

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ETİL ALKOL İLE OLUŞTURULAN KARACİĞER
TOKSİKASYONUNDA *CHLORELLA VULGARIS* VE PROPOLİS
KULLANIMININ KARACİĞER HİSTOPATOLOJİSİ, LİPİT
PEROKSİDASYON, GSH ve GSH-Px DÜZEYLERİ ÜZERİNE
ETKİSİ**

Pelin ŞAHİN

Fizyoloji Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman

Prof. Dr. Nadide Nabil KAMILOĞLU

2015-KARS

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ETİL ALKOL İLE OLUŞTURULAN KARACİĞER
TOKSİKASYONUNDA *CHLORELLA VULGARIS* VE PROPOLİS
KULLANIMININ KARACİĞER HİSTOPATOLOJİSİ, LİPİT
PEROKSİDASYON, GSH ve GSH-Px DÜZEYLERİ ÜZERİNE
ETKİSİ**

Pelin ŞAHİN

Fizyoloji Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman

Prof. Dr. Nadide Nabil KAMILOĞLU

2015-KARS

KAFKAS ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Fizyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans programı çerçevesinde Pelin ŞAHİN tarafından hazırlanmış olan “Etil Alkol ile Oluşturulan Karaciğer Toksikasyonunda *Chlorella Vulgaris* ve Propolis Kullanımının Karaciğer Histopatolojisi, Lipit Peroksidasyon, GSH ve GSH-Px Düzeyleri Üzerine Etkisi” adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonucunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca oy **birliği** ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: **25.12.2015**

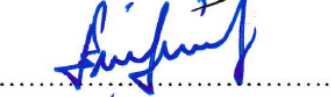
Adı Soyadı

İmza

Başkan : Prof. Dr. Nadide Nabil KAMİLOĞLU

.....


Üye : Yrd. Doç. Dr. Emin ŞENGÜL

.....


Üye : Yrd. Doç. Dr. Birkan TOPÇU

.....


Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Ali Rıza

AKSOY

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
RESİMLER DİZİNİ	VIII
ÖNSÖZ	IX
ÖZET	XII
SUMMARY	XIV
1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER	1
1.1. Karaciğer Toksikasyonu ve Etil Alkolün Biyotransformasyonu	1
1.2. Etanolün Farmakolojik Özellikleri	6
1.2.1. Karaciğer Toksikasyonunda Etanol'ün Metabolizması	6
1.3. Karaciğer Histolojisi	11
1.4. Etil Alkol Toksikasyonu ve Karaciğer Histopatolojisindeki Değişiklikler	13
1.5. Etil Alkol Toksikasyonu Karaciğerde Oksidatif Stres	14
1.6. Etil Alkol Toksikasyonu ve Karaciğerde Biyolojik Antioksidanlar	17
1.7. Chlorella Vulgaris	19
1.7.1 Chlorella Vulgaris ve Toksikasyon	21
1.8. Propolis ve Antioksidan Etkileri	22
1.8.1 Karaciğer Toksikasyonunda Propolis'in Rolü	24
2. MATERYAL VE METOT	27
2.1. Materyal	27
2.1.1. Çalışmada Kullanılan Aletler	27
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeleri	27
2.2. Metot	28
2.2.1. MDA Düzeylerinin Belirlenmesi	28
2.2.2. GSH Düzeylerinin Belirlenmesi	29
2.2.3. GSH-Px Düzeylerinin Belirlenmesi	29
2.2.4. Karaciğer Dokusunda Histopatolojik Değişikliklerin Belirlenmesi	29
2.2.5. Propolis ve Chlorella vulgaris Ekstraktının Hazırlanması	29
2.2.6. İstatistiksel Analiz	30

3.	BULGULAR	31
3.1.	Grupların Karaciğer Dokusundaki Histopatolojik Bulgular	31
3.2.	Grupların MDA Düzeylerinde Belirlenen Değişiklikler	32
3.3.	Grupların GSH Düzeylerinde Belirlenen Değişiklikler	33
3.4.	Grupların GSH-Px Düzeylerinde Belirlenen Değişiklikler	34
4.	TARTIŞMA VE SONUÇ	36
5.	KAYNAKLAR	41
6.	ÖZGEÇMİŞ	46

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADH	: Alkol dehidrogenaz
ALDH	: Asetalaldehit dehidrojenaz
ALT	: Alaninaminotransferaz
AST	: Aspartat aminotransferaz
ATP	: Adenozintrifosfat
Ca	: Kalsiyum
CAPE	: Kafeik asit fenil etil ester
CAT	: Katalaz
CCl ₄	: Karbon tetraklorür
Cd	: Kadmiyum
CO ₂	: Karbondioksit
Cu	: Bakır
DNA	: Deoksi ribonükleik asit
Fe	: Demir
GGT	: Gamma-glutamyltransferase
GP	: Glutasyon peroksidaz
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
GSSG	: Glutathione disulfide
GST	: Glutasyon s-transferaz
H ₂ O	: Su
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
K	: Potasyum
LDH	: Laktat dehidrogenaz
L-NAME	: N ω -Nitro-L-arginine methyl ester
LPO	: Lipid peroksidasyonun
MDA	: Malondialdehit
MEOS	: Mikrozomal etanol enzim sistemi
Mg	: Magnezyum
Mn	: Mangan

Na	: Sodyum
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotit
NO	: Nitrik oksit
NO ₂ ⁻	: Nitrit
NO ₃ ⁻	: Nitrat
O ₂ [•]	: Süperoksit
PUFA	: Poliansatüre yağ asidi
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksid dismutaz
TBA	: Tiyobarbitürk asit
TNF- α	: Tümör nekroz faktör
Zn	: Çinko

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa no
Şekil 1. Alkolün Metabolik Biyotransformasyon Yolu	3
Şekil 2. Alkol dehidrogenaz (ADH) Enzim Sistemi Yolu ile Metabolize Edilmesi	4
Şekil 3. Mikrozomal Enzim Sistemi ile Metabolize Edilmesi	5
Şekil 4. Katalaz Enzim Sistemi Yolu İle Metabolize Edilmesi	5
Şekil 5. Etil Alkol	7
Şekil 6. Etanolün Elde Edilme Aşamaları	8
Şekil 7. Alkol Mayalanması	9
Şekil 8. Karaciğer hücresi	12
Şekil 9. Karaciğer Hücresinin Histolojik Yerleşimi	14
Şekil 10. Grupların MDA Düzeylerinde Belirlenen Değişiklikler	33
Şekil 11. Grupların GSH Düzeylerinde Belirlenen Değişiklikler	34
Şekil 12. Grupların GSH-Px Düzeylerinde Belirlenen Değişiklikler	35

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa no
Resim 1. Grupların Karaciğer Dokularının Histolojik Kesitleri	32

ÖNSÖZ

Alkol tüketimi ve kullanımı hakkındaki bilgiler çok uzun yıllar öncesine dayanmaktadır ve alkol dezenfektan, anestezi ve içki yapımında kullanılmıştır. Bu özelliklerinin yanı sıra bağımlılık etkisi de toplumsal olarak önemli bir tartışma konusu olmuştur. Beyin fonksiyonlarını baskılayıcı özelliğinin yanısıra toksik etkisinin de bulunduğu bilinen alkolün kullanımı M.Ö. 2000 yıllarına kadar dayanmakta olup oldukça yaygın olarak kullanılan maddeler arasına girmiştir (Kalyoncu ve Mırsal 2014).

Alkol türlerinin sürekli ve giderek artan dozlarda tüketimi alkolizm olarak değerlendirilmekle birlikte, yüksek dozlarına karşı duyulan tüketim isteğinin alkolik karaciğer hastalığı olarak tanımlanan problemlerin sebebi olduğu bilinmektedir. Bedensel, ruhsal ve psikolojik problemleri de beraberinde getiren alkolizm, davranışsal bir bozukluk olarak da değerlendirilen toplumsal bir problemdir.

Organizmaya girdiği andan itibaren çok kısa bir sürede kana geçebilen ve fizyolojik olarak ihtiyaç duyulmayan bir madde olan alkol, çeşitli karbonhidratların fermentasyonu ile elde edilebilmektedir. İlaç, kimyasallar ve bazı toksik ajanların yanı sıra alkolün de atılımının büyük bir kısmı karaciğerde biyotransformasyon olarak adlandırılan reaksiyonlarla hepatositlerde gerçekleşir. Alkolün sürekli ve aşırı kullanımı ile karaciğer hepatosit hücrelerinde gerçekleşen detoksifikasyon reaksiyonları dolayısıyla oluşan serbest radikaller hücre membranı ve hücresel enzimlerde fonksiyon bozukluğuna ve hücrede işlev bozukluğuna sebep olabilmektedir. Karaciğerde gerçekleşen detoksifikasyon reaksiyonları nikotinamid adenin dinükleotit (NAD) olarak adlandırılan bir elektron taşıyıcı sistem aracılığıyla gerçekleşmektedir. NAD^+ , elektron alarak NADH haline dönüşürken, ortamda bulunan NAD moleküllerinin azalması yağların ikincil enerji kaynağı olarak kullanılmasını engelleyerek hücrede yağ birikimine neden olur.

Sindirim sistemi dolayısıyla organizmaya giren pek çok yabancı organik ve inorganik maddeler portal sistemle karaciğere ulaşarak burada detoksifikasyon

reaksiyonlarıyla zararsız hale getirilir. Bu reaksiyonlar sırasında meydana gelen reaktif oksijen türleri karaciğer hücrelerinde çeşitli harabiyetlere neden olabilir. Bu sebeplerle hasara uğramış olan hepatositleri tedavi edebilmek için, bugün alternatif tıp yöntemleri lipit peroksidasyonu azaltıcı ve antioksidan sistemi destekleyici etkilerinden faydalanmak maksadıyla tercih edilmektedir. Bu yöntemlerde kullanılan ve antioksidan sistem üzerine etkisinden dolayı tercih edilen tek hücreli bir alg olan *Chlorella vulgaris*'in yapısındaki flavonoidler, mineraller, zengin α ve β karoten içeriği ile askorbik asit ve alfa tokoferol gibi birçok antioksidan özellikli kofaktöre sahip olması nedeniyle karaciğer hasarının önlenmesinde etkili olabileceği araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Peng ve ark. 2009, Oukarroum ve ark. 2012, Li ve ark. 2013). Ayrıca, kimyasal detoksifikasyon reaksiyonları sırasında serbest radikalleri ortadan kaldırdığı ve hücre yağlanması ile nekroz oluşumunun önüne geçebildiği tespit edilmiştir (Peng ve ark. 2009).

Propolis, arıların kavak, meşe, kayın, okaliptüs, akasya ve kozalaklı ağaçlardan toplayarak kovani soğuk ve enfeksiyonlardan korumak için kapladıkları reçinemsi bir maddedir. Yapısında bulunan yüksek flavonoid içeriği ve polifenoller ile kalsiyum (Ca), potasyum (K), çinko (Zn) ve demir (Fe) gibi birçok mineral propolise; antimikrobiyal, antitümöral, antitoksik ve antiinflamatuvar gibi birçok antioksidan etki kazandırmaktadır. Ayrıca, yüksek antioksidan içeriği sayesinde hücreleri lipit peroksidasyona karşı koruyucu etkilere sahiptir. Toksik ajanların organizmadan uzaklaştırılması sırasında karaciğerde bulunan enzim sistemleri üzerine olumlu etkide bulunduğu bildirilmektedir. Bu doğal antioksidan kaynağının, reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve serbest radikallerin uyardığı karaciğer hastalığının düzeltilmesinde veya önlenmesindeki etkisi ve karaciğer hücresi üzerine koruyucu aktivitesi pek çok araştırmada gösterilmiştir (Polat ve Koçan 2006, Saral ve Kolaylı 2012).

Bu çalışmada etil alkol ile oluşturulan akut karaciğer toksikasyonunda *Chlorella vulgaris* ve Propolis kullanımının karaciğer histopatolojisi ve karaciğer dokusunun MDA, GSH ile GSH-Px düzeyleri üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmamda bana her zaman sabırla destek olan, ilgisini, sevgisini ve emeğini esirgemeyen bir tanecik danışmanım Prof. Dr. Nadide Nabil Kamiloğlu'na, çalışmamda beni destekleyen ve akademik hayatıma sayısız katkıda bulunan değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Birkan Topçu, Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Avni Eroğlu, Yrd. Doç. Dr. Gözde Atila ve Araş. Gör. Mustafa Makav'a, yine laboratuvar çalışmalarımda beni yalnız bırakmayan arkadaşlarım Dr. Öğr. Barış Yıldız ve YL. Öğr. Tarık Mecit'e, histopatolojik çalışmamda gerekli laboratuvar çalışması için yardımlarını esirgemeyen Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. şahin Aslan başta olmak üzere tüm ğretim üyelerine, asistanlarına ve sevgili arkadaşım Dr. Öğr. Serap İlhan'a ve bütün eğitim-ğretim hayatım boyunca maddi manevi destekleri için başta annem ve babam olmak üzere tüm şAHİN ailesine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Bu çalışmada, etil alkol ile oluşturulan akut karaciğer toksikasyonunda *Chlorella vulgaris* ve propolis kullanımının karaciğer histopatolojisi, MDA, GSH ve GSH-Px düzeyleri üzerine etkisinin incelenmesi amaçlandı. Bu amaçla, 10-12 aylık, 200-250 gr. ağırlığında 32 adet erişkin erkek Sprague Dawley ratlar kullanıldı. Ratlar her grupta 8 hayvan bulunacak şekilde 2 deney ve 2 kontrol grubu olmak üzere 4 gruba ayrıldı. 1. Grup kontrol grubu olarak değerlendirildi ve 5mg/kg izokalorik maltoz gavajla verildi. 2. Gruba 7 g/kg/gün Etil alkol + %50 su, 3. Gruba önce 300 mg/kg/gün *Chlorella vulgaris*, sonra 7 g/kg/gün Etil alkol+ %50 su ve 4. Gruba önce 200 mg/kg/gün propolis, sonra 7 g/kg/gün Etil alkol+ %50 su gavajla verildi. İlk uygulamadan 15 gün sonra ratlar eter anestezisi altında sakrifiye edildi. Alınan karaciğer doku örnekleri lipit peroksidasyon, GSH ve GSH-Px düzeylerine bakılmak üzere -20°C'de saklandı. Ayrıca, karaciğer örnekleri % 10'luk formaldehit çözeltisine konularak histopatolojik olarak inceleninceye kadar saklandı.

Histopatolojik incelemelerde, kontrol grubunun karaciğerinde herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Ancak, etil alkol ile toksikasyon oluşturulan hayvanların karaciğerinde hasar olduğu, hücre bütünlüğünün bozulduğu ve hücre içinde yer yer vakuolleşmelerin meydana geldiği gözlemlenmiştir. *Chlorella vulgaris* ve propolis verilen grupların karaciğerinde etil alkol toksikasyonu sonucu oluşan bozuklukların yer yer azaldığı veya kaybolduğu belirlendi.

MDA düzeyinin Kontrol Grubu'na göre Etil Alkol Grubu'nda istatistiksel olarak belirgin düzeyde yüksek olduğu görülürken ($p<0.001$), *Chlorella vulgaris* ve Propolis Grupları'nın MDA düzeylerinin Kontrol ($p<0.05$) ve Etil Alkol Grubu'na ($p<0.001$) göre düşük olduğu gözlenmiştir. GSH enzim düzeylerinin Etil Alkol Grubu'nda Kontrol Grubu'na göre belirgin şekilde düşük olmasına karşın ($p<0.05$), *Chlorella vulgaris* ve Propolis Grupları'nın GSH enzim düzeylerinin Etil alkol ve Kontrol Grubu'na göre belirgin şekilde yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0.001$). GSH-Px enzim düzeylerinin Etil Alkol Grubu'nda Kontrol Grubu'na göre düşük

olduğu ($p<0.05$), *Chlorella vulgaris* ve Propolis Grupları'nın GSH-Px enzim düzeylerinin ise Etil Alkol Grubu'na göre yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0.001$).

Sonuç olarak, akut alkol toksikasyonunda dođal antioksidanlardan olan propolis ve *Chlorella vulgaris*'in kullanımının karaciđer dokusunu koruyucu etkinliđi tespit edilmiřtir. Propolis ve *Chlorella vulgaris*'in bu etkinliđini karaciđer antioksidan enzim sistemlerini destekleyerek ve lipit peroksidasyon düzeyini dűřürerek yaptığı dűřünülmektedir.

SUMMARY

In this study, it was aimed to investigate of effect of using *Chlorella vulgaris* and propolis on liver histopathology, levels of lipid peroxidation, GSH and GSH-Px in acute liver toxication which induced by ethyl alcohol. For this purpose, 10-12 monthold, 200-250 g, 32 Sprague-Dawley rats were used. Animals were divided into 4 groups in which 2 experimentand 2 control. In each group had 8 rats. Group 1 was evaluated as the control group and 5 mg/kg isocaloric maltose were administrated using by gavage. For Group 2, 7g/kg/day ethly alcohol solution (50%), for Group 3 first 300 mg/kg/day *Chlorella vulgaris*, then 7g/kg/day ethly alcohol solution (50%), for Group 4, first 200 mg/kg/day propolis, then 7g/kg/day ethly alcohol solution (50%) was administrated by using gavage. After 15 days of administration, the rats were sacrificed under ether anesthesia. Taken liver tissue samples were kept at -20°C in order to investigate the lipid peroxidation, GSH and GSH-Px levels. In addition, liver samples were kept in 10% formaldehyde solution until histopathologically investigate.

In histopathological examinations, there is no change was observed in liver of Control Group. However, formed damage that shown as failed histological integrity and the locally balloons in the cells were observed in liver of animals with ethly alcohol toxication. It was determined that ethly alcohol intoxication disorder in the cell decreased or dissappear in the liver cells of *Chlorella vulgaris* and propolis treated groups.

While the MDA levels in the Ethly Alcohol Group were statistically high distinctly compared to the Control Group ($p < 0.001$), MDA levels of *Chlorella vulgaris* and Propolis Groups were observed as low compared to Control ($p < 0.05$) and Ethly Alcohol Groups ($p < 0.001$). GSH enzyme levels of *Chlorella vulgaris* and Propolis Groups were higher than Ethly Alcohol and Control Groups ($p < 0.001$). The GSH enzyme levels of Ethly Alcohol Group were observed low as compared to Control Group ($p < 0.05$). GSH-Px enzyme levels of Ethyl Alcohol Group were determined were low compared to Control Group ($p < 0.05$). GSH-Px enzyme level of

Chlorella vulgaris and Propolis Groups were high as compared to Ethyl Alcohol Group ($p < 0.001$).

Consequently, it was determined that using of natural antioxidants, Propolis and *Chlorella vulgaris*, had protective effect on liver tissue in acute alcohol toxication. It is considered that *Chlorella vulgaris* and Propolis were made this effect though by supporting the antioxidant enzyme systems and reducing the lipit peroxidation.

1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER

1.1. Karaciğer Toksikasyonu ve Etil Alkolün Biyotransformasyonu

Tarihte bağımlılık yapan ilk maddenin alkol olduğu tespit edilmiştir. Eski zamanlardan bu yana alkolün rahatlatıcı etkisi insanlar tarafından keşfedilmiş ve kullanım sebebini kolaylaştırmıştır. Alkolün ilk kullanımının bal, elma, üzüm gibi şekerli yiyeceklerin fermente olarak tüketilerek başladığı düşünülmektedir. Daha sonraki zamanlarda üzüm fermentasyonu ile alkol üretimine dair bilgiler M.Ö. 6000 yılına kadar uzamaktadır. Ayrıca bu dönemlerde şarabın da kullanıldığı ve ilaç olarak da tüketildiği bilgileri bulunmaktadır (Uzbay 1981). Orta çağda ateşli hastalıkların tedavisinde kullanılmakla birlikte, sürekli olarak kullanımının bağımlılığa neden olması ve çeşitli fizyolojik fonksiyonlarda problemler oluşturması nedeniyle kullanımı sınırlandırılmıştır (Kalyoncu ve Mırsal 2000, Özfiliz 2001).

Alkol tahıl, meyve gibi karbonhidratların fermantasyonu sonucu elde edilen iyi bir dezenfektan ve yüksek dozlarda algı azalmasıyla ve motor fonksiyonlarda bozulmayla seyreden anesteziye sahiptir. Ancak, bağımlılık oluşturması ve canlı organizmaların sindirim sistemlerinde, karaciğer ve böbreklerinde toksisiteye neden olması ayrıca, cinsel güçte azalma ile sinir sistemini baskılama gibi fizyolojik etkiler meydana getirmesi ve organizmanın stabil işleyişini bozması nedeniyle etil alkol de toksik maddeler arasına girmiştir (Tunçok 2003). Toksik olduğu kabul edilen maddeler karaciğerde bazı metabolik değişiklikler ile vücuttan uzaklaştırılmaktadır. Organizma için toksik etkili maddelerin daha az toksik bileşiklere çevrilerek vücuttan uzaklaştırılması detoksifikasyon olarak adlandırılmaktadır. Detoksifikasyonda 'toksikolojik devir' olarak da adlandırılan emilim, dağılım, birikim, değişim ve atılım süreçleri büyük oranda karaciğerde gerçekleşmektedir (Budağ 2011, Bat 2014, Tucer 2015).

Alkol kullanımının bir hastalık sebebi olarak kabul edilmesi 14. yüzyıla kadar uzamaktadır. Tıbbi olarak kanıtlanması ve 'alkolizm' olarak ifade edilmesi 1800'lü yıllarda ve 19.yüzyıl ortalarında olmuştur. 1904 yılında alkolizmin bir davranış

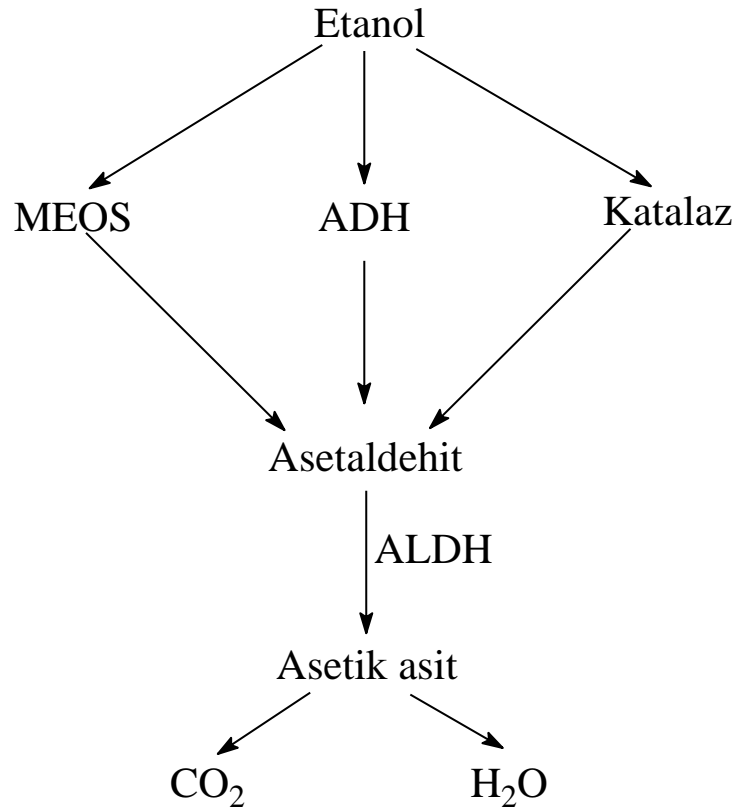
bozukluğu olduğu fikri ortaya atılmıştır ve bedensel, ruhsal ve toplumsal sağlık bozulması olarak da desteklenmiştir. En son tanımlamalar WHO tarafından 1992 yılında ve Amerikan Psikiyatri Birliği tarafından 1994 yılında yapılmıştır ve alkol kullanımının ‘biyopsikososyal’ bir rahatsızlık olduğu kabul edilmiştir. Hastalığın tanımı ve sonuçlarıyla ilgili çelişkiler devam etmekte olup tanı ve tedavinin bir uzmandan çok sorunu yaşayan kişilerin kabullenmesi ile aşılacağı düşünölmektedir. Alkol kullanımına bağlı olarak kişinin bağımlı olma durumuna karar verilmesi hali bazı gözlemler aracılığıyla belirlenmektedir. Alkol, beyni etkileyerek keyif verici etkileri ile bağımlılık oluşturur ve alınmaması halinde gerçekte huzursuzluk durumundan kurtulmak için tekrar alma isteği oluşturur. Bu nedenle, alkol ve türevleri kullanıldıkları miktara bağlı olmak koşuluyla, ilk olarak tüketildiğinde bağımlılık değil uyarıcı etkiler gösterdiği, içilen miktardaki sürekli artış ve buna bağlı olarak alkol toleransının artması, alkol alınmadığı durumlarda yoksunluk duygusunun yaşanması bağımlılık oluşumu için alt yapıyı oluşurmaktadır (Uzbay 2014). Her defasında bir öncekinden fazla alkol alma isteği, kendini kontrol edememe ve bırakmayı başaramama, alkol kullanımı sebebiyle devam eden sosyal yaşamından uzaklaşma ve bununla beraber gelişen psikolojik rahatsızlıklar alkol bağımlılığının meydana geldiğinin habercisidir (Kalyoncu ve Mırsal 2000).

Ağızdan alınan alkol, vücudun bütün sıvılarına kolaylıkla geçebilir ve emilimi mide ve ince bağırsaktan yapılır. Vücuda ağız yoluyla alınan alkol yemek borusu, mide ve sonrasında ince bağırsaklara ulaşır. Alınan alkolün neredeyse tamamı ince bağırsaklardan emilerek portal yolla karaciğere ulaşır. Karaciğer, organizmaya giren alkolün büyük bir bölümünün metabolik olarak işlev gördüğu organdır. Alkol karaciğer hücrelerinde sitozolde bulunan alkol dehidrogenaz (ADH) enzim sistemi, endoplazmik retikulumda bulunan mikrozomal etanol enzim sistemi (MEOS) ve peroksizomlarda bulunan katalaz enzim sistemi olmak üzere üç farklı şekilde metabolize edilir (Akyılmaz 2002, Bouneva ve ark.2003, Özkan 2007).

Portal yolla karaciğere ulaşan alkolün biyotransformasyon olarak da adlandırılan metabolik dönüşümü karaciğerde gerçekteşir. Biyotransformasyon olayı, karaciğerin özelleşmiş hücreleri olan hepatositlerde gerçekteşmektedir (Kalyoncu ve

Mırsal 2000, Eren ve ark. 2004). Biyotransformasyonun ilk aşaması olan Faz1'de; monooksijenaz özelliği bulunan sitokrom P-450 enzim sistemi yardımıyla hidroksillenme reaksiyonlarının gerçekleştiği evredir. Bu kimyasal olaylar hidroliz, redüksiyon ve oksidasyon gibi daha küçük bileşene ayrılma olaylarıdır. Bir sonraki aşama olan Faz 2'ye geçen reaksiyon ürünleri glukuronik asit, sülfat veya glutatyon ile toksik ajanları uzaklaştırırken su açığa çıkması ile sonuçlanan aşamadır (Kuralay 2003, Zamani ve Yıldırım 2014).

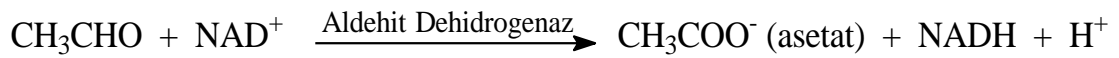
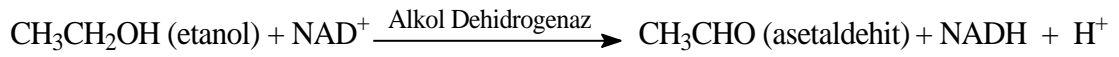
Biyotransformasyon reaksiyonları, alkolün karaciğerde metabolik olarak işlev görebilmesi için özelleşmiş enzim sistemlerinden oluşmaktadır. Tüm reaksiyonlar sonucunda meydana gelen ürün asetalaldehit dehidrojenaz (ALDH) ile metabolize edilerek oluşan asetaldehittir (Şekil1).



Şekil 1. Alkolün Metabolik Biyotransformasyon Yolu (Akyılmaz 2002).

Sitozolde gerçekleşen metabolik reaksiyon, alkol dehidrogenaz enzimi ile asetaldehidde, asetaldehid de aldehyd dehidrogenaz enzimi ile asetikaside dönüşür. Son olarak da karbondioksit (CO₂) ve su (H₂O) olarak vücuttan uzaklaştırılmaktadır (Özcan 2008). Asetaldehit reaktif bir üründür ve alkole bağlı karaciğer hasarının sebebi olduğu düşünülmektedir. Asetaldehit, mitokondriyal glutatyonun azalmasına sebep olur, yağ asitlerinin mitokodriyal β- oksidasyonunu azaltır ve membran lipitlerinin okside ederek serbest oksijen radikallerinin oluşmasına sebep olur (Özerol 1996).

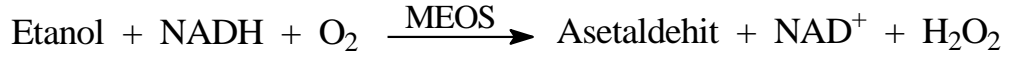
Etanol, mitokondri başta olmak üzere taşıyıcı proteinler, enzimler, membran akışkanlığına ve karaciğer hücre membranına zarar verebilir. Diğer taraftan, alkol metabolizması sonucu oluşan asetat, krebs döngüsü, elektron taşıma sisteminin aracılığıyla yağ asitlerinin sentezinde kullanılır. Bu yüzden alkol önemli bir enerji kaynağıdır ve ikincil enerji kaynağı olarak kullanılan yağların kullanımını engellenmektedir. Etanolün oksidasyonu, nikotinamid adenin dinükleotit (NAD)'i indirgenmiş şekli olan NADH'a dönüştürür. Yağların oksidasyonu için gerekli olan NAD'ın azalması yağ asitlerinin oksidasyonunu engeller ve hepatositlerde yağ birikimine sebep olur (Bouneva ve ark. 2003, Özkan 2007, Şekil 2).



Şekil 2. Alkol dehidrogenaz (ADH) Enzim Sistemi Yolu ile Metabolize Edilmesi.

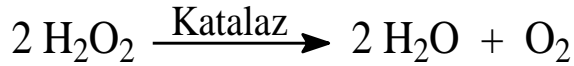
Mikrozomal etanol oksidasyon sistemi (MEOS) alkol, kimyasal ya da ilaçların biyotransformasyonunda bir cevap olan sitokrom P-450 2E1 (CYP2E1) redüktaz enzim sistemini ve P-450 izoenzim grubunu içerir. P-450 2E1 yolu, alkol alımı ile uyarılır (Reuben 2006). Bu metabolik yolda bir oksijen NADPH'ı NADP⁺'ye yükseltir ve öte yandan diğer oksijen de etanolden asetaldehit oksidasyonuna

sebepler olur. Böylece oksijen atomları indirgenmiş olur ve bu durumun sonucu olarak da iki mol su oluşur. Endoplazmik retikulumda membrana bağlı olarak bulunan MEOS, etanolün yıkımı sırasında oksijen yardımıyla NADPH'nin oksidasyonunu sağlar (Lieber 1999, Akyılmaz 2002, Şekil 3)



Şekil 3. Mikrozomal Enzim Sistemi ile Metabolize Edilmesi.

Diğer bir aşama ise Katalaz yoludur. Peroksizomlarda yerleşmiş ve hidrojen peroksit (H_2O_2) varlığında uyarılan bir enzimdir. Alkolü metabolize ettiği miktar %1-2 oranındadır. Bu yüzden her zaman aktive olan bir enzim değildir. Aynı zamanda sürekli olarak alkol tüketmeyen insanlarda aktivitesinin daha yüksek olduğu görülmüştür (Hoek ve ark. 2002, Şekil 4).



Şekil 4. Katalaz Enzim Sistemi Yolu ile Metabolize Edilmesi.

Yüksek dozlarının toksik etkiye sahip olduğu bilinen etanol, karaciğerde bazı detoksifikasyon mekanizmaları ile organizma için zararsız bileşiklere dönüştürülerek uzaklaştırılmaktadır. Aşırı ve sürekli kullanımının elektron taşıyıcı sistemde oluşturduğu azalma nedeniyle, hücrelerde yağ birikimine sebep olduğu, oluşan hepato steatozun hücrelerde ROS oluşumunu başlatan sinyalleri yarattığını ve bunun takiben antioksidan mekanizmaların yetersizliğinin hücre hasarını da beraberinde getirdiği bilinmektedir.

1.2. Etanolün Farmakolojik Özellikleri

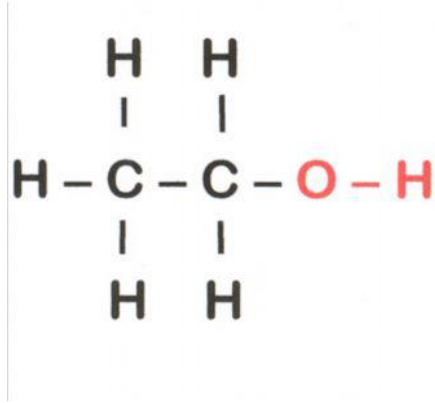
Organik yapılu bir bileşik olan etanol (etil alkol, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{OH}$) iki karbonlu alifatik yapılu kimyasal bir maddedir. Karbonhidratlar, meyveler ve tahılların fermentasyonu sonucunda elde edilmektedir. Renksiz, yanıcı, kendine özgü kokusu ve tadı olan bir sıvıdır. Suda neredeyse yüzde yüze yakın bir çözünme gösterir. Bu özelliği dolayısıyla sindirim kanalına kolayca geçerek ve karaciğer aracılığıyla sistemik dolaşıma katılmaktadır (Özcan 2008).

Vazodilatör etkisinden dolayı damar genişletici özelliği vardır. Bu durum etil alkolün özelliğine bağlı olmayıp bir ara ürün olan asetaldehit ile ilişkilendirilmektedir. Etanol ağızdan alınıp mideye ulaştığında, midede hidroklorik asit ve gastrin salınımı arttırarak kusma ve bulantıya sebep olabilmektedir. Sempatik sinir sistemi yoluyla bazı hormonları uyararak kalp atım hızının artmasına, damarların genişlemesine, kan akımının hızlanmasına ve ciltten hızlı bir şekilde ısı kaybına sebep olur. Aynı zamanda vazomotor etkisinden dolayı alkol alımı sonrasında yüz kızarmaları da gözlenebilir (Coşkunol ve Altıntoprak 1999). Aynı zamanda solunum sayısının artmasına ve solunum sayısının ve derinliğinin değişmesine sebep olur. Hormonal düzeyde hem stimüle edici hem de inhibe edici etkisi bulunmaktadır. Antidiüretik hormonu baskılayarak diüretik etki yaratırken, adrenalin salınımını uyararak kardiovasküler ve respiratör değişikliklere neden olur (Yalçın ve ark. 2003) .

1.2.1. Karaciğer Toksikasyonunda Etanol'ün Metabolizması

Etanol olarak da bilinen etil alkol, doymuş bir karbon grubuna hidroksil grubunun bağlanmasıyla oluşan organik bir moleküldür (Şekil 5). Düz zincirli bir yapısı ve kendine özgü tadı ve kokusu vardır. Renksiz, uçucu ve yanıcı bir sıvıdır (Özcan 2008). Molekül ağırlığı 46,07 g/mol, yoğunluğu 0,789 g/cm³ , erime noktası -114 °C ve kaynama noktası 78 °C olan bir sıvıdır (Uzbay 2014). Karbonhidratların fermentasyonu veya distilasyonu sonucu elde edilmektedir. Şeker kamışı, mısır, buğday gibi tahıllar kullanılan hammaddeler arasındadır. Etil alkol biyoyakıt,

antiseptik, glikojen yapılı maddelerin korunması ve bazı histokimyasal çalışmalarda kullanılmaktadır. Dokulardan su çekerek protein bozulması, doku sertleşmesine ve denatürasyonuna sebep olur. Keyif verici etkisinin yanı sıra yüksek dozlarının toksik etkiye sebep olduğu bildirilmektedir (Meral ve Saydan Kanberoğlu 2012). Plazma proteinlerine bağlanmaz ve vücudun sıvı bölümlerine kolayca geçebilir (Uzby 2014).



Şekil 5. Etil Alkol (Özcan 2008).

Gay-Lussac tarafından şekerin fermantasyonu ile etanol oluşumu ilk olarak 1815 yılında formülize edilmiştir (Bengisu 2014).

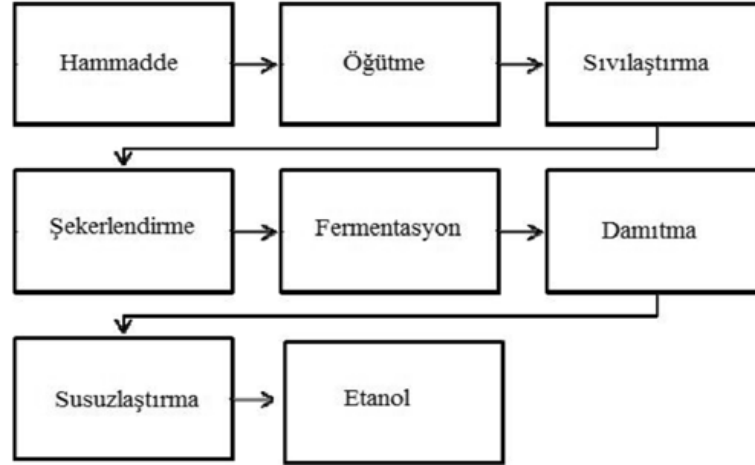


Herhangi bir kaynaktan etanol elde edildiğinde izlenen yol dört temel aşamadan oluşur;

Bunlar sırasıyla;

- Şekerin açığa çıkması için ön işlemlerin uygulanması,
- Bakteri ya da mayaların kullanılması ile şekerin etanol ve CO_2 'e dönüşmesi,

- Etanolün distilasyon yöntemi ile fermentasyon ortamındaki diğer bileşenlerden ayrılması,
- Dehidrasyon uygulaması ile etanol ile birlikte bulunan suyun uzaklaştırılmasıdır (Meral ve Saydan Kanberoğlu 2012, Şekil 6).

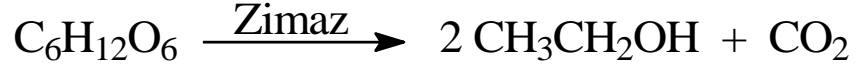


Şekil 6. Etanolün Elde Edilme Aşamaları (Meral ve Saydan Kanberoğlu 2012)

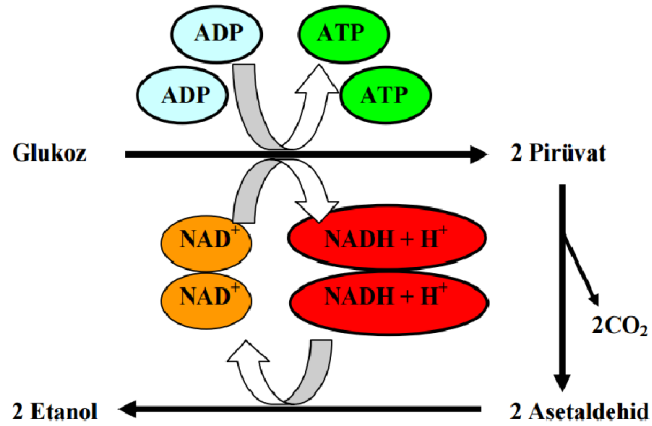
Endüstriyel olarak etanol sentezlemek için, fermantasyon yolunun veya etilenin kullanıldığı yol olmak üzere iki metottan faydalanılmaktadır. Ticari amaçlı veya alkollü içki olarak tüketilen tüm içkiler fermantasyon yolu kullanılarak elde edilebilir. Fermentasyon yöntemi ile alkol eldesi anaerobik bakteriler yardımıyla yapılır. Bakterilerin bulunduğu ortama sakkaroz eklenerek bir süre ısıya tabi tutulur. Optimum ısıya ulaşıldığında bakterilerin yapısında bulunan invertaz enzimi yardımıyla sakkaroz, glikoz ve fruktoza ayırır (Akyılmaz 2002).



Reaksiyon sonucu oluşan glikoz ve fruktozu yine maya hücrelerinin yapılarında bulunan zimaz enzimi ile etanol ve karbondioksite dönüştürür (Akyılmaz 2002).

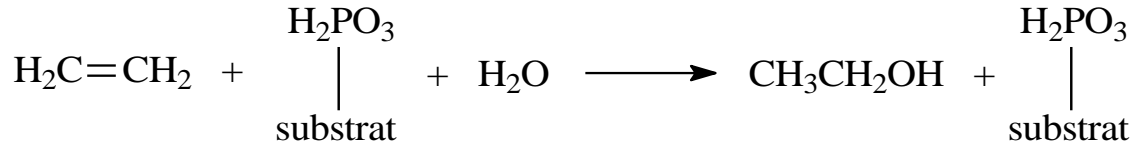


Fermantasyon sırasında karbonhidratların pirüvata yıkımı glikoliz olayı esasına göre gerçekleşir ve pirüvat dekarboksilaz enzimi tarafından asetaldehite dekarboksillenir. Böylece asetalhehid serbest bırakılır. Bunu takiben asetaldehit NADH ve ADH ile etanole indirgenir ve ATP (adenozintrifosfat) oluşur (Akyılmaz 2002, Şekil 7).



Şekil 7. Alkol Mayalanması (Akyılmaz 2002).

Etilen ile elde edilen etanol; boya, kozmetik ve temizlik malzemelerinin yapım aşamasında kullanılmaktadır. Bu yöntem, reaksiyonun tek aşamada gerçekleşmesi ve katalizörlerin tekrar tekrar kullanılarak çevreye zarar verici etkisinin azalması sebebiyle tercih edilmektedir (Akyılmaz 2002).



İlaçlar, anestezikler, bazı yiyecekler, alkol, kimyasal maddeler organizmalar için farmakolojik dozlarda beklenen etkileri oluştururken, yüksek dozlarda karaciğer toksikasyonuna sebep olabilen ajanlardır. Toksik etkiye sahip olan maddeler karaciğerde detoksifiye edilir. Fakat bu maddelerin aşırı kullanımı veya bu maddelere aşırı maruz kalma karaciğer hücrelerinin dejenerasyonuna, hücre içi dengenin bozulmasına ve yağ birikimine neden olarak, karaciğer hücrelerinin toksifikasyonuna neden olabilir. Toksik etki yaratan maddeler hücre içi iyon dengesini bozarak, hücrelerarası iletişimi sağlayan kalsiyum dengesini de bozar. Bu durum aktin yapısının dağılmasına neden olarak hücre yıkımına sebep olur. Bazı ilaçlar veya kimyasalların taşınmasını sağlayan proteinleri etkilemenin yanında, safra salgılanmasını sağlayan bölgedeki aktin filamentlerinin yıkımına da sebep olabilir. Bu durum safra salınımına engel olur ve hücre zedelenmesine yol açar. Safra birikimi, hücre ölümünü tetikleyen ve sitoplazmada bulunan reseptörlerin plazmaya geçişini ve kontrollü hücre ölümünü başlatır. Hücre ölümü, hücre hasarı ile uyarılan immün sistem tümör nekroz faktör (TNF- α) ve Fas yolaklarını aktif hale getirir. Böylelikle hücre ölümüne ve kromatin kaybına sebep olur. Toksik etki gösteren maddeler biyotransformasyon sonrasında P-450 enzim aktivasyonu ile birlikte oluşan metabolitler enzimlerle birleşerek hücre yok olması olarak (T hücre cevabı) da adlandırılan sitoliz olayını tetikler. Bu uyarım hepatosit hücre ölümü ile sonuçlanır. Organizmalar için toksik kabul edilen kimyasallar karaciğer hücrelerindeki toksik etkilerinin dışında, mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna da neden olarak toksikasyonu daha da güçlendirebilir (Arıcı 2008, Tucer 2015).

1.3. Karaciğer Histolojisi

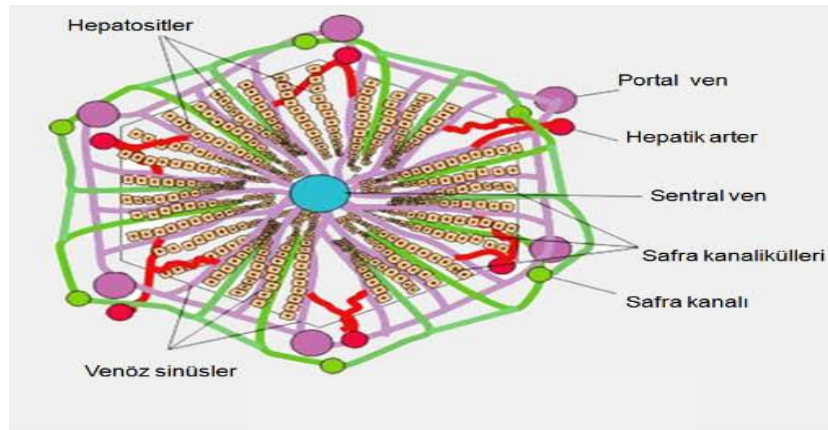
Karaciğer, karın boşluğunda yer alan, lobları bulunan vücudun en büyük organı ve en büyük bezidir. Yetişkinlerde ortalama ağırlığı vücut ağırlığının %2'sine eşittir. En dışta periton ile örtülüdür. Peritonun altında karaciğeri bölümlere ve loblara ayıran glisson kapsülü adı verilen bir zar bulunmaktadır. Temelde lobus hepatis dexter ve lobus hepatis sinister olmak üzere iki ana loba ayrılır. Ayrıca lobus hepatis dexterin alt kısmında quadratus ve arkada kısmında ise lobus caudatus olmak üzere iki alt loba yine ayrılır. Hem iç hem dış salgı bezidir (Ergün ve Ergün 2009).

Karaciğerin en küçük hücresi hepatositlerdir. Yaklaşık yaşam süreleri 150 gündür. Bu hücreler karaciğerin işlevlerine göre özelleşmiştir. Sindirim kanalından emilen besinlerin işlenmesi, depolanması, zararlı olanların detoksifiye edilmesi veya dolaşıma katılmasını yine burada sağlanmaktadır. Hepatosit hücreleri hem düz hem de granüllü endoplazmik retikulumdan zengindir. Karaciğere gelen kanın işlev görmesiyle albümin, fibrinojen gibi bazı kan proteinlerine ayrılması gibi asidohilik sitoplazmada gerçekleşen olaylar granüllü endoplazmik retikulum, alkol, ilaç veya organizmaya alınmış toksik bir maddenin uzaklaştırılması da granülsüz endoplazmik retikulum yardımı ile gerçekleşmektedir. Yaklaşık 500'ün üzerinde kimyasal olayın gerçekleştiği düşünülmektedir. Karaciğerin önemli bir dış salgısı (ekzokrin) olan safra, duodenuma boşalarak yağların sindirimine yardımcı olur. Lipit, protein, yağ metabolizmasında sindirime yardımcı olur (endokrin). Vücuda alınan ilaçlar gibi birçok toksik maddeyi inaktive eder. Vücuttaki metabolik artıkların üreye dönüştürülmesini sağlayarak böbrekten atılmasını sağlar. Bazı kan proteinlerinin yapımında görev alarak kanın pıhtılaşması için gerekli proteinleri sağlar ve demir metabolizmasında görev alır. A, D, K gibi bazı vitaminleri depolar. Aynı zamanda hematopoez'in de embriyonel dönemde yapıldığı yerdir (Demirci 2006, Ergün ve Ergün 2009).

Karaciğer bahsedilen bu görevleri bir dolaşım sistemiyle sağlamaktadır. Karaciğere kan iki ayrı ana damardan gelir. Birincisi karaciğerin fonksiyonel damarı olan portal ven olarak da bilinen vena porta, diğeri ise karaciğerin besleyici damarı

olan arteria hepaticadır. Her iki damarda karaciğer kapısı olarak adlandırılan hilumdan (porta hepatis) girer. Vena porta; periferden alınan kanın büyük bir kısmını karaciğere getiren damardır. Besin maddeleri bakımından zengin olan kan gastrointestinal sistemin büyük bir kısmını dolaşır. Sindirim sistemi ve pankreastan salınan hormonları, dalaktan eritrosit yıkım ürünlerini ve diğer artık maddeleri alarak karaciğere gelir (Ergün ve Ergün 2009).

Arteria hepatica; aort damarının bir koludur. Aynı zamanda karaciğerin besleyici damarıdır. Oksijence zengin kanı karaciğere getirir. Çok fazla bağ dokusuna sahip olmayan bu bölge stroma olarak adlandırılır ve gittikçe dallanarak karaciğerin çok küçük alanlarına da dağılır. Dallanan damar ağı sinuzoid adı verilen boşluklarla birleşir ve sinuzoidler yardımıyla da sentral vene bağlanır. Böylece arterio hepatica aorttan gelen oksijenli kanı sindirim sisteminden gelen kan ile karıştırır. İçerikler sinozoidlerin duvarında bulunan endotel hücreler yardımıyla hepatositlere aktarılmaktadır. Hepatositler tarafından işlenen kan dış salgı yoluyla duodenuma gönderilir ve dolaşıma katılır. Tek dönüşe sahip olan bu damarlar bir araya gelerek vena hepatica adını alır. Genişleyen sinusoidler ile de birleşerek vena cava inferior'a açılırlar (Kuşcu 2010, Şekil 8).



Şekil 8. Karaciğer hücresi

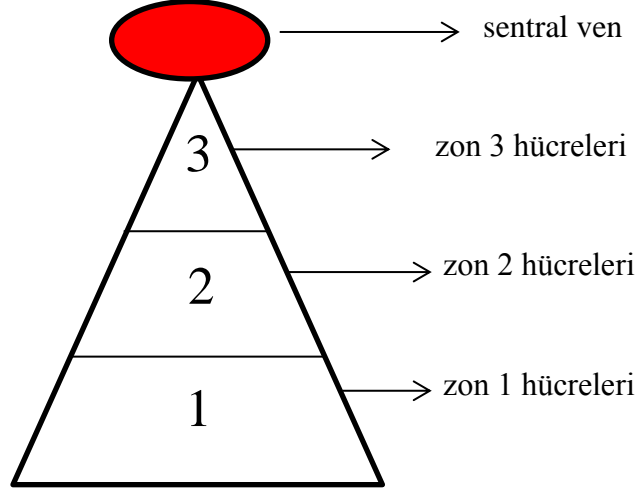
(<http://www.drahmetdobrucali.com/hastaliklar/primer-biliyer-siroz>, son erişim:15.12.2015).

1.4. Etil Alkol Toksikasyonu ve Karaciğer Histopatolojisindeki Değişiklikler

Kan dolaşımı, karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasının düzenlenmesi, vitaminlerin depo edilmesinin yanısıra karaciğer; ilaç, alkol, mantar gibi toksik etkiye sahip olabilecek maddelerin arındırılması işlemini de yapmaktadır. Toksik etkiye sahip bu maddeler karaciğerde bulunan ALT (alaninaminotransferaz), AST (aspartat aminotransferaz), GGT (gamma-glutamyltransferase) enzim sistemleri üzerinde etkili olabilmektedir. Fakat bu etkinin yanısıra histopatolojik olarak bazı hasarlar da gözlemlenebilmektedir. Bu durum karaciğer hepatositlerinde genellikle yağlanma olarak görülebilmektedir. Karaciğer yağlanması yaygın olarak bilinmeyen sebeplerin yanı sıra obezite ve diyabet gibi bazı durumlarla da ilişkilendirilmektedir (Sonsuz 2007).

Etanol hepatositlerde meydana getirdiği balonlaşma olarak da adlandırılan ve yağ metabolizmasını etkileyen hasara sebep olur. Protein yapısının hasar görmesine bağlı olarak karaciğer enzim sistemlerinin bozulması ile asetaldehit hepatositlerde birikerek nekroz, hücre bozulması ve yağlanmaya sebep olmaktadır. Yağlanma, makroveziküler yağlanma ve mikroveziküler yağlanma olarak derecelendirilir. Makroveziküler yağlanma en yaygın şeklidir. Hepatositler, hücre çevrelerini ve nükleusu saran, hepatositleri dolduran geniş ve büyük bir yağ kitlesi içerir. Herhangi bir karaciğer doku bozulması olmadan kısa süreli olduğunda nispeten iyi huylu olarak adlandırılır. Yağlanmanın meydana gelmesi yağ dokusunun birikimi, artan yağ asidinin hepatositlerde birikiminin artması, karaciğerden trigliserit miktarının azalması ve mitokondriyal β -oksidasyon yokluğu gibi sebeplerle nitelendirilebilir. Yağlanmanın diğer bir çeşidi olan mikroveziküler yağlanmanın aksine, hepatositler çekirdekten ayrılan küçük yağ vezikülleri ile doludurlar. Bu durumun karışıklığı ilerleyen dönemlerde hastalık seyri açısından sınıflandırılmaktadır. Ayrıca yağlanmaya ek olarak nekroz ve fibrozis gibi diğer karaciğer rahatsızlıkları da görülmektedir. Bu durumlarda serum transaminaz ve bilirubin miktarı artmasına rağmen protrombin zamanında uzamalar gözlemlenebilmektedir (Romenty ve ark. 1997, Clouston ve ark. 2005). Aynı zamanda sentral vene yakın olan hücreler hipoksik ortama daha fazla maruz kaldıkları için mitokondri bakımından oldukça zengin olup

toksik hasarlara karşı daha hassastır. Bu durum alkol veya herhangi bir toksik ajana maruz kalma durumunda birinci alan olarak gösterilmektedir (Saral ve Kolaylı 2012, Şekil 9).



Şekil 9. Karaciğer Hücresinin Histolojik Yerleşimi.

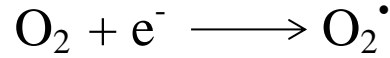
1.5. Etil Alkol Toksikasyonu ve Karaciğerde Oksidatif Stres

Yaşamlarını aerobik solunum yardımıyla devam ettirebilen bazı organizmalar, güneş enerjisinin redükte edilmiş halini, bazı biyokimyasal ve fizyolojik yollarla CO₂ ve O₂'e kadar indirgemek koşuluyla enerji olarak kullanabilirler. Gerçekleşen reaksiyonlar sırasında metabolizmada bulunan organik moleküller O₂ kullanılarak enerjiye dönüştürülür ve dönüşüm sırasında elektron aktarımları gerçekleşerek O₂ daha aktif hale getirilir. Serbest radikallerin oluşumuna da neden olan bu durum oksidasyon olarak adlandırılmaktadır. Serbest radikaller ise, hücre membranı ve deoksi ribonükleik asit (DNA) hasarı, enzimatik yollarda aksaklıklar ve toksisite gibi fonksiyon bozukluklarına sebep olmaktadır (Burçak ve Andican 2004).

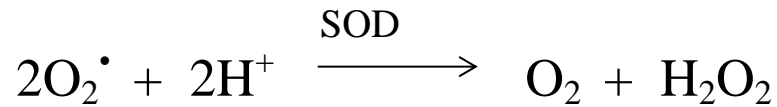
Serbest radikallerin oluşumuna en büyük katkıyı sağlayan O₂, hayatsal faaliyetlerin sürdürülebilmesi ve enerji ihtiyacının karşılanabilmesi için vazgeçilmez

bir kaynaktır. Ancak, O₂ biyokimyasal tepkimeler sonucu organizmaya hasar verebilecek ürünlerin oluşumuna sebep olabilmektedir. Oksidatif stres olarak adlandırılan bu durumun, mitokondri elektron taşıma sistemi, oksidatif reaksiyonlar, metabolik olaylar sonucu oluşan düşük pH'ya sahip maddeler, ultraviyole ışınlar, ilaçlar, sigara ve toksik ajanlar gibi birçok sebebi bulunmaktadır (Çaylak 2011). Organizmaya en çok zarar veren reaktif oksijen türleri (ROS) olarak bilinen serbest radikal grupları; O₂[•] (süperoksit) radikali ve H₂O₂'tir (Çaylak 2011).

O₂[•] (süperoksit) radikali; metabolik dönüşümler için oldukça önemli bir kaynak olan oksijen, kullanımını sırasında oldukça reaktif bir hal almaktadır. Mitokondrielerde oksijen kullanılarak su oluşturmak üzere elektron alarak indirgenmesi ve bağ yapmamış bir elektron bulundurması dolayısıyla oldukça reaktif bir halde gelir. Karaciğer enzim sistemleri, hormon sentezi, fagositoz, hücre büyümesi gibi fizyolojik olaylarda oluşabilmektedir (Çaylak 2011).



H₂O₂ (Hidrojen peroksit) radikali; süperoksitler gibi reaktif bir ürün olmasının yanında yüksek oranda toksik etkiye de sahiptirler. O₂[•]'ye bir elektron aktarımı veya O₂[•]'ye iki elektron alması ile oluşmaktadır. İnsan vücudunda saatte milyonlarla ifade edilebilen bir üretimin söz konusu olduğu bildirilmiştir (Gürgöze ve ark. 2007).



Hücre membranında bulunan ve hücrede gerçekleşen fonksiyonel olaylar sırasında oluşan reaksiyon ürünleri hücre hasarına sebep olabilmektedir. Bu durum toksik ajanlar, aşırı ve sürekli alkol tüketimi, kimyasallar, vitamin eksikliği, yaşlanma, kanser gibi durumlar ile desteklenerek hücre hasarı ve toksikasyonu, nekroz ve hücre ölümüne sebep olmaktadır. En çok karşılaşılan durumlardan biri

olan doymamış yağ asitlerinden H'nin ayrılması ile oluşan reaktif oksijen türleri H'nin ayrılmasıyla bir lipit radikali meydana getirebilmektedir. Bu oluşum oksijenle tepkimeye girerek aktif bir lipit radikali ve sonrasında lipit hidroperoksitlerini oluşturmaktadır (Sezer ve Keskin 2014).

Lipit peroksidasyonu, hücre membranında bulunan yağ asitleri ile serbest radikallerin oksidasyonu sonucu malondialdehit (MDA) gibi son ürünlerin oluşumunu meydana getirerek hücre hasarının habercisi olabilmektedir. Oksijen, hücre membranında bulunan yağlar ile reaksiyon göstermesi hücre bütünlüğünün bozularak hücre içi iyon dengesine zarar verebilmektedir. Bunun yanı sıra protein ve enzimatik reaksiyonların işleyişini hasara uğratarak DNA ve RNA (ribonükleik asit) üzerinde de olumsuz etki gösterebilmektedir. Lipit peroksidasyonu sırasında peroksitler hücre membranında bulunan yağ asitlerini etkileyerek yeni radikallerin oluşumunu sağlarken öte yandan oluşan H atomlarını kullanarak lipit peroksidasyona dönüştürür ve böylece bu reaksiyonlar bütünü kendi kendini katalizleyerek devam eder (Sezer ve Keskin 2014).

Bir takım toksik ajanlar, hücrede serbest radikal oluşumunu artırarak hücre membranı hasarını indüklemektedir. Organizmanın maruz kaldığı bu toksisite durumu karaciğer tarafından ortadan kaldırılabilir. Karaciğere gelerek triklorometile dönüşümü ve sonrasında oksijenle birleşerek serbest radikal meydana getiren karbon tetraklorür (CCl₄), karaciğerde toksikasyona sebep olabilmektedir. Toksik maddeler karaciğerde glutatyon miktarını azaltarak antioksidan savunma sisteminin baskılanması sonucunda hücre hasarı meydana getirebilmektedir. Aynı zamanda mitokodride de oldukça fazla bulunabilen süperoksitler, sitokrom P-450 gibi bazı enzim sistemlerini önemli derecede etkileyebilmektedir. Ksenobiyotiklere maruz kalma durumunda karaciğer histopatolojisinde yağlanma ve nekroz olarak gözlenebilmektedir. Aynı zamanda karaciğer hücrelerinin maruz kaldığı toksik ajanlar süperoksitlerle birleşerek lipit peroksidasyonunu başlatan öncül maddelerin oluşumunu sağlar. Böylece hücre hasarı başlatılmış olur (Mercan 2004).

Karaciğerde toksikasyona sebep olan maddeler arasında yer etanol, hepatositlerde serbest radikal oluşumu ile toksikasyona sebep olabilmektedir. Bu durum hücrel hasar meydana getirerek antioksidan enzim sistemlerini baskılamaktadır. Etanol sahip olduğu toksik etkisi dolayısıyla ROS üretimini ve lipid peroksidasyonunu uyarmaktadır. Alkolün karaciğerde önemli derecede artışı ile birlikte GSH ve GSH-Px gibi enzim seviyesinde azalma gözlenebilmektedir ve bu duruma bağlı olarak hücre hasarının ilerlemesine katkı sağlayarak lipid peroksidasyonun başlamasına ve hücre hasarının habercisi olan MDA düzeyinde artışa sebep olabilmektedir. Oluşan oksidatif stresle beraber ileri derecede hücre hasarının da gözlemlendiği incelenmiştir (Darwish ve ark. 2012, Yang ve ark. 2012). Aşırı alkol tüketimini takiben yağlanmayı ile birlikte ilerleyen alkolik hepatit ve sonunda siroz ve nekrozu getirmektedir. Alkol ile oluşan karaciğer hasarının sebebi çoğunlukla karaciğer hücrelerinde artarak biriken serbest radikallerdir. Böylece lipid peroksidasyona sebep olan bu reaktif ürünler oksidatif hasarı tetikleyebilmekle birlikte histopatolojik hasarı da oluşturabilmektedir (Wu ve Cederbaum 2003, Cederbaum ve ark. 2009). Etanol ile ilişkilendirilen bu durumun ilk ve önemli adımını oluşturan oksidatif stres, ROS, oksidan/ antioksidan dengenin bozulması, hücrel proteinler ve lipidlerin oksidanlarının uyarılmasıyla değerlendirilebilmektedir. Ayrıca, antioksidan sistemde yer alan vitamin miktarının azalması, hücre içi antioksidan miktarının düşüşüne sebep olarak oksidatif stres oluşumuna önemli derece uygun koşullar sağladığı bildirilmiştir (Ramírez-Farías ve ark. 2008).

1.6. Etil Alkol Toksikasyonu ve Karaciğerde Biyolojik Antioksidanlar

Organizmanın maruz kaldığı ilaçlar, kanserojenler, ksenobiyotikler, toksik maddeler ve kimyasalların zararlı etkilerinden korunmak için metabolizmada bulunan maddelere antioksidan adı verilmektedir. Bazı vitaminler (C,E,A), betakaroten, flavonoidler, polifenoller ve bu maddeleri içeren meyve ve sebzeler, besin desteği amaçlı bulunan ticari ürünler external antioksidanlar, organizmada bulunan süperoksit dismutaz, GSH, glutasyon peroksidaz, katalaz (CAT) gibi internal antioksidanlar olarak değerlendirilmektir (Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2009). E

vitamini zincir kırıcı özelliği dolayısıyla peroksit yapılarını indirgeyerek zararsız hale gelmelerini sağlamaktadır (Çaylak 2011, Sezer ve Keskin 2014). Yine, meyve ve sebzelere renk veren karotenoidler, büyük oranda β -karotenin elektron yakalama özelliği ile süperoksitlerdeki eşleşmemiş elektronu yakalayarak oksidatif hasara engel olmaktadır. Suda çözünen ve turuncu, domates ve yeşil yapraklı sebzelerde bulunan C vitamini de serbest radikalleri temizleme özelliği ile detoksifikasyon mekanizmalarına katılmaktadır. Ayrıca, askorbik asit pro-antioksidan özellik gösterir ve kofaktör görevi yapan mineralleri indirgeyerek hücre hasarının önüne geçer (Çaylak 2011).

Karaciğer hücrelerinde toksikasyona karşı antioksidan etki gösterebilen enzim sistemleri bulunmaktadır. Sitozolda bulunan ve süperoksit dismutaz (SOD) olarak adlandırılan bu enzimler kimyasal reaksiyonlar sonucu oluşan serbest radikalleri hidrojen peroksite ve oksijene dönüştürür. Bu dönüşüm süperoksit düzeyini düşürerek lipid peroksidasyonunun önüne geçer. Eritrositlerde ise bu durumun önüne geçen ve antioksidan etki gösteren bir enzim olan glutatyon peroksidaz (GSH-Px) organizmanın savunma sistemini oluşturan hücreleri koruyarak immün sisteme destek olur. Savunma sistemine destek olan bir diğer antioksidan enzim ise glutatyon S-transferaz (GST) dir. Karaciğerde detoksifikasyon mekanizmasında büyük öneme sahip olan sitokrom P-450 enzim sistemi ile birlikte hücre içi taşıyıcı ve bağlayıcı sisteme destek olur. Böylece reaktif ürünler uzaklaştırılarak toksikasyona engel olunur. Çoğunlukla peroksizomda bulunan ve nadir olarak da sitozolda görülen katalaz ise hidrojen peroksit radikalinden su ve oksijen oluşumu ile H_2O_2 birikimini engelleyerek detoksifikasyona yardımcı olur (Kasapçopur Özel ve Birdane 2014).

Organizmanın doğal antioksidan enzim mekanizmaları arasında yer alan ve etanolün yanısıra diğer birçok toksik maddelerin okside edilmesinde önemli rol oynayan GSH, CYP2E1 uyarımının enzim sistemine iletilmemesi ile GSH, miktarında düşüş görülmektedir. Bu düşüşün sebebi mitokondiyal ve hücre membranı hasarı ile ilişkilendirilmektedir. Etanolün hücre hasara ve toksik etkiye sebep olması, ligazların transkripsiyonel aktivasyonu sayesinde GSH uyarımı gerçekleşmektedir. Etanol tüketimi dolayısıyla oksidanların oluşumu, oksijenli

solunum sonucunda oluşan yan ürünlerin de birikimiyle karaciğer hücreleri üzerinde toksik etki oluşturmaktadır. Bu durum mitokondriyal glutatyon taşınımına engel olarak GSH oluşumunu inhibe eder. GSH, etanol ve solunum ile oluşan peroksitlere karşı önemli bir savunma mekanizması olduğu gösterilmektedir (Das ve Vasudevan 2007). Sitolde bulunan ve hidrojenperoksit ve hidroperoksitlerin indirgenmesinde önemli bir yere sahip olan GSH-Px antioksidan sistem, fagositik hücrelerin zarar görmesini engelleyerek hücrel mekanizmayı korumaktadır. Proteinlerin yapısında bulunan -SH gruplarını koruyarak hücre içi amino asit taşınımına yardımcı olmaktadır. Hidrojenperoksitlerin aktivasyonu ile oluşan GSSG, glutatyon redüktazların oluşumu ile GSH'a dönüşmektedir. Toksikasyonlara maruz kalma durumu GSH-Px enzim sistemini etkilerken hidrojen peroksit birikimine ve lipid peroksidasyonunun başlamasına sebep olduğu gösterilmiştir (Gürsoy 2005). Metabolik olaylar sonucu oluşan hidrojen peroksit, organizmadan uzaklaştırılması su ve oksijene dönüşerek yapılmaktadır. Antioksidan enzim sistemi elemanlarından olan CAT, ROS indirgeyerek su ve oksijen oluşumunu sağlar. Ayrıca SOD da dokularda oksijen basıncının yükselmesi dolayısıyla aktivasyon göstererek karaciğer hücre hasarının önüne geçerek toksik etkiyi baskıladığı bildirilmiştir (Koch ve ark. 1994).

1.7. Chlorella Vulgaris

Tedavi edici etkisi, yüksek antioksidan özelliği bulunan ve besin desteği olarak da tüketilen *Chlorella vulgaris* tek hücreli bir algdir. Yapısında karbonhidratlar, proteinler, nükleik asitler, esansiyel amino asitler, yağ asitleri (omega 3 ve omega 6), vitaminler, diyeter fibriller, büyüme faktörleri gibi pek çok makro ve mikro besin maddelerin barındırır. *Chlorella vulgaris*, klorofil alfa ve beta karoten, askorbik asit, alfa tokoferol, lutein, likopen, zeaksantin gibi farklı pek çok anti oksidantı içerdiği gibi bakır, çinko ve magnezyum gibi iz elementleri de içermektedir. Bazı araştırmacılara göre, hipertansiyonun kontrolü, ülser, kronik yorgunluk ve uykusuzluk gibi problemlere karşı fayda sağladığı düşünülmektedir. Aynı zamanda antitümör ve toksik durumlara karşı da verimli sonuçlar elde edildiği gösterilmektedir (Azzat ve ark. 2010, Yasmin ve ark. 2010). Sadece temel besin kaynağı formlarının yanısıra su kirliliğine de karşı kendi kendini arıtma ve temizleme

işlemi de yaparak yaşadıkların suların ekosistemleri için de önemli rol oynamaktadırlar. Buna bağlı olarak da algler, nanopartiküller, toksik ajanların yok edilmesi için kullanılan organizmalardan biridir (Ji ve ark. 2011). Böyle bir arındırıcı göreve sahip olması yaşayan su canlıları ve bitkileri için yaşamsal bileşenlerin elde edilmesine katkı sağlamaktadır (Niczyporuk ve ark. 2012). Ayrıca poliansatüre yağ asitlerini (PUFA) barındırarak inflamatuvar ve otoimmün rahatsızlıklar üzerine olumlu etki oluşturur. İnsanlar ve hayvanlar tarafından yapılamayan ve hücre membranının yapısında da bulunan PUFA dışarıdan hazır alınmaktadır. *Chlorella vulgaris* yapısında bulundurduğu enzim sistemi yardımıyla omega-3 ve omega-6 gibi önemli bileşenlerine oluşumuna katkı sağlamaktadır. Böylece *Chlorella vulgaris* kullanımı koroner kalp rahatsızlığı ve kalp krizi riskini azaltmakta, hipertansiyon ve aritmilerin önüne geçebilmekte, şeker hastalıkları oranını düşürebilmektedir (Xue 2012).

Yapılan bir çalışmada, temiz sularda yaşayan bir mikro alg olan *Chlorella vulgaris*in gümüş toksikasyonunda hücrelerin yaşamını devam ettirmesi, reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve hücre hasarı üzerine etkisi incelenmiştir (Oukarroum ve ark. 2012). Liyofilize alg tozu veya yaşayan organizma halininin, gümüş, altın ve plantinyum gibi metallerin uzaklaştırılmasında ve maden artıklarının zararlı etkilerinin iyileştirilmesinde faydalı etkileri olduğu gösterilmiştir (Gong ve ark. 2011).

Chlorella vulgaris, anti tümör, anti inflamatuvar, anti kanser ve anti bakteriyal etkisinin yanısıra içerdiği vitamin ve mineraller dolayısıyla karaciğer koruyucu olarak da önemli bir yere sahiptir. Aynı zamanda mide ülseri, hipertansiyon ve kas güçsüzlüğüne karşı önemli bir teröpatik ajan olarak da değerlendirilmektedir. Tek başına zararlı bir molekül olan ve reaktif oksijen türlerinin oluşumunda önemli bir yeri olan O_2^{\bullet} , metallerle birleşerek hücrel toksisiteye neden olmaktadır. *Chlorella* 'nın birden fazla türünün içerdiği antioksidan mekanizma sayesinde çeşitli toksik etkiye sahip maddelerin detoksifiye edilmesinde önemli bir etkisinin olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda hücre membranında bulunan askorbik asit, α - tokoferol, α ve β -karoten içeriği dolayısıyla önemli derecede serbest radikalleri

temizleyici etkiye sahiptir (Mallick 2004, Vijayavel ve ark. 2007, Yasmin Anum ve ark. 2010).

Klorofil içeriğine sahip bir tek hücreli olan *Chlorella vulgaris* bu sayede ışık etkisinde fotosentez yaparak besin ve oksijen üretebilen bir organizmadır. Sahip olduğu fotosentetik alt yapı nedeniyle oluşan reaksiyonlar UV-B ışınları etkisiyle cereyan etmektedir. Fotosentetik sistemde klorofil içerisinde cereyan eden reaksiyonlarda aktif olarak çalışan fotosistem I, elektron transport sistemi ve kalvin döngüsü ile stomal açıklıkların UV-B radyasyonundan etkilendikleri araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (Teramura 1983). Güçlü fotooksidatif potansiyelleriyle kloroplastlar, aktif oksijen radikallerini fazla miktarda üretme potansiyeline de sahiptir ve muhtemelen bunlardan en çok etkilenen organeldir. Kloroplast tilekoidleri moleküler oksijeni ışıkla indirgeyerek süperoksit radikalinin oluşmasına sebep olur. Bunun yanında oluşan süperoksitten ($O_2^{\cdot -}$) SOD'un katalizlemesi ile H_2O_2 yapılarak serbest radikal indirgenmiş olur. Süperoksit ve artan H_2O_2 nin tutulması kloroplastın normal çalışmasını sürdürmesi için son derece önemlidir (Malanga ve ark. 1997).

1.7.1. Chlorella Vulgaris ve Toksikasyon

Hücre bütünlüğünü korumak için ve organizma için zararlı kimyasalların yan etkilerini gidermek için doğal olarak elde edilen koruyucu bitkisel kaynaklı besinler yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. *Chlorella vulgaris* de tek hücreli bir mikro alg olarak içerdiği karbonhidrat, protein, vitamin, mineraller ve büyüme faktörleri dolayısıyla son yıllarda ticari besin desteği olarak da kullanıma sunulmuştur. Yapılan deneysel çalışmalarda *Chlorella vulgaris*'in antiaterojenik, antikolestolemik, antiinflamatuvar ve antitümör etkileri olduğu gösterilmiştir (Azamai ve ark. 2009).

Organizmada oksidatif stres oluşturabilen maddelerin neden olduğu hücre hasarı, nekroz ve hücre ölümü gibi bazı olaylar *Chlorella vulgaris* in antioksidan ve koruyucu özelliği dolayısıyla önlenbildiği çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir (Mallick 2004, Shim ve ark. 2008, Li ve ark. 2013). Yapılan bir çalışmada, *Chlorella vulgaris*'in ağır ve toksik etkiye sahip olan kurşunun beyin hücrelerinde oksidatif

olarak oluşturduğu hasarı azaltıcı aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Aynı zamanda kadmiyum (Cd) ile oluşturulan hepatoksisitede antioksidan etkinliği ile doku koruyucu etki gösterdiği gösterilmiştir (Yun ve ark. 2011). Serbest radikallerin ve ROS artışı, karsinojen, mutajen, yaşlanma ve yağlanma gibi etkiler göstererek hücrel hasarın habercisi olabilmektedir. Çeşitli eksojen ve endojen nedenlerle artan serbest radikaller, antioksidan enzim sistemlerini uyararak hücrel savunmayı başlatır. *Chlorella vulgaris*'in yapısında bulunan bileşikler de enzimatik olmayan GSH ve enzimatik GSH-Px ve SOD gibi antioksidan enzim sistemlerini aktive ederek toksik koşullarda hücrel savunmayı kuvvetlendirmektedir (Peng ve ark. 2009).

1.8. Propolis ve Antioksidan Etkileri

Arıların, birçok yaprak, çiçek, filiz, tohum, tomurcuk gibi bitkilerin herhangi bir bölgesinden topladığı propolis organik bir maddedir. Reçineli, kıvamlı, suda erimeyen mumsu bir yapıya sahiptir. Oda sıcaklığında yarı katı halde bulunabilmekte ve çoğunlukla çam, ladin, köknar gibi kozalaklı ağaçlardan elde edilmesine rağmen meşe, kavak, kestane gibi birçok otsu odunsu bitkiden elde edilebilmektedir. Propolis kelimesi yunanca kökenli bir kelime olup pro=ilk ya da savunma, polis=şehir şeklinde ifade edilebilmektedir. Arı toplandığı bu ürünü kesesinde biriktirerek kendi yapısında bulunan enzimler ile birleştirmektedir. Propolisin yapısı, içeriği, rengi gibi fiziksel özellikleri elde edildiği ağaca, çiçeğe, mevcut bitki örtüsüne ve iklim koşullarına göre değişiklik gösterebilmektedir. 10°C'nin altında kırılğan, 15-25 °C arasında elastik yapıdadır. Yumuşak bir kıvam alabilmesi için yaklaşık 30°-40°C'yi görebilmesi gerekmekte olup 80°C'de ise kısmen eriyebilmektedir. Ilıman iklimli olan bölgelerde elde edilen propolis kahverengi, tropik alanlarda siyah, Küba bölgesinde üretilen propolisin ise menekşe renginde olduğu ve saydam propolisin bile elde edilebildiği coğrafik alanlar bulunduğu gözlemlenmiştir (Kutluca ve ark. 2008). Arılar bu ürünlerini kovan içerisinde dış ortamdan korunma, kuvvetlendirme ve mikroorganizmaları önlemek gibi çeşitli amaçlarla değerlendirmektedir (Kutluca ve ark. 2008, Alan ve ark. 2014, Kara ve ark. 2014).

Kullanılan bitkiye ve arı ırkına göre farklılık gösteren propolisin kimyasal yapısı genel olarak;

- Yaklaşık %40-45 oranında reçine,
- %23-35 oranında mum ve yağ asidi,
- %10 esansiyel yağlar,
- Kalsiyum (Ca),
- Magnezyum (Mg),
- Potasyum (K),
- Sodyum (Na),
- Demir (Fe),
- Bakır (Cu),
- Çinko (Zn) ve
- Mangan (Mn) gibi birçok mineralden oluşmaktadır.

Ayrıca yapısında;

- Flavonoidler,
- Fenolik asitler ve
- Fenolik asit esterleri gibi polifenoller,
- Terpenoidler,
- Steroidler,
- Aminoasitleri de bulundurduğu bildirilmiştir (Kara ve ark. 2014).

Bu durum propolisin biyolojik olarak etkinliğini ortaya koymuştur (Kara ve ark. 2014). Flavonoidler propolisten en çok elde edilen ve biyolojik aktivitelerinin birçoğunu oluşturan bileşik grubu olarak incelenmiştir. Bu incelemenin bir sonucu olarak da propolisin antibakteriyel, antiviral, antifungal, anti inflamatuvar, antitümoral ve anestezik etkisi gibi birçok antioksidan özelliğinin bulunduğu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra kanser ilaçlarına karşı koruyucu sitostatik aktivitesi, karaciğeri koruyucu özelliği, diyabet ve kalp hastalıkları gibi bir takım rahatsızlıkların önüne

geçebilmek için beslenme alışkanlıklarına dahil edilerek de etkisinin bulunduğu gösterilmiştir (Albayrak ve Albayrak 2008).

Organizmaların günlük stres, ilaç, kimyasal gibi toksik etkilere sahip ajanlar, bakteriyel ve viral enfeksiyonlar gibi vücudun oksidan ve anti oksidan mekanizması tarafından ortadan kaldırılabilir. Bu durum süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GP) gibi enzimler yardımıyla meydana gelmektedir. Flavonoidler, streptokokların glukoziltransferaz enzim sistemi, protein metabolizması sonucu ortaya çıkan reaktif ve yan ürünler, araşidonik asit metabolizması ürünleri, süperoksitler, alkalın fosfataz ve hidrolazlara karşı inhibisyon etki göstermektedir. Ruminantlarda bulunan ve *Ruminococcus flavefaciens* isimli mikroorganizmanın enzim sistemi üzerine durdurucu etki göstererek büyümesi durdurulmuş ve mevcut toksisitenin uzaklaştırılması sağlanmıştır (Polat ve Koçan 2006). Propolis yapılan antioksidan çalışmalarında lipit peroksidasyonunu önlediği ve yapısında bulunan flavonoidler sayesinde oluşan iz elementleri ve serbest radikalleri ortadan kaldırır. Hücre membranında bulunan doymamış yağ asitlerini C vitamini etkisine benzer bir koruyucu etki ile koruyabilmektedir. Propolisin bileşenlerinden biri olan ve reaktif oksijen türlerinin üretimini engelleyen kafeik asit fenil etil ester (CAPE), bakteriyel RNA-polimeraz enzim sistemini inhibe ederek anti mikrobiyal etki gösterdiği bildirilmiştir (Albayrak ve Albayrak 2008). Bunun yanında yanık oluşturulan ratlar üzerinde yapılan çalışmada süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin önlenerek malondialdehit (MDA) ve nitrik oksit seviyelerini düşürdüğü gözlemlenmiştir. Aksi takdirde, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan savunma mekanizması enzimlerinin yokluğu lipit membranlarının oksidasyona sebep olarak şiddetli hücre hasarına neden olur (Seven ve ark. 2007).

1.8.1. Karaciğer Toksikasyonunda Propolis'in Rolü

Karaciğer, sindirim sisteminde bulunan ve birçok periferik damar yardımıyla organlar ve sistemlerden gelen kanı fizyolojik ve biyokimyasal olarak metabolize eden ve sonra tekrar perifere dağıtan vücudun en büyük organıdır. Hem arter hem

ven ve kapiller bulunduran oldukça geniş ve zengin damar ağına sahiptir. Sindirim, solunum gibi vücuda herhangi bir yolla giren ve ksenobiyotik olarak adlandırılan ilaç, mikrobiyolojik ajanlar ve toksik etkiye sahip tüm yabancı maddelerin uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. Bu şekilde ilerleyen ve detoksifikasyon işlemi olarak da adlandırılan bu durum karaciğer hücrelerine ve enzim sistemine zarar verebilmektedir. Ksenobiyotikler sitokrom P-450 enzim sistemi aracılığıyla sülfasyon, metilasyon, glutasyon ve glukuronidasyon gibi pek çok kimyasal reaksiyon geçirirler. Bu reaksiyon sırasında enzim sistemleri ve karaciğerin kendi hücreleri olan hepatositler de zarar görebilmektedir. Bu durum dokuda inflamasyon, toksik hasar ve fibrotik doku oluşumuna sebep olmaktadır (Bhadoria ve Nirala 2009).

Karaciğer tüm maddelerin transformasyona uğradığı bir organ olması sebebiyle ve çeşitli etkenlerin oluşturduğu hepatosit hasarının mevcudiyeti durumunda, farmakolojik yollarla hücre hasarının giderilmeye çalışılması hücresel bozunmanın ilerlemesine neden olabilir veya tedavi mümkün olmayabilir. Bu durum alternatif tıp yöntemlerine yönelmeye ve bitkisel tedavi arayışlarına yol açmıştır (Saral ve Kolaylı 2012). Alternatif tıp yöntemleri arasında yer alan propolisin de doku yenilenmesi, ülser, kalp rahatsızlıkları, kanser tedavisi, sindirim sistemi hastalıkları ve karaciğer üzerine koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (Polat ve Koçan 2006). Kolankaya ve ark. (2002)'ın alkol ile oluşturulmuş karaciğer hasarında kestane propolisi ile yapmış olduğu bir çalışmada, propolisin AST, ALT ve LDH (laktat dehidrogenaz) gibi karaciğer enzim aktivitelerini düşürerek hücre koruyucu etkisini tespit etmişlerdir.

Yapısında bulunan birçok vitamin ve mineral sayesinde propolis, oldukça zengin bir içeriğe sahiptir. Bu durum propolise antiinflamatuvar, antitoksik ve antitümör gibi birçok antioksidan özellik kazandırmaktadır. Karaciğer toksikasyonu üzerine yapılan çalışmalarda da, detoksikasyon mekanizmasına yardımcı olarak toksikasyon üzerinde olumlu etkileri saptanmıştır (Saral ve Kolaylı 2012). Çeşitli kimyasallar veya toksik ajanlar dolayısıyla hasara uğrayabilen karaciğer hücreleri, organizmada bulunan enzim sistemleri yardımıyla ortadan kaldırılabilir. Fakat

herhangi bir toksik ajana aşırı ve sürekli maruz kalma durumu, enzim sistemlerinin çalışma mekanizmaları üzerinde durdurucu etki göstererek hücre hasarını kaçınılmaz kılabilir. Böylelikle toksik etki oluşumu başlatarak organizmada aksaklıklar meydana getirebilmektedir. Propolis kullanımı, zengin kofaktör içeriği sayesinde karaciğer enzim reaksiyonlarına katılarak antioksidan etki göstermektedir. Bu etki sayesinde süperoksit ve reaktif maddeler indirgenerek toksik etki oluşumuna engel olmaktadır (Bhadauria ve Nirala 2009, Saral ve Kolaylı 2012).

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

Çalışma Kafkas Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda KAÜ'nin "Yerel Etik Kurulu" ilkelerine uygun olarak gerçekleştirildi (HADYEK Karar No:2014/43). Bu çalışmada 10-12 aylık, 200-250 gr ağırlığında 32 adet erişkin erkek Sprague Dawley ratlar kullanıldı. Ratlar standart ışık (12 saat gün ışığı/ 12 saat karanlık), 25°C 'de, yeteri kadar (ad libitum) su ve yem ile beslendi.

2.1.1. Çalışmada Kullanılan Aletler

Spektrofotometre

Vorteks (Velp scientifica, ZX³, Italy)

Hassas terazi (Precisa, 205A SCS, Switzerland)

Derin dondurucu (Arçelik, 2560, Türkiye)

Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)

Ayarlanabilir Otomatik pipetler (10-100 µl, 100-1000 µl, Ependorf, Varipette, Germany)

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeleri

Hayvan kafesi

Rad yemi

1.5 ml'lik ependorf mikro santrifüj tüpleri

Otomatik pipet uçları

Chlorella vulgaris

Etil alkol

Propolis

İzotonik

2.2. Metot

Ratlar 4 gruba ayrılarak her grupta 8 hayvan bulunacak şekilde 2 deney ve 2 kontrol grubundan oluşturuldu. 1. Grup kontrol grubu olarak değerlendirilerek ve 5mg/kg izokalorik maltoz gavajla 12 saatte bir verildi. 2. Grup 7 g/kg/gün Etil alkol + %50 su gavajla verilen, 3. Grup önce 300 mg/kg/gün Clorella vulgaris, sonra 7 g/kg/gün Etil alkol+ %50 su, 4. Grup önce 200 mg/kg/gün propolis, sonra 7 g/kg/gün Etil alkol+ %50 su verilen olmak üzere dört grup oluşturuldu.

Çalışmada kullanılan gruplar aşağıdaki şekilde oluşturuldu;

- Grup 1: Kontrol Grubu 5mg/kg izokalorik maltoz gavajla (n=8; erkek)
- Grup 2: 7 g/kg/gün Etil alkol + %50 su gavajla verilen (n=8; erkek)
- Grup 3: Önce 300 mg/kg Clorella (n=8; erkek)
Sonra 7 g/kg/gün Etil alkol+ %50 su verilen
- Grup 4: Önce 200 mg/kg/gün propolis, (n=8; erkek)
Sonra 7g/kg/gün Etil alkol+ %50 su verilen

15. gün sonunda, ratlara eter anestezi uygulanarak sakrifiye edildi. Alınan karaciğer doku örnekleri GSH, MDA, GSHPx düzeylerine bakılmak üzere -20°C'de saklandı. Ayrıca, karaciğer örnekleri histopatolojik olarak değerlendirildi.

2.2.1. MDA Düzeylerinin Belirlenmesi

Tiyobarbitürk asit (TBA) ile plazmanın 100 °C'de inkübasyonu ile lipid peroksidasyonun (LPO) sekonder bir ürünü olan malondialdehit (MDA) oluşmaktadır. Oluşan MDA, TBA ile pembe renkli bir kompleks yapar. Pembe

renğin spektrofotometrede 532 nm'de ölçümü ile LPO nmol/ml olarak belirlenir (Placer ve ark 1966). Standart eğri çizimi için 1,1,3,3 tetra etoksipropan kullanıldı.

2.2.2. GSH Düzeylerinin Belirlenmesi

GSH'nın sülfidril grubunun asitte çözünerek tiyol grubunun enzimatik veya kimyasal işlemler ile ölçülmesi bu bileşiğin miktar tayininin temelini oluşturur. 412 nm'de belirlenen absorbans değerleri $\mu\text{mol/ml}$ olarak ölçülür (Sedlak ve Lindsey 1968).

2.2.3. GSH-Px Düzeylerinin Belirlenmesi

Glutasyon peroksidaz aktivitesi cumene hidroperoksit ve indirgenmiş GSH'nın ko-substrat olarak kullanıldığı ve enzimatik reaksiyonlarda GSH azalması prensibine dayalı Ellman ayıracında 412 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü (Lawrence ve Burk 1976).

2.2.4. Karaciğer Dokusunda Histopatolojik Değişiklerin Belirlenmesi

Bütün deney hayvanlarından alınan karaciğer örnekleri % 10'luk formaldehid solüsyonunda tespit edildi. Rutin işlemlerin ardından hazırlanan parafin bloklardan 5 μm kalınlığında doku kesitleri alındı ve Hemotoksilen-Eosin (H&E) ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi.

2.2.5. Propolis ve Chlorella vulgaris Ekstraktının Hazırlanması

Propolis ekstraktının hazırlanması; toplanan propolis 30 g tartılarak üzerine 100 ml hacmi tamamlayacak şekilde % 70'lik etanol konuldu. Işıktan korunarak iki kez filtre edildi ve kullanılıncaya kadar +4°C'de saklandı.

Chlorella vulgaris (Sigma, USA, C 9845), kültürü alınarak oda sıcaklığında hazırlandı.

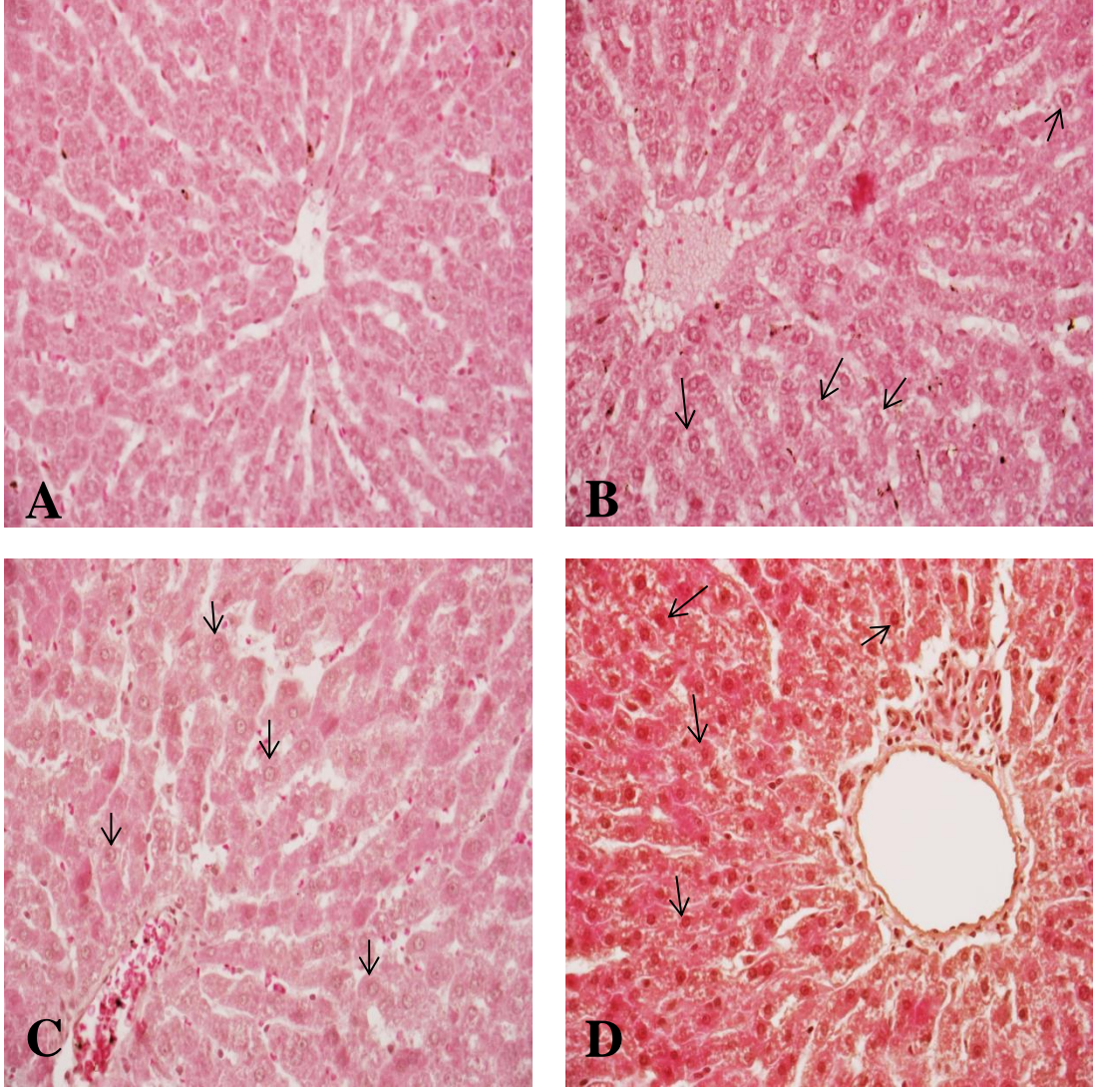
2.2.6. İstatistiksel Analiz

İstatistik hesaplamalarda ONE-WAY ANOVA testi kullanılarak deneme gruplarının kontrol gruplarına göre değişimleri kıyaslandı. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma ($X \pm SD$) olarak belirlendi ve $p < 0.05$ istatistiksel farklılığı gösterdi. Tüm hesaplamalar SPSS (16.0-2010) paket programı kullanılarak yapıldı.

3. BULGULAR

3.1. Grupların Karaciğer Dokusundaki Histopatolojik Bulgular

Bütün gruplarda alınan karaciğer örneklerinin histolojik incelemeleri yapıldı (Resim 1). Kontrol grubu (A) histolojik kesitlerinde hepatositlerin düzgün hücresel görüntüye sahip olduğu ve sinozoidal yapının normal görünümde olduğu belirlenmiştir. Etil Alkol Grubunda (B) hepatositlerde vakuolleşme ve yer yer dejenerasyonlar belirlendi. Etil alkolün etkilerini azaltmak üzere uygulanan *Chlorella vulgaris* (C) ve Propolis (D) gruplarında ise dejenerasyon ve vakuolleşmenin azaldığı belirlendi. Etil alkol ile oluşan karaciğer hasarının Propolis verilen grupta *Chlorella vulgaris* grubuna göre daha az olduğu gözlemlenmiştir.

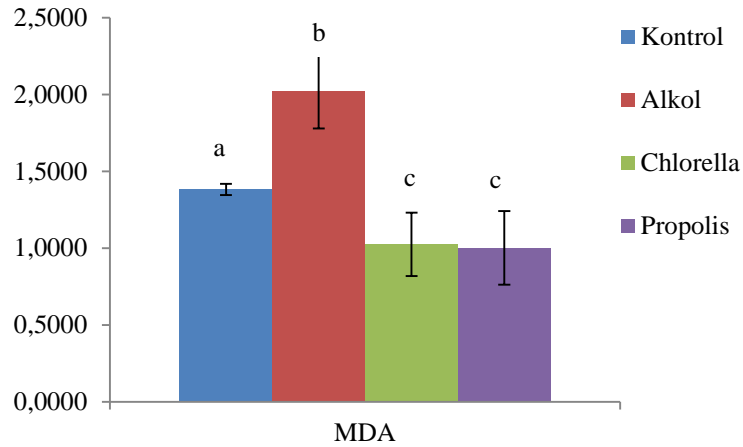


Resim 1. Grupların karaciğer dokularının histolojik kesitleri. A. Kontrol Grubu, B. Etil Alkol Grubu, C. *Chlorella vulgaris* Grubu, D: Propolis Grubu. H&E, X40, → : Hüresel dejenerasyon ve vakuolleşme alanlarını gösterir.

3.2. Grupların MDA Düzeylerinde Belirlenen Değişiklikler

Kontrol ve deneme gruplarının karaciğer dokularının MDA düzeylerine ait belirlenen değişimler Şekil 10’da gösterilmiştir.

MDA düzeylerinde meydana gelen değişiklikler gruplar arasında karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre etil alkol grubunda MDA düzeyinin istatistiksel olarak belirgin düzeyde yükseldiği tespit edilmiştir ($p < 0.001$). *Chlorella vulgaris* ve Propolis gruplarının MDA düzeylerinin Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha düşük olduğu gözlenmiştir ($p < 0.05$). *Chlorella vulgaris* ve Propolis gruplarının MDA düzeylerinin Etil alkol grubuna göre istatistiksel olarak belirgin şekilde düşük olduğu belirlendi ($p < 0.001$, Şekil 10).



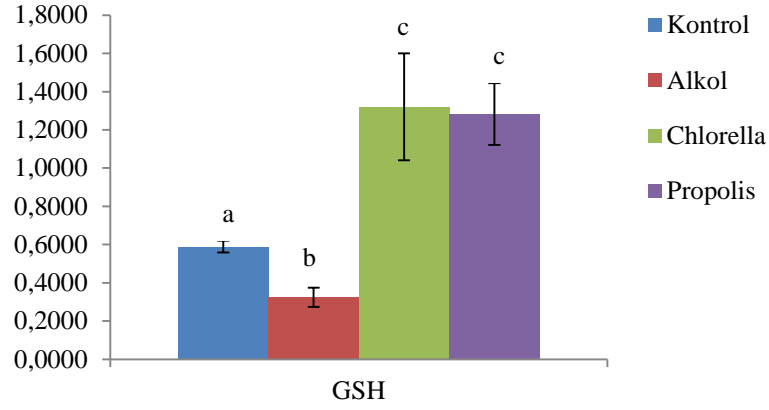
Şekil 10. Grupların MDA Düzeylerinde Belirlenen Değişiklikler.

$ab, bc: p < 0.001$, $ac: p < 0.05$

3.3. Grupların GSH Düzeylerinde Belirlenen Değişiklikler

Kontrol ve deneme gruplarının karaciğer dokularının GSH düzeylerine ait belirlenen değişimler Şekil 11’de gösterilmiştir.

Karaciğer dokusu GSH düzeylerinde meydana gelen değişiklikler gruplar arasında kıyaslandığında Etil alkol grubu GSH düzeylerinin Kontrol grubuna göre belirgin şekilde azaldığı ($p < 0.05$), bununla birlikte *Chlorella vulgaris* ve Propolis gruplarının GSH düzeylerinin hem etil alkol hem de kontrol grubuna göre belirgin şekilde yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.001$, Şekil 11).



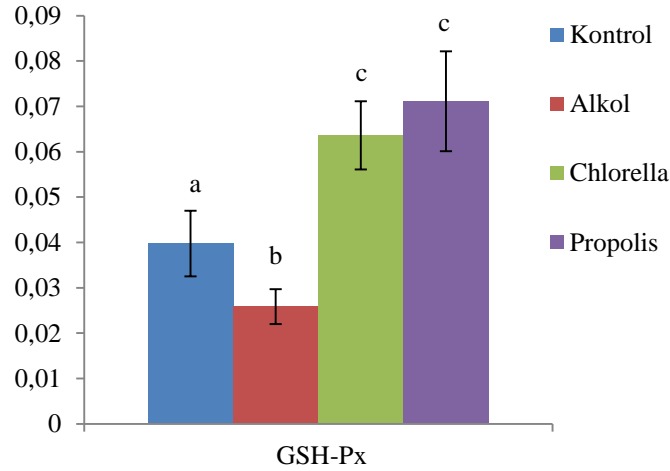
Şekil 11. Grupların GSH Düzeylerinde Belirlenen Değişiklikler.

^{ab}: $p < 0.05$, ^{ac, bc}: $p < 0.001$.

3.4. Grupların GSH-Px Düzeylerinde Belirlenen Değişiklikler

Kontrol ve deneme gruplarının karaciğer dokularının GSH-Px düzeylerine ait belirlenen değişimler Şekil 12’de gösterilmiştir.

Karaciğer dokusu GSH-Px düzeyleri Kontrol grubu ile deneme grupları arasında kıyaslandığında; Etil alkol grubunun enzim düzeylerinin Kontrol grubuna göre belirgin şekilde düşük olmasına karşın ($p<0.05$), *Chlorella vulgaris* ve Propolis gruplarının GSH-Px enzim düzeylerinin belirgin şekilde yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0.001$). Etil alkol grubunda GSH-Px düzeylerinin *Chlorella vulgaris* ve Propolis gruplarına göre belirgin şekilde düşük olduğu tespit edilmiştir ($p<0.001$, Şekil 12).



Şekil 12. Grupların GSH-Px Düzeylerinde Belirlenen Değişiklikler.

ab: $p<0.05$, ac, bc: $p<0.001$.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Organizma için toksik olan kimyasal, kanserojen, ilaç veya alkol içerikli maddeler karaciğerin antioksidan sistemi veya immun sistem aracılığıyla vücuttan uzaklaştırılır. Bu maddeler, biyokimyasal etkinliklerine göre vücutta bir veya birden fazla sistem üzerinde olumsuz etkiler oluşturabilmektedir. Akut yüksek dozları ile kronik alınımının toksik etkiye sahip olduğu kabul edilen maddeler arasında yer alan etil alkolün, karaciğer ve akciğerler başta olmak üzere pek çok sistem üzerine zararlı etkileri bilinmektedir. Bu durumu ortadan kaldırmak için özelleşmiş karaciğer detoksifikasyon mekanizması, aşırı maruz kalma durumunda yetersiz kalarak toksik etkinin meydana gelmesini önleyememekte ve böylece yağlanma ile başlayan hasar fibrozis ve kansere kadar ilerleyebilmektedir.

Organizmada bulunan detoksifikasyon mekanizması dolayısıyla maruz kalınan herhangi bir toksik ajanın uzaklaştırılması ROS oluşumuna sebep olabilmektedir. Oluşan ROS türleri elektron kaynağı olarak genetik materyal, lipitler, proteinler ve karbonhidratları kullanabilmektedirler. Herhangi bir toksikasyona aşırı maruz kalma durumu, hücre içi iyon dengesinin bozulmasına sebep olmaktadır. Bu durum hücre hasarının habercisi olan MDA oluşumu ile gösterilmektedir. Toksikiteyi engellemek amacıyla vücutta GSH ve GSH-Px'in de arasında bulunduğu bir takım doğal antioksidan enzim sistemleri bulunmaktadır. Hücre içersinde redoks dengesini koruyarak ROS türlerinin ortadan kaldırılmasını sağlarlar. Aynı zamanda sülfidril gruplarını korurlar ve H₂O₂ gibi toksik etkiye sahip maddeleri su veya daha zararsız maddelere dönüştürerek vücuttan uzaklaştırılmasını sağlarlar (Sezer ve Keskin 2014). Karaciğerde süperoksit oluşması, NADH/NAD oranındaki değişiklikler, GSH ve GSSG seviyelerindeki farklılıklar ile lipit peroksidasyon düzeylerinin ve okside hepatik proteinlerin miktarının belirlenmesi, oksidatif stres belirteçleri olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, alkolün neden olduğu karaciğer hasarında antioksidanların radikal artışına karşı hepatositleri koruyucu ve hücre membranını destekleyici olarak aktivite gösterdiği pekçok araştırmada gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada (Navasumrit ve ark. 2000) akut alkol toksikasyonu sırasında (5g/kg)ratlarda karaciğerde meydana gelen serbest radikaller elektron spin rezonans

spektroskopi yoluyla safrada belirlenmiştir. Aynı çalışmada serbest radikallerin neden olduğu DNA kırıklarındaki artış da tespit edilmiştir. Suresh ve ark. (2000) da alkol uygulanan hayvanların MDA, hidroperoksit ve konjugedien seviyelerinin arttığını ancak askorbik asit uygulamasının serbest radikal artışını önleyerek hücre koruyucu etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada etil alkol uygulaması ile azalan GSH ve GSH-Px düzeylerinin askorbik asit ile yükseldiği de gösterilmiştir. Benzer şekilde alkol tüketimiyle artan karaciğer hidroksil radikallerinin neden olduğu DNA kırıklarının tiolden zengin bir protein olan metalotionen kullanılarak önlenebileceği de gösterilmiştir (Zhou ve ark. 2002). Başka bir araştırmada (Baustista ve Spitzer, 1996) kan alkol seviyesindeki artış ile sitokrom C'nin azaldığını ve bunun karaciğer süperoksit radikallerinin oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir. Yine alkol metabolizmasında aktif olarak çalışan P-450 enzim sisteminin hepatositlerde ROS yapımına aracılık ederek hepatosit hasarına yol açtığı bildirilmiştir (Nieto ve ark. 2002). Aynı çalışmada CYP2E1 seviyelerindeki artışın hücre içi ve hücre dışı ROS artışına neden olduğu ve bu durumun hücre sel bozulmayla sonuçlandığı da gösterilmiştir. Yaptığımız çalışma ile etil alkol toksikasyonunun karaciğer dokusunda lipit peroksidasyon düzeylerini belirgin şekilde yükselttiğini ve antioksidan enzimlerden GSH ve GSH-Px düzeylerini düşürdüğünü tespit ettik.

Güçlü bir antioksidan tek hücreli olan *Chlorella vulgaris*'in, toksikasyon durumunda meydana gelebilecek hücre sel hasarda karaciğer dokusunu koruyucu etkiye sahip olabileceği düşünülmektedir. Farelerde CCl₄ ile oluşturulan karaciğer toksikasyonunda, *Chlorella vulgaris* kullanımının, karaciğer enzimleri üzerinde olumlu etki gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca histopatolojik olarak yapılan bir çalışmada (Li ve ark. 2013), vena sentralis çevresindeki hepatositlerdeki nekroz görüntülerinin, *Chlorella vulgaris* uygulanmasıyla belirgin düzeyde azaldığı görülmüştür. Shim ve ark. (2008), Cd ile oluşturulan karaciğer toksikasyonunda, *Chlorella vulgaris*'in içerdiği fotokimyasallar, klorofil, mineraller ve vitaminler dolayısıyla metabolizmanın stabil düzenine katkı sağladığı ve koruyucu özelliği olduğunu bildirmişlerdir. *Chlorella vulgaris*'te bulunan Ca, Zn ve diğer antioksidan etki gösterebilen maddelerin Cd gibi birçok maddenin toksik etkisi üzerine

antioksidan etki gösterdiği düşünülmektedir. Halkalı yapıya sahip bir hidrokarbon olan ve yaygın olarak endüstriyel alanlarda ve ticari amaçla kullanılan naftalin, mikrozomal metabolizma üzerinde etki göstererek ve serbest oksijen radikallerinin oluşmasını sağlayarak toksik etkiye sebep olmaktadır. α tokoferol, β karoten ve lutein gibi içeriği ile yüksek antioksidan özelliğe sahip olan *Chlorella vulgaris*, naftalin gibi oksidatif stres oluşumuna neden olabilecek bileşenlerin uygulandığı ratlarda böbrek ve karaciğer dokusunda meydana gelen hücre hasarının önemli derecede azaltılmasını sağladığı gösterilmiştir (Vijayavel ve ark. 2007). Yaptığımız literatür araştırmalarında etil alkol toksikasyonunda *Chlorella vulgaris*'in etkisini gösteren bir çalışmaya rastlamadık. Bu çalışma ile etil alkol toksikasyonunda *Chlorella vulgaris* kullanımının lipit peroksidasyon düzeyini düşürerek antioksidan sisteme destek olduğunu belirledik. Bu durumun; bağırsak sisteminde enzimlerin etkisiyle parçalanan *Chlorella vulgaris* hücre membranındaki biyomoleküllerin karaciğer dokusunda ROS için kuvvetli bir tutucu olarak aktivite göstermesi ve hücrel ve hücrel olmayan enzim aktivitelerini desteklemesi nedeniyle olabileceğini düşünmekteyiz.

İçerdiği organik ve inorganik bileşikler sebebiyle hücre koruyucu, anti inflamatuvar ve antitoksik gibi birçok koruyucu etkiye sahip olan ve etken maddesi büyük oranda flavonoidler ve polifenoller olan propolis, ROS oluşumunu engelleme, süperoksitleri engelleyici özelliği sayesinde lipit peroksidasyonunun önüne geçebilmektedir. Hoşnuter ve ark. (2004), ratlarda 100°C su ile yanık oluşturulduğunda hücre nekrozuna sebep olan NO (nitrik oksit) artışının, intraperitoneal olarak propolis içeriği olan CAPE enjeksiyonu ile NO, MDA ve SOD miktarlarını düşürdüğünü tespit etmişlerdir. Ayrıca meme kanseri oluşturulan ratlarda farklı oranlarda propolis uygulamasının kontrol grupları ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde tümör oluşumunun önüne geçtiği bildirilmiştir (Kimoto ve ark. 1999). Babatunde ve ark. (2015), streptozotocin ile oluşturulan diyabetin sebep olduğu oksidatif hasar ile oluşan karaciğer hücre bozulmasının ve antioksidan enzim düzeylerindeki düşüşün propolisin uygulanması ile önemli derecede düzeldiğini göstermişlerdir. Aynı zamanda Talas ve ark. (2015), yaptığı bir çalışma ile N ω -Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) uygulaması ile

hipertansiyon oluşturulan hayvan gruplarına koruyucu olarak propolis verilmesinin, MDA düzeyini anlamlı olarak düşürdüğü ve CAT enzim aktivitesini yükselttiğini göstermişlerdir. Flavonoidlerin biyolojik aktivitelerinin çoğunlukla serbest radikallerin hasar verici aktivitelerine karşı koruyucu olmaları nedeniyle olduğu düşünülmektedir. Bu biyofenollerin, yayılma reaksiyonlarına müdahale ettiği ve bunun yanında geçiş metalleriyle şelatlar oluşturarak ve başlangıç reaksiyonlarını yöneten enzimleri inhibe ederek serbest radikal oluşumunu engellediği bilinmektedir. Lin ve ark. (1999), kronik alkol toksikasyonunda propolisin rat karaciğer mikrozomal enzimlerinin artışı engelleyici ve lipit peroksidasyonu azalttığını göstermişlerdir. Küba kırmızı propolisinin oksijen radikallerini tutarak karaciğer koruyucu etkisini gösterdiği ve yapılan klinik çalışmalarda bu özelliğinin antiinflamatuvar aktivitesinde de önemli olduğu gösterilmiştir (Rodríguez ve ar. 1997). Arjantin'in farklı bölgelerinden elde edilen propolislerin alkol ekstraktlarının çok güçlü radikal tutucu aktiviteye sahip olduğu ve bu özelliği ile kuvvetli bir antioksidan olarak karaciğer koruyucu niteliği gösterilmiştir (Moreno ve ark. 2000).

Yaptığımız çalışmada propolis uygulamasının antioksidan enzimleri destekleyici ve lipit peroksidasyonu olarak aktivite gösterdiğini belirledik.

Yüksek dozlarda ve sürekli maruz kalma durumunda etil alkol metabolizmasının son ürünü olan asetaldehitin hepatositlerde birikerek hücre bozulması, vakuolleşme, yağlanma ve en son nekroz ve fibroz ile sonuçlanan bir dizi dejenerasyona sebep olduğu bilinmektedir. Etil alkolün toksik dozlarının karaciğer hücrelerinde süper oksitlerle birleşerek lipid peroksidasyonu başlattığı ve oluşan ROS ürünlerinin hücresel bozulmayı tetiklediği gösterilmiştir (Tsukamoto ve ark. 1995). Diğer taraftan *Chlorella vulgaris* gibi tek hücreli biyolojik antioksidanların hücresel yapısında bulunan bileşiklerin antioksidan enzimleri aktive ederek toksik koşullarda hücresel dejenerasyonun önüne geçebileceği bildirilmiştir (Shim ve ark. 2008). Benzer şekilde arıların kovanlarını korumak için ürettikleri biyolojik bir ürün olan propolisin de karaciğer toksikasyonuna neden olan toksik koşullarda içerdiği zengin kofaktörler ile yüksek antioksidan kabiliyeti ile ROS türlerini indirgeyerek karaciğer hücre bütünlüğünü koruduğu ve hücresel dejenerasyonun engellenmesinde

katkı sağladığı pek çok araştırmada bildirilmiştir (Nakamura ve ark. 2013). Yaptığımız çalışmada etil alkol grubu ile karşılaştırıldığında *Chlorella vulgaris* ve propolis verilen ratların karaciğer dokularındaki hücresel bozulmanın daha düşük olduğu histopatolojik olarak tespit edildi.

Sonuç olarak, etil alkol ile oluşturulan karaciğer toksikasyonunda, etil alkolün neden olduğu hücresel hasarın habercisi olarak kabul edilen lipid peroksidasyonun *Chlorella vulgaris* ve Propolisin uygulanması ile belirgin azalma gösterdiği, GSH ve GSH-Px değerlerinin ise yükseldiği gösterilmiştir. Ayrıca, yapılan histopatolojik incelemelerde de hücre hasarının azaldığı tespit edilmiştir. Bu durum; *Chlorella vulgaris* ve Propolisin güçlü antioksidan özellikleri ve hücre yapısını lipid peroksidasyona karşı koruyucu nitelikleri ile karaciğer dokusunda etil alkol toksikasyonuna karşı hücre hasarının önüne geçebileceklerini düşündürmüştür.

5. KAYNAKLAR

1. Aizzat O, Yap SW, Sopia H, Madiha MM, Hazreen M, Shailah A, Wan JW, Nur SA, Srijit D, Musalmah M, Yasmin AM: Modulation of oxidative stress by chlorella vulgaris in streptozotocin (STZ) induced diabetic sprague-dawley rats. *Adv Med Sci*, 55: 281–288, 2010.
2. Akyılmaz E: Alkol tayinine yönelik biyosensör geliştirilmesi. 2002.
3. Alan Y, Atalan E, Erbil N, Bakır O, Orman Z, Kanik P: Muş ve Bitlis yöresinde toplanan bal ve propolisin antimikrobiyal aktivitesinin araştırılması. *Muş Alparslan Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 2 (1), 221-229, 2014.
4. Albayrak S, Albayrak S: Propolis: Doğal antimikrobiyal madde. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 37 (3) 201 - 215, 2008.
5. Arıcı S: Toksik hepatit. *Pamukkale Tıp Dergisi*, 2008.
6. Babatunde İR, Abdulbasit A, Oladayo Mİ, Oİ Olasile, Olamide FR, Gbolahan BW: Hepatoprotective and Pancreatoprotective Properties of the Ethanolic Extract of Nigerian Propolis. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 4(2), 2015.
7. Bat L, Gökkurt BO, Karakaş E, Vişne A, Okay Ç: Ağır metallerin ekosistem tepkilerini anlamaya yönelik karadeniz'in gösterge organizmaları kullanılarak yapılmış çalışmalar. *Yunus Araştırma Bülteni*, 2: 71-91, 2014.
8. Bengisu G: Alternatif yakıt kaynağı olarak biyoetanol. *Alinteri Dergisi*, 27 (B), 43-52, 2014.
9. Bhadauria M, Nirala SK: Reversal of acetaminophen induced subchronic hepatorenal injury by propolis extract in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 27:17–25, 2009.
10. Bouneva İ, Abou-AS, Heuman DM, Mihas AA: Alcoholic liver disease. *Clinical Review Article*, 2003.
11. Budağ C: Yem fabrikalarında hijyen sorunu ve zoonoz hastalıklar. *Iğdır Üni. Fen Bilimleri Enst. Dergisi* 1(2): 141-154, 2011.
12. Burçak G, Andican G: Oksidatif DNA hasarı ve yaşlanma, *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 35 (4), 2004.
13. Cederbaum AI, Lu Y, Wu D: Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury. *Archives of Toxicology*, 83(6), 519–548, 2009.
14. Clouston AD, Powell EE, Walsh MJ, Richardson MM, Demetris AJ, Jonsson JR: Fibrosis correlates with a ductular reaction in hepatitis c: roles of impaired replication, progenitor cells and steatosis. *Hepatology*, 41(4), 2005.
15. Coşkunol H, Altıntoprak E: Alkol kullanımının genetik yönleri. *Klinik Psikiyatri*, 2:222-229,1999.
16. Çaylak E: Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 9(1):73-83, 2011.

17. Darwish HA, Abd Raboh NR, Mahdy A: Camel's milk alleviates alcohol-induced liver injury in rats. *Food Chem Toxicol*, 50 1377-1383, 2012.
18. Das SK, Vasudevan DM: Alcohol-induced oxidative stress. *Life Sciences*, 81 :177–187, 2007.
19. Demirci U: Karaciğer hastalıklarında vasküler endotel büyüme faktör (vascular endothelial growth factor, Vegf) düzeyleri. 2006.
20. Eren M, Saltık Temizel İN, Koçak N: İlaça bağlı hepatoksisite. *Çocuk Sağlığı ve Hastalığı Dergisi*, 47: 222-227, 2004.
21. Ergün Y, Ergün Y: Karaciğer sirozu ve nitrik oksit. *Arşiv*, 18: 91, 2009.
22. Gong N, Shao K, Feng W, Lin Z, Liang C, Sun Y: Biototoxicity of nickel oxide nanoparticles and bio-remediation by microalgae *Chlorella vulgaris*. *Chemosphere*, 83: 510–516, 2011.
23. Gürgöze SY, Şahin T, Durak MH: Memelilerde ortalama yaşam süresi ve yaşlanma sürecinde serbest radikallerin rolü. *İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 33 (1), 43-49, 2007.
24. Gürsoy F: Etanolün indüklediği karaciğer hasarında matriksmetalloproteinazların rolü ve antioksidanların etkisi. 2005.
25. Hoek JB, Cahill A, Pastorino JG: Alcohol and mitochondria: a dysfunctional relationship. *Gastroenterology*, 122(7):2049-63, 2002.
26. Hoşnüter M, Gürel A, Babuççu O, Armutçu F, Kargı E, Işıkdemir A: The effect of CAPE on lipid peroxidation and nitric oxide levels in the plasma of rats following thermal injury. *Burns*, 30:121–125, 2004.
27. Ji J, Long Z, Lin D: Toxicity of oxide nanoparticles to the green algae *Chlorella* sp. *Chemical Engineering Journal*, 170:525–530, 2011.
28. Kalyoncu A, Mırsal H: Alkol kullanım bozuklukları, *Psikiyatri Dünyası*; 4:22-30, 2000.
29. Kasapçopur Özel GS, Birdane YO: Antioksidanlar. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, 7(2): 41-52, 2014.
30. Kara K, Kocaoğlu Güçlü B, Karakaş Oğuz F: Propolis ve fenolik asitlerin ruminant beslemede kullanımı. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 11(1), 43-53, 2014.
31. Kimoto N, Hirose M, Kawabe M, Satoh T, Miyataka H, Shirai T: Post-initiation effects of a super critical extract of propolis in a rat two-stage carcinogenesis model in female F344 rats. *Cancer Letters*, 147 (1-2): 221-227, 1999.
32. Koch OR, De Leo ME, Borrello S, Palombini G, Galeotti T: Ethanol treatment up-regulates the expression of mitochondrial manganese superoxide dismutase in rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 201 (3), 1356–1365, 1994.
33. Kolankaya D, Selmanoğlu G, Sorkun K, Salih B: Protective effects of Turkish propolis on alcohol-induced serum lipid changes and liver injury in male rats. *Food Chemistry*, 78: 213–217, 2002.
34. Kuralay F, Toksikolojide mekanizmalar: detoksikasyon mekanizmaları. *T. Klin. Farmakoloji*, 18/1, 2003.

35. Kuşcu FY: Nonalkolik karaciğer yağlanması olan hastaların beslenme alışkanlıkları ve beslenme durumlarının değerlendirilmesi. 2010.
36. Kutluca S, Genç F, Korkmaz A: Propolis. Samsun Valiliği İl Tarım Müdürlüğü, 2008.
37. Lawrence RA, Burk FR: Glutathione-peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Communt.*,71,952-955, 1976.
38. Li L, Li W, Kim Y, Lee YW: Chlorella vulgaris extract ameliorates carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in mice. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 65:73–80, 2013.
39. Lieber CS: Microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS). The First 30 Years (1968-1998)- A Review, *Alcohol Clin Exp Res*, 23(6), ss 991-1007, 1999.
40. Lin SC, Chung CY, Chiang CL, Hsu SH: THE influence of propolis extract on liver microzomal enzymes and glutathione after chronic alcohol administration. *Am. J. Chin. Med.* 27(1),83-93, 1999.
41. Malanga G, Calmanovici G, Puntarulo S: Oxidative damage to chloroplasts from chlorella vulgaris exposed to ultraviolet-b radiation. *Physiologia Plantarum*. 101: 455-462, 1997.
42. Mallick N: Copper-induced oxidative stress in the chlorophycean microalga Chlorella vulgaris: response of the antioxidant system. *J. Plant Physiol.*, 161. 591–597, 2004.
43. Meral R, Saydan Kanberoğlu G: Tahıllardan etanol üretimi. *Iğdır Üni. Fen Bilimleri Enst. Der.* 2(3): 61-68, 2012.
44. Mercan U: Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15(1-2):91-96, 2004.
45. Moreno MIN, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA: Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, 71:109–114, 2000.
46. Nakamura T, Ohta Y, Ohashi K, Ikeno K, Watanabe R, Tokunaga K, Harada N: Protective Effect of Brazilian Propolis against Liver Damage with Cholestasis in Rats Treated with α -Naphthylisothiocyanate. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Article ID 302720, 2013.
47. Navasumrit P, Ward TH, Dodd JF, O'Connor JO: Ethanol-induced free radicals and hepatic DNA strand breaks are prevented in vivo by antioxidants: effects of acute and chronic ethanol exposure. *Carcinogenesis*, 21, 93-99, 2000.
48. Niczyporuk AP, Bajguz A, Zambrzycka E, Zylkiewicz BG: Phytohormones as regulators of heavy metal biosorption and toxicity in green alga chlorella vulgaris (chlorophyceae). *Plant Physiology and Biochemistry*, 52; 52-65, 2012.
49. Nieto N, Friedman SL, Cederbaum AI: Stimulation and proliferation of primary rat hepatic stellate cells by Cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species,. *Hepatology*, 35, 62-73, 2002.

50. Oukarroum A, Bras S, Perreault F, Popovic R: Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 78;80–85, 2012.
51. Özcan F: Gebelik sırasında uzun dönem etil alkol, metil alkol ve etilen glikol'e maruz kalmanın yeni doğan yavrular üzerine toksik etkisinin incelenmesi. 2008.
52. Özerol E: Sitokrom P450 monooksijenaz enzim sistemleri. *Journal of Turgut Özal Medical Center* 3(3):1996.
53. Özfiliz N: Alkol (Etanol) kullanımının testis yapısı ve işlevi üzerindeki etkileri. *J Fac Vet Med*, 20;109-115, 2001.
54. Özkan H: Kardiyovasküler klinikte ilaç uygulamalarında sağlık personelinin rolü. 2007.
55. Peng HY, Chu YC, Chen SJ, Chou ST: Hepatoprotection of *Chlorella* against carbon tetrachloride-induced oxidative damage in rats. *In Vivo*, 23: 747-754, 2009.
56. Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC: Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Anal. Biochem.* 16, 359-364, 1966.
57. Polat G, Koçan D: Propolis ve antimikrobiyel etkisi. 9. Gıda Kongresi; 24-26 Mayıs 2006.
58. Ramírez-Farías C, Madrigal-Santillán E, Gutiérrez-Salinas J, Rodríguez-Sánchez N, Martínez-Cruz M, Valle-Jones I, Gramlich-Martínez I, Hernández-Ceruelos A, Morales-González J: Protective effect of some vitamins against the toxic action of ethanol on liver regeneration induced by partial hepatectomy in rats. *World J Gastroenterol*, 14(6): 899-907, 2008.
59. Reuben A: Alkol ve karaciğer current opinion in gastroenterology. 1(3), 22:263-271, 2006.
60. Rodríguez S, Ancheta O, Ramos ME, Remírez D, Rojas E, González R: Effect of Cuban red propolis on galactosamine-induced hepatitis in rats. *Pharmacological Research*, 35, 1–4, 1997.
61. Romenty B, Berson A, Pessayre D: Microvesicular steatosis and steatohepatitis: role of mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation, *Journal of Hepatology*, 26: 13-22, 1997.
62. Saral Ö, Kolaylı S: Arı ürünlerinin karaciğer hasarını önlemedeki rolü nedir?, *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 12 (4): 147-152, 2012.
63. Sedlak J, Lindsay RH: Estimation of total protein-bound and non-protein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* 25, 192-205, 1968.
64. Seven İ, Aksu T, Tatlı Seven P: Propolis ve hayvan beslemede kullanımı. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 18(2):79-84, 2007.
65. Sezer K, Keskin M: Serbest Oksijen radikallerinin hastalıkların patogeneziindeki rolü. *F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.*, 28 (1): 49 – 56, 2014.
66. Shim JY, Shin HS, Han JG, Park HS, Lim BL, Chung KW ve Om AS: Protective effects of *Chlorella vulgaris* on liver toxicity in cadmium-administered rats. *Journal of Medicinal Food*, 11 (3), 479–485, 2008.
67. Sonsuz A: Karaciğer fonksiyon bozukluklarına klinik yaklaşım. *İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri*, 58, 69-78, 2007.

68. Suresh MV, Menon B, Indira M: Effects of exogenous vitamin C on ethanol toxicity in rats. *Indian J. Physiol. Pharmacol*, 44, 410-410, 2000.
69. Şekeroğlu ZA, Şekeroğlu V: Oksidatif mitokondrial hasar ve yaşlanmadaki önemi. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 2(2): 69-74, 2009.
70. Talas ZS, Özdemir İ, Çiftçi O, Gulhan MF, Savci A: Antioxidant effect of ethanolic extract of propolis in liver of L-NAME treated rats. *Adv Clin Exp Med*. 24(2), 2015.
71. Teramura AH: Effects of ultraviolet-B radiation on the growth and yield of crop plants. *Physiologia Plantarum*, 58:415-427, 1983.
72. Tsukamoto H, Horne W, Kamimura S, Niemela O, Parkkila S, Yla-Herttuala S, Brittenham GM: Experimental liver cirrhosis induced by alcohol and iron. *J. Clin. Invest*, 96, 620-630, 1995
73. Tucer D: Gıda Zehirlenmeleri ve Toksik Hepatit. 19/3, 2015.
74. Tunçok Y: Toksikoloji tanımı ve tarihçesi. *T Klin J Pharmacol* 24, 2003.
75. Uzbay İT: Mezopotamya uygarlığında eczacılık mesleğine dair bir inceleme. *Eczacılık Bülteni*, 23:57-60, 1981.
76. Uzbay İT: Madde bağımlılığının tarihçesi, tanımı, genel bilgiler ve bağımlılık yapan maddeler. *MİSED*, 15;3, 2014.
77. Vijayavel K, Anbuselvam C, Balasubramanian MP: Antioxidant effect of the marine algae *Chlorella vulgaris* against naphthalene-induced oxidative stress in the albino rats. *Mol Cell Biochem.*, 303:39–44, 2007.
78. Wu D, Cederbaum AI: Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Research and Health*, 27(4), 277–284, 2003.
79. Xue M, Ge Y, Zhang J, Wang Q, Hou L: Gene transfer of *Chlorella vulgaris* n-3 fatty acid desaturase optimizes the fatty acid composition of human breast cancer cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 45: 1141-1149, 2012.
80. Yang HY, Lin HS, Chao JC, Chien YW, Peng HC, Chen JR: Effects of soy protein on alcoholic liver disease in rats undergoing ethanol withdrawal. *J Nut Biochem*, 23:679-684, 2012.
81. Yalçın İ, İnan SY, Aksu F: Etanol ve santral sinir sistemi nöromedyatörleri, *Arşiv*12: 115, 2003.
82. Yasmin Anum MY, Suhana MS, Suzana M, Nor AS, Wan Zurinah WN: Basic research hot water extract of *Chlorella vulgaris* induced dna damage and apoptosis clinics. 65(12):1371-1377, 2010.
83. Yun HJ, Kim I, Kwon SH, Kang JS, Om AS: Protective effect of *Chlorella vulgaris* against lead-induced oxidative stress in rat brains. *Journal of Health Science*, 57(3) 245-254, 2011.
84. Zamani AG, Yıldırım A: Biyomarker olarak sitokrom p450 ekspresyonunun değerlendirilmesi. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 12(1):37-42, 2014.
85. Zhou Z, Sun X, Kang YJ: Metallothionein protection against alcoholic liver injury through inhibition of oxidative stress. *Exp. Biol. Med*. 227, 214-222, 2002.

6. ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Kars ilinde doğdum. İlköğrenimimi Kars'ta, Gazi Ahmet Muhtar Paşa İlköğretim okulunda ve liseyi Kars Cumhuriyet Lisesi'nde okudum. 2008 yılında Kafkas Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünü kazandım ve 2012 yılında bu bölümden mezun oldum. 2013-2015 Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünün açtığı Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans programına başladım.