespit edilmiştir. Grup 3’de biyokimyasal testleri yapılan 13 ratın serum AST ortalaması  $4566\pm 2318$  U/L, serum ALT ortalaması  $3821\pm 2001$  U/L, serum LDH ortalaması  $3685\pm 2268$  U/L olarak bulunmuştur. Grup 4’de biyokimyasal testleri yapılan 14 ratın serum AST ortalaması  $3447\pm 2654$  U/L, ALT ortalaması  $2976\pm 1487$

U/L, LDH ortalaması  $2959 \pm 1597$  U/L olarak tespit edilmiştir. AST, ALT ve LDH değerleri Grup 2'de diğer gruplara göre daha yüksek bulunmuştur. AST, ALT ve LDH değerleri Grup 2'de Grup 1'e göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (AST ve ALT için  $p < 0,01$ , LDH için  $p < 0,03$ ). AST, ALT ve LDH'nın serum düzeyleri Grup 3'de Grup 2'ye göre istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte daha düşük bulunmuştur ( $p < 0,39$ ). Grup 4'de ALT ve AST serum düzeyleri Grup 2'ye göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ( $p < 0,01$ ). Grup 4'de LDH serum düzeyleri Grup 2'ye göre anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur ( $p < 0,02$ ). (Tablo 1).

#### **4.2. KARACİĞER DOKU MDA DÜZEYLERİ**

Grup 1'de çalışılan 9 ratın karaciğer dokusu MDA düzeyi ortalaması  $28,5 \pm 2,1$  nmol/gr olarak bulunmuştur. Grup 2'de çalışılan 13 ratın karaciğer dokusu MDA düzeyi ortalaması  $36,3 \pm 3,3$  nmol/gr olarak bulunmuştur. Grup 3'de çalışılan 13 ratın karaciğer dokusu MDA düzeyi ortalaması  $45,6 \pm 13,1$  nmol/gr olarak bulunmuştur. Grup 4'de çalışılan 13 ratın karaciğer doku MDA düzeyi ortalaması  $32,4 \pm 2,6$  nmol/gr olarak bulunmuştur. Karaciğer doku MDA düzeyleri Grup 2'de Grup 1'e göre yüksek bulunmuştur. Ancak istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ( $p < 0,21$ ). Grup 4'de karaciğer doku MDA düzeyleri Grup 1'e göre yüksek, Grup 2'ye göre düşük bulunmuştur. Ancak istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Karaciğer doku MDA düzeyleri Grup 3'de diğer gruplara göre yüksek bulunmuştur (Tablo 2).

### 4.3.KARACİĞER DOKU REDÜKTE GLUTATYON DÜZEYLERİ

Grup 1'de çalışılan 9 ratın karaciğer dokusu GSH düzeyi ortalaması  $26,6\pm 4,3$  nmol/mg olarak bulunmuştur. Grup 2'de çalışılan 13 ratın karaciğer dokusu GSH düzeyi ortalaması  $29,8\pm 4,5$  nmol/mg olarak bulunmuştur. Grup 3'de çalışılan 13 ratın karaciğer dokusu GSH düzeyi ortalaması  $21,1\pm 5,1$  nmol/mg olarak bulunmuştur. Grup 4'de çalışılan 13 ratın karaciğer doku GSH düzeyi ortalaması  $26,1\pm 4,1$  nmol/mg olarak bulunmuştur. Karaciğer doku GSH düzeyleri Grup 1, Grup 2 ve Grup 4'de farklı bulunmamıştır.

## 5. TARTIŞMA

İlaçlar ve çeşitli toksik maddeler ile oluşan karaciğer hasarına bağlı hepatotoksisite son zamanlarda giderek artmaktadır. Endüstriyel ve çevresel hepatotoksinler giderek önem kazanmaktadır. Geleneksel bitkisel ilaçlar ve vitaminleri içeren alternatif tedaviler gittikçe artan miktarda kullanılmaktadır. Hepatotoksisite toplumdaki sarılık ve akut hepatitin %5'ini oluşturmakla birlikte karaciğer hastalığının daha ciddi tiplerinin önemli bir sebebidir. Batı ülkelerinde akut karaciğer yetmezliğinin % 20-75'ini oluşturmaktadır. Elli yaş üzeri hastalar arasında hepatitin % 43'ünün sebebidir.

Karaciğer, gastrointestinal sistem ve portal dolaşım ile periferik organlar ve sistemik dolaşım arasında yer alan bir organdır. Hem hepatic arter hem de portal ven ile kanlandığından dolayı gerek oral gerekse parenteral yolla alınan hemen tüm ilaçlar ve toksik maddelerin ulaştığı bir organdır. Normal şartlarda ilaçlar ve kimyasal maddeler karaciğerde metabolize edildikten sonra vücuttan idrar, safra ve dışkı ile atılırlar. Bu metabolizma sırasında toksik metabolitler de oluşur. Bu toksik metabolitler ise detoksifikan enzimler tarafından detoksifikasyon işlemine tabi tutulur. Toksik madde oluşumu ile detoksifikasyon arasındaki denge bozulduğu zaman hepatobiliyer patolojiler oluşur. Toksik metabolitler hücrede yaşamsal fonksiyonları olan belirli yerlere etki ederek, hücre hasarı veya ölüme sebep olurlar (29).

Karaciğer hastalıklarının çoğu formunda reaktif oksijen metabolitleri (ROM) patogeneizde önemli rol oynar. Toksik karaciğer hasarında da ROM'leri önemli rol oynarlar. Karaciğer hücreleri aşırı ROM'a maruz kaldığı zaman oksidatif stres ortaya çıkar ve hücresel fonksiyonlar etkilenir (7). Oksidatif stres sonucu oluşan

ROM'leri lipid, protein ve DNA gibi hücrel elemanları yıkabilir (8). Lipid peroksidasyonu sonucu doku malondialdehit (MDA) düzeylerinde artış görülür. Glutasyon (GSH), toksin ve serbest radikallere karşı savunma yapan thioldür. Karaciğerdeki en önemli antioksidandır (10).

Tioasetamid (TAA), ratlarda kısa dönemde yüksek doz verildiğinde hepatik nekroz yapan bir hepatotoksindir. Karaciğer hasarı, TAA'in biyotransformasyona uğraması sonucu oluşan serbest radikaller ile meydana gelir (9,14). Bu serbest radikaller karaciğer dokusunda oksidatif strese yol açarlar (9). TAA, ratlara subletal dozlarda verildiğinde MDA'nın hepatik konsantrasyonunda anlamlı artışa neden olur. Bunu glutasyon azalması takip eder (9,11,17). Biz bu çalışmayı antioksidan etkileri olduğu bilinen L-karnitin ve melatoninin ratlarda TAA ile oluşturulan toksik hepatit modelinde karaciğer hasarından koruyucu etkilerini araştırmak amacıyla planladık.

Hepatotoksinler ile oluşan karaciğer hasarının tanınması ve takibinde biyokimyasal testler önem taşımaktadır (29). TAA'nın intraperitoneal uygulanması sonrası serum aminotrasferaz değerlerinde yükselme olması uyguladığımız hepatotoksik ajanın belirgin hepatik fonksiyon bozukluğuna yol açtığını göstermektedir. Bizim araştırmamızda TAA grubunda (Grup 2), kontrol grubuna göre (Grup 1) serum AST, ALT, LDH seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı ( $p<0.01$ ). Özellikle biyokimyasal test değerlerinde TAA grubu (Grup 2) ve karnitin grubu (Grup 4) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olması karnitin grubunun toksik hasardan daha az etkilendiğini göstermektedir ( $p<0,01$ ) (tablo 1). Atilla K. ve arkadaşlarının rat karaciğeri üzerinde uyguladıkları iskemi-reperfüzyon modelinde, karnitin verilen grupta serum aminotransferaz enzimlerinin düzeyi karnitin verilmeyen gruba göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur (30). Ancak bu

çalışmada L-karnitinin karaciğer dokusunu koruyucu etkisinin neye bağlı olduğu gösterilememiştir.

TAA'ya bağlı karaciğer hasarının patogeneğinde önemli yere sahip olan oksidatif stresi en iyi gösteren parametrelerden bir tanesi redükte glutatyondur (GSH). Araştırmamızda TAA+L-karnitin verilen grupta (Grup 4) karaciğer doku GSH düzeyleri kontrol grubu (Grup 1) ile benzer bulunmuştur (tablo 2). L-karnitinin antioksidan rolü, mitokondriyal fonksiyonlar üzerine olan olumlu etkisi nedeniyle mitokondriyal süperoksit üretiminin daha az olması olabilir. Böylece hücre içi reaktif oksijen radikali miktarı düşecek dolayısıyla redükte glutasyon düzeyleri düşmeyecektir.

L-karnitin yağ asitlerinin mitokondride  $\beta$ -oksidasyona girmesini sağlayarak hücre enerji metabolizması için kritik öneme sahip olduğu bilinmektedir (24). Oksidatif stresin belirleyicisi olan GSH'nın miktarında azalma serbest radikal oluşumu ve bunu takip eden mitokondri hasarına yol açabilir. Bu da enerji üretiminde defekte neden olabilir (32). L-karnitin, GSH dengesini düzeltebilir. Antioksidan GSH'nın sentezlenmesi ATP bağımlı olan iki basamakta düzenlenir (şekil 2). Karnitin verildikten sonra karaciğer doku GSH seviyelerinin kontrol grubu ile benzer bulunmasının sebebi karnitinin enerji arttırma etkisi olabilir.

Reaktif oksijen ürünleri lipid peroksidasyonuna yol açmaktadır. Lipid peroksidasyonu hücre organel membranlarının yapısal ve fonksiyonel yapısını zedelemektedir. Bu TAA'a bağlı hepatotoksisitede önemli bir rol oynamaktadır (9). TAA ile yapılan çalışmalarda MDA'nın hepatik konsantrasyonunda anlamlı artış saptanmıştır. Hücreyi ölüme götüren mekanizma lipid peroksidasyonu ile başlıyor olabilir (9,11,17).



Bu araştırmada lipid peroksidasyonu ürünü olarak karaciğer dokusunda MDA düzeyleri çalışılmıştır. Oksidatif stres sonucu oluşan lipid peroksidasyonu ile doku MDA düzeyinde artış beklenmektedir. Araştırmamızda TAA verilen grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da karaciğer doku MDA düzeyleri yüksek bulunmuştur ( $36,3\pm 3,3$  nmol/gr vs  $28,5\pm 2,1$  nmol/gr). Araştırmamızda Grup 4'deki karaciğer doku MDA düzeyleri, tek başına TAA verilen gruba (Grup 2) göre istatistiksel olarak anlamlı fark olmamakla birlikte daha düşük bulunmuştur ( $32,4\pm 13,1$  nmol/gr vs  $36,3\pm 3,3$  nmol/gr,  $p>0,05$ ). Bu sonuç, L-karnitinin lipid peroksidasyonunu çalışmamızda uyguladığımız dozlarda kısmi olarak engellediğini göstermektedir. Dayanandan A. ve arkadaşlarının yaptığı bir deneysel çalışmada 300 mg/gün L-karnitin uygulamasının, ratların karaciğer ve kalp dokusunda lipid peroksidasyonunu belirgin olarak azalttığını belirtilmiştir (30). Bu sayede L-karnitinin hücrelere önemli bir antioksidan özellik kazandırdığı belirtilmiştir.

Vanella A. ve arkadaşlarının yaptığı deneysel çalışmada karnitinin kalbin iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruyucu olduğu belirtilmiştir. Miyokard hücrelerinde oksijen radikallerinin oluşumunu, bunu takip eden proteinlerin oksidatif hasarını önlediğini göstermiştir . Bu etkisinin birkaç nedene bağlı olabileceğini belirtmiştir. Bu nedenlerden birisi L-karnitinin lipid peroksidasyonunu önleyici etkisidir. L- karnitinin süperoksit anyon ve hidroksi radikal oluşumunu inhibe ettiğini göstermişlerdir (24).

Rani PJA. ve arkadaşlarının yaptığı deneysel çalışmada karnitinin yaşlanma boyunca oluşan oksidatif hasarı baskıladığını göstermişlerdir (32).

Sonuç olarak L-karnitinin toksik hasara karşı karaciğeri koruması birkaç etki ile olabilir. Bunu özellikle mitokondri ve fonksiyonları üzerine yaptığı olumlu etki nedeniyle oksidatif stresi azaltarak yaptığını söyleyebiliriz. Bu çalışmada ortaya

çıkan lipid peroksidasyonunu kısmi olarak önleyici etkisi, L-karnitinin birkaç özelliği nedeniyle oluşmuş olabilir. Hücre içi oksijen radikali kaynağı olan mitokondriyi oksidatif hasardan korumasının sonucunda mitokondride üretilen süperoksit anyon miktarı azalmış olabilir. Bu sayede L-karnitin reaktif oksijen radikallerinin yaptığı lipid peroksidasyonunu azaltmada katkı sağlamaktadır.

Melatoninin (MEL) in vitro ve in vivo antioksidan fonksiyonları olduğu bilinmektedir. Son zamanlarda yapılan çeşitli in vitro çalışmalar pineal hormon olan melatoninin etkili antioksidan fonksiyonları olduğunu göstermiştir (33). Melatonin, serbest oksijen radikallerini elimine eder. Hidroksil radikal, single oksijen, hidrojen peroksit, peroksil radikal gibi serbest oksijen radikallerine karşı kurtarıcı (scavenger) etkisi vardır. Ayrıca melatonin normal rat karaciğerinde oksidatif stresi azaltır. Bunu süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon redüktaz (GSSG-R) gibi antioksidan enzimlerin ve antioksidan GSH'nın seviyelerini artırarak yapar (5). Hayvanlar ve dokular lipid peroksidasyonuna maruz kaldığında lipidlerin oksidatif hasarına karşı melatonin önemli korunma sağlar (34,35). Aktif oksijen ürünleri yoluyla uyarılan lipid peroksidasyonu etanol, haloalkanlar, endotoksik şok, iskemi-reperfüzyon ile uyarılan akut karaciğer hasarının patogeneğinde rol oynar. Melatonin antioksidan etkisi yoluyla ratlarda İR ve endotoksik şok ile uyarılan akut karaciğer hasarına karşı koruyucu etkiyi arttırdığı rapor edilmiştir. Yukarıda da bahsedildiği gibi TAA, ratlarda yüksek doz verildiğinde hepatik nekroz yapar. Bu hasarda oksidatif stresin büyük rolü vardır. TAA, ratlara subletal dozlarda verildiğinde MDA'nın hepatik konsantrasyonunda artma ve GSH'nın hepatik konsantrasyonunda azalma görülür (9,14). Bu çalışmayı planlamamızın sebeplerinden birisi de antioksidan etkileri olduğu bilinen

melatoninin ratlarda TAA ile oluşturulan toksik hepatit modelinde oksidatif streden koruyucu rolünü araştırmaktır.

TAA'nın intraperitoneal uygulanması sonrası serum aminotrasferaz değerlerinde yükselme olması uyguladığımız hepatotoksik ajanın belirgin hepatik fonksiyon bozukluğuna yol açtığını gösterdiğini daha önce belirtmiştik. Araştırmamızda melatonin uygulanan grupta (Grup 3) serum biyokimyasal testlerin tek başına TAA uygulanan gruba göre (Grup 2) istatistiksel olarak anlamlı olmasa da daha düşük olması melatonin grubunun toksik hasardan daha az etkilendiğini göstermektedir (tablo 1). Bu sonuç, ratlardaki TAA ile uyarılan akut karaciğer hasarında melatoninin koruyucu rolü olabileceğini göstermektedir. Daha önce melatonin ile yapılan çalışmalar melatoninin toksik karaciğer hasarında koruyucu olduğunu göstermiştir. Ohta Y. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, karbon tetraklorür (CCl<sub>4</sub>) ile oluşturulan akut karaciğer hasarında melatonin verilen grupta serum aminotransferaz enzimlerinin düzeyleri melatonin verilmeyen gruba göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Bu sonuçların, ratlardaki CCl<sub>4</sub>'e bağlı akut karaciğer hasarında melatoninin muhtemel antioksidan etkisi yoluyla olduğu söylenmiştir (33). Yine Ohta Y. ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada  $\alpha$ -naphthylisothiocyanate (ANIT) ile uyarılan akut karaciğer hastalığının ilerlemesinde melatoninin koruyucu etkisine bakılmıştır. Hepatik hücre hasarının göstergesi olan serum ALT, AST ve LDH düzeylerinde tek başına ANIT alan grupta kontrol grubuna göre anlamlı yükseklik saptanırken, ANIT+melatonin alan gruptaki ratların serum AST, ALT ve LDH düzeyleri tek başına ANIT alan gruba göre anlamlı olarak azaltmıştır (35).

TAA'ya bağlı oksidatif hasarı göstermede GSH'nın önemli parametrelerden biri olduğundan daha önce bahsetmiştik. Araştırmamızda karaciğer doku GSH

düzeylelerine bakıldığında melatoninin koruyucu rolü saptanmamıştır. Bu sonuç, melatoninin oksidatif stresden korunmadaki etkisinde başka faktörlerin de rolünün olabileceğini akla getirmiştir. Daha önce melatoninin oksidatif hasardan korunmadaki rolü üzerine yapılan çalışmalarda verilen melatonin dozu üzerinde durulmaktadır. Ohta Y. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada CCl<sub>4</sub> verilen ratlarda oluşan akut karaciğer hasarında melatoninin tedavi edici etkisine bakılmıştır. CCl<sub>4</sub> ile birlikte 10, 50 ve 100 mg/kg olmak üzere üç farklı doz melatonin uygulanmıştır. CCl<sub>4</sub> ile birlikte 50 ve 100 mg/kg melatonin verilen gruplarda tek başına CCl<sub>4</sub> verilen gruba göre anlamlı karaciğer doku GSH artışı izlenirken, 10 mg/kg verilen grupta tek başına CCl<sub>4</sub> verilen gruba göre karaciğer doku GSH düzeylerinde fark saptanmamıştır. Sonuçta, melatoninin koruyucu etkisinin doz bağımlı olduğu söylenmiştir (33). Bizim çalışmamızda da melatonin 10 mg/kg uygulanmıştır. Bu dozda uygulanan melatonin ile yeterli anti-oksidatif etki oluşturulamamış olabileceği düşünüldü.

Ohta Y. ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada,  $\alpha$ -naphthylisothiocyanate (ANIT)'in ratlarda oluşturduğu akut karaciğer hasarının ilerlemesinde melatoninin koruyucu etkisine bakılmıştır. ANIT'in serbest oksijen radikalleri oluşturarak lipid peroksidasyonuna bağlı karaciğer hasarı yaptığı belirtilmiştir. Burada melatonin 10 ve 100 mg/kg olmak üzere iki farklı dozda uygulanmıştır. ANIT ile karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda 10 ve 100 mg/kg melatoninin oral verilmesi hepatik GSH konsantrasyonundaki artışı etkilemediği belirtilmiştir. Bunun sebebi olarak da hepatik GSH düzeylerinde erken evre yükselme görülse de bu etkinin 48 saat sonra ortadan kalktığı olarak gösterilmiştir. Dolayısıyla ratlarda ANIT'a bağlı karaciğer hasarında koruyucu olarak melatonin verilmesi karaciğer dokusundaki GSH artışı üzerine etkisiz bulunmuştur (35). Bizim

çalışmamızda da melatoninin son dozu verildikten 24 saat sonra karaciğer doku örnekleri alınmıştır. Bu nedenle hepatik GSH düzeylerinde daha erken dönemde olabilecek yükselme 24 saat sonra normale gelmiş olabilir.

Hücrelerin ve dokuların oksidatif strese bağlı hasarı ile lipid peroksidasyonu oluşmaktadır. Bu durumda oksidatif hasara karşı karaciğer hücrelerini koruduğu iyi bilinen GSH'nın doku düzeyleri azalırken lipid peroksidasyonu ürünü olan malondialdehit (MDA) düzeylerinde artış görülmektedir (33). Bizim yaptığımız çalışmada da TAA verilen gruptaki (Grup 2) karaciğer doku MDA düzeyleri kontrol grubuna (Grup 1) göre daha yüksek bulunmuştur ( $p < 0,21$ ). Bu da oksidatif hasara bağlı lipid peroksidasyonuna bağlanabilir. TAA+melatonin verilen grupta (Grup 3) karaciğer doku MDA seviyelerine bakıldığında melatoninin oksidatif stres üzerindeki etkisi saptanamamıştır.

Jahovic N. ve arkadaşlarının ratlarda yaptığı çalışmada methotreksata (MTX) bağlı hepatorenal oksidatif hasarda melatoninin koruyucu etkisine bakılmıştır. Methotreksata bağlı karaciğer ve böbrek hasarının olası mekanizmalarından birisinin lipid peroksidasyonu olduğu söylenmiştir. Serbest oksijen radikalleri aracılığı ile oluşan lipid peroksidasyonunun hücre membranlarının hasarının önemli sebeplerinden biri olduğuna inanılmaktadır. Ratlara methotreksat verilmesi karaciğer dokusunda MDA düzeylerinde artış ile sonuçlanmıştır. Melatoninin ise bu etkiyi geri döndürdüğü belirtilmiştir. Melatoninin aynı zamanda karaciğer doku GSH düzeylerinde melatonin verilmeyen gruba göre anlamlı artışa neden olmuştur. Melatoninin bu etkileri sayesinde MTX'in oksidatif toksik etkisini geri dönüştürme yeteneğine sahip olduğu belirtilmiştir (36).

Sonuç olarak melatonin ile yapılan çalışmaların çoğunda melatoninin antioksidan etkileri olduğu gösterilmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada ise TAA ile

oluşturulan karaciğer hasarında melatonin, karaciğer enzimlerinin serum seviyelerinde azalma sağlamıştır. Ancak oksidatif hasara karşı korumada etkili bulunmamıştır. Melatoninin TAA ile oluşturulan karaciğer hasarından koruması oksidatif stres dışında başka mekanizmalarla da olabileceği dışunılmüştür.

## 6. SONUÇLAR

Ratlarda tioasetamid ile oluşturulan toksik hepatit modelinde, L-karnitin, özellikle karaciğer enzimlerinin serum düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma yaptığı görülmüştür. L-karnitin, oksidatif stresin yarattığı lipid peroksidasyonu üzerine kısmi koruyucu etki sağladığı görülmüştür. Melatonin, tioasetamidin karaciğerde oluşturduğu toksik hasarda transaminazların serum seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da azalma yaparak karaciğer hasarına karşı koruyucu olabileceği görülmüştür. Melatoninin, oksidatif stres üzerine koruyucu etkisi saptanamamıştır. L-karnitin ve melatoninin oksidatif strese karşı olan etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi için ek çalışmaların planlanmasının gerekli olduğu düşünülmüştür.

## 7. ÖZET

Karaciğer hastalıklarının çoğu formunda oksidatif stres önemli rol oynamaktadır. Oksidatif stresin patogenezinde reaktif oksijen metabolitleri önemli rol oynar. Karaciğer hücreleri aşırı reaktif oksijen metabolitine maruz kaldığı zaman oksidatif stres ortaya çıkar ve hücresel fonksiyonlar etkilenir. Oksidatif stres sonucu oluşan reaktif oksijen metabolitleri lipid, protein ve DNA gibi hücresel elemanları yıkabilir ve lipid peroksidasyonu oluşabilir. Deneysel hepatotoksin olan tioasetamid karaciğerde oksidatif stres ve lipid peroksidasyonuna neden olmaktadır. Antioksidan ve serbest radikallere karşı kurtarıcı özellikleri olduğu bilinen L-karnitin ve melatoninin tioasetamide bağlı karaciğer hasarında muhtemel oksidatif stresden koruyucu etkilerini saptayabilmek amacı ile bu araştırma planlandı.

Toplam 55 Wistar albino rat çalışmaya dahil edilmiştir. Ratlar 4 gruba ayrılmıştır. Kontrol grubunda 10 diğer gruplarda 15 rat bulunmaktadır.

*Grup 1*; intraperitoneal serum fizyolojik verilen kontrol grubu,

*Grup 2*; intraperitoneal tioasetamid verilen grup,

*Grup 3*; intraperitoneal tioasetamid+melatonin verilen grup,

*Grup 4*; intraperitoneal tioasetamid+L-karnitin verilen gruptur.

Tüm ratlardan işlemler tamamlandıktan sonra serum aminotransferazları (AST, ALT) ve laktatdehidrogenaz (LDH) çalışılmak üzere kan örnekleri ve doku malondialdehid ve redükte glutasyon düzeylerini tespit etmek üzere karaciğer doku örnekleri alınmıştır.

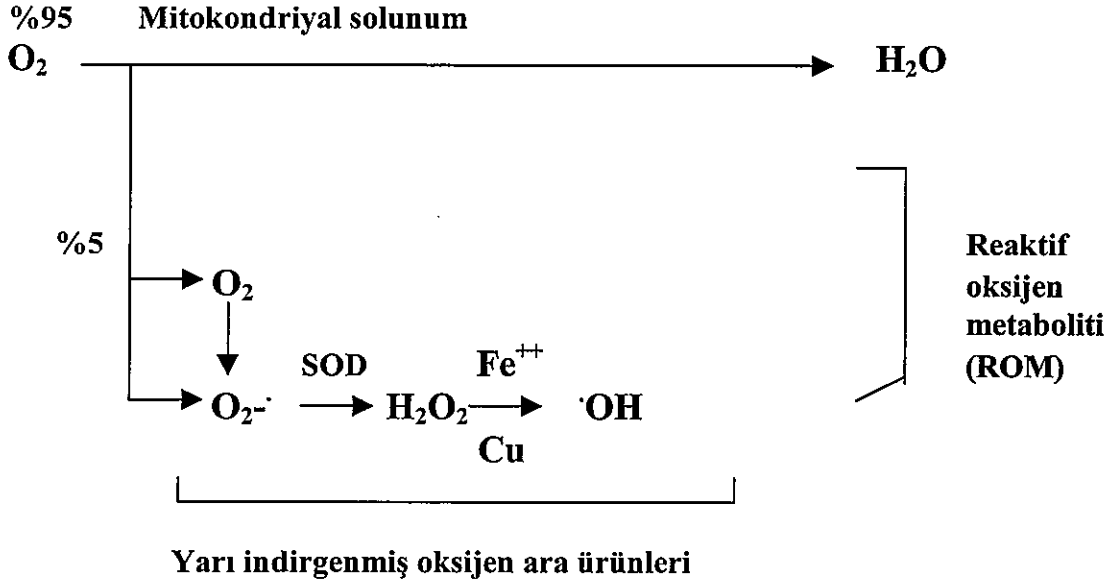
Araştırma bulgularında: Grup 2, Grup 3 ve Grup 4 serum biyokimyasal testleri (AST, ALT ) değerleri kontrol grubundan yüksektir ( $p<0.01$ ). Tioasetamid ile birlikte melatonin verilen grupta (Grup 3) serum AST ve ALT değerleri tek başına



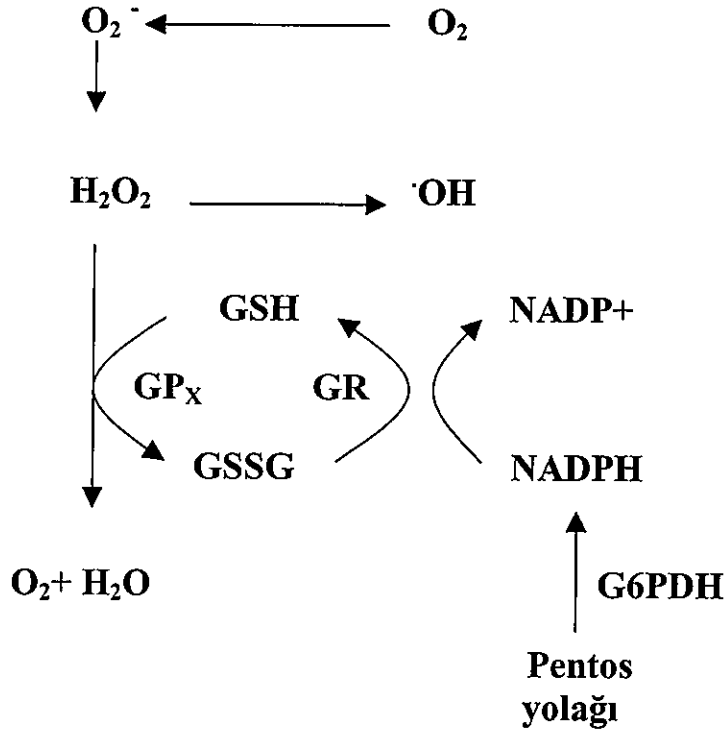
tioasetamid verilen gruba (Grup 2) göre daha düşük bulunmuştur ( $p<0,39$ ). Tioasetamid ile birlikte L-karnitin verilen grupta (Grup 4) AST ve ALT değerleri tek başına tioasetamid verilen gruba (Grup 2) göre daha düşük olup aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ( $p<0.01$ ). Karaciğer dokusunda MDA düzeyi ortalaması Grup 2'de kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur ( $p<0.21$ ). Grup 3'de doku MDA düzeyi ortalaması kontrol grubuna göre daha yüksek bulunurken Grup 4'de daha düşük bulunmuştur.

Ratlarda oluşturulan karaciğerin toksik hepatit modelinde L-karnitinin serum transaminaz seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde düşürerek toksik hasara karşı koruma sağladığı görülmüştür. L-karnitin, oksidatif stresin yol açtığı hasarı kısmi olarak azaltarak karaciğer dokusunu koruduğu saptanmıştır. Melatoninin ise serum transaminaz seviyelerinde düşme sağlayarak toksik hasara karşı kısmi koruma sağladığı görülmüştür. Melatoninin oksidatif stres üzerine koruyucu etkisi saptanamamıştır.

**Şekil 1: Oksijen metabolizması**



Şekil 2: Glutatyonun antioksidatif etkisi



GSH: Redükte glutatyon

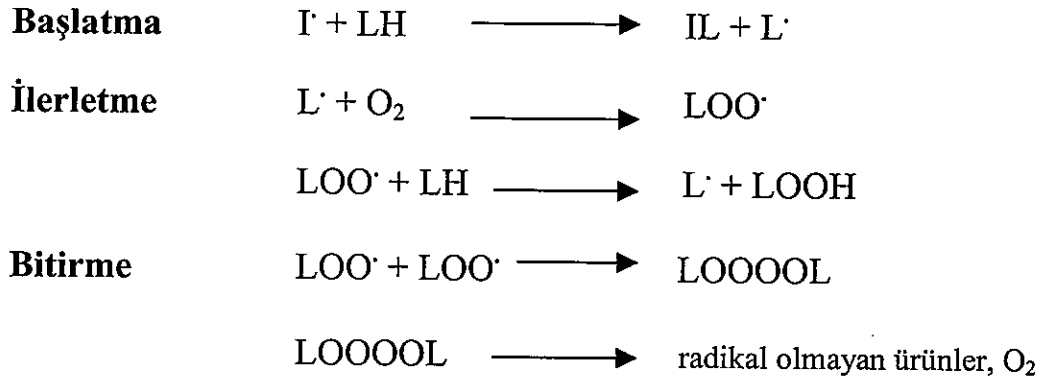
GSSG: Okside glutatyon

GPx: Glutatyon peroksidaz

GR: Glutatyon redüktaz

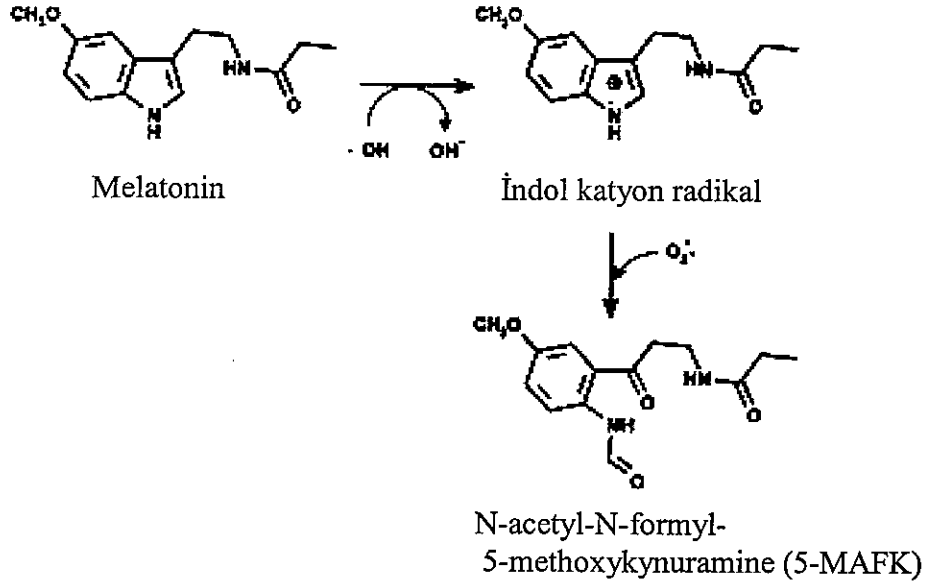
G6PDH: Glikoz 6-fosfat dehidrogenaz

### Şekil 3: Lipid peroksidasyonu



$I\cdot$  = Başlangıç radikali  
 $L\cdot$  = Lipid radikal  
 $LOO\cdot$  = Peroksil radikal  
 $LH$  = Lipid molekülü

Şekil 4: Melatonin  $\cdot\text{OH}$  ve  $\text{O}_2^{\cdot-}$  için kurtarıcı (scavenger) etkisi



**Tablo 1: Biyokimyasal test sonuçları (ortalama  $\pm$  standart deviasyon)**

	<b>AST (U/L)</b>	<b>ALT (U/L)</b>	<b>LDH (U/L)</b>
Grup 1	165 $\pm$ 39	51 $\pm$ 16	2824 $\pm$ 1340
Grup 2	6328 $\pm$ 2756	4903 $\pm$ 1670	5300 $\pm$ 2734
Grup 3	4566 $\pm$ 2318	3821 $\pm$ 2001	3685 $\pm$ 2268
Grup 4	3447 $\pm$ 2654	2976 $\pm$ 1487	2959 $\pm$ 1597

**Tablo 2: Karaciğer doku MDA ve GSH testleri sonuçları (ortalama  $\pm$  standart deviasyon)**

	<b>Doku MDA düzeyi (nmol/gr)</b>	<b>Doku GSH düzeyi (nmol/mg)</b>
Grup 1	28,5 $\pm$ 2,1	26,6 $\pm$ 4,3
Grup 2	36,3 $\pm$ 3,3	29,8 $\pm$ 4,5
Grup 3	45,6 $\pm$ 13,1	21,1 $\pm$ 5,1
Grup 4	32,4 $\pm$ 2,6	26,1 $\pm$ 4,1

MDA: Malondialdehit, GSH: redükte glutatyon

## 9. KAYNAKLAR

1. Geoffrey C. Frarrell. Liver disease caused by drugs, anesthetics and toxins. Sleisenger&Ford trans. Gastrointestinal and Liver Disease. 7th edition, volum II, chapter 73, 1403-47.
2. Dienstag JL, Isselbache KJ. Toxic and drug-induced hepatitis. Harrison's Principles of Internal Medicine. 15 th edition, volume 1, part eleven, 1737-1742.
3. Bruck R, Aeed H, Shirin H, Matas Z, Zaidel L, Avni Y, Halpern Z. The hydroxyl radical scavengers dimethylsulfoxide and dimethylthiourea protects rats againtns thioacetamide-induced fulminant hepatic failure. Journal of Hepatology 1999;31:27-38.
4. Sewerynek E, Reiter RJ, Melchiorri D, Ortiz GG, Lewinski A. Oxidative damage in the liver induced by ischemia-reperfusion: protection by melatonin. Hepato-gastroenterology 1996;43:898-905.
5. Meki MMA, Hussein AAA. Melatonin reduces oxidative stress induced by ochratoxin A in rat liver and kidney. Comp Bio and Phy 2001;Part C 130:305-313.
6. Lango R, Smolenski RT, Narkiewicz M, Suchorzewska J, Lysiak-Szydłowska W. Influence of L-carnitine and its derivatives on myocardial metabolism and fuction in ischemic heart disease and during cardiopulmonary bypass. Cardiovascular Research 2001;51:21-29.
7. Kaplowitz N. Mechanisms of liver cell injury. Journal of Hepatology 2000;32:39-47.
8. Fernandez JC, Garcia-Ruiz C, Colell A, Morales A, Mari M, Mirande M, Ardite E. Oxidative stress: Role of mitokochondria and protection by glutathione. BioFactors 1998;8:7-11.
9. Diez-Fernandez C, Sanz N, Alvarez AM, Zaragoza A, Cascales M. Influence of aminoguanidine on parameters of liver injury and regeneration induced in rats by a necrogenic dase of thioacetamide. British Journal of Pharmacol 1998;125:102-108.



10. Lu SC, Huang ZZ, Yang H, Tsukamoto H. Effect of thioacetamide on the hepatic expression of  $\gamma$ -glutamylcystein synthetase subunits in th rat. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1999;159:161-168.
11. Diez-Fernandez C, Sanz N, Cascales M. Intracellular calcium concentration impairment in hepatocytes from thioacethamide-treated rats. Implications for the activity of  $Ca^{+2}$ - dependent enzymes. *Journal of Hepatology* 1996;24:460-467.
12. Dyroff MC, Neal AR. Studies of the mechanism of thioacethamide S-oxide by rat liver microsomes. *Molecular Pharmacology* 1982,23:2129-227.
13. Chielì E, Malvaldi G. Role of the microsomal FAD-containing monooxygenase in the liver toxicity of thioacetamide S-oxide. *Toxicology* 1984,31:41-52.
14. Diez-Fernandez C, Bosca L, Fernandez-Simon L, Alvarez A, Cascales M. Relationship between genomic DNA Ploidy and parameters of liver damage during necrosis and regeneration induced by thioacethamide. *Hepatology* 1993;18:912-918.
15. Sun F, Hayami S, Ogiri Y, Hruna S, Tanaka K, Yamada Y, Tokumaro S, Kojo S. Evaluatin of oxidative stress on lipid hydroperoxide, vitamin C and vitamin E during apopitosis and necrosis caused by thioacethamide in rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000;1500:181-185.
16. Bruck R, Oren R, Aeed H, Papa M, Matas Z, Zaidel L, Avni Y, Halpern Z. Hypothyroidism minimizes liver damage and improves survival in rats with thioacetamide induced fulminant hepatic failure. *Hepatology* 1998;27:1013-1020.
17. Müller D, Sommer M, Kretzschmar M, Zimmermann T, Buko VU, Lukivskaya OJ, Dargel R. Lipid peroxidation in thioacethamide- induced macronodular rat liver cirrhosis. *Arc Toxicol* 1991;65:199-203.
18. Bubenik GA. Gastrointestinal melatonin, localization, function ve clinical relevance. *Digestive Diseases and Scienses*, 2002;47:2336,2348.
19. Cabrera J, Burkhardt S, Tan DX, Manchester LC, Karbownik M, Reiter RJ. Autoxidation and toxicant-inducedoxidation of lipid and DNA in monkey liver: Reduction of Molecular damage by melatonin. *Pharmacology&Toxicology* 2001;89:225-230.
20. Reiter RJ. Cytoprotective properties of melatonin: Presumed association with oxidative damage and aging. *Nutrition* 1998;14:691-696.

21. L-karnitin. Archives of disease in childhood. The Journal of the British Paediatric Association. Archives of Disease in Childhood 1996;74:475-478.
22. Kelly GS. L-karnitin:Therapeutic applications of a conditionally-essential amina acid. Altern Med Rev 1998;3:345-360.
23. Rebouche CJ. Caritine function and requirements during the life cycle. FASEB J. 1992;6:3379-3386.
24. Vanella A, Russo A, Asquaviva R, Campisi A, Di Giacomo C, Sorenti V, Barcellona ML. L-Propionyl-carnitine as superoxide scavenger, antioxidant, and DNA cleavage protector. Cell Biology and Toxicology 2000;16:99-104.
25. Calvani M, Reda E, Martelli ED. Regulation by carnitine of myocardial fatty acid and carbohydrat metabolism under normal and pathological conditions. Basic Res Cardiol 2000;95:75-83.
26. Lowry OH. Protein measurement with the folin phenolreagent. J Biol Chem 1951;193:265-275.
27. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol 1978;53:302-310.
28. Ellman GL. Tissue sulphhydryl groups. Arch Biochem Biophys 1959;82:70-77
29. Çakaloğlu Y. İlaça bağlı hepatobiliyer hastalıklar. Gastroenterohepatoloji. Editör; Ökten A. Nobel Tıp Kitabevleri; 2001:481-513.
30. Atilla K, Çoker A, Sağol O, Çoker I, Topalak O, Astarçioğlu H, Karademir S, Astarçioğlu I. Protective effect of carnitine in an experimental ischemia-reperfusion injury. Clin Nutr 2002;21(4):309-313.
31. Dayanandan A, Kumar P, Panneerselvam C. Protective rol on liver and heart lipid peroxidation in atherosclerotic rats. Journal of Nutritional Biochemistry 2001;12:254-257.
32. Rani PJA, Panneerselvam C. Carnitine as a free radical scavenger in aging. Experimental Gerontology 2001;36:1713-1726.
33. Ohta Y, Kongo M, Sasaki E, Nishida K, Ishiguro I. Therapeutic effect of melatonin on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. J. Pineal Res.2000;28:119-126.
34. Melchiorri D, Reiter RJ, Bam A. Potent protective effect of melatonin on in vivo paraquat induced oxidative damage in rats. Life Sci 1995;56:83-89.

35. Ohta Y, Kongo M, Kishikawa T. Preventive effect of melatonin on the progression of  $\alpha$ -naphthylisothiocyanate-induced acute liver injury in rats. *J. Pineal Res.* 2003;34:185-193.
36. Jahovic N, Çevik H, Özer Şehirli A, Yeğen BÇ, Şener G. Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. *J. Pineal Res.* 2003;34:282-287.