



T.C.

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

VBY-YL-2012-0001

**KARBON TETRAKLORÜR İLE
OLUŞTURULAN KARACİĞER HASARINDA
GLUTATYON (GSH) VE GLUTATYON S-
TRANSFERAZ (GST) AKTİVİTESİ ÜZERİNE
N-ASETİL SİSTEİNİN ETKİSİ**

Hakan TEKELİ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayşegül BİLDİK**

AYDIN - 2012

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
VBY-YL-2012-0001

**KARBON TETRAKLORÜR İLE
OLUŞTURULAN KARACİĞER HASARINDA
GLUTATYON (GSH) VE GLUTATYON S-
TRANSFERAZ (GST) AKTİVİTESİ ÜZERİNE
N-ASETİL SİSTEİNİN ETKİSİ**

Hakan TEKELİ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayşegül BİLDİK**

AYDIN - 2012

ÖNSÖZ

Eksojen yollarla vücuda alınan toksik maddelerin organizmada metabolize edilememesi sonucu hücrelerde ortaya çıkan serbest radikaller birçok fonksiyonel ve metabolik bozukluklar ortaya çıkarırlar. Bu bozuklukların başında kronik karaciğer hastalıkları gelir. Karbon tetraklorür (CCl₄), hepatotoksin olarak bilinen ve üzerinde çok geniş çalışmalar yapılan kimyasallardan biridir. Serbest radikal üretimi ile hücresel hasar oluşturabilen bir ksenobiyotiktir. Oluşan serbest radikaller, hücrelerin lipid, protein, DNA ve karbohidratlar gibi tüm önemli bileşiklerin yapılarının bozulmalarına neden olurlar. CCl₄ intoksikasyonu, insan ve hayvanlarda hepatotoksisite modeli oluşturmak için deneysel çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, karaciğerde CCl₄ ile oluşturulacak toksisite modelinde lipit peroksidasyon göstergesi olan Malondialdehit (MDA) aktivitesini ve detoksifikasyon reaksiyonlarında önemli rol oynayan biyomoleküllerden GSH ve GST enzimlerinin aktivitesi üzerine N-Asetil sisteinin etkisinin olup olmadığı araştırılacaktır.

Araştırma, “Karbon Tetraklorür ile Oluşturulan Karaciğer Hasarında Glutatyon (GSH) ve Glutatyon S-Transferaz (GST) Aktivitesi Üzerine N-Asetil sisteinin Etkisi” isimli ve VTS-11021 kodlu proje olarak, Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenerek gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1. 1. Karaciğer	2
1. 1. 1. Karaciğer Morfolojisi	2
1. 1. 1. 1. Karaciğerin İşlevleri	3
1. 1. 2. Karaciğer Fizyolojisi	5
1. 1. 3. Karaciğer Enzimleri.....	6
1. 1. 4. Karaciğer Hasarı	6
1. 1. 5. Karaciğerde Rejenerasyon.....	8
1. 2. Karbon tetraklorür (CCl ₄).....	9
1. 2. 1. Karbon tetraklorür Etki Mekanizması	10
1. 3. Serbest Radikaller.....	11
1. 3. 1. Serbest Radikal Kaynakları	12
1. 3. 2. Serbest Radikal Çeşitleri	13
1. 3. 3. Serbest Radikallerin Etkileri.....	15
1. 4. Antioksidan Savunma Sistemleri	18
1. 4. 1. Enzimatik Antioksidanlar	20
1. 4. 1. 1. Süperoksit Dismutaz (SOD).....	20
1. 4. 1. 2. Katalaz (CAT)	20
1. 4. 1. 3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)	21
1. 4. 1. 4. Glutasyon S-Transferaz (GST)	21
1. 4. 1. 5. Glutasyon Redüktaz (GR).....	25
1. 4. 2. Nonenzimatik Antioksidanlar.....	25
1. 4. 2. 1. Glutasyon (GSH)	25
1. 4. 2. 1. 1. Glutasyon Biyosentezi	26
1. 4. 2. 1. 2. γ -Glutamil Transpeptidaz	26

1. 4. 2. 1. 3. Doku Glutasyon Düzeylerinin Modifikasyonu	30
1. 4. 2. 1. 4. Doku Glutasyon Düzeylerinin Azalması	30
1. 4. 2. 1. 5. Doku Glutasyon Düzeylerinin Artması.....	31
1. 4. 2. 2. Vitamin E (α -Tokoferol).....	31
1. 4. 2. 3. Vitamin C (Askorbik asit)	31
1. 4. 2. 4. Karotenler	32
1. 4. 2. 5. Flavonoidler.....	32
1. 4. 2. 6. Ürat	32
1. 4. 2. 7. Bilirubin.....	32
1. 5. N-Asetil sistein	32
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	35
2. 1. Gereç.....	35
2. 1. 1. Deney Hayvanları	35
2. 1. 2. Deney Grupları ve Uygulama Protokolü	35
2. 1. 3. Kullanılan Cihazlar	36
2. 1. 4. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	37
2. 1. 5. Kullanılan Çözeltiler.....	37
2. 1. 5. 1. Doku Homojenizasyonunda Kullanılan Çözeltiler	37
2. 1. 5. 2. Protein Miktarını Ölçmek için Kullanılan Çözeltiler	37
2. 1. 5. 3. Glutasyon (GSH) Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler.....	38
2. 1. 5. 4. Glutasyon S-Transferaz (GST) Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler	38
2. 1. 5. 5. Malondialdehid (MDA) Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler.....	38
2. 2. Yöntemler	38
2. 2. 1. Doku Homojenizasyonu	39
2. 2. 2. Karaciğer Dokusunda Protein Miktarının Ölçümü.....	39
2. 2. 3. Serumda Aspartat Aminotransferaz (AST) Analizi.....	39
2. 2. 4. Serumda Alanin Aminotransferaz (ALT) Analizi	39
2. 2. 5. Karaciğer Dokusunda Glutasyon (GSH) Analizi.....	39
2. 2. 6. Karaciğer Dokusunda Glutasyon S-Transferaz (GST) Analizi.....	40
2. 2. 7. Karaciğer Dokusunda Malondialdehid (MDA) Analizi	40
2. 2. 8. İstatiksel Analizler	41
3. BULGULAR	42

3. 1. Aspartat Aminotransferaz (AST) ve Alanin Aminotransferaz (ALT) Sonuçları	42
3. 2. Glutasyon (GSH), Glutasyon S-Transferaz (GST) ve Malondialdehid (MDA) Sonuçları.....	44
4. TARTIŞMA.....	48
5. SONUÇ.....	57
ÖZET	58
SUMMARY	60
KAYNAKLAR.....	62
ÖZGEÇMİŞ.....	76
TEŞEKKÜR	77

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALT	: Alanin aminotransferaz
AST	: Aspartat aminotransferaz
ATP	: Adenozin trifosfat
Ca ⁺²	: Kalsiyum
CAT	: Katalaz
CCl ₃	: Triklorometil
CCl ₄	: Karbon tetraklorür
CDNB	: 1-kloro-2,4-dinitrobenzen
Cu	: Bakır
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
EGF:	: Epidermal büyüme faktörü
Fe	: Demir
GGT	: Gama-glutamil transferaz
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
GSSG	: Okside glutasyon
GST	: Glutasyon S-transferaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
LPO	: Lipit peroksidasyon
MDA	: Malondialdehit
Mn	: Mangan
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NAS	: N-Asetil sistein
RBP	: Retinol Bağlayıcı Protein
RNA	: Ribonükleik asit
RO [•]	: Alkoksil radikal
ROO [•]	: Peroksit radikal
ROS	: Reaktif oksijen türleri
Se	: Selenyum
SOD	: Süperoksit dismutaz
TGSH	: Total glutasyon

VLDL	: Çok düşük dansiteli lipoprotein
Zn	: Çinko
γ -GT	: γ -Glutamil transpeptidaz
$^{\circ}$ C	: Santigrat Derece
i.p	: Periton içi
μ l	: Mikrolitre
μ mol	: Mikromol
nm	: Nanometre
rpm	: Dakika başına dönüş sayısı

ÇİZELGELER

	Sayfa
Çizelge 1. Hücredeki serbest radikal oksijen kaynakları.....	14
Çizelge 2. Serbest radikallerin hücredeki başlıca zararlı etkileri	16
Çizelge 3. Biyolojik sistemlerde antioksidan savunma sistemi.....	21
Çizelge 4. GST'lerin katalizlediği reaksiyonlar	25
Çizelge 5. Deney grupları ve uygulama protokolü.....	39
Çizelge 6. Serumda Aspartat Aminotransferaz (AST) ve Alanin Aminotransferaz (ALT) bulguları ve gruplar arası bulguların istatistik değerleri.....	46
Çizelge 7. Deneme ve Kontrol grubu rat karaciğer dokusunda GSH, GST, MDA bulguları ve gruplar arası bulguların istatistik değeri.....	48
Çizelge 8. Deneme ve kontrol grubu rat karaciğer dokusu 6. ve 72. saat GSH, GST, MDA bulgularının istatistik değeri.....	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1. Karaciğerden bir kesit ve karaciğer hücresi	3
Şekil 2. CCl ₄ moleküler yapısı	10
Şekil 3. Vücuttaki önemli serbest radikaller ve serbest radikal hasarı sonuçları	13
Şekil 4. Lipit peroksidasyonunun kimyasal yolu	17
Şekil 5. Antioksidan savunma mekanizması	20
Şekil 6. Merkaptürik asit süreci	24
Şekil 7. Glutasyon yapısı	27
Şekil 8. Glutasyon metabolizması.....	29
Şekil 9. Redükte ve okside glutasyonun yapısı.....	30
Şekil 10. Glutasyon (GSH)'a bağlı enzim sistemleri	31
Şekil 11. Oksidatif stresten korunmada GSH'ın antioksidant fonksiyonlarının şematik gösterimi.....	32
Şekil 12. N-Asetil sisteinin yapısal formülü.....	36
Şekil 13. N-asetil sisteinin glutasyon üzerine etkisi	37
Şekil 14. Aspartat aminotransferaz (AST) sonuçları grafiği	47
Şekil 15. Alanin aminotransferaz (ALT) sonuçları grafiği	47
Şekil 16. Glutasyon (GSH) sonuçları grafiği	49
Şekil 17. Glutasyon S-Transferaz (GST) sonuçları grafiği.....	50
Şekil 18. Malondialdehit (MDA) sonuçları ve grafiği	51

1. GİRİŞ

Karaciğer, biyokimyasal ve fizyolojik yönden çeşitli ilaçlara ve özellikle toksik maddelere maruz kalan bir organdır. Bununla birlikte mikrobik, metabolik, neoplastik ve dolaşımsal hastalıklarda karaciğeri etkiler.

Karaciğerde birçok ksenobiyotik hasar oluşturabilir ve bunlardan biri de karbon tetraklorürdür. Karbon tetraklorür (CCl_4), deneysel karaciğer harabiyeti oluşturmak amacıyla yaygın olarak kullanılır ve peroksidant aktiviteleri de bilinen bir maddedir. CCl_4 'ün metabolizması sonucu ortaya çıkan serbest radikaller organizmalar üzerinde olumsuz etkiler oluşturmaktadır (Muriel ve ark 2001, Wang ve ark 2005).

Karbon tetraklorür ile oluşan hücre hasarı lipit peroksidasyonundaki artışa bağlıdır ve CCl_4 'ün toksik etkisinin, serbest radikal olan CCl_3 radikaline dönüşümü ile başladığı belirlenmiştir. Son yıllarda yapılan birçok çalışmada karaciğer hastalıklarında oksidatif stres ve bunun sonucunda ortaya çıkan karaciğer hasarı ile fibrozis arasında ilişki olduğu belirlenmiştir (Shimizu 2003).

Malondialdehit (MDA), lipit peroksidasyonun son ürünü olarak oluşur ve oksidatif hasarda önemli bir indikatördür. Lipit peroksidasyon düzeyi, MDA ölçümü ile belirlenebilmektedir (Düzgüner 2005).

Karbon tetraklorür ile oluşan karaciğer hasarına karşı N-asetil sisteinin doku savunmasında etkili olduğu düşünülmektedir. Yapılmış çalışmalarda N-asetil sisteinin, moleküler yapısından dolayı hücrelere kolayca girebildiği ve önemli bir antioksidan olan glutatyon (GSH) oluşumunda rol oynayarak oksidan strese karşı dokuların savunmasını desteklediği, yapısında bulunan serbest tiyol grupları ile de direkt antioksidan etki gösterdiği belirtilmektedir (Kelly 1998, Zafarullah ve ark 2003).

Glutatyon, önemli bir antioksidan savunma mekanizmasıdır, karaciğerde diğer organlara göre daha yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Glutatyon serbest radikaller ve reaktif toksik maddelerin zehirsizleştirilmesinde rol oynar. Aynı zamanda indirgenmiş formu sayesinde hücrelerdeki sülfhidril grubunun devamlılığını sağlar (Liebman ve Greenberg 1988).

Bazı deneysel bulgular sonucunda toksik maddelerden dolayı oluşan hasarlar sonucunda doku glutatyon miktarının azaldığı belirlenmiştir ve bununla birlikte tedavi için GSH ön maddelerinin kullanılması sonucunda toksikasyon ve hastalıklarda azalmanın meydana geldiği görülmüştür. Glutatyon mekanizması ile, ilaç metabolizması, kanser

toksisitesi, immünoloji, makromolekül biyosentezi, endokrinoloji ve yaşlanma gibi değişik konular arasındaki ilişki yaygın olarak araştırılmaktadır (Bray ve Taylor 1994).

Bu çalışmada;

1-) Karaciğerde CCl_4 ile oluşturulan doku hasarında detoksifikasyon reaksiyonlarında önemli rol oynayan biyomoleküllerden GSH ve GST enzimlerinin CCl_4 toksikasyonundaki önemi ve glutatyonun ön maddesi olan N-asetil sisteinin, bu moleküller üzerine ve dolayısıyla CCl_4 toksikasyonundaki olası koruyucu etkisini tespit etmek,

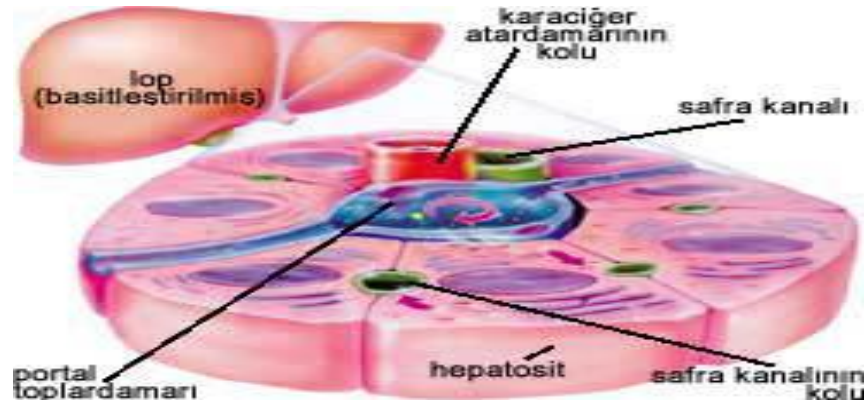
2-) GSH ve GST'nin detoksifikasyon rolü dışında antioksidan olarak önemlerinin de saptanması amaçlanmıştır.

1. 1. KARACİĞER

1. 1. 1. KARACİĞER MORFOLOJİSİ

Karaciğer, karın boşluğunun sağ üst bölümünde, diyaframın altında olup mide ve bağırsakların üstünde yerleşmiştir. Vücudun deriden sonra en büyük organı ve en büyük bezidir. Sindirim sistemine ait yardımcı bir bez olarak kabul edilir (Ross ve ark 2003).

Karaciğer, fibröz bağ dokusu bir kapsülle (Glison kapsül) kaplıdır ve doğrudan diyaframa veya diğer organlara yapıştığı yerler dışında, kapsülü seroz bir yapı çevreler (Şekil 1). Glison kapsülü; damar ve sinir kollarıyla karaciğer parankimi için destekleyici bir yapı sağlamakta ve parankimi ikiye ayırmaktadır (Şekil 1) (Aslan 2005).



Şekil 1. Karaciğerden bir kesit ve karaciğer hücresi (Anonymous 2003)

Karaciğer, safra kanalları yoluyla safrayı duodenuma boşalttığından ekzokrin; glikoproteinler, fibrinojen, protrombin, albumin, globulinler gibi proteinleri ve glikoz sentezlemesi ve bu maddeleri kana doğrudan doğruya vermesinden dolayı endokrin bir bezdir (Junqueira ve ark 1998).

1. 1. 1. 1. Karaciğerin işlevleri:

Karaciğerin hayati önem taşıyan işlevlerini aşağıdaki şekilde özetleyebiliriz (Solomon 1997):

- a. Vücuda girmiş birçok ilaçların ve zehirlerin meydana getirdiği toksik etkiyi azaltır veya ortadan kaldırır.
- b. Kandaki besin maddeleri depolanır ya da işlenir.
- c. Glikoz, glikojene çevrilir ve depolanır. Glikoza ihtiyaç olduğu zaman glikojen parçalanır ve kana glikoz salgılanır.
- d. Kanda bulunan birçok plazma proteini yapılır.
 - e. Bakteri ve yıpranmış kırmızı kan hücrelerini fagosite eder.
 - f. Safra salgılar ve yağların sindiriminde çok önemli rolü vardır.
 - g. Protein, karbonhidrat ve yağların metabolizmasında birçok önemli fonksiyon yerine getirilir.
 - h. Aminoasitler, yağ asidine ve üreye çevrilir.

-Vücudun enerji kaynaklarını üretir: Karaciğerin önemli özelliğinden biri enerji kaynağı olan glikozu üretmesidir. Karaciğer kandaki glikoz oranını devamlı kontrol eder ve beslenme sırasında alınan glikoz, glikojene çevrilerek karaciğerde depolanır. Kandaki glikoz miktarı düşmeye başlayınca, karaciğer depoladığı glikojeni tekrar glikoza çevirerek kana verir ve böylece kandaki glikoz düzeyinin düşmesi engellenmiş olur.

-Kendi kendini onarabilir: Kendini tamir etme özelliği vardır ve bir kısmı tahrip olduğunda kalan diğer hücreler hemen çoğalarak eksik kısmı tamamlar. Ölen ve zedelenen hücreler ortamda uzaklaştırılır ve yerine yenilerini koyar. Bir karaciğer hücresi yaklaşık 500'den fazla işlemi yapabilecek kapasitededir ve bu işlemleri ardı ardına değil aynı anda başarmaktadır.

-Bakterileri temizler: Karaciğerdeki kupffer hücreleri, bağırsaktan gelen bakterileri ortadan kaldırırlar.

-Vücutun savunma sistemini destekler: Sadece beslenme ve metabolizma atıkları için bir filtre olmasının yanı sıra bağışıklık maddeleri olan globülinleri ve damar tamir grupları olan enzimleri de üretmektedir.

-Kanı depolar: Karaciğer, küçülebilen ve genişleyebilen bir yapıya sahiptir ve bu özelliği sayesinde kan damarlarındaki kanı depolayabilir ya da bırakabilir. Sağlıklı vücuttaki karaciğer, toplam kanın % 10'unu tutar. Vücutta kan ihtiyacı olduğu zaman karaciğer, depolamış olduğu kanı dolaşıma geri verir ve kan ihtiyacını giderir.

-Ekonomik çalışır: Kaslarda glikoz harcanması olduğu zaman laktik asit ortaya çıkar ve laktik asit kasta kaldığı sürece acı vermesinin yanı sıra çalışmayı engeller. Karaciğer bu asidi kaslardan tutarak yeniden glikoza döndürebilir.

-Ölü alyuvarların yenilerini üretir: Karaciğer, ölen alyuvarları yerine yenilerinin üretildiği, proteinin büyük bir kısmının parçalandığı ve aminoasitler olarak tekrardan farklı amaçlar için kullanıldığı yerdir.

1. 1. 2. KARACİĞER FİZYOLOJİSİ

Karaciğer, vitaminlerin ve besin maddelerinin kan dolaşımından alınmasından, dağıtılmasından ve depolanmasından sorumlu olmasının yanı sıra çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) seviyelerini ve kan glukoz düzeylerini korur. Karaciğer tarafından plazma proteinleri üretilmesine ve sağlanmasına ilaveten, karaciğer çok sayıda toksik maddeleri bağlar ve indirger, fakat aşırı miktardaki toksik madde tarafından harap edilebilir. Karaciğer, detoksifikasyon reaksiyonlarının yanı sıra, dolaşımdaki plazma proteinlerinin çoğunu üretir. Bunların başlıcaları (Rumevlekiöglü 2007):

Non-immün α - ve β - globülinler: plazma kolloid ozmatik basıncının korunmasına yardımcı olur ve değişik maddelerin taşıyıcı proteini olarak rol oynar.

Albumin: plazma kolloid ozmotik basıncını koruyarak plazma hacminin ve doku sıvı dengesinin düzenlenmesini sağlar.

Protrombin ve fibrinojen: kan pıhtılaşmasında görev alan önemli bileşiklerdir.

Lipoproteinler: VLDL karaciğerde çok fazla sentezlenir, bunlar trigliseritlerin karaciğerden diğer organlara taşınmasına yardımcı olur.

Glikoproteinler: demir taşınımı ile ilgili proteinlerdir.

Karaciğer, çeşitli vitaminleri kan dolaşımından alarak depolar ve bunlar biyokimyasal olarak modifiye edilirler. Bu vitaminlerden bazıları: (Junqueira ve ark 2003)

K Vitamini: şilomikronlarla karaciğere taşınır. Protrombin ve diğer pıhtılaşma faktörlerinin karaciğerde sentezi için önemlidir. İnce bağırsaktaki bakteriyel flora tarafından sentezlenir ve vücuda diyetel olarak alınmasından sonra burada hızlı şekilde absorbe edilip, daha sonra VLDL ile salgılanır.

A Vitamini: karaciğer vitamin A'nın depolanması, alınması ve dolaşım düzeylerinin korunmasında önemli rol oynar. Kandaki A vitamini seviyesi düştüğü zaman karaciğer, İto hücrelerinde bulunan depo alanlarından vitamin A'yı harekete geçirdikten sonra, A vitamini retinol bağlayıcı proteine bağlı bir şekilde dolaşıma katılır. Karaciğer, RBP sentezler ve RBP sentezi, plazma A vitamin düzeyleri ile düzenlenir.

D Vitamini (kolekalsiferol): karaciğer, D vitamini metabolizmasında önemli bir rol oynar. D3 vitamini 25-hidroksikalsiferole dönüştürür. Bu dolaşan D vitamininin yaygın şeklidir. D vitamini, A vitamininden farklı olarak karaciğerde depolanmaz, fakat iskelet kaslarına ve yağ dokusuna dağılır. Fosfat ve kalsiyum mekanizmasında önemli bir vitamindir.

Bunun yanı sıra karaciğerin, demir dengesini düzenleme ve depolama gibi fonksiyonları da vardır. Demirin büyük bölümü karaciğerde ferritin şeklinde depo edilir. Karaciğer hücrelerinde, demirle birleşebilen apoferritin adında bir protein bulunmaktadır. Vücut sıvılarında demir miktarı arttığı zaman, apoferritinle birleşerek ferritini oluşturur ve gerektiğinde başka yerde kullanılmak üzere saklanır. Vücut sıvılarında demir miktarı düştüğü zaman ferritin demiri serbest bırakır. Böylece, karaciğerdeki apoferritin-ferritin

sistemi bir demir deposu görevi yaptığı gibi kan demirinin tamponu işlevini de yürütür (Guyton 2001).

1. 1. 3. KARACİĞER ENZİMLERİ

Karaciğerdeki hücre hasarı veya kolestaz hakkında bilgi vermeye yönelik karaciğer fonksiyon testi olarak bilinen bazı enzim ölçüm yöntemleri bulunmaktadır. Karaciğerdeki hasar hakkında genel bilgi ALT, AST veya ALP ve GGT enzim aktivitelerinin tayiniyle anlaşılmaktadır ve karaciğerdeki hasarlar bu enzimlerin serum düzeylerinde yükselmeye sebep olurlar (Roderick 2004).

Aminotransferaz karaciğerde görev alan bir enzimdir ve plazmadaki yüksek aminotransferaz seviyeleri bu enzimlerden zengin hücre hasarını gösterir. Aminotransferazlardan ALT ve AST karaciğer hasarının belirlenmesinde ayrı bir önem taşır. Genellikle tüm karaciğer hastalıklarında, serum ALT ve AST düzeylerinde yükselme gözlenir. İlerlemiş hücre nekrozuna sebep olan durumlarda daha belirgin düzeylerde yükselme meydana gelir (Soyak 2006).

Aspartat aminotransferaz; bir amino asitin alfa amino gurubunun bir alfa keto asite transferi ile yeni bir alfa keto asidi ve yeni bir alfa amino asiti meydana getiren reaksiyonu katalizler. Reaksiyona katılan maddelerden her ikisi önce bir ara madde oluştururlar. Bu ara madde bir hidrolitik olarak yeni bir keto asite ve yeni bir amino asite parçalanır. Pridoksal fosfat koenzim olarak görev yapmaktadır ve amino grupları için bir ara taşıyıcı olarak hizmet eder. En çok kalp kası, iskelet kası, beyin, karaciğer ve böbrekte bulunur. Kas, kalp ve karaciğer hücresindeki şiddetli travma ve nekrozlu durumlarda kısa bir sürede serumdaki miktarı oldukça artar (Ertekin 1996).

Alanin aminotransferaz; karaciğer, beyin ve kasta yüksek konsantrasyonda bulunur. Glutamik asitten bir amino gurubunu, pirüvik asite transfer eder ve alanin amino asiti oluşurken yine alfa keto glutarik asit ortaya çıkar. ALT karaciğerin akut hücre zedelenmesinde AST'ye göre daha spesifiktir (Murray ve ark 1993).

1. 1. 4. KARACİĞER HASARI

Farklı tiplerde mikrobik, toksik, metabolik, neoplastik ve dolaşımsal hastalıklar karaciğeri etkiler. Kalp yetmezliği, alkolizm, kanser ve ekstrahepatik enfeksiyonlar gibi birçok hastalık da karaciğeri sekonder olarak hasara uğratar. Karaciğerin depo özelliği olmasından dolayı, karaciğer bozukluklarının kliniğe yansımaları bir süre belirgin olmayabilir, fakat hasarın kronikleştiği durumlarda karaciğer parankiminin ilerleyici kaybı

ve safra akışının çeşitli sebeplerle engellenmesi sonucu karaciğer fonksiyonları ciddi derecede etkilenebilir (Robbins ve ark 2000).

Karaciğerin hasara karşı beş adet cevap şekli vardır :

-İnflamasyon:

İnflamasyon parankimde yayılabileceği gibi lökositlerin giriş bölgesiyle sınırlı olabilir. Karaciğere gelen inflamatuvar hücrelerin hepatosit hasarına hepatit adı verilir. İnflamasyonu hepatosit apoptozisi ya da nekrozu izleyebilir ancak ters durum olarak iyileşme de görülebilir. Kupffer hücreleri hepatositlerin nekroza uğramaları ile ölü hücreleri fagosite ederler ve bunun sonucunda parankim içerisinde inflamatuvar hücre grupları oluştururlar (Vinay Kumar ve ark 2000).

-Dejenerasyon:

Geri dönüşlü hücre zedelenmesi bulgusu hücresel şişme, balonlaşma dejenerasyonu olarak adlandırılır. Atılamayan safra, bakır ve demir gibi bazı maddeler de canlı hepatositlerde birikebilir. Yağ damlacıklarının hepatosit içinde birikmesine steatoz denir. Nükleusun yerini değiştirmeyen birden fazla küçük yağ damlacığının varlığı mikrovesiküler steatoz olarak adlandırılırken büyük yağ damlacığının varlığına ise makroveziküler steatoz denir (Robbins ve ark 2000).

-Nekroz:

Canlı organizmada lokal doku ve bir grup hücre ölümü sonucu meydana gelen lezyona nekroz denir. Ağır bir hücre zedelenmesi sonucu nekroz oluşabilir. Kimyasal ve immün mekanizmada oluşan bozukluklardan dolayı hepatositlerin apoptozise gitmeleri ile oluşan nekrozda, izole hepatositler, büzülmüş piktonik koyu eozinofilik 'Councilman cisimcikleri' şeklini alırlar. Hepatositler ozmotik etkiyle şişip parçalanırsa buna litik nekroz adı verilir.

Nekrozlar genellikle bölgesel bir yayılım gösterirler. Bu durum, santral venin hemen çevresindeki hepatositlerin nekrozunda oldukça belirgindir (sentrilobüler nekroz). Bu tip nekrozda inflamasyon bulgusu yoksa toksik ajanlar, ilaçlar ve iskemi hasarın yol açtığı düşünülmektedir (Vinay Kumar ve ark 2000).

-Fibrozis:

Doğrudan toksik hasar veya inflamasyona cevap olarak fibrotik doku oluşur. Fibrozis başlangıç döneminde portal bölgenin çevresinde, içinde veya sentral venler çevresinde gelişebilir veya sinüzoidler içinde depolanabilir. Fibröz bantlar zamanla karaciğerin çeşitli bölgelerini birleştirir ve bu olay 'köprüleşme fibrozisi' olarak adlandırılır (Vınay Kumar ve ark 2000).

-Siroz:

Karaciğerin anatomik yapısının nodülleşme ve fibrozis sonucu bozulmasıdır. İlerleyici ve kronik bir karaciğer hastalığıdır. Batı ülkelerinde başta gelen 10 ölüm nedeninden biridir. Kronik karaciğer hastalığının bu son dönemi üç karakteristik özellik ile tanımlanabilir (Vınay Kumar ve ark 2000).

- 1- İnce bantlar ya da nobüllerin yerini alan geniş skar dokusu şeklinde köprüleşen fibröz septumlar,
- 2- Çevrelenmiş hepatositlerin rejenerasyonundan kaynaklanan çok küçük yada büyük parankimal nodüller,
- 3- Tüm karaciğerin genel yapısının bozulması.

1. 1. 5. KARACİĞERDE REJENERASYON

Karaciğer, rejenerasyonu fazla olan bir organdır. Karaciğer dokusunun cerrahi yolla ya da toksik ajanlarla kaybedilmesi durumunda, karaciğer hücrelerinin bölünmesini başlatan ve dokunun orjinal kitlesi oluşuncaya kadar devam eden bir süreci meydana getirir. Sıçanlarda karaciğerin % 75'i çıkarılırsa bir ayda kaybedilen dokunun yenilediği görülür. Fakat insanda bu düzeyde bir gelişme görülemez (Junqueira ve ark 1998).

Doku çıkarılması gibi durumlarda şalon miktarının düşmesine bağlı olarak hızlı bir mitoz olayı başlar. Kanda dolaşan şalon denen mitoz inhibitörleri ile karaciğerdeki mitoz olayı kontrol edilir ve şalon miktarının artması rejenerasyon ilerledikçe devam eder, bunun sonucunda da mitotik aktivite azalır ve biter (Junqueira ve ark 1998).

Büyüme faktörü ve sitokinler karaciğer rejenerasyonunda önemli rol oynarlar. Bu faktörler şunlardır:

1-) Epidermal büyüme faktörü (EGF) : Hepatositlerde DNA sentezini uyardığı belirlenen ilk faktördür (Michalopoulos 1990).

2-) Hepatosit büyüme faktörü (HGF) : Plazma ve birçok dokudaki protein yapısında bulunan bir büyüme faktörüdür. Ratlarda hepatektomi sonrasında bir saat içinde plazma HGF konsantrasyonu 20 katına çıkar (Nishizaki ve ark 1995). D-galaktozamin ve karbon tetraklorür gibi toksik maddeler de karaciğer nonparankimal hücrelerinde HGF artışına neden olur (Michalopoulos 1990).

3-) TNF- α ve IL-6: IL-6 gen delesyonu ve TNF- α ve reseptör eksikliği olan koyunlarda karaciğer DNA sentezinin bozulduğu saptanmıştır (Michalopoulos ve De Frances 1997).

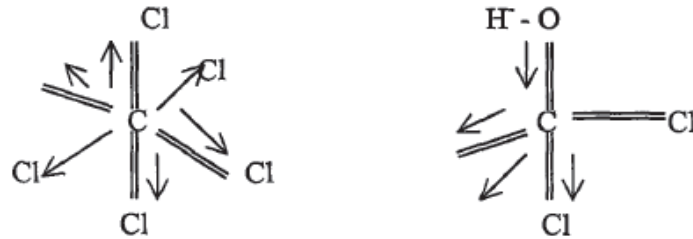
4-) Transforme edici büyüme faktörü alfa (TGF- α) : EGF ile benzer reseptörleri etkileyen ve rejenerasyonun başlangıç safhasından sonra rol aldığı belirtilmektedir (Michalopoulos 1990).

5-) Norepinefrin: EGF'yi arttırarak indirekt yolla, α 1-adrenerjik reseptör yoluyla direkt karaciğer rejenerasyonunu arttırır (Michalopoulos ve De Frances 1997).

6-) Diğerleri: Karaciğer rejenerasyonunda en önemli inhibitör TGF- β 1' dir. Ayrıca bunun yanında retinoik asit, triiyodotironin, vasküler endotel büyüme faktörleri (VEGF), fibroblast büyüme faktörleri (FGF), ilaçlar, büyüme hormonu, siklosporin, vazopressin gibi faktörlerin karaciğer rejenerasyonunda olumlu yönde önemli rol oynadığı belirtilmektedir (Tsujii ve ark 1993).

1. 2. KARBON TETRAKLORÜR (CCl₄)

Apolar bir molekül olan karbon tetraklorür, genellikle organik bir çözücüdür. Bir karbon molekülüne bağlı dört Cl atomu tetrahedral bir şekilde bağlı olup, H ve Cl iyon değişmesiyle (CHCl₃) molekül durumuna geçer (Şekil 2) (Doğan 2000).



Şekil 2. CCl₄ moleküler yapısı (Dianzani 1979)

Karbon tetraklorür hızlı buharlaşabilen, renksiz, yanıcı olmayan ve hoş kokulu bir sıvıdır. CCl_4 doğal olarak bulunmadığından dolayı kimyasal olarak üretilmektedir. Kararlı bir kimyasal yapıya sahip olmasından dolayı çok yavaş bozunur ve çok uzun bir yarılanma ömrü vardır (National Academies Press 1995).

Vücuda CCl_4 , büyük oranda soluma yoluyla alınmasının yanında yutma ve deri yoluyla da alınabilir. İnsanlarda yağ dokusuna yerleşirler ve buradan da akciğerlere doğru hareket eder. Metabolize olan CCl_4 'ün % 4 kadarı nefesle dışarı verilir. Geri kalan kısmı hücre içi moleküller ve proteinler ile etkileşime girer. Çevreden insan vücuduna günlük ortalama 0,1 μg CCl_4 girişi olduğu tahmin edilmektedir. Birleşik Devletler Çevre Koruma Dairesi (EPA) hayvan deneylerinden elde edilen sonuçlara dayanarak, CCl_4 'ü insan için olası kanserojen (grup B2) sınıfına dahil etmiştir (Thrall ve ark 2000).

Karbon tetraklorür iyi bir kimyasal çözücü olmasından dolayı endüstriyel alanlarda, tohum ekstratlarının elde edilmesinde, soğutucu ekipmanlarda ısı transfer elemanı olarak kloroflorakarbonların (CFCs) sentezinde kullanılmaktadır. Ayrıca CCl_4 yağlar, pestisit ürünleri, petrol ürünlerinde organik çözücü olarak da kullanılır. Tekstil ve kimya fabrikalarına yakın yerlerde yaşayanların, böcek ilacı uygulayıcılarının, atık merkezlerinde çalışanların, kuru temizleyicilerin CCl_4 'e maruz kaldıkları ve büyük risk altında oldukları söylenebilir (National Academies Press 1995, Kumar ve ark 2005). CCl_4 genellikle merkezi sinir sistemini etkilemektedir. Maruz kalınan süreye ve doza bağlı olarak baş dönmesi, vücutta dengesizlik, güçsüzlük, sersemlik ve uyuşukluk oluşabilir. Şiddeti az olan vakalarda ise CCl_4 'e maruz kalınma ortadan kalktıktan bir süre sonra meydana gelen sorunlarda ortadan kalkmaktadır. CCl_4 'e kronik maruz kalma siroza neden olurken, akut maruz kalma hepatotoksisiteye neden olabilir (Basu 2003).

1. 2. 1. Karbon tetraklorür Etki Mekanizması

Karbon tetraklorür, hayvanlarda ve insanlarda hepatotoksisiteye neden olan bir ksenobiyotiktir. Serbest radikal üretimi ile hücre hasar oluşturabilme özelliğine sahiptir ve toksisite modeli oluşturmak için yaygın olarak kullanılır. CCl_4 ile oluşan hücre hasarı lipit peroksidasyonundaki artışa bağlıdır. CCl_4 'ün toksik etkisinin, serbest radikal olan CCl_3 radikaline dönüşümü ile başladığı deney hayvanlarıyla yapılan çalışmalarda belirlenmiştir (Muriel ve ark 2001, Wang ve ark 2005).

Granülsüz endoplazmik retikulum içerisinde yer alan sitokrom p-450; kolesterol, yağ asitleri, steroid biyosentezi ve detoksifikasyonu için gereken hidroksilasyon mekanizmasını gerçekleştiren birçok enzimin yer aldığı bir elektron taşıma sistemidir.

Sitokrom p-450 sistemi böbrek, akciğer ve bağırsak gibi organlara kıyasla en çok karaciğerde bulunur. Sitokrom p-450 tarafından gerçekleştirilen hidroksilasyon mekanizması yabancı maddeleri ara metabolitler haline dönüştürerek vücuttan uzaklaştırılmalarını sağlayan bir reaksiyondur (Sheweita ve ark 2001a,b).

Sitokrom p-450 sistemi, ksénobiyotikleri katalizleyerek ara metabolitlere dönüştürür ve oluşan ara metabolitler reaktif toksik maddelerdir. Bunun yanı sıra sitokrom p-450 sistemi, karsinojenlerin ve polisiklik aromatik hidrokarbonların da (PAHs) reaktif ara ürünlere dönüşümüne neden olur (Sheweita ve ark 2001a,b).

Karbon tetraklorür, sitokrom p-450 enzim sistemi tarafından metabolize edildikten sonra, bir ara metabolit olan triklorometil radikalinin (CCl_3) oluşmasına ve daha sonra oksijen varlığında triklorometilperoksi radikaline ($OOCCl_3$) dönüşmesine sebep olur. CCl_4 'ün bu reaktif serbest radikal metabolitleri, poliansatüre yağ asitleri ile reaksiyona girerek lipid peroksidasyonu başlatır; ya da kovalent olarak protein ve yağ asitlerine bağlanarak hücre membranının bozulmasına, bunun sonucunda da karaciğer hasarına neden olurlar (Muriel ve ark 2001, Sheweita ve ark 2001, Basu 2003).

Karaciğeri CCl_4 ile intoksikasyona uğratılan sıçanlarda yapılan çalışmalara göre sentrilobüler nekrozis ve yağ dokusunun dejenerasyonu tespitiyle CCl_4 'in hepatotoksik bir ajan olduğu belirlenmiştir. Sentrilobüler nekrozis'in, serbest radikaller aracılığı ile olan reaksiyonlardan sonuçlandığı ileri sürülmüştür (Arosio ve ark 2000).

Karbon tetraklorür ile yapılan bir çalışmada (Muriel ve ark 2001), CCl_4 'ün deney hayvanlarına akut olarak verilmesinden sonra sentrilobüler karaciğer nekrozu ve yağlı karaciğer olduğu görülmüştür. CCl_4 'den oluşan triklorometilperoksi radikalinin (CCl_3O_2) hepatosit zar proteinlerine kovalent bağlanarak ve lipid peroksidasyonuna neden olarak hücre hasarını başlattığı belirtilmiştir.

1. 3. SERBEST RADİKALLER

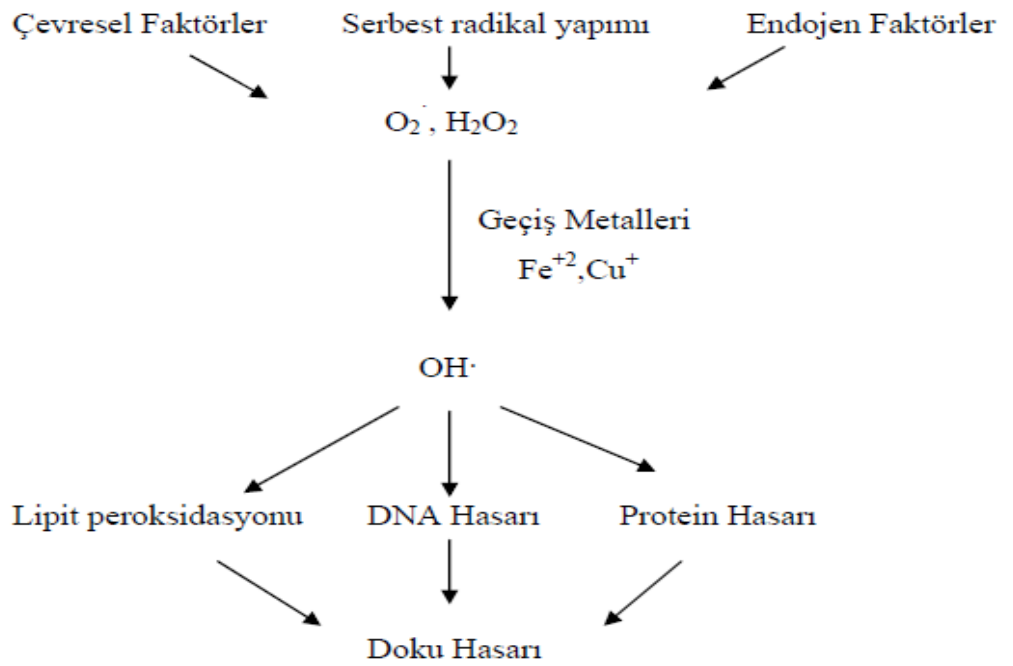
Elektronların birbirleriyle düzenli şekilde ilişkili olması bileşiğe kararlı bir yapı kazandırır. Dış yörüngesinde bir veya daha fazla çiftleşmemiş elektrona sahip bileşik veya elementlere 'serbest radikaller' adı verilir. Tarihsel olarak ise 'Radikal' terimi, reaksiyon sırasında değişmeden kalan atom gruplarını tanımlamaktadır (Staroverov ve Davidson 2000).

Serbest radikaller çeşitli yollarla meydana gelirler (Şekil 3) (Akkuş 1995).

1-) Homolitik ayrılma ile radikal oluşumu: Kovalan bağlı bir molekülün her bir parçasında ortak elektronlardan birisinin kalarak radikal oluşumu.

2-) Heterolitik ayrılma ile radikal oluşumu: Kovalan bağlı bir molekülden tek bir elektron kaybı olmasıyla radikal oluşumu.

3-) Elektron transferi ile radikal oluşumu: Normal bir moleküle tek bir elektron eklenmesi veya transferi ile de radikal oluşu şeklindedir.



Şekil 3. Vücuttaki önemli serbest radikaller ve serbest radikal hasarı sonuçları (Antmen 2005)

1. 3. 1. Serbest Radikal Kaynakları

Serbest radikaller, tetraklorid, doksorobusin, bleomisin gibi ajanların alınmasının yanında araşidonik asit yolu, oksidatif fosforilasyon, pürinlerin katabolizması, demir ile parçalanmış reaksiyonların meydana gelmesi sonucu endojen kaynaklı olarak da ortaya çıkabilir (Akkuş 1995).

Bu sebepten serbest radikal oluşumu endojen ve eksojen olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.

Çizelge 1. Hücredeki serbest radikal oksijen kaynakları (Cross ve ark 1987)

Endojen Kaynaklar	Eksojen Kaynaklar
Mitokondiyal elektron transport zinciri	İlaç oksidasyonları (Ör. CCl ₄)
Kloroplast elektron transport zinciri	İyonize radyasyon
Oksidan enzimler: Ksantin oksidaz	Güneş ışığı
İndolamin	X- ışınları
Triptofan	Ultraviyole ışınları
Galaktoz	Isı şoku
Siklooksijenaz	Glutasyonu
Lipooksijenaz	okside eden maddeler
Mono	Ortam havası
Fagositik hücreler: Nötrofiller	Sigara dumanı
Monosit ve	Ozon
Eozinofiller	Kükürt dioksit
Endotelyal	Egzos gazları
Oto-oksidasyon reaksiyonları (Fe ⁺² , epinefrin)	

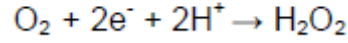
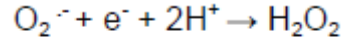
1. 3. 2. Serbest Radikal Çeşitleri

- Süperoksit Anyon Radikali (O₂⁻)

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden türeyen serbest oksijen radikalleridir ve sekiz elektrona sahiptir. Hücredeki enerji metabolizmasında, süperoksit radikalleri, oksidazlar ya da oksidasyon sırasında bazı enzimlerin aktivitesi sonucunda oluşurlar. Süperoksit dismutaz enzimi süperoksit radikallerini inaktive edebilmektedir. Orbitallerinde oksijen atomu, iki eşleşmemiş elektrona sahiptir ve oksijenin bu özelliği serbest radikallerle çabuk reaksiyona girmesini sağlarken radikal olmayan maddelerde daha yavaş reaksiyona girmesine neden olur (Koç 2007).

- Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

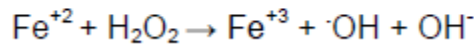
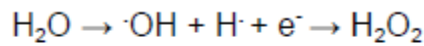
Moleküler oksijenin ortamdan iki elektron alması veya süperoksitin bir elektron alması sonucu asidik ortamda hidrojen peroksit meydana gelir (Gutteridge 1995).



Hidrojen peroksit kendi başına zayıf bir oksidan özelliğe sahiptir ve ortaklanmamış bir elektron içermektedir. Reaktif oksijen türleri (ROS) kapsamına giren hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Geçiş metalleri veya Fe²⁺ varlığında Fenton reaksiyonu sonucu, süperoksit radikalinin (O₂^{·-}) varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali (OH[·]) oluşturur (Gutteridge 1995).

- Hidroksil Radikali (OH[·])

Hidroksil radikali, Haber-Weiss reaksiyonu ve Fenton reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten oluşmaktadır, son derece reaktif oksidan radikalidir. Biyolojik moleküller üzerinde etkili olan ve oluştuğu yerde büyük hasarlara neden olan hareketli bir oksidandır. Yarılanma ömrü çok kısadır (Koç 2007).



Reaktif oksijen türlerinin en güçlüsüdür ve lipit peroksidasyonunda rol oynar. Yağ asitleri ve tiyoller gibi moleküllerden proton kopartarak tiyil radikalleri, karbon merkezli organik radikaller, organik peroksitler gibi yeni radikallerin oluşmasına ve sonuçta büyük hasara neden olur. Hidroksil radikalının araşidonik asit gibi doymamış yağ asitlerine olan ilgisinin de fazla olduğu ileri sürülmektedir (Koç 2007)

- Nitrik oksit (NO) ve nitrojen dioksit (NO₂)

Eşleşmemiş elektronları ile nitrik oksit ve nitrojen dioksit birer radikaldirler. NO (nitrik oksit) ile oksijenin reaksiyona girmesi sonucu NO₂ (nitrojen dioksit) oluşur ve oldukça güçlü ve zehirli bir oksidandır (Gutteridge 1995).

- Singlet Oksijen (¹O₂)

Oksijenin eşleşmemiş elektronlardan birinin verilen enerji sonucu bulunduğu orbitalden başka bir orbitale veya kendi spininin ters yönünde yer değiştirmesiyle oluşur. Oksijenin yüksek enerjili ve mutajenik formudur (Yanbeyi 1999).

1. 3. 3. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller etkilerini hücrel yaşam için büyük önem taşıyan DNA, protein ve yağlara karşı gösterirler.

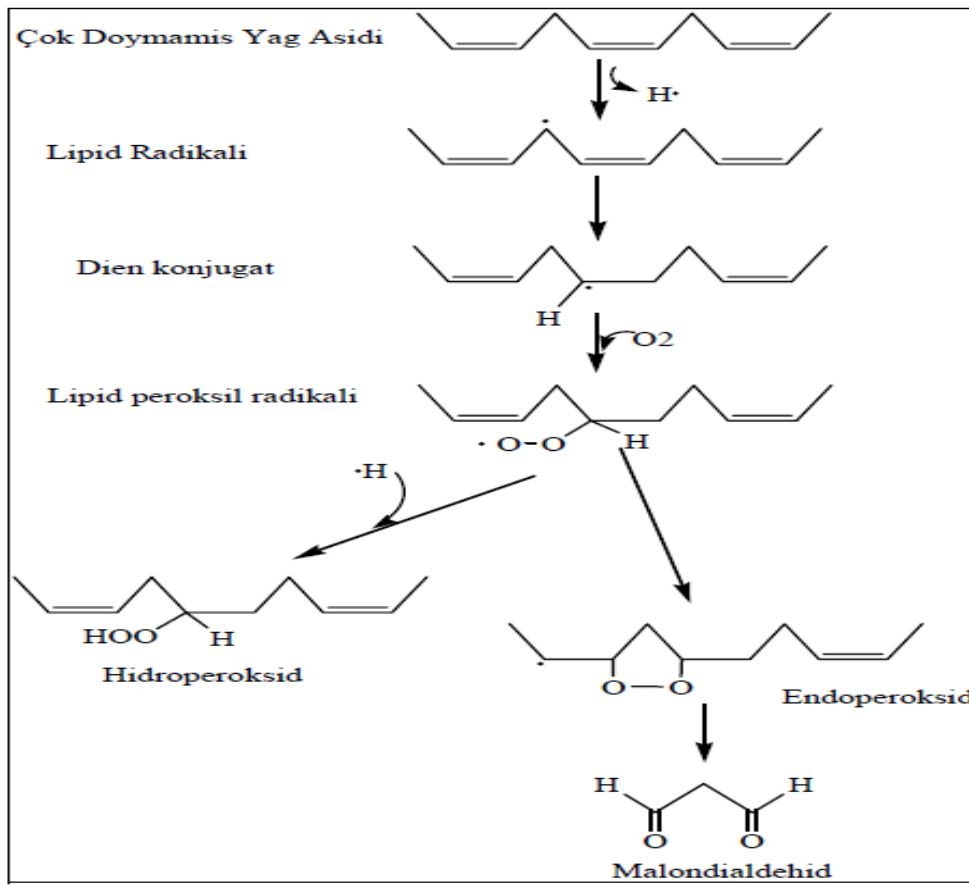
Çizelge 2. Serbest radikallerin hücredeki başlıca zararlı etkileri (Yanbeyi 1999)

Doymamış yağlar	Kolesterol ve yağ asitlerinde oksidasyon Lipitlerde çapraz bağlanmalar Organel ve hücrelerde çapraz bağlanmalar
Karbonhidratlar	Polisakkaritlerin depolimerizasyonu
Nükleik asit bazları	Hidroksilasyonlar Mutasyonlar, kimyasal modifikasyonlar Şekerlerde benzer reaksiyonlar
Kükürtlü amino asitler	Proteinlerin denatürasyonu ve çaprazlanma Enzimlerde inhibisyon
Proteinler	Peptid zincirlerinde kopma Denatürasyon

- Membran lipitleri üzerine etkisi:

Membranlardaki birçok molekül ve bileşik, serbest radikallerden etkilenir. Hücre membranında bulunan kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünlerini oluştururlar (Delibaş ve Özcankaya 1995).

Lipit peroksidasyonu (LPO), poliansatüre yağ asitlerinin alfa-metilen gruplarından hidrojen atomunun uzaklaştırılmasıyla başlatılmaktadır ve poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipit peroksidasyonu olarak bilinir. LPO kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Hücre membranlarında lipit peroksit radikalleri ve lipit serbest radikalleri oluşması, reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hücre hasarının önemli bir göstergesi olarak kabul edilir. Serbest radikallerin sebep olduğu lipit peroksidasyonuna "nonenzimatik lipit peroksidasyonu" denir (Akpoyraz ve Durak 1995). LPO reaksiyonu ya toplayıcı antioksidan reaksiyonlarla sonlandırılır veya otokatalitik yayılma reaksiyonları ile devam eder (Gutteridge 1995).



Şekil 4. Lipit peroksidasyonunun kimyasal yolu (Murray ve ark. 1993)

LPO sonucunda membran yapısında çeşitli değişiklikler meydana gelir. Bunlar kısaca; (Long ve Bislskl 1980)

1-) LPO sırasında meydana gelen lipit hidroperoksitleri biomembranlar üzerinde yerleşmiş halde bulunan bazı enzimleri inhibe eder.

2-) Membran üzerindeki yağ asidi miktarında azalma meydana gelir.

3-) Membranın yapı taşlarından olan yağların akışkanlığını bozar.

4-) Tiyol gruplarını oksidasyona uğratarak membran üzerindeki protein-lipit ilişkisini bozar.

5-) LPO sonucu oluşan serbest radikaller membran dışında da çeşitli moleküllerde bozulmalara sebep olurlar.

Lipit peroksidasyonunun son ürünü olarak oluşan malondialdehit (MDA) oksidatif hasarın bir indikatörüdür. MDA ölçümü ile LPO değerlendirilmesi yapılabilir. MDA üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu ile meydana gelir. Peroksidasyon sonucunda oluşan MDA; hücre membranlarından iyon alış-verişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve kolay bir şekilde hücre içine geçişi yapılabilir, hücre içindeki Schiff bazları ile birleşerek lipofuksin şeklinde sitoplazmada birikebilir. Enzim aktivitesinin ve iyon geçirgenliğinin değişimi gibi olumsuzluklara da neden olabilir. Bu nedenle biyolojik materyalde malondialdehit ölçülmesi lipit peroksit seviyelerinin indikatörü olarak kullanılır (Düzgüner 2005).

- Proteinler üzerine etkisi:

Serbest radikallerin proteinler üzerindeki hasarı lipitlerde oluşan hasardan daha azdır. Sülfür ve doymamış bağ içeren tirozin, triptofan, histidin, fenilalanin, sistein, metionin gibi aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Proteinlerde oluşan hasar sonucunda protein fragmentasyonu ve agregasyonu oluşabilir. Özellikle enzimlerin yapısında bulunan proteinlerin hasar görmesi sonucu hücre fonksiyonlarında bozukluklar ve enzim aktivitelerinde sorunlar meydana gelebilir (Freeman ve Crapo 1982).

- DNA üzerine etkisi:

Serbest radikaller DNA'yı etkileyerek mutasyona neden olurlar. Hidroksil gibi serbest radikal bileşiklerinin DNA bazları üzerinde etkisi büyüktür ve geri dönüşümsüz değişikliklere neden olurlar (Marnett 2002).

- Karbonhidratlar üzerine etkisi:

Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu peroksitler, oksaldehyitler ve hidrojen peroksitler oluşmaktadır. Hidrojen peroksitin invitro olarak hyaluronik asidi parçaladıkları gösterilmiştir (Maxwell 1995).

1. 4. ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

Biyolojik sistemlerde serbest radikallerin etkilerini ortadan kaldırmak için çeşitli savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bu mekanizmalara ‘antioksidan savunma mekanizmaları ya da antioksidanlar’ adı verilir. Antioksidanlar; lipit peroksidasyonunu engellerler ve okside olan substratlara göre daha az konsantrasyonlarda bile substratın oksidasyonunu geciktirirler ve inaktif duruma getirirler (Yanbeyi 1999).

Antioksidanlar, birbiriyle ilişkili ya da birbirinden bağımsız altı farklı mekanizma ile etkilerini gösterirler (Şekil 5) (Cross ve ark 1987, Yanbeyi, 1999).

1-) Oksijenin yerini alarak veya reaksiyona girerek lokal oksijen konsantrasyonu azaltabilirler.

2-) Hidroksil radikali yapısında yer alan hidrojen atomları bağ oluşturabilecek yapıdaki ürünleri temizleyerek peroksidasyonun başlamasını önleyebilirler.

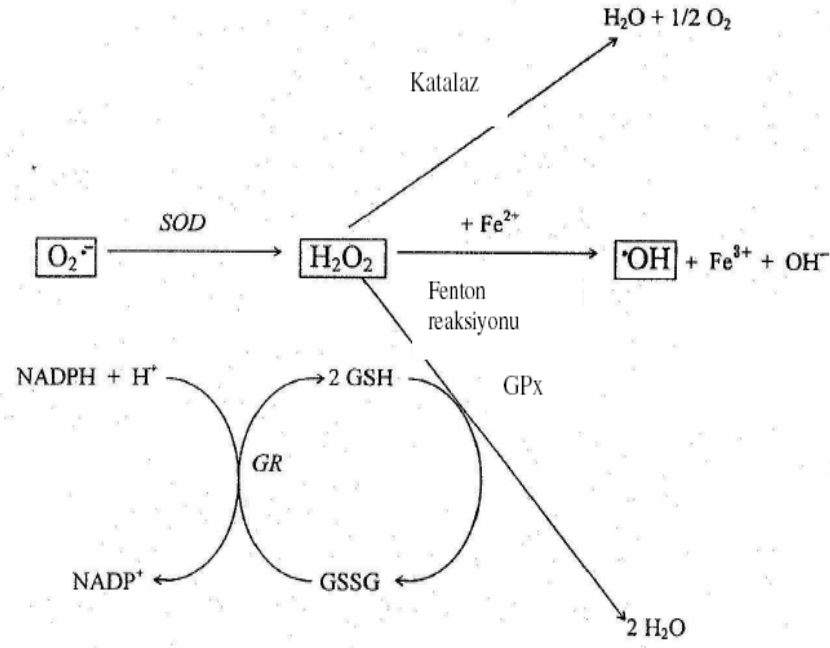
3-) Membran lipitlerini güçlü şekilde etkileyerek peroksit oluşturan singlet oksijeni temizleyebilir.

4-) Metal iyonlarını bağlamak vasıtasıyla reaktif grupların ve lipit peroksitlerden peroksil ve alkoksil radikallerin oluşumunu önleyebilirler.

5-) Peroksitleri, radikal olmayan ürünlere çevirebilir.

6-) Zincir oluşumuna neden olan serbest radikallerle reaksiyona girebilirler ve böylece zincir kırılması meydana gelebilir.

Bu mekanizmalardan ilk dört tanesi ile önleyenler, ‘koruyucu antioksidanlar’ olarak kabul edilmektedir. Dördüncü mekanizma ile etki edenler reaksiyon sırasında tüketilmezler. Beşinci mekanizma ile etki eden antioksidanlar ise koruyucu olmakla birlikte reaksiyon sırasında tüketilir ya da tüketilmezler. Altıncı mekanizma ile etki eden zincir kırıcı antioksidanlar zincir uzama reaksiyonlarına sebep olan radikallerle kompleks yaptıklarından kırma reaksiyonu süresinde tüketilirler. Bir antioksidanın etkisini gösterebilmesi için, o maddenin serbest radikalleri indirgeme hızı yeterli seviyede olması gerekir. Antioksidanların çoğunun tek bir mekanizma üzerinden etkisinin çok olmadığı ve birden fazla mekanizma ile asıl etkisinin olduğu söylenebilir (Cross ve ark 1987, Yanbeyi 1999).



Şekil 5. Antioksidan savunma mekanizması (Armstrong 1998)

Eksojen ve endojen kaynaklı olarak ikiye ayrılabilirdiği gibi fonksiyonlarına göre de radikallerin dokudaki etkilerini önleyen (E vitamini, ubikinon, retinoik asit, glutatyon, ürat) ve radikal oluşumunu önleyen (SOD, katalaz, metal şelatörler ve glutatyon peroksidaz) antioksidanlar olmak üzere ikiye ayrılırlar (Yanbeyi 1999).

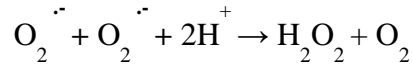
Çizelge 3. Biyolojik sistemlerde antioksidan savunma sistemi (Yanbeyi 1999)

Enzimatik		Nonenzimatik	
(SOD)	Süperoksit dismutaz	Glu	Albümin
(GSH-Px)	Katalaz (KAT) Glutatyon peroksidaz	tatyon (GSH) α -	Seruloplazmin
glutatyon	Fosfolipit hidroperoksit	Tokoferol (vit E) Ask	Transferrin
(GST)	Peroksidaz Glutatyon S-transferaz	orbat (vit C) β -	Ferritin
(GSSG-R)	Glutatyon redüktaz	Karoten Fla	Laktoferrin
		vonoidler Üra	Melatonin
		t Bili	Sistein
		rubin	

1. 4. 1. Enzimatik Antioksidanlar

1. 4. 1. 1. Süperoksit dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz antioksidan savunmanın ilk basamağı olan süperoksitin H_2O_2 'e dismutasyonunu katalizleyen enzimdir (Çakır 1997).

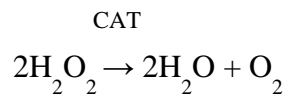


Bu dismutasyon reaksiyonu süperoksit radikalinin katyon ve anyon formlarının aynı oranda olduğu pH 4,8'de kendiliğinden de gerçekleşebilir. Fakat fizyolojik şartlarda pH'nın 7,35-7,45 arasında olduğu zaman bu reaksiyon daha yavaş gerçekleşecektir (Memişoğulları 2005).

SOD genelde bütün canlılarda bulunmaktadır ve memelilerde üç tipi vardır. Bunlar sitozolde bulunan dimerik Cu ve Zn ihtiva eden Cu-ZnSOD, extraselular etki gösteren ECSOD ve mitokondri de bulunan tetramerik Mn ihtiva eden Mn-SOD izomerlerdir. SOD'nin Fe ihtiva eden izomeri Fe-SOD ise sadece mikroorganizmalarda ve bazı bitkilerde bulunmaktadır. SOD'nin tüm çeşitleri süperoksitin dismutasyon reaksiyonunu katalizleyebilirler (Buettner ve ark 2006).

1. 4. 1. 2. Katalaz (CAT)

Molekül ağırlığı yaklaşık 248,000 Dalton olan katalaz, çoğu hücre tipinde farklı konsantrasyonlarda bulunan dört tane hem grubu içeren bir hemoproteindir. Bu enzimin en önemli görevi hidrojen peroksiti, moleküler oksijen ve suya katalizlemektir (Yanbeyi 1999, Akkuş 1995).

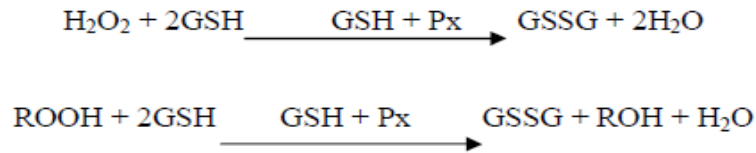


Katalaz enzimi daha çok peroksizomlarda lokalizedir ve büyük molekülle lipit hidroperoksitlerine etki etmez. CAT'ın indirgeyici aktivitesi hidrojen peroksit ile metil, etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşıdır. CAT, kan, mukoz membranlar, karaciğer, kemik iliği ve böbreklerde yüksek miktarda bulunmaktadır (Scibior ve Czczot 2006).

1. 4. 1. 3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Hücrelerde meydana gelen hidroperoksitlerin uzaklaştırılmasında görevli enzimdir ve molekül ağırlığı 85000 Dalton'dur. 1957 yılında Mills tarafından ilk kez memeli eritrositlerinde saptanmıştır. Birbirine benzer dört subünitten oluşan tetramerik bir enzimdir ve her subünit bir selenyum atomu içerir. Bu yüzden hücreleri çeşitli hasarlara karşı koruyan bir selenoenzim olduğu düşünülmektedir (Fırat 1997, Yanbeyi 1999).

GSH-Px, lipitleri peroksidasyondan koruyan önemli bir enzimdir. GSH-Px, redükte glutasyonu yükseltirken H_2O_2 'i de suya çevirir ve böylece membran lipitlerini ve hemoglobini oksidan strese karşı korur (Memişoğulları 2005).



GSH-Px'in aktivitesinin devam etmesi için glutasyon'un belirli bir seviyede bulunması gerekir. NADPH'e bağımlı glutasyon redüktazın katalizlediği bir reaksiyonla, Glutasyon disülfid (GSSG), tekrar iki molekül GSH'a dönüşür. H_2O_2 molekülüne etki eden katalazdan farklı olarak GSH-Px, türlü reaksiyonlarda hızlı oluşan tek molekül H_2O_2 'in ortadan kaybolmasını sağlar (Akkuş 1995).

GSH-Px'in, akciğerde en etkili olduğu düşünülmektedir ve enzim aktivitesinin % 60-75'i ökaryot hücrelerin sitoplazmasında bulunur. % 25-40'ı ise mitokondridedir. Enzim aktivitesinin en fazla olduğu dokular ise karaciğer ve eritrosittir (Fırat 1997).

1. 4. 1. 4. Glutasyon S-Transferaz (GST)

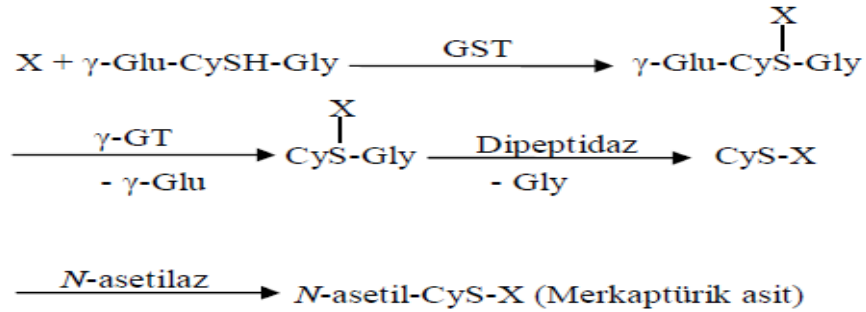
Glutasyon S-transferazlar, elektrofilik ve hidrofilik bileşiklerin glutasyon ile etkileşimlerini sağlayarak, hücrel makromolekülleri reaktif elektrofillere karşı koruyan Faz-II detoksifikasyon enzim ailesi üyesidir. Molekül ağırlıkları 20.000-25.000 daltondur ve her bir alt birim 200-240 aminoasitten oluşur. İlk kez sıçan karaciğerinde Boyland ve ark tarafından tanımlanmıştır (Hayes ve ark 2005).

GST'ler kataliz reaksiyonlarında, elektrofilik substratlar üzerine glutasyon (GSH) tripeptidin nükleofilik atağını kataliz ederler. Bunun yanında oksidasyonla oluşan ürünlerin ya da dışarıdan alınan yabancı toksik maddelerin, vücutta bulunan diğer makromoleküller ile birleşmesini önleyip, hücre komponentlerine zarar vermeden

atılmasını sağlarlar. Bu yüzden GST'ler, çok önemli koruyuculuk görevi gören enzim gruplarından biridir (Armstrong 1997).

Glutasyon S-transferazlar; mitokondriyal, sitosolik ve mikrozomal olmak üzere üç aileye ayrılırlar. Mitokondriyal ve sitosolik GST'ler üç boyutlu katlanmaları açısından birbirlerine benzerler ve çözünebilir GST'ler olarak isimlendirilirler. Bu gruptaki GST'ler fazla sayıda izoenzime sahiptirler; bu izoenzimler farklı dokularda farklı miktarlarda bulunabilirler. Çözünebilir GST izoenzimleri birbirlerinden izoelektrik noktaları ve aminoasit dizileri arasındaki farklılıklarla ayrılırlar. Mikrozomal GST'ler, (MAPEG) çözünebilir gruplara yapısal benzerlik göstermezler, bu yüzden mitokondriyel GST formları ve primer yapıları farklıdır (Mannervik ve ark 2005).

Merkaptürik asit biyosentezinin başlangıç reaksiyonlarında önemli bir rol oynarlar. GST'nin GSH-konjugasyonu aracılığıyla katalizlediği merkaptürik asit oluşum süreci genellikle detoksifikasyon tepkimeleri olarak tanımlanır. Merkaptürik asit biyosentezi başlangıcında GSH konjugatı ile başlayan ve daha sonra γ -GT tarafından glutamik asitin uzaklaştırılması ile sonuçlanan, sisteinilglisin konjugatının oluşumuyla devam eden birkaç basamaktan oluşmaktadır. Bu reaksiyon glisinin uzaklaştırılması ile sisteinil S-konjugatının yani pre-merkaptürik asitin oluşmasıyla devam eder. N-asetil transferazlar tarafından sisteinil S-konjugatını N Asetilasyonu N-asetil türevi olan merkaptürik asit oluşumu ile reaksiyon sonuçlanır (Leblanc ve Dauterman 2001).



Şekil 6. Merkaptürik asit süreci. X, GSH ile konjugasyon yapan ksenobiyotiği göstermektedir (Lu 1999).

Glutasyon S-transferazların (GST) indirgeme özelliği, membran bileşenlerini lipit peroksidasyonundan korur. Ayrıca lipit peroksidasyonunun aldehit yapıda ürünleri olan 4-hidroksi alkenaller, GSH ile konjuge olurlar. Mikrozomal fraksiyonda bulunan GST'ler de peroksidaz aktivitesiyle lipit peroksitlere karşı koruma sağlar. Doğal koruyucu sistemlerden biri olarak da kabul edilen GST'ler herbisid, pestisid, antikanser ilaçlar, kimyasal kanserojenler ve çevresel kirlilikler gibi elektrofilik ksenobiyotiklerin

detoksifikasyonunda da önemli bir role sahiptirler. GST, E.coli'den memelilere kadar birçok organizmada bulunmakta olup insan, sıçan, fare, sığır, gibi hayvanların karaciğer, eritrosit, akciğer, plasenta ve barsak mukozasından izole edilerek çalışılmıştır (Gyamfi ve ark 2004).

Glutasyon S-transferazların katalizlediği temel reaksiyonlar oksiran halkasının nükleofilik açılımı, nükleofilik yer değiştirme, polarize çift bağlara Michael katımı reaksiyonları yer almaktadır (Hermier ve ark 1999).

Çizelge 4. GST'lerin katalizlediği reaksiyonlar (Hermier ve ark 1999)

Reaksiyon tipi	Substrat
1.Michael katımı	N-asetilbenzokinonmin 4-hidroksinon-enol
2.Oksiran halkasına atak	1-nitropiren-4,5 oksit
3.Nükleofilik yer değiştirme	Brom izovalerilüre iyodometan 1-kloro-2,4-dinitrobenzen
4.Organik hidroksiperoksitin indirgenmesi	Linoleik asit hidroperoksit 5-hidroperoksimetil-urasil
5.Organik nitratin indirgenmesi	Nitrogliserin ve türevleri

Sıçanda karaciğer, GST açısından en zengin organdır ve bunu testisler takip eder. Böbreküstü bezinde ise GST içeriği cinsiyete göre farklılık gösterir. Erkek sıçanda GST içeriği dişiye oranla daha fazladır (Ketterer ve ark 1988).

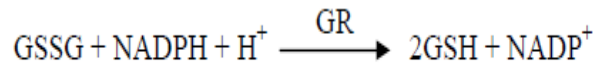
Birbirlerinden yapı olarak farklı on herbisit in fare karaciğer ksenobiyotik metabolize edici enzimleri üzerine etkisinin araştırıldığı bir in vivo çalışmada (Moody ve ark 1991), molinat, bentiyokarb, trifluralin ve alaklor sitozolik GST'ler üzerinde substrat olarak CDNB kullanıldığında, aktivitede önemli miktarda artışa neden olmuştur.

Glutasyon S-transferazlarla bu kadar yaygın araştırma yapılmasının nedeni onların laktonlar, alkoller, aril halidler, kinonlar, epoksitler, esterler gibi yapısal olarak farklı substratların büyük bir kısmını katalizleme özelliğine sahip olmalarıdır. GST'lerin tanıdığı substratların sayısı fazla olmasına rağmen, substratların ortak özellikleri çoğunun elektrofilik bir merkez taşımaları ve hidrofilik oluşlarıdır (Çoşkun 2007).

GST aktivitesinin ölçümü iki yöntemle belirlenebilir. Bunlardan ilki spektrofotometrik yöntemdir. Bu yöntem Habig ve arkadaşları ve Howie ve arkadaşlarının geliştirmiş olduğu GST'a özgül substratın, GSH konjugasyonu ile ortaya çıkan bileşiğin renk şiddetinin ölçülmesine dayanan bir yöntemdir. Diğer bir yöntem immünoradiyometrik yöntemdir ve serum doku örneklerinde ki GST aktivitesini radyoimmünassay ile tayin etmek mümkündür (Howie ve ark 1988).

1. 4. 1. 5. Glutasyon Redüktaz

Glutasyon redüktaz, glutasyon S-transferaz ve glutasyon peroksidazın katalizlediği reaksiyonlar sırasında oluşan okside glutasyonu (GSSG), redükte glutatona (GSH) dönüştüren ve antioksidan etki gösteren bir enzimdir. Katalizi gerçekleştirirken koenzim olarak NADPH kullanılır (Akyol 2004).

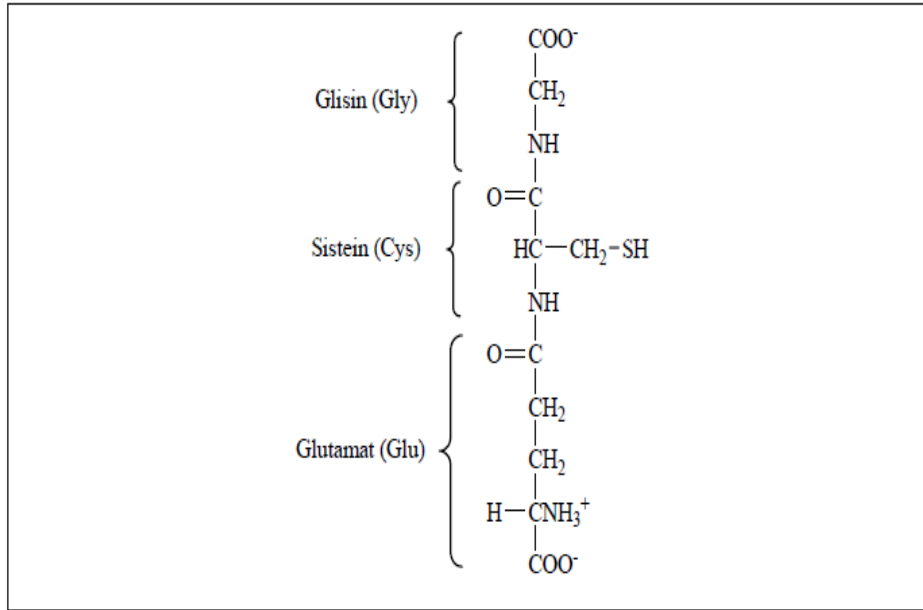


Hücrelerdeki fizyolojik GSH-GSSG oranı büyük önem taşır. GSSG olmadığı durumlarda NADPH'ın hücre içi seviyesinin düşmesi glutasyon redüktazı inaktive etmektedir ve daha sonra oksidatif bir stres sonucu GSSG'nin hücre içi seviyesi artınca glutasyon redüktaz tekrardan aktive olmaktadır (Candas ve ark 1997).

1. 4. 2. Nonenzimatik Antioksidanlar

1. 4. 2. 1. Glutasyon (GSH)

Glutasyon; glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan düşük molekül ağırlıklı fakat fonksiyonu büyük bir tripeptiddir. Bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalarda hücre sitozolünde bulunan GSH, aynı zamanda en bol bulunan intrasellüler tiyoldür (Kidd 1997).



Şekil 7. Glutasyonun yapısı (Champe ve Harvey 1997).

Hücredeki glutasyon üç büyük uygulamada kullanılır:

- 1-) Bir antioksidan olarak direk serbest radikal temizleyicisi olarak,
- 2-) Detoksifikasyon sırasında GSH-S transferazlar için kofaktör olarak,
- 3-) Glutamini GSH'dan diğer aminoasitlere transfer eden gama-glutamil transpeptidazlar için substrat olarak kullanılır.

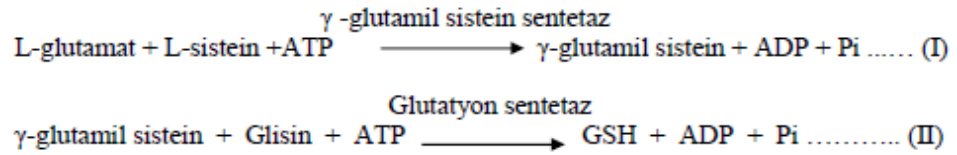
Glutasyon, hücrenin okside-redüksiyon dengesinde önemli bir rol oynar. Hücreden toksik metabolitleri uzaklaştırır ve indirgenmiş formu sayesinde hücrelerdeki sülfhidril grubunun devamlılığını sağlar (Liebman ve Greenberg 1988).

Plazma, kan hücreleri, beyin, akciğer, böbrekler gibi birçok doku ve organda bulunur fakat temel kaynağı karaciğerdir. Karaciğer sitozolündeki GSH hızlı bir döngüye sahiptir ve yarı ömrü 2-4 saattir, mitokondride ise daha uzun kalır yaklaşık 30 saatlik bir yarı ömre sahiptir.

Karaciğer ksenobiyotiklerin detoksifiye edildiği en önemli organdır ve glutatyonun sağlıklı karaciğer hücrelerinde en yüksek hücre içi konsantrasyonu yaklaşık olarak 20 milimolar dır. Karaciğerin GSH içeriği böbrek ve testislerden yaklaşık iki kat, akciğerden üç kat daha fazladır (Reed 2000).

1. 4. 2. 1. 1. Glutatyon Biyosentezi

Glutatyon biyosentezi, glutatyon sentetaz ve γ -glutamilsisteinil sentetaz adı verilen iki enzimin katalizlediği reaksiyon sonucunda ATP'ye bağımlı olarak iki adımda gerçekleşir (Anderson 1998).



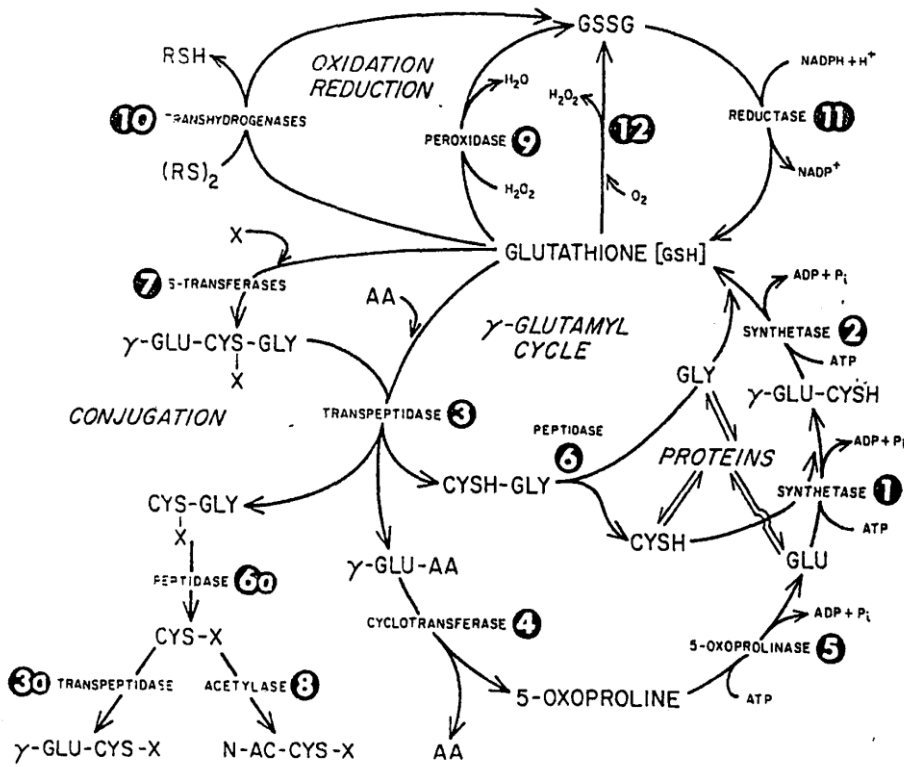
İlk adım γ -Glutamil sisteinil sentetaz tarafından, L-glutamat ile L-sistein birleşmesidir. Reaksiyonu katalize eden γ -glutamil sistein sentetaz, glutatyon sentezini sınırlandırabilen bir enzimdir (Pena- Llopis ve ark. 2003). İkinci adım ise γ -glutamil sistein ile glisin birleşmesidir. Enzimin sentezlenmesi ve aktivitesi, GSH homeostazisinin sağlanabilmesi açısından kritik bir öneme sahiptir. Bunun yanı sıra GSH sentezinin çok fazla olduğu durumlarda, γ -glutamil siklotransferaz enzimiyle 5-oxoprolinone dönüştürülebilir ve 5-oxoprolinin artışı da metabolik asidozise neden olur (Griffith 1999).

Hücre içi GSH sentezinin gerçekleştirilebilmesi için, GSH'ın hücre dışında degradasyona uğratılması ve oluşan ürünlerin hücre içerisine alınması gerekmektedir. Bunu da membrana bağlı bir enzim olan γ -glutamil transpeptidaz (γ -GT, EC 2.3.2.2) enzimi gerçekleştirmektedir (Anderson 1998).

1. 4. 2. 1. 2. γ -Glutamil Transpeptidaz

Glutatyon hücre tarafından direkt olarak alınamaz. GSH'ın yapıtaşı olan amino asitlere hidrolize edilmesi gerekmektedir. Oluşan aminoasitler hücre membranındaki amino asit taşıyıcı proteinler tarafından hücrelere taşınabilir. γ - Peptid bağı GSH'ın proteazlara karşı dayanıklılığını sağlamaktadır (Hanigan 1998).

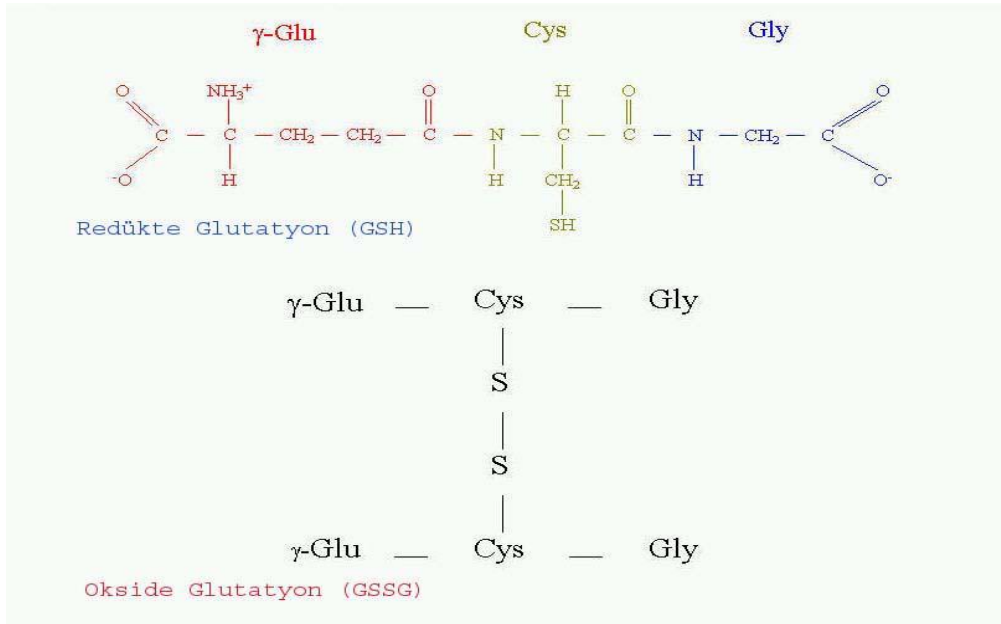
Enzim, sisteinil-glisin dipeptidi açığa çıkarmak üzere γ -glutamil grubunun ayrılmasını sağlamaktadır. GSH'tan ayrılan γ -glutamil grubu transpeptidasyon adı verilen tepkime sonunda bir akseptör aminoaside transfer edilmektedir. Bunun sonucunda membrandaki dipeptidazlar tarafından sisteinil-glisin dipeptidi sistein ve glisine dönüştürülmektedir. Böylece intraselüler GSH sentezini sağlamak üzere yapıtaşları hücre dışından sağlanmaktadır, γ -GT aynı zamanda GSH S-konjugatlarının merkaptürik asitlere dönüşümünü de başlatmaktadır (Hanigan 1998).



Şekil 8. Glutatyon metabolizması (Meister ve Anderson 1983)

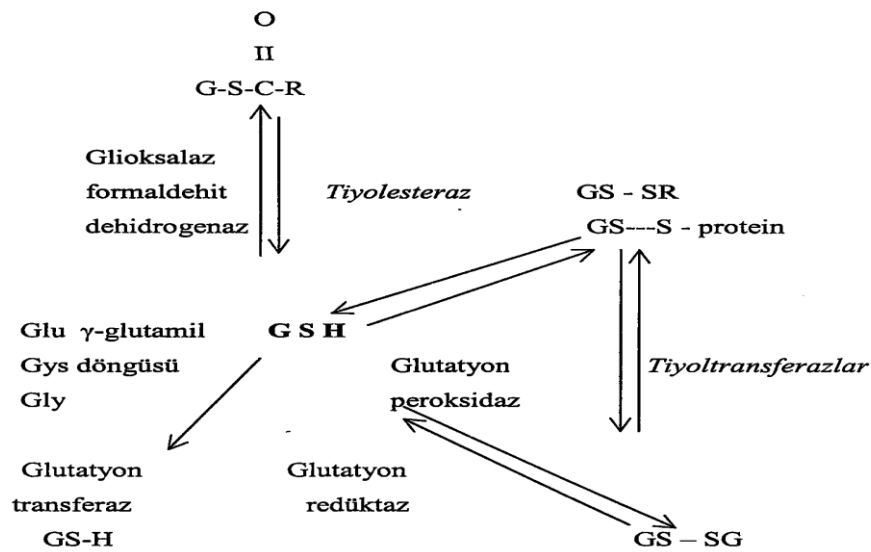
Glutatyon, dokularda birbiriyle dengede bulunan, indirgenmiş glutatyon (GSH) ve okside glutatyon (GSSG) olmak üzere iki formda bulunur. İndirgenmiş GSH serbest bir sülfhidril grubuna sahiptir. Bunun sayesinde hemoglobinin sistein gruplarını ve diğer hücre içi proteinlerin tiol gruplarını indirgenmiş halde tutar. Protein ve enzimlerin tiyol gruplarının (-SH) indirgenmesi ile redükte formlarının yeterli seviyede kontrolü sağlanmaktadır. Bu şekilde GSH'ın sistein rezidüsündeki -SH yan zinciri onun fizyolojik özelliklerinin bir kısmını yerine getirir. Tiyol grubuna sahip enzimler düşük hızdadırlar ancak O_2 'nin temasıyla veya okside olarak hızla aktivitelerini kaybederler.

Bunun sonucunda glutatyon kendisi okside olup tiyol gruplarını tekrar indirgeyerek bunların aktivasyonunu sağlar (Akkuş 1995, Yanbeyi 1999).



Şekil 9. Redükte ve okside glutatyonun yapısı (Halliwell ve Gutteridge 1999).

GSH'nin tüm hücrel düzenleyici ve metabolik fonksiyonlarındaki en önemli mekanizması tiyol-disülfid değişimi dengesidir. Tiyol grupları hücre içerisinde her zaman indirgenmiş durumda bulunurlar ve CoA'nın protein sentezi, sistein aminoasidi ve bir takım enzimatik reaksiyonlar için indirgenmiş durumda olmaları gerekir (Meister ve Anderson 1983, Murray ve ark 1993).

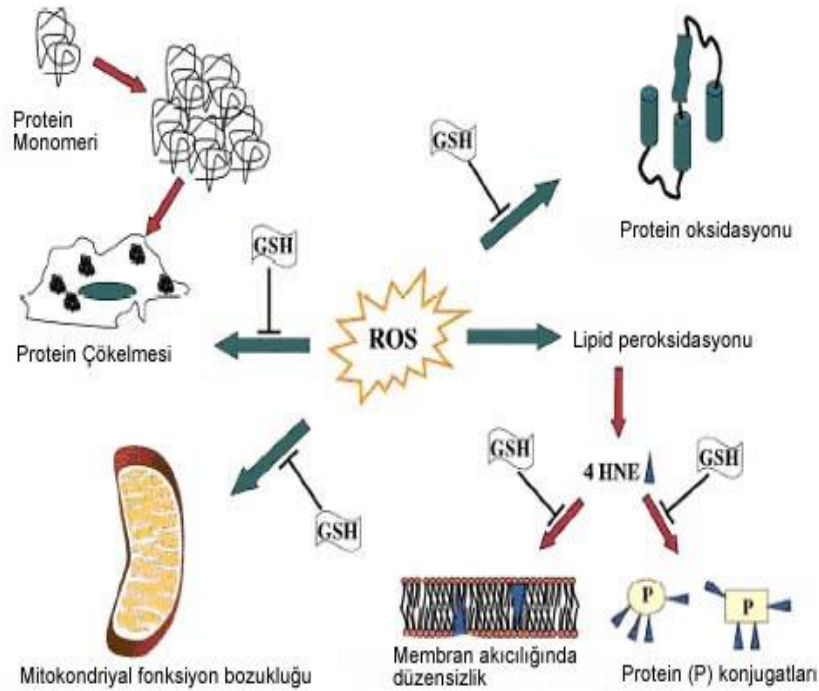


Şekil 10. Glutatyon (GSH)'a bağlı enzim sistemleri (Meister ve Anderson 1983)

Hücrelerde total glutatyonun, %95'i GSH, kalan %5'lik kısmı ise okside glutatyon (GSSG) şeklinde bulunur (Reed 2000). GSSG, hayvansal hücrelerde protein sentezini inhibe ettiği ve bu nedenle GSSG'nin hücrelerde düşük seviyelerde olduğu iddia edilmiştir. Karaciğer ve kalp gibi organlardan plazmaya GSSG salınımının olması bu sebebe dayandırılmaktadır. Sıçan karaciğerinde yarı ömrü 3 saatken, insan eritrositlerinde ise yarı ömrü yaklaşık 4 gündür (Halliwell ve Gutteridge 1999).

Bazı durumlarda hücrenin indirgeme kapasitesi yetersiz kalabilir. Bunun sonucunda da GSH/GSSG oranında azalmalar meydana gelir. İntrasellüler GSSG miktarı oksidatif stres indikatörü olarak bilinirken, hücrel redoks durumunun indikatörü olarak değerlendirilen GSH/GSSG oranı hücrelerin antioksidatif kapasitesini belirleyen en önemli redoks çiftidir (Cnubben ve ark 2001).

Oksidatif stres ve patolojik durumlarda reaktif oksijen türlerinin GSH'a bağımlı detoksifikasyonu iki temel mekanizma ile gerçekleşmektedir. Bunlardan ilki, ROS ile direkt ya da kendiliğinden gerçekleşen reaksiyonlardır. Diğeri ise Se içeren bir enzim olan GPx tarafından katalizlenen reaksiyonlardır ve bu enzim H₂O₂ ile diğer peroksitleri indirgeyerek peroksitleri korumaktır. Her iki reaksiyonun sonucunda da GSSG oluşmaktadır (Sen ve Packer 2000).



Şekil 11. Oksidatif stresten korunmada GSH'ın antioksidant fonksiyonlarının şematik gösterimi (Bharath ve ark 2002) **Glutatyonun metabolizmadaki görevi** (Knapen ve ark 1999):

- 1- Metabolik son ürünlerin ve bazı ksenobiyotiklerin konjugasyonla detoksifikasyonu,
- 2- Ca²⁺ homeostasisinin,
- 3- Serbest radikaller ve reaktif toksik ara maddelerin zehirsizleştirilmesi,
- 4- DNA ve protein sentezi,
- 5- Sistein depolanması ve transportu,
- 6- Membran proteinleri (hemoglobin ve spektrin vb.) ve çeşitli enzim proteinlerinin tiyol gruplarının korunması,
- 7- Proteinlerin disülfür bağlarının koparılması ve bunun sonucunda proteinlerin konformasyonlarının değişmesi,
- 8- Merkapturik asitin oluşumunda,
- 9- Lökoeritrin sentezinde yer alan enzimler ve gliksilazları da içeren farklı metabolik yollarda çalışan bazı enzimler için kofaktör olarak rol oynar.

Toksitesi yüksek olan ksenobiyotikler, GSH ile konjugasyona uğramamış olsalardı; DNA, RNA veya hücre proteinleri ile birleşerek hücre hasarlarına yol açabilirdi. Bu yüzden GSH toksik maddelere karşı çok önemli bir savunma mekanizmasıdır. Örneğin karaciğer gibi dokularda GSH seviyesinin düştüğü görülürse, dokunun normalde GSH ile konjuge olarak uzaklaştırılması gereken toksik madde tarafından hasara uğradığı görülmüştür (Bray ve Taylor 1994).

1. 4. 2. 1. 3. Doku Glutasyon Düzeylerinin Modifikasyonu

GSH'nin üretimi ve tüketilmesi arasında ki dengeyi hücresel GSH düzeyi belirlemektedir. GSH'nin hücresel miktarı *de novo* sentezi yoluyla belirlenmektedir. Diğer bir yöntemde GR varlığıyla GSSG'nin GSH'a çevrimiyle sağlanmaktadır. Kantitatif olarak GSSG'den GSH çevrimi *de novo* sentezine göre daha önemli görünmektedir ve GR genellikle tGSH düzeylerinin baskın olarak GSH yönünde tutulmasına yardımcı olmaktadır. Bu yüzden GR varlıklı GSSG-GSH arasındaki redoks döngüsü hücresel GSH düzeylerine önemli bir katkı yapmamaktadır (Griffith 1999).

1. 4. 2. 1. 4. Doku Glutasyon Düzeylerinin Azalması:

Dokularda ve hücrelerde GSH içeriğini düşüren üç önemli faktör bulunmaktadır.

- 1- GSH kullanımının artması,
- 2- Sınırlı glutatyon sentezi,
- 3- Okside glutatyonun hücre içi redüksiyonunun azaltılmasıdır (Sevgiler 2007)

1. 4. 2. 1. 5. Doku Glutatyon Düzeylerinin Artması:

Oksidatif stres ajanlarının detoksifikasyonunda GSH büyük öneme sahiptir. GSH düzeylerinin korunması veya artırılmasında kullanılan en yaygın yöntem sınırlayıcı aminoasit olan L-sistein yapıtaşının kullanılabilirliğini arttırmak ya da GST tepkimeleri ile geri dönüşümü olmayan ve kaybedilen bu aminoasidi yerine koymak üzere dokulara iletilmesini sağlamaktır (Griffith 1999).

Aminoasit L-sisteiniN Asetilenmiş formu olan N-asetil sistein çalışmaların çoğunda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır ve çok iyi bir sülfidril grubu kaynağıdır. N-asetil sistein, vücuda girmesinin ardından metabolitlerine ayrılarak GSH sentezini uyarmaktadır ve detoksifikasyonu desteklemektedir. Bunun yanı sıra ROS'un eliminasyonuna da katılır (Suntres 2002).

1. 4. 2. 2. Vitamin E (α -Tokoferol)

Vitaminler canlı vücudunda minimum seviyelerde bulunmasına rağmen vücut için önemleri oldukça fazladır. E vitamini 'Tokotrienoller ve tokoferoller' olmak üzere ikiye ayrılır. E vitamini yağda çözünen bir vitamin olup görevi lipitleri oksidatif hasardan korumaktır. En aktif formu α -tokoferoldür. α -Tokoferol dokularda değişik konsantrasyonlarda bulunur (Akkuş 1995, Çakır 1997, Yanbeyi 1999).

Serbest radikallere karşı glutatyon peroksidaz ile E vitamini birbirlerine tamamlayıcı etki gösterirler. Enzim peroksitleri yok ederken, E vitamini peroksitlerin sentezini engeller (Fırat 1997, Halliwell ve Gutteridge 1999, Yanbeyi 1999).

1. 4. 2. 3. Vitamin C (Askorbik asit)

Suda eriyen ve sulu ortamda serbest radikallerle reaksiyon verebilme yeteneğinde olan askorbik asit, serbest radikallerin etkilerini ortadan kaldırmaya yardımcı olmaktadır. Vitamin C'nin, L-dehidroaskorbik ve L-askorbik asit gibi iki aktif formu vardır. Redükleyici bir ajan ve radikal süpürücü olarak askorbik asit, reaktif oksijen türlerine karşı koruyucu etki sağlar. Bununla birlikte serbest radikal kaynağı gibi hareket edebilme özelliğide bulunur (Yanbeyi 1999).

1. 4. 2. 4. Karotenler

Hücreleri korumada görev alan pigmentlerdir. β -Karoten organizmada A vitamininin oksijen öncülü olmasının yanı sıra bir antioksidan olarak görev yapar. β -Karoten hücrelerin dışında görev alırken; hücre duvarından içeri girmek isteyen zararlılara karşı savunmayı ise eser elementlerden selenyumun da yardımıyla E vitaminini üstlenmiştir (Odabaşoğlu 1999).

1. 4. 2. 5. Flavonoidler

Bitkilerdeki kırmızı, mavi ve sarı renk pigmentlerini oluşturan polifenoller flavonoidlerdir. Flavonoidler, 3'-4'dihidroksi konfigürasyonu ile antioksidan aktiviteye sahiptir. Lipit radikallere hızla H⁺ veren fenolik antioksidan lipit oksidasyonu ile etkileşir. Görevi ROO[•] ve RO[•] radikalini parçalamak ve LPO zincir reaksiyonunu ortadan kaldırmaktır bunun yanı sıra bakır iyonlarıyla kompleks oluşturabilirler (Avcı 2001).

1. 4. 2. 6. Ürat

Peroksi radikallerini, süperoksit, hidroksil ve singlet oksijeni temizler. Lipit radikalleri üzerine etkisi yoktur bunun yanı sıra C vitamini oksidasyonunu da engeller (Akkuş 1995).

1. 4. 2. 7. Bilirubin

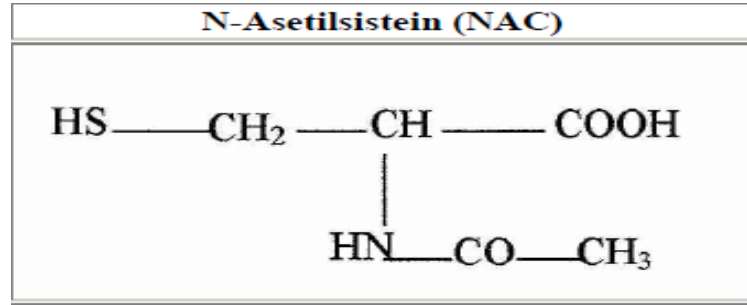
Bilirubin bir lipit antioksidandır ve düşük konsantrasyonlarda peroksil radikalini yakalar. Zincir kıran bir özelliği olduğu belirtilmiştir (Gutteridge 1995, Fırat 1997).

Bunların dışında plazmada hipokloröz asitin güçlü bir temizleyicisi olan albumin, hem doku homojenatları hem de basit lipit emilsiyonlarında güçlü bir serbest radikal inhibitörü olan seruloplazmin (Yanbeyi 1999) zararlı bir serbest radikal olan hidroksil radikalini ortadan kaldıran ve güçlü bir antioksidan olarak bilinen melatonin nonenzimatik antioksidanlar olarak bilinirler (Akkuş 1995).

1. 5. N-ASETİL SİSTEİN

Bir thiol molekülü olan N-asetil sistein, mukolitik bir ajan olup L-sistein ve indirgenmiş glutatyonun ön maddesidir. Kimyasal formülü C₅H₉NO₃S olup, molekül ağırlığı 163,2 gr/mol' dür. NAS, moleküler yapısından dolayı hücrelere kolayca girer ve etkili bir antioksidan olan glutatyon oluşumunda rol oynar. Oksidatif strese karşı dokuların

savunmasını destekleyen NAS, yapısında bulunan serbest tiyol grupları ile direkt antioksidan etki de gösterdiği belirtilmiştir (Kelly 1998, Zafarullah ve ark 2003).



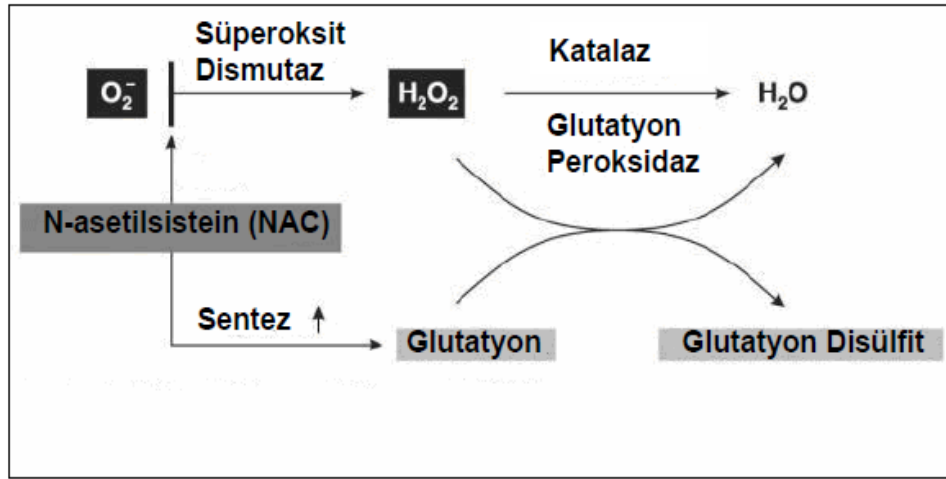
Şekil 12. N-asetil sisteinin yapısal formülü (Ahola 2004)

N-asetil sistein, molekül içerisinde bulunan serbest sülfhidril (-SH) grupları için zengin bir kaynaktır. İntrasellüler karaciğerde GST aktivitesini artırarak ve direk olarak hareket etkileriyle serbest oksijen radikallerini, hidroksil radikallerini ve hipoklorik asidi esas indirgeyicisi olarak temizler. Hepatositlerin reaktif oksijen molekülleri üretimini inaktif hale getirir ve karaciğeri oksidatif strese karşı korur. Bu aktiviteler ajanın; antikarsinojenik, antimutajenik, antioksidan ve antiinflamatuvar etkilerinin temelidir (Aydoğdu ve ark 2005).

NAS'ın koruyucu etkisi, en az üç farklı mekanizma ile açıklanmaktadır (Vendemiale ve ark 2001):

- 1) NAS'ın kendi potansiyel antioksidan etkisi,
- 2) Toksik metabolitlere karşı detoksifiye edici mekanizma için çok önemli olan olan intrasellüler GSH konsantrasyonunun idamesi,
- 3) İntrasellüler sülfhidril havuzunun onarımı

N-asetil sistein, hücre membranını geçtikten sonra hücre içinde sisteine dönerek GSH üretimini artırır. Glutatyon ön maddesi olması ve glutatyon biyosentezinde etkin rol oynaması, toksik radikallere karşı koruyucu olduğunu gösterir. NAS, çabuk absorbe olabilme yeteneğiyle ve deasetile edilebilmesiyle hücre dışı ve hücre içi glutatyon depolarına katılır (Van Zandwijk 1995).



Şekil 13. N-asetil sisteinin glutasyon üzerine etkisi (Tossios ve Mehlhorn 2004)

NAS'ın karaciğer hastalıklarında antitoksik ve antioksidan özellikler göstererek yararlı olduğu belirtilmiştir. NAS; karaciğer kan akımını arttırması, GSH seviyelerini yükseltmesi ve serbest oksijen radikallerini temizlemesi gibi olumlu etkileri gerçekleştirmektedir (Angulo ve Lindor 2002).

N-asetil sisteinin kullanıldığı hastalıklar arasında, kardiovasküler hastalıklar, kanser, metal toksisitesi ve karaciğerin parasetamol toksisitesi sayılabildiği gibi endotelial disfonksiyonunu azaltmakta, inflamasyon, fibroz, invazyon, kartilaj erezyonu, asetaminofen detoksifikasyonu ve transplantasyon ihtiyacının geciktirilmesi amacıyla da yararlanılmaktadır (Zafarullah ve ark 2003, Grinberg ve ark 2005).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2. 1. Gereç

2. 1. 1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada, 5,5-6 aylık ortalama 350–400 gram ağırlıklarında 72 adet erkek Spraque Dawley türü rat kullanıldı. Deneme süresince hayvanlar Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında ışık (12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık) ve ısı ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$) kontrollü odalarda % 20 protein içeren kuru pelet yem ve su *ad libitum* verilmek üzere izlendi.

2. 1. 2. Deney Grupları ve Uygulama Protokolü

Hayvanların çalışma başlamadan üç hafta önce deney hayvanları ünitesinde standart kafeslere konularak ortama alışması beklendi. Çalışmada her biri 12 hayvandan oluşan 6 grup oluşturuldu (Çizelge 5). Gruplara şu işlemler uygulandı.

Karaciğer toksisitesi oluşturmak amacıyla CCl_4 , periton içi (i.p.) 2 ml/kg (1/1 oranında zeytinyağındaki çözeltisi) tek doz enjekte edildi. N-asetil sistein uygulamasına ise (periton içi 50 mg/kg/gün) CCl_4 ve Zeytinyağı+NAS gruplarına CCl_4 ve zeytinyağı enjeksiyonundan 3 gün önce başlandı ve deney süresince devam edildi. Gruplardan CCl_4 uygulamasından 6. ve 72.saat sonra kan örnekleri ve karaciğer dokuları alındı. Kan örneklerinden elde edilen serumlar ve karaciğer dokusu homojenizasyondan sonra analizler yapılmaya kadar -80°C 'de saklandı. Uygulanan deney protokolü ayrıntılı olarak Çizelge 5'de gösterilmiştir.

Çizelge 5. Deney grupları ve uygulama protokolü

<u>Gruplar</u>	<u>n</u>	<u>CCl₄2mg/kg (ip)</u>	<u>N Asetil Sistein 50 mg/kg/gün (ip)</u>	<u>Zeytinyağı² ml/kg (i.p.)</u>
CCl₄, (6. saat)	12	X		
CCl₄+NAS, (6. saat)	12	X	X	
Zeytinyağı (6. saat)	6			X
Zeytinyağı+NAS (6. saat)	6		X	X
CCl₄, (72. saat)	12	X		
CCl₄+NAS (72. saat)	12	X	X	
Zeytinyağı (72. saat)	6			X
Zeytinyağı+NAS (72. saat)	6		X	X

Elde edilen serumlardaki AST ve ALT düzeyleri hazır ticari kitler kullanılarak analiz edildi. Karaciğer dokularındaki GSH analizi Beutler ve ark (1963), GST aktivitesi GSH ve 1-2 dikloro, 4 nitrobenzenin (CDNB) konjugasyonu sonucu oluşan ürünün 340 nm dalga boyunda verdiği absorbansı spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanan metoda göre, MDA aktivitesi ise Yoshioko ve ark'ın (1979) bildirdiği yönteme göre yapıldı.

2. 1. 3. Kullanılan Cihazlar

Analizler sırasında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarında bulunan; -80°C'lik derin dondurucu (Glacier ultralow temperature freezer, Japonya), -20°C'lik derin dondurucu (Bosch, Türkiye), santrifüj (Nüve NF800R, Türkiye), homojenizatör (Yellow Line Ost Basic, Almanya), spektrofotometre (Shimadzu UV-1601, Avusturalya), vorteks (Velp, İtalya), manyetik karıştırıcı (Velp, İtalya), etüv (Memmert, Almanya), hassas terazi (Sartorius, Almanya) ve

otomatik pipetler (İsolab 2-20µl, İso term 20-200 µl, Brand 5-50 µl, İso term 100-1000 µl), pH metre (pH 211, Hanna, Amerika) kullanılmıştır.

2. 1. 4. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Analizler sırasında CCl_4 , N-asetil sistein (Merck, K40328922), asetik asit (Merck, K40866656), paraformaldehit (Sigma, P6148), bovine serum albümin (SİGMA, USA), DTNB (5, 5'- Dithio-bis (2- nitrobenzoic asit), butanol (Merck K37211388), triklorasetik asit (Merck, K36929507), tiyobarbitürik asit (Merck, L55063680), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (disodyum hidrojen fosfat dihidrat) (Merck, 6580), KH_2PO_4 (potasyum dihidrojen fosfat) (Merck, 4871), NaCl (sodyum klorür) (Merck, 6400), etil alkol (Smyras, 2050500), ksilol (Carlo Erba, 492306), eter (Carlo Erba, 447522), glutamil, sisteinil glisin (SİGMA, USA), CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzoic acit) (SİGMA), AST kiti (AST, Archem, A2212, TURKEY), ALT kiti (Archem, A2222, TURKEY) ve deneyde kullanılan diğer kimyasal maddeler amaca uygun saflıkta kullanılmıştır.

2. 1. 5. Kullanılan Çözeltiler

2. 1. 5. 1. Doku Homojenizasyonunda Kullanılan Çözeltiler

- 0.1 M Potasyum fosfat tamponu/ 0.15 M potasyum klorür çözeltisi (PH:7.4):

17.418 g K_2HPO_4 ve 13.609 g KH_2PO_4 tartılıp bir miktar 0.15 M KCl (11.475 g/l) çözeltisinde çözüldürüldü. Çözeltinin pH'sı 1N NaOH ile magnetik karıştırıcıda pH: 7.4'e ayarlandı ve 0.15 M KCl çözeltisi ile litreye tamamlandı.

- 0.1 M Fosfat tamponu:

Hazırlanan 0.1 M Potasyum fosfat tamponu/ 0.15 M potasyum klorür çözeltisi üzerine 5 mM EDTA çözeltisi ilave edilerek, pH' sı 1N NaOH ile 8' e ayarlandı.

2. 1. 5. 2. Protein Miktarını Ölçmek için Kullanılan Çözeltiler

- Büret Çözeltisinin Hazırlanması:

9 g NaOH 30 ml suda bir beher içerisinde çözüldü. İkinci beherde 0.15 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ saf su ile beherde çözüldü ve bunun üzerine 0.6 g NaK-tartarat eklenerek 50 ml su ilave edilip toplam hacim 100 ml olacak şekilde seyreltildi.

2. 1. 5. 3. Glutasyon (GSH) Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler

- Presipitasyon solüsyonu:

Bir beher içine 1.67 g Metafosforik asit, 0.2 g EDTA, 30 g NaCl ekledikten sonra distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

- Fosfat Solusyonu:

0.3 M Na₂HPO₄ hazırlandı.

- DTNB:

40 mg %1 lik Na-asetat hazırlandı.

2. 1. 5. 4. Glutasyon S Transferaz (GST) Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler

- 30 mM CDNB Çözeltisi:

1.550 g CDNB 250 ml etanolde hazırlandı.

- GSH çözeltisi:

800 mg GSH 100 ml distile suda çözülerek hazırlandı.

- 100 mM Potasyum Fosfat Tamponu (pH: 6.5):

1.741 g K₂HPO₄ ve 1.360 g KH₂PO₄ bir miktar distile su içerisinde çözüldü ve 1N NaOH ile pH: 6.5'e ayarlandıktan sonra distile su ile litreye tamamlandı.

2. 1. 5. 5. Malondialdehit (MDA) Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler

- %10'luk Triklorasetik asit çözeltisi:

10 mg Triklorasetik asit distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

- % 0.67'lik Tiyobarbitürik asit çözeltisi:

0.67 mg Tiyobarbitürik asit distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

2. 2. Yöntemler

2. 2. 1. Doku Homojenizasyonu

Doku parçacıklarının yaş ağırlıkları saptandı, bistüri ile daha küçük parçalara ayrılıp bir miktar distile su ile yıkandı. Homojenizasyon tüpünde işgal ettikleri miktarın beş katı 0.1 M fosfat tamponu ile yüksek devirde 10 dakika +4°C de homojenize edildi. Homojenizatlar bekletilmeden 13255 rpm de 30 dakika santrifüje tabi tutularak, süpernatant kısmı ayrıldıktan sonra analiz gününe kadar -80°C de saklandı (Srivatave ve ark 1987, Foye 1989).

2. 2. 2. Karaciğer Dokusunda Protein Miktarının Ölçümü

Peptid bağlarının alkali çözeltilerde bakır ile kompleks oluşturması esasına dayanır. Biüret reaktifinde bulunan Cu^{+2} iyonları, bir veya daha fazla sayıdaki peptid bağı ile reaksiyona girmekte ve mavi-mor renkli bir kompleks oluşturmaktadır. Homojenize edilmiş dokularda ölçüm için kör, standart ve numune tüpleri hazırlandı. Hazırlanan biüret çözeltilisinden 1 ml kör, standart ve numune tüplerine konuldu. Üzerine numune tüpüne 50 µl örnek, standart tüpüne ise 50 µl Bovine serum albumin ve kör tüpüne 50 µl saf su ilave edildi. Karıştırıldıktan sonra 505 nm'de okuma yapıldı ve standarda göre hesaplaması yapıldı. Dokuda yapılan analizler protein sonucuna uyarlandı

2. 2. 3. Serumda Aspartat Aminotransferaz (AST) Analizi

Serumda aspartat aminotransferaz (AST) analizi aspartat aminotransferazın 25°C'de bir dakikada 1 mmol L-aspartat ve alfa ketoglutaratı; oksaloasetat ve glutamata transaminasyonu sonucu meydana gelen absorbans artışının 340 nm'de 1-3 dakika boyunca ölçülmesi prensibi ile çalışan hazır ticari kit (AST, Archem, A2212, TURKEY) kullanılarak yapıldı. Bir tüpe 4:1 oranında birinci ve ikinci ayıraç karışımından 1 ml konuldu. Üzerine 100 µl serum ilave edilip karıştırılıp 90 saniye 37°C'de inkübe edildikten sonra 60 saniyede bir 340 nm'de 3 okuma yapıldı ve delta absorbans değeri hesaplanıp standart faktör ile çarpılarak U/L cinsinden sonuç bulundu.

2. 2. 4. Serumda Alanin Aminotransferaz (ALT) Analizi

Serumda alanin aminotransferaz (ALT) analizi alanin aminotransferazın 25°C'de bir dakikada 1 mmol L-alanin ve alfa ketoglutaratı; piruvat ve glutamata transaminasyonu sonucu meydana gelen absorbans artışının 340 nm'de 1-3 dakika boyunca ölçülmesi prensibi ile çalışan hazır ticari kit (ALT, Archem, A2222, TURKEY) kullanılarak yapıldı. Bir tüpe 4:1 oranında birinci ve ikinci ayıraç karışımından 1 ml konuldu. Üzerine 100 µl serum ilave edilip karıştırıldıktan sonra 90 saniye 37°C'de inkübe edildikten sonra 60 saniyede bir 340 nm'de 3 okuma yapıldı ve delta absorbans değeri hesaplanıp standart faktör ile çarpılarak U/L cinsinden sonuç bulundu.

2. 2. 5. Karaciğer Dokusunda Glutasyon (GSH) Analizi

Analiz için kör, standart ve numune tüpleri hazırlandı. Standart tüpe 200 µl standart, numune tüpüne 200 µl örnek konulduktan sonra her iki tüpe 1.8 ml saf su ve 3 ml presipitasyon solüsyonu ilave edildi. Kör tüpe ise 0.4 ml saf su ve 0.6 ml presipitasyon

solüsyonu konuldu. Hazırlanan karışımlara süzme işlemi uygulandıktan sonra süzülen kısımlardan 1 ml süpernatant alındı ve üzerine 4 ml fosfat solüsyonu ve 0.5 ml DTNB (5-5'- dithiobis (2-nitrobenzoik asit) eklendikten sonra 412 nm' de okundu ve sonuçlar µmol/g doku olarak hesaplandı (Beutler ve ark 1963).

2. 2. 6. Karaciğer Dokusunda Glutasyon S-Transferaz (GST) Analizi:

Dokuda GST aktivitesi, Glutasyon ve 1-2 dikloro,4 nitrobenzenin (CDNB) konjugasyonu sonucu oluşan ürünün 340 nm dalga boyunda verdiği absorbansın spektrofotometrede (Shimadzu UV-1601, Australia) ölçülmesi esasına dayanan metotla gerçekleştirilmiştir (Habig ve ark 1974).

	Kör Tüp	Deney tüpü
GSH çözeltisi (ml)	0.1	0.1
CDNB çözeltisi (ml)	0.1	0.1
Potasyum- fosfat tamponu (ml)	2.2	2.2
Süpernatant (ml)	-	0.6

Yukarıda verildiği şekilde hazırlanan karışımların 340 nm'de absorbansları saptandı. (A₁) Beş dakika sonra yeniden okuma yapıldı. (A₂) Absorbans farkı alınarak aşağıdaki formül ile spesifik aktivite hesaplandı (Gibson ve Skett 1986, Hermier ve ark 1999).

Hesaplama: $C = A / \text{dakika} \times (\text{toplam hacim} \times 10^6 / 9,6 \times 10^3 \times \text{ml süpernatant} \times l) \times 10$

Spesifik aktivite = $C / \text{toplam protein} \times 1000$

2. 2. 7. Karaciğer Dokusunda Malondialdehit (MDA) Analizi

Malondialdehit analizi lipid peroksidasyon ölçüm metodu olan Yoshiko ve ark (1979) bildirdikleri metod uygulanarak spektrofotometrede (Shimadzu UV-1601, Australia) yapıldı. Bu yöntemin prensibi TBA (tiyobarbitürik asit) ile MDA'nın asidik pH ve sıcak ortamda tepkimesi sonucu oluşan pembe renkli pigmentin spektrofotometrik

ölçümüne dayanmaktadır. Analiz için numunelerden 250 µl vidalı kapaklı cam tüplere konuldu, üzerine 1,25 ml triklorasetik asitin (TCA) % 10'luk çözeltisinden ilave edilip karıştırıldı ve 0,5 ml % 0,67'lik tiyobarbitürik asit ilave edildi. Kör tüpüne ise TCA'dan 1,5 ml ve TBA'dan 0,5 ml konuldu. Tüplerin ağızları sıkıca kapatılıp 30 dakika kaynar su banyosunda tutulduktan sonra çeşme altında soğutuldu ve 2 ml n-butanol ilave edilip karıştırılarak 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki faz 535 nm'de okundu.

Hesaplama: Standart olarak 1,1,3,3- tetraetoksipropan kullanıldı ve sonuçlar µmol /gr doku olarak hesaplandı.

2. 2. 8. İstatistiksel Analizler

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi amacıyla SPSS (for Windows Release 11.5 Standart Versiyon Copyright © Spss Inc. 1989-2001) hazır paket programı kullanıldı. Çalışma gruplarına ait veriler ortalama ± standart hata (Ortalama± $S_{\bar{x}}$) şeklinde gösterildi, gruplar arası karşılaştırmalar Wilcoxon testiyle, grup içi karşılaştırmalar ise Mann Whitney U testiyle yapıldı.

3. BULGULAR

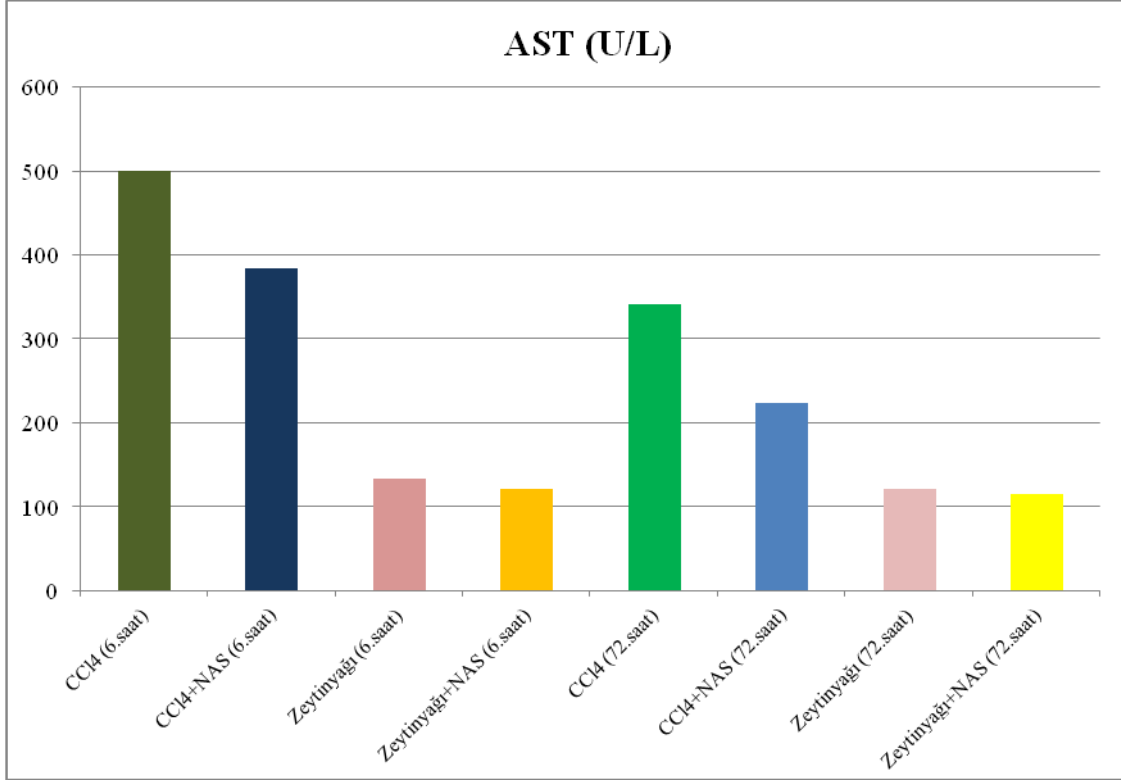
3. 1. Aspartat Aminotransferaz (AST) ve Alanin Aminotransferaz (ALT)

Sonuçları

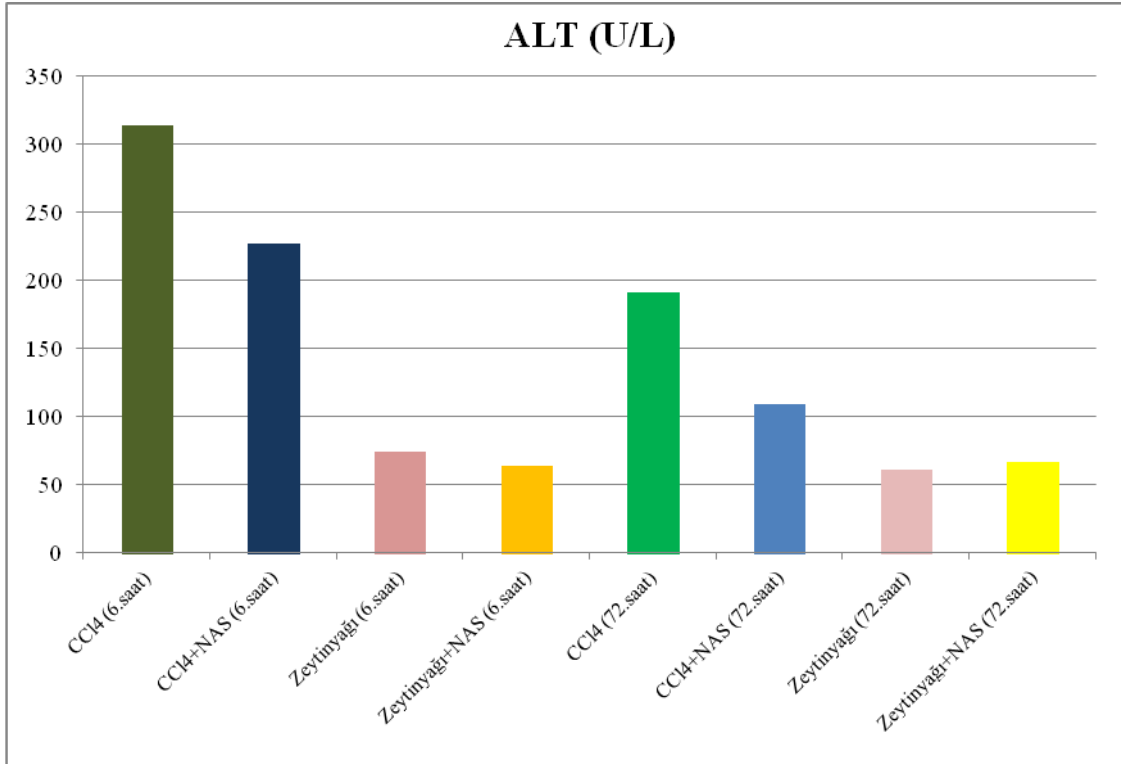
AST ve ALT düzeylerinin CCl₄ verilen grupta 6. ve 72. saatlerde kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı ve NAS eklenmesi ile AST ve ALT düzeylerinin düştüğü izlendi (P<0.05). Bununla birlikte enzim düzeylerinde, CCl₄ ve CCl₄ ve NAS verilen gruplarda 72. saatte 6. saate göre anlamlı bir düşüş olduğu gözlemlendi. Yalnızca NAS verilen gruplar ile kontrol gruplarının AST ve ALT düzeylerinde, 6. saat ALT düzeyi dışında, önemli bir fark olmadığı görüldü (Çizelge 6, Şekil 14. ve Şekil 15).

Çizelge 6. Serumda Aspartat Aminotransferaz (AST) ve Alanin Aminotransferaz (ALT) bulguları ve gruplar arası bulguların istatistikî değerleri

	CCl ₄ n=12	CCl ₄ +NAS n=12	NASn=6	Kontroln=6
AST (U/L) (6.saat)	500,451±8,73 ^a	384,722±9,07 ^b	120,86±5,59 ^e	133,18±6,37 ^e
AST (U/L) (72.saat)	341,95±34,68 ^c	224,06±8,56 ^d	114,48±3,21 ^e	121,74±7,04 ^e
ALT (U/L) (6.saat)	313,215±2,39 ^a	227,21±3,46 ^b	63,706±2,33 ^f	74,454±2,42 ^e
ALT (U/L) (72.saat)	191,104±1,48 ^c	109,318±2,08 ^d	66,774±3,85 ^{e,f}	60,714±4,53 ^f
a, b, c, d, e, f: Farklı satırda farklı harf taşıyan grup ortalamaları arası fark önemlidir (P<0,001).				



Şekil 14. Aspartat aminotransferaz (AST) sonuçları grafiği



Şekil 15. Alanin aminotransferaz (ALT) sonuçları grafiği

3. 2. Glutasyon (GSH), Glutasyon S-Transferaz (GST) ve Malondialdehit (MDA) Sonuçları

Çizelge 7. Deneme ve Kontrol grubu rat karaciğer dokusunda GSH, GST, MDA bulguları ve gruplar arası bulguların istatistikî değerleri

	CCl ₄ n=12	CCl ₄ +NAS n=12	NASn=6	Kontroln=6
GSH (µmol/g doku) (6.saat)	6,99±1,6 ^a	11,12±3,7 ^b	15,93±3,4 ^{bc}	14,64±3,9 ^{cd}
GSH (µmol/g doku) (72.saat)	6,52±1,6 ^a	7,45±1,06 ^b	7,64±1,2 ^b	7,57±0,9 ^b
GST (nmol/mg protein) (6.saat)	4215±3243 ^{acd}	2030±1762 ^b	5883±1462 ^c	3272±1426 ^d
GST (nmol/mg protein)(72.saat)	5322±1203 ^a	4991±2203 ^{ab}	2128±1663 ^c	2767±2265 ^{bc}
MDA(µmol/g doku) (6.saat)	39,54±14,8 ^a	30,41±8,6 ^{ab}	17,62±4,6 ^c	23,97±3,6 ^{bd}
MDA(µmol/g doku) (72.saat)	19,45±2 ^a	16,63±4,5	15,32±4,6 ^b	13,38±2,6 ^b
Gruplar arasındaki a, b, c, d harfleri istatistik açıdan önemi ifade etmektedir.				

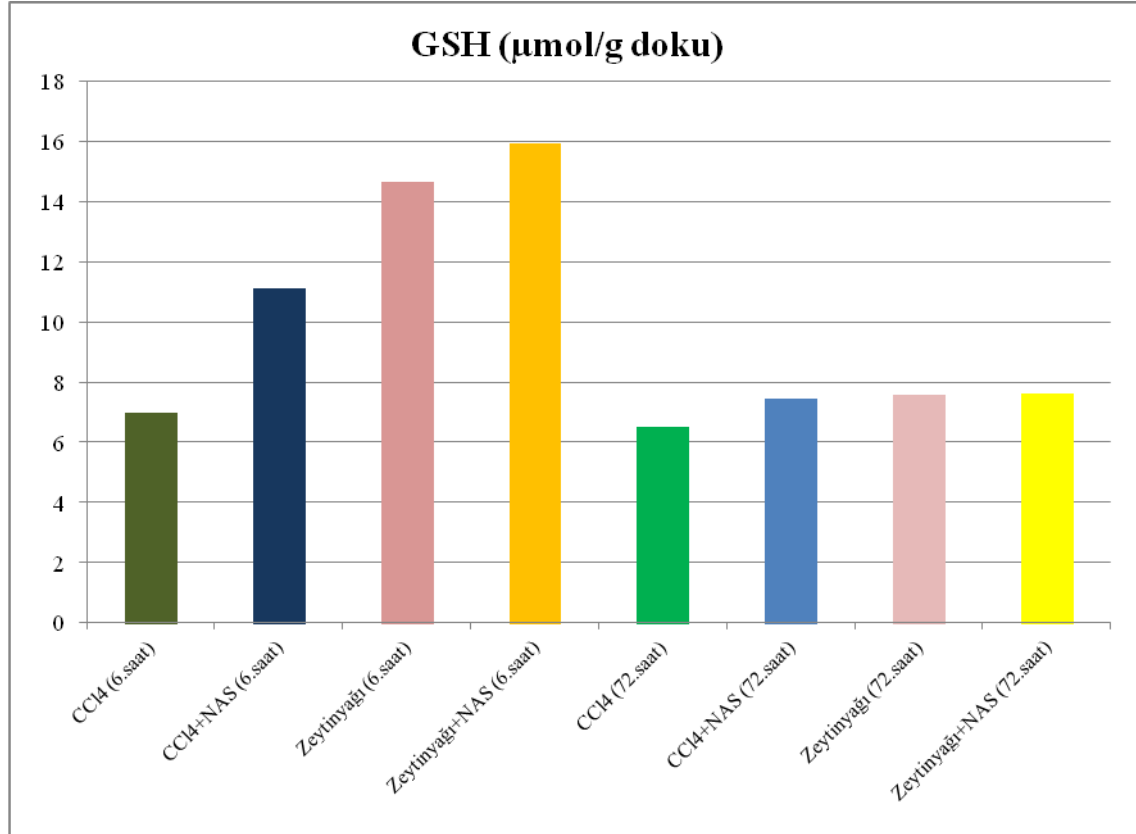
Çizelge 8. Deneme ve kontrol grubu rat karaciğer dokusu 6. ve 72. saat GSH, GST, MDA bulgularının istatistikî değerlendirilmesi

	CCl ₄ n=12	CCl ₄ +NASn=12	NASn=6	Kontroln=6
GSH (µmol/gdoku)	-	P<0.05 ↓	P<0.05↓	P<0.05↓
GST(nmol/mgprotein)	-	P<0.001↑	P<0.05↓	-
MDA(µmol/g doku)	P<0.05↓	P<0.05↓	-	P<0.05↓

Glutasyon düzeyinin, CCl₄ verilen grupta 6. ve 72. saatlerde kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğu ve NAS ilavesi ile arttığı izlendi (P<0.05). CCl₄ ile birlikte NAS uygulanan grupta doku GSH düzeylerinin, kontrol grubuna göre 6. saatte

düşük olduğu, 72. saatte ise bir fark olmadığı görüldü. Yalnızca NAS uygulanan grup doku GSH düzeyleri ile kontrol grubu GSH düzeyleri arasında elde edilen sonuçlar arasındaki fark istatistiksel açıdan anlam taşımamaktadır.

Bununla birlikte GSH düzeylerinde, 72. saatte 6. saate göre istatistiksel açıdan CCl₄ verilen grupta bir fark olmadığı, diğer gruplarda ise istatistiksel açıdan önemli azalma olduğu gözlemlendi (Çizelge 7, Çizelge 8. ve Şekil 16).

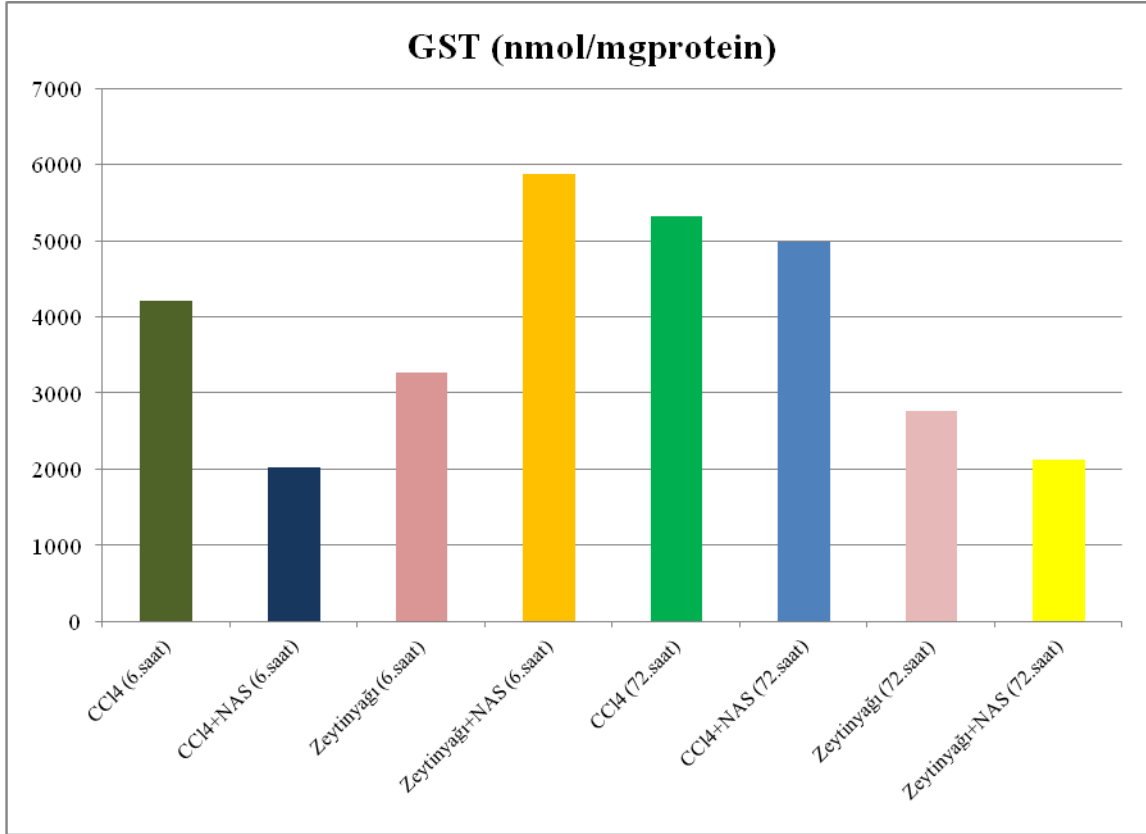


Şekil 16. Glutatyon (GSH) sonuçları grafiği

Glutatyon S-transferaz düzeyinin CCl₄ verilen grupta 6. saatte kontrol grubuna göre arttığı, ancak bu artışın istatistiksel değerlendirme açısından önemli olmadığı ve NAS eklenmesi ile miktarın önemli oranda düştüğü görüldü (P<0.05). 6. saatte CCl₄+NAS verilen grubunda karaciğer GST düzeyleri tüm gruplara göre düşük bulundu (P<0.05). 6. saatte NAS verilen gruptaki GST düzeyinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu ve istatistiksel açıdan önemli olduğu belirlendi.

72. saatte CCl₄ verilen grupta GST düzeyleri, NAS verilen grup ile kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. CCl₄+NAS verilen grupta ise NAS ve kontrol grubuna göre yüksek olmasına rağmen aradaki farkın istatistiksel değerlendirme

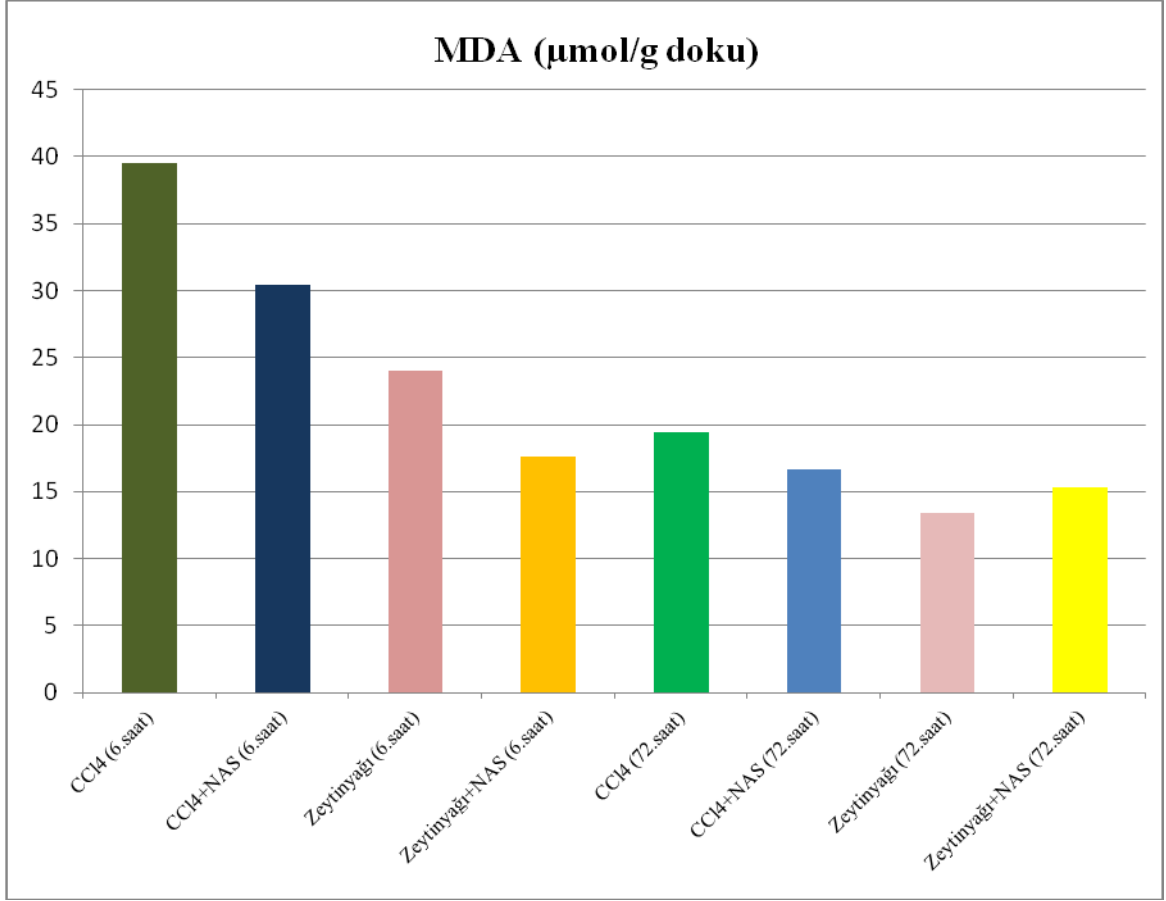
açısından önem taşımadığı görüldü. Bununla birlikte GST düzeylerinde, 72. saatte 6. saate göre CCl₄+NAS verilen grupta istatistiksel açıdan önemli bir artış olduğu, NAS verilen grupta ise azalma olduğu belirlendi (Çizelge 7, Çizelge 8. ve Şekil 17).



Şekil 17. Glutasyon S-Transferaz (GST) sonuçları grafiği

Malondialdehit düzeyinin CCl₄ verilen grupta 6. saatte kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı ve NAS eklenmesi ile düzeyinin düştüğü izlendi (P<0.05). 6. saatte CCl₄ verilen grup ile CCl₄+NAS verilen gruptaki MDA düzeylerinin NAS grubuna göre yüksek olduğu ve istatistiksel açıdan önemli olduğu belirlendi. 6. saatte NAS verilen grupta MDA düzeyinin kontrol grubuna göre düşük olduğu, aradaki farkın istatistiksel değerlendirme sonucu anlamlı olduğu gözlemlendi. 72. saat CCl₄ verilen grupta karaciğer MDA düzeylerinin, NAS verilen grup ile kontrol grubuna göre önemli oranda yüksek olduğu, ancak diğer gruplar arasında istatistiksel açıdan önemli fark olmadığı belirlendi

Bununla birlikte 72. saatte 6. saate göre NAS verilen grup dışında diğer gruplarda doku MDA düzeylerinde anlamlı azalma olduğu gözlemlendi (Çizelge 7, Çizelge 8. ve Şekil 18).



Şekil 18. Malondialdehit (MDA) sonuçları ve grafiği

4. TARTIŞMA

Karaciğer, çeşitli toksinler, kimyasal ajanlar ve ilaçlarla sürekli karşılaşan ve onları detoksifiye eden veya oluşan hasara rejenerasyon yeteneği ile karşılık veren bir organdır.

Karaciğer; sindirim sistemi ve dolaşım sistemi arasındaki yerleşimi ve ortaya koyduğu fonksiyonlar nedeniyle pek çok etkenle hasarlanabilmektedir. Kimyasal ajanlar, ilaçlar, viral hepatitler, alkol kullanımı, metabolik hastalıklar gibi pek çok etken karaciğerde akut ve kronik hasarlara yol açar. Hasarlanma süreci etkin bir rejenerasyon ve onarımla cevaplanmazsa normal karaciğer yapısı bozulur. Bu gibi sebeplerden dolayı hasar gören karaciğer araştırmalarda çok yaygın olarak kullanılan bir organdır (Çetinkaya 2009).

Karaciğer hasarının değişik formları, oksidatif stres ve bunu takiben oluşan toksik serbest radikallerle oluşmaktadır. Serbest radikal miktarı belirli miktarları aştığında önemli hücresel hasarlar meydana gelmektedir (Brattin ve ark 1985).

Oksidatif stres oluşumunda rol alan ve birçok araştırmacı tarafından karaciğer hasarı oluşturduğu tespit edilen en önemli kimyasallardan biri CCl_4 dür (Arosio ve ark 2000). CCl_4 , deneysel amaçlı olarak karaciğer hasarı geliştirmesi bakımından literatürde çok sık kullanılmaktadır (Bahçecioğlu ve ark 1999, Muriel ve Escobar 2003, Wang ve ark 2005, Devay 2008). Yapılan çalışmada karaciğerde hasar oluşturmak için CCl_4 toksisite modeli uygulandı.

Karbon tetraklorür'ün hepatotoksik etkisi, ara ürünlerinin metabolik aktivasyonuna ve lipit peroksidasyonundaki artışa bağlı olup; oluşan lipit peroksidasyonu sonucu endoplazmik retikulum ve diğer membranların yapıları değişmekte, azalan metabolik enzim aktivasyonu ve protein sentezi sonucunda karaciğer hasarı oluşmaktadır (Azri ve ark 1992).

Alanin aminotransferaz hepatositlerde bulunan stoplazmik bir enzimdir. Bu enzimin serumda yüksek bulunması zar permeabilitesinde oluşan bozukluklar sonucu meydana gelen hücre ölümlerinin bir göstergesi olarak kabul edilir (Lu ve ark 2002). Karaciğer hücre hasarını gösteren bir diğer enzim de Aspartat aminotransferaz dır (Lu ve ark 2002). AST ve ALT enzim aktiviteleri birçok araştırmacı tarafından bildirildiği gibi, sıçanlarda CCl_4 toksikasyonu ile indüklendiği çalışmalarda önemli oranlarda artış

göstermiştir (Ichinose ve ark 1994, **Qiusheng ve ark 2004**, Tanrıverdi 2005, Üstündağ ve ark 2005).

Ratlarda oral olarak 1 ml/kg dozunda karbon tetraklorür ile karaciğer toksisitesi oluşturulan bir çalışmada ALT ve AST düzeyinin karbon tetraklorür uygulanan grupta 12. saatte artmaya başladığı ve 24. saatte kontrol grubuna göre en yüksek seviyeye ulaştığı bildirilmiştir (Lida ve ark 2009).

AltınSaat ve Sert (2008), gebe ve gebe olmayan sıçanlara CCl₄ tek doz (2 ml/kg) enjekte ettikten sonra 24. saatte kan örneklerini almışlardır. Deneme sonrası gebe olmayan sıçanların AST değerinin 944±329 U/L'den 3816±926 U/L'ye, gebe sıçanlarda ise 443±241 U/L'den 3579±1058 U/L'ye, ALT değerinin gebe olmayan sıçanlarda 151±36 U/L'den 2460±781 U/L'ye, gebelerde ise 85±27 U/L'den 1833±697 U/L'ye yükseldiği gözlenmiştir.

Tanrıverdi (2005) yaptığı çalışmada kronik CCl₄ uygulaması ile karaciğer hasarının oluştuğunu, CCl₄ grubunda AST ve ALT düzeyinin kontrol grubuna göre artış gösterdiğini rapor etmiştir. Başka bir çalışmada (Üstündağ ve ark 2005), ratlara 5 hafta süresince haftada 3 gün olmak üzere i.p CCl₄ uygulamış, yapılan analizler sonucunda CCl₄ grubunda plazma ve karaciğer dokusu MDA düzeylerinin arttığını, AST ve ALT artışının ise kontrol grubuna göre yaklaşık olarak 5 katı düzeyinde olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan çalışmada CCl₄ 2 ml/kg i.p tek doz olarak uygulanmış, AST ve ALT düzeyindeki artışın CCl₄ grubunda kontrol grubuna göre 6. saatte yaklaşık 5 kat düzeyde arttığı görülmüştür. Enzim düzeylerindeki bu artış yukarıda ayrıntılı verilen araştırmalarda olduğu gibi CCl₄'ün karaciğer hasarına neden olduğunu göstermiştir. Lida ve ark (2009) ile AltınSaat ve Sert (2008) karaciğer enzimlerinin, CCl₄'ün enjeksiyondan 24 saat sonra en yüksek seviyeye ulaştığını tespit etmişlerdir. Ancak yapılan araştırmada CCl₄ enjeksiyonundan 72. saat sonra alınan serumların, AST ve ALT düzeylerindeki düşüş, CCl₄ toksikasyonunun etkisinin zamanla azaldığının, karaciğer hasarının gerilediğinin belirtisi olarak kabul edilebilir.

Özenirler ve ark (1996), CCl₄'e maruz kalan sıçan hepatositlerinde lipit peroksidasyon (LPO) oluşumunun arttığını ve karaciğerde yağlı dejenerasyonla birlikte sentrilobuler nekroz görüldüğünü belirtmişlerdir. Yapılan diğer bir çalışmada (Devay 2008), karbon tetraklorür ile deneysel siroz oluşturulan ratlarda CCl₄ verilen grupta doku MDA düzeyinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu rapor edilmiştir. Araştırmacılar

CCl₄'ün yol açtığı karaciğer hasarının genellikle karaciğer mikrozomlarındaki lipid peroksidasyonuna bağlı olduğunu belirtmişlerdir.

CCl₄ alınmasına bağlı olarak ortaya çıkan lipid peroksidasyonu, artmış MDA seviyeleriyle pozitif korelasyon göstermektedir. Yapılan bir çalışmada (Kaya ve ark 2003), karbon tetraklorür oral olarak 10 hafta süre boyunca haftada 3 kez 2 ml/kg olarak verilmiş, 5. ve 10. haftada kan örnekleri alınmıştır. 5. hafta sonunda alınan ilk kan örneklerine göre kontrol grubunda ortalama MDA düzeyi 5.88 mmol/l iken, CCl₄ grubunda ortalama 14.32 mmol/l; 10. haftada kontrol grubunda MDA düzeyi 6.25 mmol/l iken, CCl₄ grubunda 19.94 mmol/l olduğu tespit edilmiştir. Farklı dozlarda CCl₄ uygulandığında da aynı sonuçların alındığını gösteren çalışmalar da mevcuttur. Ratlara CCl₄'ün 0.25, 0.5 ve 1 ml/kg olarak 3 farklı dozda i.p olarak enjekte edildiği çalışma sonunda dozun artışına bağlı olarak MDA düzeylerinde artış olduğu ve CCl₄ enjeksiyonundan 12 saat sonra şekillenmeye başladığı bildirilmiştir (Zwart ve ark 1998). Araştırma sonunda elde edilen bulgular araştırmacıların sonuçlarına benzer olarak MDA düzeyleri kontrol grubuna göre deneme gruplarında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Zwart ve ark (1998) enjeksiyondan 12 saat sonra MDA düzeylerinde artışın oluşmaya başladığını ileri sürmelerine karşın yapılan araştırmada 6. saatte lipid peroksidasyonunun karaciğerde başladığını göstermektedir. Lipid peroksidasyonun erken başlamasının uygulanan dozun daha yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Tripeptit yapıda olan glutatyon, tüm memeli canlı hücrelerinde bulunan, hücreleri serbest radikal ve toksik metabolitlerine karşı koruyan bir tiol bileşiğidir. GSH ve diğer tiol içeren bileşikler, kimyasal maddelerin oluşturduğu hücre ve doku hasarına karşı hücrenin canlılığını ve membran stabilitesini sağlamaktadırlar. GSH, kimyasal maddelerin ve çeşitli ilaçların zehirsizleştirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Başta GSH olmak üzere tiol bileşiklerinin karaciğer üzerine koruyucu rolü çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir (Liu ve ark 2007, Gökçe ve ark 2009).

Glutatyon S-transferazlar, birçok farklı eksojen ve endojen bileşiğin detoksifikasyonunu sağlayan multifonksiyonel enzimlerdir. GST, glutatyonun tiyol grubunun ikinci bir substratının elektrofilik bölgesine konjugasyon reaksiyonlarını katalizler (Çoşkun 2007).

CCl₄ ile karaciğer üzerinde oluşturulan toksik etkiler sonucunda GSH düzeylerinin belirgin şekilde azaldığı belirlenmiştir (Gui ve ark 2005, Quan ve ark 2009).

Bildik ve ark (1999) yaptıkları çalışmada, tavşanlara akut ve kronik CCl₄ uygulaması yapmış ve deneme gruplarındaki tüm kan GSH düzeylerinin kontrol gruplarına göre önemli bir azalma gösterdiğini tespit etmişlerdir. CCl₄ ile karaciğer toksikasyonu oluşturulan başka bir çalışmada (Sambath Kumar ve ark 2005) ise doku GSH düzeyinin kontrol grubunda 5.31 µg/mg protein, CCl₄ uygulanan grupta ise 0.59 µg/mg protein olduğu tespit edilmiştir.

Birçok araştırma da antioksidan enzimler ile karaciğer hasarı, fibrozis ve lipid peroksidasyon düzeyleri arasında ters bir korelasyon olduğunu göstermiştir (Maraşlı ve ark 2003, Güven ve ark 2003, **Qiusheng ve ark 2004**). Hsiao ve ark (2001) CCl₄ ile karaciğer toksikasyonu oluşturmuş ve MDA düzeylerinde 4 kat artış, antioksidan belirleyicisi olan GSH düzeylerinde ise 2 kat azalış olduğunu tespit etmişlerdir. Bununla beraber karbon tetraklorür ile karaciğer dejenerasyonu oluşturulan farelerde lipit peroksidasyon göstergesi olan MDA ve GSH düzeylerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada; oral yolla 10 hafta CCl₄ 2 ml/kg verilmiş ve analizler sonucunda CCl₄ verilen grupta MDA düzeyinin 5.58'den 20.01 nmol/ml'ye yükseldiği, GSH düzeyinin ise 1.52'den 0.96 nmol/ml'ye düştüğü bildirilmiştir (Maraşlı ve ark 2003).

Yapılan diğer bir çalışmada Yalçın ve ark (1997), karaciğer dokusundaki toksik etkilerin belirlenmesi amacıyla sıçanlara sekiz hafta boyunca haftada iki kez 1 ml/kg CCl₄ uygulamış ve analizler sonucunda karbon tetraklorürlü grupta GSH ve GST düzeylerinin kontrol grubuna göre artış gösterdiğini tespit etmişlerdir. GSH düzeyindeki artışa uzun süre CCl₄ uygulamasının sebep olabileceği belirtilmiştir. GST düzeyindeki artışın ise CCl₄ 'ün detoksifikasyonu ile ilgisi olabileceği gibi GSH'a bağımlı çalışan bir enzim grubu olarak, GSH düzeylerindeki değişiklikten etkilenmiş olabileceği rapor edilmiştir. Yapılan çalışmada karaciğer GSH düzeyleri, 6. ve 72. saatlerde kontrol grubuna göre önemli oranda düşük bulunmuştur. CCl₄'ün enjeksiyon yoluyla (Yalçın ve ark 1997, Bildik ve ark 1999, Sambath Kumar ve ark 2005) veya oral yolla (Maraşlı ve ark 2003, Güven ve ark 2003) oluşturulan toksikasyonlarında, Yalçın ve ark (1997) dışında, diğer araştırmacılar araştırmalarında GSH düzeylerinde azalma tespit edilmiştir. Yapılan araştırmada elde edilen sonuçlar da benzerdir, GSH düzeylerindeki bu azalmanın CCl₄'ün toksik etkilerini azaltmak amacıyla GSH'ın antioksidan olarak kullanımının arttığını göstermektedir. GSH düzeylerindeki azalmaya karşın CCl₄ verilen rat karaciğerlerinde GST düzeylerinde kontrol grubuna göre artış görülmüştür. Bu artış 72. saatte istatistiki

anlamda olmasına rağmen, 6. saatteki artış istatistiki açıdan önemsiz bulunmuştur. Yapılan araştırmalarda, CCl₄ verilen ratların karaciğerlerinde GST düzeylerinde bazı araştırmacılar (Amalia ve ark 2007, Güven ve ark 2003, Sheweita ve ark 2001a,b), azalış olduğunu rapor ederken; Seema ve ark (2006), GST'nin CCl₄ toksikasyonu sonrası ilk 6 saatte artan enzim olduğunu, lipit peroksidasyonuna karşı hücrel savunmanın önemli bir bileşeni olduğunu iddia etmişlerdir. Mevcut araştırmada GST düzeylerinde artış, Seema ve ark (2006)'nın bulgularını desteklemektedir. Diğer araştırmacılar ile aradaki farkın CCl₄ uygulama süresine (2-14 hafta) bağlı olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca GST, GSH kullanan bir enzimdir; GSH düzeylerindeki azalmanın GST düzeyindeki artış ile ilgili olabileceği; CCl₄ toksikasyonunda 6. ve 72. saatlerdeki yükselişin, GST'nin toksik etkili xenobiyotiklerin uzaklaştırılmasında oynadığı önemli rolden kaynaklanabileceği kanısına varılabilir.

Oksidatif stresin, CCl₄'ün karaciğer üzerindeki toksisitesi üzerinde önemli bir rol oynadığı ve bu negatif etkisinin çeşitli antioksidan maddelerle azaltıldığı birçok deneysel çalışmalarla gösterilmiştir (Güven ve ark 2003, Kurt ve ark 2004, **Qiusheng ve ark 2004**, Amalia ve ark 2007, Kaya 2007, Galicia-Moreno ve ark 2009, Öztürk ve ark 2009).

Kurt ve ark (2004) sıçanlarda yaptıkları çalışmada oksidatif stres oluşturan CCl₄'e karşı kateşinin; Kaya (2007), diyabet tedavisinde kullanılan roziglitazon (RZG) isimli ilacın antioksidan sistemi desteklediği ve MDA düzeylerinin CCl₄ grubuna göre daha düşük olduğunu bildirmişlerdir.

Deneysel olarak CCl₄ toksikasyonunun oluşturulduğu bir araştırmada, CCl₄ farelere 17 hafta boyunca her 4 günde bir 0.5 ml/kg i.p. olarak verilmiş ve çalışmanın son 3 haftasında Quercetin uygulanmıştır. Yapılan deneyler sonucunda serum AST ve ALT düzeyleri CCl₄' lü grupta artış gösterirken, Quercetin uygulamasıyla kontrol grubuna yakın değerler tespit edilmiştir. Doku MDA, GSH ve GST düzeylerinde Quercetin uygulaması sonucunda iyileştirici sonuçlar alındığı bildirilmiştir (Amalia ve ark 2007). Öztürk ve ark (2009) tarafından yapılan benzer bir çalışmada CCl₄ ile oksidatif hasar oluşturularak vit C'nin koruyucu etkisi araştırılmıştır. Analizler sonucunda ALT ve AST düzeylerinin CCl₄ verilen grupta kontrol grubuna göre artış gösterdiği vit C uygulaması ile düzeylerinin azaldığı tespit edilmiştir. CCl₄'ün toksik etkisinin MDA düzeyini artırdığı, GSH ve GST düzeylerini azalttığı vit C uygulaması ile parametrelerde iyileşmeler görüldüğü tespit

edilmiştir. Vit C uygulaması sonucunda artan GSH düzeyinin hem lipit peroksidasyon göstergesi olan MDA düzeyini azalttığı hem de GST düzeyini arttırdığı belirtilmiştir.

Karbon tetraklorürün sebep olduğu oksidatif hasara karşı, çeşitli bitki ekstratlarının koruyucu etkilerinin olduğu düşünülmektedir. Jayakumar ve ark (2008) CCl₄'ün yaptığı hasarın Pleurotus ostreatus ekstratı ile anlamlı bir şekilde düzeldiğini, GSH ve GST seviyelerinin arttığını ve buna bağlı olarak lipit peroksidasyonunda belirgin bir azalmanın olduğunu, Somayaji ve ark (2001) yaptıkları çalışmada ise CCl₄ uygulamasıyla artan serum AST ve ALT seviyelerinin Ginkgo Biloba ekstratı ile azaldığını, GSH seviyelerinin arttığını ve MDA düzeylerinin de belirgin bir şekilde azalma gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Kefir ve vit E nin koruyucu etkisinin araştırıldığı bir çalışmada (Güven ve ark 2003), kontrol grubuna yalnızca saf su, birinci deney grubuna CCl₄, ikinci deney grubuna CCl₄+kefir, üçüncü deney grubuna CCl₄+vit E oral olarak verilmiştir. Oksidatif hasarın göstergesi olan GSH ve GST düzeylerinin CCl₄ uygulanan grupta kontrol grubuna göre azaldığı, MDA düzeylerinin ise arttığı belirtilmiştir. CCl₄+kefir ve CCl₄+vit E uygulanan grupların her ikisinde ise MDA düzeyinin kontrol grubuna yaklaştığı, GSH düzeyinin arttığı, GST düzeyinin ise CCl₄ grubuna göre daha da azaldığı gözlenmiştir Luteolin-7-glucoside'in antioksidan etkisinin araştırıldığı CCl₄ ile ratlarda karaciğer hasarı oluşturulan başka bir çalışmada (**Qiusheng ve ark 2004**) da **AST, ALT, MDA ve GSH düzeylerinde de benzer sonuçlar bulunarak**, luteolin-7-glucoside'in oksidatif strese karşı antioksidan etki gösterdiği tespit edilmiştir.

N-asetil sistein'in moleküler yapısından dolayı hücrelere kolayca girebildiği ve güçlü bir antioksidan olan GSH oluşumunda aktif etki göstererek oksidan strese karşı dokuların savunmasını desteklediği bildirilmiştir (Bayır ve ark 2006). NAS'ın; karaciğer kan akımını arttırması, GSH seviyelerini yükseltmesi ve serbest oksijen radikallerini temizlemesi gibi olumlu etkileri gerçekleştirdiği bilinmektedir (Angulo ve Lindor 2002).

NAS, iskemi-reperfüzyon hasarının engellenmesi, HIV ekspresyonunun önlenmesi ve erişkinin sıkıntılı solunum sendromunun tedavisinde de kullanılmaktadır. Birçok patolojik basamakta uygulanabilen ve potansiyel olarak kullanışlı olan NAS, son yıllarda antioksidan bir ajan olarak geniş çapta çalışılmaktadır (Vendemiale ve ark 2001, Kamalakkannan ve ark 2005, Akdur ve ark 2005, Arslan 2006, Çetinkaya 2009, Galicia-

Moreno ve ark 2009). Çalışmada CCl₄'ün neden olduğu radikal hasarının engellenmesi amacıyla antioksidan molekül olan N-asetil sistein kullanılmıştır.

NAS'ın CCl₄ ile oluşturulan deneysel karaciğer sirozunda oksidatif stres ve profibrinogenik etki üzerinden yararlı etkileri olduğu (Galicia-Moreno ve ark 2009), safra kanalı ligasyonu sonucunda karaciğer fibrozu meydana gelen ratlarda NAS uygulamasının iyileştirici bir etki oluşturduğu (Tahan ve ark 2007) yapılan araştırmalarda bildirilmiştir.

Yapılan bir çalışmada vankomisine bağlı gelişen böbrek hasarında vankomisin ile artan MDA düzeylerinin, NAS uygulaması ile azaldığı ve iyileştirici bir etki gösterdiği belirtilmiştir (Arslan 2006).

Bir GSH öncülü olan NAS uygulamasının doku GSH düzeyinde yükselmeyi sağladığı bildirilmektedir (Allameh ve ark 1997). Çetinkaya (2009) yaptığı çalışmada, karbon tetraklorür ile oluşturduğu akut karaciğer hasarında N-asetil sisteinin etkisini araştırmıştır. 10 gün süren çalışma boyunca CCl₄ 2 ml/kg ve N-asetil sistein 150 mg/kg i.p olarak verilmiştir. 10. gün sonunda yapılan analizlerde AST ve ALT düzeylerinin CCl₄ grubunda belirgin olarak yükseldiği ve NAS tedavisi ile azalma gösterdiği tespit edilmiştir. Lipit peroksidasyon göstergesi olan MDA düzeylerinin CCl₄'lü grupta anlamlı olarak arttığı ve NAS tedavisiyle düştüğü, antioksidan parametre olan GSH düzeylerinin de CCl₄'lü grupta azalırken NAS tedavisiyle arttığı tespit edilmiştir.

Zavodnik ve ark (2008), ratlarda karbon tetraklorür ile karaciğer hasarı oluşturmuş ve NAS'ın antioksidan etkisini araştırmışlardır. Çalışmada CCl₄ 2.5 ml/kg i.g olarak tek doz verilmiş ve NAS uygulaması 150 mg/kg i.p olarak 3 kez enjekte edilmiştir. İlk NAS uygulaması CCl₄ uygulamasından 30 dakika önce, ikincisi CCl₄ uygulamasından 6 saat sonra, üçüncüsü de CCl₄ uygulamasından 12 saat sonra yapılmıştır. CCl₄ uygulamasından 24 saat sonra alınan örneklerde yapılan analizler sonucunda CCl₄ uygulaması ile plazma AST ve ALT düzeylerinin kontrol grubuna göre sırasıyla 1.6 ve 2 kat arttığı, NAS tedavisi ile artan enzim aktivitelerinde önemli bir değişim olmadığı tespit edilmiştir. Lipit peroksidasyon göstergesi olan MDA düzeylerinin CCl₄ verilen grupta arttığı NAS uygulaması ile düzeylerinin düştüğü, doku GST düzeylerinin de CCl₄ uygulaması sonucunda azaldığı NAS uygulaması ile hafifde olsa düzeldiği bildirilmiştir. Doku GSH düzeylerinin ise CCl₄ verilen grupta kontrol grubuna göre azaldığı, NAS uygulamasıyla hem CCl₄ grubuna hem de kontrol grubuna göre düzeyinin anlamlı derecede yükseldiği tespit edilmiş ve artan hücre içi GSH biyosentezinin yükselmeye sebep

olabileceği iddia edilmiştir. Araştırmacılar NAS'ın CCl₄'ün oluşturduğu hasarı hafifletmediğini ve kısmen koruyucu bir etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Yine benzer bir çalışmada (Kamalakkannan ve ark 2005), karbon tetraklorür (CCl₄) ile karaciğer hasarı oluşturulmuş ve ratlara oral olarak 150 mg/kg N-asetil sistein (NAS) uygulanmıştır. 3 ay süren çalışma boyunca CCl₄ her hafta 3 ml/kg oral olarak verilmiştir. Yapılan analizler sonucunda plasma AST düzeyinin CCl₄ verilen grupta arttığı, NAS uygulaması ile azaldığı belirtilmiştir. Lipit peroksidasyon göstergesi olan MDA düzeyinin CCl₄ verilen grupta arttığı, NAS uygulaması ile önemli oranda azaldığı tespit edilmiştir. Antioksidan parametre olan GSH düzeyinin ise CCl₄ verilen grupta kontrol grubuna göre yarı yarıya azaldığı ve NAS uygulamasıyla kontrol grubu değerlerine yaklaştığı belirlenmiştir. Araştırmacılar NAS'ın antioksidan özelliklerinin yanı sıra serbest radikalleri temizleme ve hücre zarlarını sağlamlaştırıcı yeteneği sayesinde CCl₄'ün oluşturduğu toksik etkiye karşı koruyucu bir rol oynadığını iddia etmişlerdir. Yapılan çalışma sonunda antioksidan olarak CCl₄ ile birlikte NAS uygulanan grupta AST ve ALT düzeyleri, kontrol grubuna göre yüksek olmasına rağmen CCl₄ grubuna göre önemli miktarda düşük bulunmuştur. 72. saatteki düşüş 6. saate göre oldukça anlamlıdır. Bu sonuçlar Tahan ve ark (2007) ile Çetinkaya (2009)'nın bulgularına paralel; Zavodnik ve ark (2008) bulgularının aksine NAS'ın karaciğer hasarı üzerine özellikle zamana bağlı iyileştirici etkilerinin olduğunu gösterdi.

Parakuat (PQ) ile indüklenen oksidatif strese karşı güçlü bir serbest radikal tutucusu olan NAS'ın iyileştirici etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada (Çeçen ve ark 2002), parakuat uygulanan grupta artan MDA düzeylerinin NAS uygulamasıyla azaldığı, parakuat uygulamasından dolayı azalan GSH düzeylerinin ise arttığı tespit edilmiştir. Araştırmacılar GSH düzeyinin azalmasının birkaç sebebi olduğunu belirtmişlerdir. Azalma sebeplerinin: 1) parakuat gibi ksenebiyotik redoks çevriminin oksidasyonunda meydana gelen artışa, 2-) selüler GSH'ın parçalanmasındaki artma veya sentezindeki azalmaya, 3-) peroksitlerin ve yabancı komponentlerin detoksifikasyonu sırasında GSH'ın aşırı tüketilmesine bağlı olabileceği bildirilmiştir. NAS'ın de GSH biyosentezine öncülük ettiği ve GSH düzeyini artırarak toksisiteye karşı koruyucu etki gösterdiği rapor edilmiştir.

Klor gazı solutulan ratlara, 40 mg/kg N-asetil sisteinin 6. ve 24. saatlerde enjekte edildiği bir çalışmada (Akdur ve ark 2005), klor gazı verilen gruplarda GSH seviyesinin azaldığı, N-asetil sistein uygulamasıyla GSH düzeylerinde yükselme

gözleendiği, 24. saatte yükselmenin daha belirgin olduğu bildirilmiştir. Başka bir çalışmada ise farelerde arseniğin karaciğerde, böbrekte ve kalpte belirgin biçimde lipid peroksidasyonunu arttırdığı, GSH düzeylerini düşürdüğü, NAS tedavisiyle ise iyileşmeler görüldüğü belirtilmiştir (Ramos ve ark 1995).

Çalışmada antioksidan olarak kullanılan N-asetil sistein'in CCl₄ kullanımının ortaya çıkardığı radikal hasar üzerine olan etkisi değerlendirildiğinde; NAS+CCl₄ uygulanan grubun 6. saat ve 72. saat karaciğer GSH seviyeleri, CCl₄ verilen gruba göre anlamlı olarak yüksek bulunurken, 6. saat düzeylerinin kontrol grubuna göre düşük olmasına rağmen, 72. saatte kontrol grubuna yakın seviyeye ulaştığı görülmektedir. GSH seviyelerindeki yükselişin aksine; NAS, CCl₄'ün toksik etkisiyle yükselen GST enzim aktivitesini düşürmüştür. Ancak bu düşüş 6. saatte kontrol grubuna göre anlamlı, 72. saatte kontrol grubu aradaki farkın önemsiz olduğu gözlenmiştir. MDA için çalışma sonuçları değerlendirildiğinde; NAS+CCl₄ uygulanan grupta kontrol grubuna göre 6. ve 72. saat MDA seviyeleri yüksek iken CCl₄ uygulanan gruba göre düşük olduğu gözlenmektedir. Birçok antioksidan ile yapılan çalışmalarda olduğu gibi NAS'ın karaciğer MDA düzeyini azalttığı, GSH düzeyini artırdığı araştırma sonuçları ile desteklenmektedir. GSH seviyesindeki bu artışın araştırmacıların (Kamalakkannan ve ark 2005, Çeçen ve ark 2002) iddia ettiği gibi CCl₄'ün detoksifiye edilmesi sırasında aşırı tüketilen GSH'ın GSH ön maddelerini içeren NAS ilavesi ile yeniden sentezlendiği görüşünü doğrulamaktadır. Aynı grupta 6. saatte GST düzeylerindeki düşüş, NAS'ın GSH sentezi için ön madde olduğu gibi aynı zamanda radikal temizleyicisi olarak CCl₄'ün toksik etkisini hafiflettiği, buna bağlı olarak hücre içi GST sentezini azalttığı sonucuna varılabilir.

5. SONUÇ

Elde edilen bulgular CCl_4 'ün oksidatif strese neden olduğunu, N-asetil sisteinin antioksidan olarak oksidatif strese karşı koruyucu rol oynadığını göstermektedir.

Karaciğer hasar göstergelerinden AST ve ALT düzeylerinin CCl_4 ile belirgin derecede artarken, NAS uygulanan grupta etkili bir şekilde azaldığı ortaya konmuştur. Karaciğer enzimlerindeki bu yükselişin karaciğerde hasar şekillendiğinin göstergesi olduğu kabul edilmiştir. Glutatyon öncülü olan NAS'ın, GSH biyosentezini artırarak CCl_4 'ün toksik etkisini hafiflettiği, buna bağlı olarak GST sentezini azalttığı düşünülmektedir. Yapılan çalışmada NAS'ın, CCl_4 'ün indüklediği lipit peroksidasyon göstergesi olan MDA düzeyini düşürdüğü, antioksidan parametre olan GSH düzeyini arttırdığı gözlemlenmiştir. Lipit peroksidasyonunun, fibrozun ve karaciğer hasarının antioksidan enzim aktiviteleriyle ters korelasyon gösterdiği bulgularla desteklenmektedir. Bununla birlikte CCl_4 verilen grupta 72. saatte 6. saate göre parametrelerin azalma sebebinin, CCl_4 intoksikasyonun zamana bağlı olarak organizma tarafından tolere edilmesi olduğu düşünülmektedir. Kontrol gruplarında 72. saatteki parametrelerin 6. saatteki parametrelere göre düşük olmasının hayvanlarda ortam stresine bağlı olarak oluştuğu sonucuna varıldı. Araştırma sonuçlarına göre akut karaciğer toksikasyonunda karaciğer hasarının hafifletilmesi amacıyla tedaviye NAS ilavesi önerilebilir.

ÖZET

Bu çalışmada, karaciğerde karbon tetraklorür (CCl₄) ile oluşturulacak toksisite modelinde lipit peroksidasyon göstergesi olan Malondialdehit (MDA) aktivitesini ve detoksifikasyon reaksiyonlarında önemli rol oynayan biyomoleküllerden GSH ve GST enzimlerinin aktivitesi üzerine N-asetil sisteinin etkisinin olup olmadığı araştırılacaktır.

Çalışmaya altı grupta toplam 72 adet rat alındı. 1. grup (CCl₄, 6. saat) 2 ml/kg i.p verilirken, 2. gruba (CCl₄+NAS, 6. saat), 3. gruba (CCl₄, 72. saat), 4. gruba ise (CCl₄+NAS, 72. saat) uygulandı. 5. gruba zeytinyağı verilirken, 6. gruba zeytinyağı+NAS (periton içi 50 mg/kg/gün) uygulandı. N-asetil sistein uygulamasına deney gurubuna enjekte edilen CCl₄'den 3 gün önce başlandı ve deney süresince devam edildi. 1. ve 2. deneme gruplarındaki hayvanlar CCl₄ enjeksiyonundan 6 saat sonra, 3. ve 4. deneme gruplarındaki hayvanlar ise 72 saat sonra eter anestezisine alınıp kalplerinden kan örnekleri ve karaciğer dokusu alındı. Kontrol grubu oluşturmak amacıyla 5. gruptaki ratlardan 6 adeti 6 saat sonra, 6 adeti de 72 saat sonra kontrol değerlerini elde etmek amacıyla kullanıldı. 6. gruba N-asetil sistein uygulaması 2. ve 4. gruplara paralel sürede uygulandı ve 6 adet rattan 6 saat sonra, 6 adet rattan 72 saat sonra eter anestezisi altında kan ve karaciğer örnekleri kontrol değerleri için alındı. Kanda karaciğer enzimleri AST ve ALT, karaciğer dokularında ise indirgenmiş glutatyon (GSH), Glutatyon S-transferaz (GST) ve lipit peroksidasyon göstergesi olan malondialdehit (MDA) çalışıldı.

Karaciğer enzimlerinin değerlendirilmesinde; AST ve ALT düzeylerinin CCl₄ verilen grupta 6. ve 72. saatlerde kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı ve NAS eklenmesi ile AST ve ALT düzeylerinin düştüğü izlendi. Karaciğer doku MDA seviyelerinin CCl₄ verilen grupta 6. saatte kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı ve NAS eklenmesi ile düzeyinin düştüğü tespit edildi. 72. saat CCl₄ verilen grupta karaciğer MDA düzeylerinin, NAS verilen grup ile kontrol grubuna göre önemli oranda yüksek olduğu, ancak diğer gruplar arasında istatistiki açıdan önemli bir fark olmadığı belirlendi. Doku antioksidan seviyeleri değerlendirildiğinde, GSH seviyelerinin CCl₄ verilen grupta 6. ve 72. saatlerde kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğu ve NAS ilavesi ile arttığı izlendi. GST seviyelerinin ise CCl₄ verilen grupta 6. saatte kontrol grubuna göre arttığı, ancak bu artışın istatistiki değerlendirme açısından önemli olmadığı ve NAS eklenmesi ile miktarın önemli oranda düştüğü görüldü. 72. saatte CCl₄ verilen grupta GST

düzeylerinin NAS verilen grup ile kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu; CCl₄+NAS verilen grupta ise NAS ve kontrol grubuna göre yüksek olmasına rağmen NAS grubu ile aradaki farkın istatistiki değerlendirme açısından önem taşımadığı görüldü.

Sonuç olarak; CCl₄ intoksikasyonunun zamana bağılı olarak organizma tarafından tolere edildiğı ve NAS'ın, CCl₄ ile oluşturulan karaciğer hasarı üzerine yararlı etkileri olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Karbon tetraklorür, N-asetil sistein, karaciğer

SUMMARY

Carbon Tetrachloride, Effect of N-Acetyl Cysteine on Glutathione (GSH) and Glutathione S- Transferase Activity in Carbon Tetrachloride Induced Liver Damaged

In this study, N-acetyl sistein was researched whether has an effect on GSH and GST enzymes, that has an important role on detoxification reactions, and Malondialhedit (MDA) activity, that is lipid peroxidation determinant at toxicity model that will be composed with carbon tetra chloride (CCl₄) in liver.

Totally 72 rats from six groups were collected to study. 1 st group (CCl₄, 6 th hour) 2 ml/kg i.p assigned, 2 nd group (CCl₄+NAS, 6 th hour), 3 rd group (CCl₄, 72 nd hour), 4 th group (CCl₄+NAS, 72 nd hour) were applied. Olive oil was assigned to 5 th group, while olive oil + NAS (inside peritoneum 50/mg/kg/day) was applied. In N-acetyl sistein application was started 3 days before CCl₄ that injected to tested group and continued while experiment. Blood samples and lives tissues were taken by ether anesthesia from 1 st and 2 nd sample groups -6 hours after CCl₄ injection- and 3 rd and 4 th sample groups –after 72 hours-. To compose a control group 6 rats (after 6 hours later) and respectively 6 rats (72 hours later) from 5 th group were taken. N-acetyl sistein application to 6 th group was performed parallel to 2 nd and 4 th groups and blood samples and lives tissues were taken by ether anesthesia from 6 rats after 72 hours for control values. AST and ALT enzymes in blood and lowered GSH and GST and Malondialhedit (MDA) activity, that is lipid peroxidation determinant were performed.

While observing liver enzymes, it was observed that AST and ALT levels increased importantly in CCl₄ given groups in 6 th and 72 nd hours than control group and also observed that AST and ALT levels decreased with addition of NAS. In 72 nd hour CCl₄ given group liver MDA levels were importantly higher than NAS given and control groups, but statistically there was no important difference. While tissue antioxidant levels reviewed, GSH levels were importantly lower than 6 th and 72 nd hours than control groups and increased with NAS addition. GST levels were increased with CCl₄ given group in 6 th hour than control group, but this increase wasn't imporant statistically and lowered with NAS addition. In 72 nd hour CCl₄ given group GST levels were higher than NAS given and control groups; in CCl₄+NAS given groups whether being higher than NAS and control groups, difference between NAS group has no statistical importance.

As a result CCl_4 intoxication was tolerated by organism related to time and NAS has beneficial effects on CCl_4 caused liver defects.

Keywords: Carbon Tetra Chloride, N-Acetyl Sistein, Liver

KAYNAKLAR

Ahola T. Preventive potential of N-Acetylcysteine in oxidative stress-related complications of prematurity (dissertation). Medical Faculty of the University of Helsinki 2004.

Akdur O, Sözüer EM, İkizceli İ, Avşaroğulları L, Öztürk F, Muhtaroglu S, Özkan S, Durukan P. Klor gazı solutulan ratların beyin ve kalp dokusunda oluşan hasarın incelenmesi ve N-asetil sisteinin etkinliği. Erciyes Tıp Dergisi (Erciyes Medical Journal) 2009; 31(4): 293-298.

Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya: Mimoza Yayınları, 1995.

Akpoyraz M, Durak İ. Serbest radikallerin biyolojik etkileri. The Journal of the Faculty of Medicine 1995; 48: 253-262.

Akyol Ö. Şizofrenide oksidatif stres. Kocatepe Tıp Dergisi 2004; 5: 15-25.

Allameh A, Vansoun EY, Zarghi A. Role of glutathione conjugation in protection of weanling rat liver against acetaminophen-induced hepatotoxicity. Mechanisms of Ageing Development 1997; 95(1-2): 71-79.

Altınsoat Ç, Sert NN. Gebe ve gebe olmayan sıçanlarda karbon tetraklorürün (CCl₄) bazı biyokimyasal değerler üzerine olan etkileri. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2008; 14(2): 237-242.

Amalia PM, Possa MN, Augusto MC, Francisca LS. Quercetin prevents oxidative stress in cirrhotic rats. Dig Dis Sci 2007; 52: 2616-2621.

Anderson ME. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. Chemico-Biological Interactions 1998; 111-112: 1-14.

Angulo P, Lindor KD. Treatment of non-alcoholic steatohepatitis. Best Practise & Research Clinical Gastroenterology 2002; 5: 797-810.

Anonymus. Karaciğerden bir kesit ve karaciğer hücresi. http://www.esselam.net/harunyahya/bilim/insanmucizesi/insanmucizesi2_3.html. 2003 .
Erişim Tarihi: 22 Aralık 2011.

Antmen ŞE. Beta talasemide oksidatif stres. Yüksek lisans tezi. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, Türkiye. 2005.

Armstrong DA. Methods in molecular biology. New Jersey: Toronto Humana Pres; 1998.

Armstrong RN. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. Chemical Research in Toxicology 1997; 10(1): 2-18.

Arosio B, Gagliano N, Fusaro LMP, Parmeggiani L, Tagliabue J, Galetti P, Castri DD, Moschemi C, Annoni G. Aloe-Emodin quinone pretreatment reduces acute liver injury induced by Carbon tetrachloride. Pharmacology and Toxicology 2000; 87: 229-233.

Arslan MK. Ratlarda vankomisin ile indüklenen renal hasara karşı N-asetil sistein ve E-vitaminin koruyucu etkileri. Uzmanlık Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalığı Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye. 2006.

Aslan D, Tietz. 'Klinik kimyada temel ilkeler'. 5. Baskıdan Çeviri. Palme Yayıncılık; 2005. 748-760.

Avcı A. Diyabet oluşturulmuş ratlarda böbrek antioksidan savunma sistemi ve E-vitaminin etkileri. Uzmanlık Tezi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye. 2001.

Aydoğdu N, Kaymak K, Yalçın Ö. Sıçanlarda böbrek iskemi/reperfüzyon hasarında N-asetil sisteinin etkileri. Fırat Tıp Dergisi 2005; 10: 151-155.

Azri S, Mata HP, Reid LL, Gandlofi AJ, Brendel K. Further examination of the selective toxicity of CCl₄ rat liver slices. Toxicol Applied Pharmacology 1992; 112: 81-86.

Bahçecioglu IH, Üstündağ B, Özercan İ, Ergül E, Baydaş G, Akdere T, Demir A. Protective effect of Ginkgo Biloba extract on CCl₄-induced liver damage. Hepatology Research 1999; 15: 215-224.

Basu S. Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: Eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients. Toxicology 2003; 00: 1-15.

Bayır S, Eskiocak S, Altaner G. Kolesterolde zengin diyetle beslenen ratlarda NAS'ın anti-oksidan/pro-oksidan etkileri. Türk Klinik Biyokimya Dergisi 2006; 1: 15-23.

Beutler E, Dubon O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *Journal of Laboratory Clinical Medicine* 1963; 61: 882-888.

Bharath S, Hsu M, Kaur D, Rajagopalan S, Andersen JK. Glutathione, iron and Parkinson's disease. *Biochemical Pharmacology* 2002; 64: 1037-1048.

Bildik A, Ertekin A, Yur F, Dede S. Karbon tetraklorür toksikasyonunun lipid peroksidasyonu, glutatyon ve vit C üzerine etkileri. Serbest Radikaller ve Antioksidantlar Araştırma Derneği II. Ulusal Kongresi, 1999.

Brattin WJ, Glende EA, Recknagel RO. Pathological mechanism in carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Free Radical Biology and Medicine* 1985; 1: 27-28.

Bray TM, Taylor CG. Enhancement of tissue glutathione for antioxidant and immune functions in malnutrition. *Biochemical Pharmacology* 1994; 47: 2113-2123.

Buettner GR, Ng CF, Wang M, Rodgers VGJ, Schafer FQ. A new paradigm: manganese superoxide dismutase influences the production of H_2O_2 in cells and thereby their biological state. *Free Radical Biology Medicine* 2006; 41: 1338-1350.

Candas R, Sohal S, Radyuk SN, Klickhko VI, Orr WC. Molecular organization of the glutathione reductase gene in *Drosophila melanogaster*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1997; 339: 323-334.

Champe PC, Harvey RA. Glikozaminoglikanlar. Tokullugil A, Dirican M, Ulukaya E. Lippincott's illustrated reviews serisinden: Biyokimya. 2. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 1997. s.147-156.

Cnubben NHP, Rietjens IMCM, Wortelboer H, Van Zanden J, Van Bladeren PJ. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2001; 10: 141-152.

Cross CE, Halliwell B, Borish ET. Oxygen radicals and human disease. *Annals of Internal Medicine* 1987; 107: pp. 526-545.

Çakır M. Aspirin ve vitamin E (α -Tokoferol)'nin farelerde (*Mus musculus*) karaciğer total süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitelerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye. 1997.

Çeçen ŞŞ, Cengiz G, Söylemezoğlu T. Parakuat toksisitesinde N-asetil sisteinin koruyucu etkisi. Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi 2002; 31(4): 259-271.

Çetinkaya A. Ratlarda N-asetil sistein ve L-karnitin'in karbon tetraklorür ile oluşturulan akut karaciğer hasarı üzerine etkileri. Yan Dal Uzmanlık Tezi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bilim Dalı, Kahramanmaraş, Türkiye. 2009.

Çoşkun G. Glutation-S-transferaz enziminin farklı taşıyıcılarda immobilizasyonu ve bazı özelliklerinin incelenmesi. Doktora Tezi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, Türkiye. 2007.

Delibaş N, Özçankaya R. Serbest radikaller. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 1995; 2(3): 11-17.

Devay SD. Karbon tetraklorür ile deneysel siroz oluşturulan ratlarda serbest radikal metabolizması; Stobadin'in antioksidan etkisi. Uzmanlık Tezi. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye. 2008.

Dianzani MU. Biological activity of methylglyoxal and related aldehydes. Submoleccular Biology and Cancer Ciba Foundation Series 1979; 67: 245-269.

Doğan A. Farmakoloji. Kars: Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Ders Kitapları; 2000.

Düzgüner V. Deneysel olarak diyabet oluşturulan tavşanlarda çinkonun lipid peroksidasyonu ve antioksidan sistem üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Hatay, Türkiye. 2005.

Ertekin A. Karbontetraklorür ile deneysel siroz oluşturulan tavşanlarda sialik asit, lipid-bağlı sialik asit, total protein ve bazı spesifik karaciğer enzimlerinin aktivitelerinin araştırılması. Doktora Tezi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Van, Türkiye. 1996.

Fırat S. Kobaylarda radyasyonla oluşan akciğer hasarında doku glutatyon, glutatyon peroksidaz, glutatyon S-transferaz düzeyleri ve N-Asetil sistein'in bu sistem üzerindeki etkisi.

Uzmanlık Tezi. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye. 1997. 95s.

Foye WO. Principles of medicinal chemistry. 3rd Ed. Lea-Ffbiger; 1989. 102.

Freeman BA, Crapo TD. Biology of disease free radicals and tissue injury. Laboratory Investigation 1982; 47(5): 412-25

Galicia-Moreno M, Rodríguez-Rivera A, Reyes-Gordillo K, Segovia J, Shibayama M, Tsutsumi V, Vergara P, Moreno MG, Muriel P. N-Acetylcysteine prevents carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis: role of liver transforming growth factor-beta and oxidative stress. European Journal of Gastroenterology & Hepatology 2009; 21(8): 908-914.

Gibson GG, Skett P. Introduction to drug metabolism. New York: Chapman and Hall; 1986. 262-263.

Gökçe G, Özsarlak-Sözer G, Oktay G, Kirkali G, Jaruga P, Dizdaroglu M, Kerry Z. Glutathione depletion by buthionine sulfoximine induces oxidative damage to DNA in organs of rabbits in vivo. Biochemistry 2009; 48: 4980-4987.

Griffith OW. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. Free Radical Biology and Medicine 1999; 27: 922-935.

Grinberg L, Fibach E, Amer J, Atlas D. N-acetylcystein amide, a novel cellpermeating thiol, restores cellular glutathione and protects human red blood cells from oxidative stress. Free Radical Biology & Medicine 2005; 38: 136-145.

Gui SY, Wei W, Wang H, Wu L, Sun WY, Wu CY. Protective effect of fufanghuangqiduogan against acute liver injury in mice. World Journal of Gastroenterology 2005; 11: 2984-2989.

Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clinical Chemistry 1995; 41: 1819-1828.

Guyton AC. Textbook of Medical Physiology. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2001.

Güven A, Güven A, Gülmez M. The effect of kefir on the activities of GSH-Px, GST, CAT, GSH and LPO levels in carbon tetrachloride-induced mice tissues. *Journal of Veterinary Medicine B* 2003; 50: 412–416.

Gyamfi MA, Ohtani II, Shinno E, Aniya Y. Inhibition of glutathione transferases by Thonningianin A, isolated from the African medicinal herb, *Thonningia sanguinea*, in vitro. *Food Chemical Toxicology* 2004; 42: 1401-1408.

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry* 1974; 249: 7130-7139.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. New York: Oxford University Press; 1999. s. 936.

Hanigan MH. γ -Glutamyl transpeptidase, a glutathionase: its expression and function in carcinogenesis. *Chemico-Biological Interactions* 1998; 111-112: 333-342.

Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 2005; 45: 51-88.

Hermier D, Salchon MR, Guy G, Peresson R. Metabolism and nutrition differential channelling of liver lipids in relation to susceptibility to hepatic steatosis in the goose. *Poultry Science* 1999; 78: 1398-1406.

Howie AF, Hoyes JD, Beckett GJ. Purification of acidic glutathione S-transferase from human lung, placenta and erythrocyte and the development of a specific radioimmunoassay for their measurement. *Clinica Chimica Acta* 1988; 177: 65-76.

Hsiao G, Lin YH, Lin CH, Chou DS, Lin WC, Sheu JR. The protective effects of PMC against chronic carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in vivo. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2001; 24(11): 1271-1276.

Ichinose T, Miller MG, Shibamoto T. Determination of free Malondyaldehyde formed in liver microsomes up on CCl₄ oxidation. *Journal of Applied Toxicology* 1994; 14(6): pp. 453-455.

Jayakumar T, Sakthivel M, Thomas PA, Geraldine P. Pleurotus ostreatus, an oyster mushroom, decreases the oxidative stress induced by carbon tetrachloride in rat kidneys, heart and brain. *Chemico-Biological Interactions* 2008; 176: 108-120.

Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. *Temel Histoloji*. 8. Baskı. Barış Kitapçılık; 1998.

Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. *Basic Histology*. 10nd Ed. by Appleton and Lange; 2003. 332-50.

Kamalakkannan N, Rukkuman R, Aruna K, Varma PS, Wıswanathan P, Menon VP. Protective effect of N-acetylcysteine in Carbon Tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics* 2005; 4: 118-123.

Kaya A. Deneysel karaciğer fibrozisi oluşturulan ratlarda roziglitazonun antifibrotik ve antioksidan etkileri. Uzmanlık Tezi. Fatih Üniversitesi Gastroenteroloji İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye. 2007.

Kaya N, Erginsoy S, Güven A. Kazlarda karbon tetraklorür zehirlenmesinin biyokimyasal ve patolojik parametrelere etkisi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2003; 9(2): 131-136.

Kelly GS. Clinical applications of N-Acetylcysteine. *Alternative Medicine Reviews* 1998; 3(2): 114-27.

Ketterer B, Meyer DJ, Coles B, Taylor JB. Tissue distribution of glutathione transferases. In: Miners J, Birkett DJ, Drew R, McManus M ed. *Microsomes & drug oxidations*. Newyork: Taylor & Francis; 1988. 305-12.

Kidd PM. Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage. *Alternative Medicine Reviews* 1997; 2: 155-176.

Knapen M, Zusterzeel FCM, Peters PLM, Steegers WHM. Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 1999; 82: 171-184.

Koç M. Ratlarda indometazin ile oluşturulan gastrik hasar üzerine askorbik asitin gastroprotektif etkileri ve bu etkilerin antioksidan sistem ile ilişkisi. Yüksek lisans tezi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Fakültesi, Erzurum, Türkiye. 2007.

Kumar V, Abbas A, Fausto N. Pathologic basis of disease. 7nd Ed. China: Elsevier Saunders; 2005.

Kurt H, Başaran A, Musmul A. Sıçanlarda karbon tetraklorür CCl₄'ün oluşturduğu oksidatif stresin kateşin ile önlenmesi. Kocatepe Tıp Dergisi 2004; 5: 29-34.

Leblanc GA, Dauterman WC. Conjugation and elimination of toxicants, (E. Hodgson; R.C. Smart, Editörler). Introduction to biochemical toxicology. United States of America: Wiley and Sons Inc; 2001. 115-135.

Liebman JF, Greenberg A. Mechanistic principles of enzyme activity. New York: VCH Publishers; 1988.

Lida C, Fujii K, Koga E, Washino Y, Kitamura Y, Ichi I, Abe K, Matsura T, Kojo S. Effect of alpha-tocopherol on carbon tetrachloride intoxication in the rat liver. Archives of Toxicology 2009; 83(5): 477-483.

Liu Y, Zhang H, Zhang L, Zhou Q, Wang X, Long J, Dong T, Zhao W. Antioxidant N-Acetylcysteine attenuates the acute liver injury caused by X-ray in mice. European Journal of Pharmacology 2007; 575: 142-148.

Long CA, Bislskl HJ. Rate of reaction of superoxide radical with chloride-containing species. Journal of Physics and Chemical 1980; 84: 555-557.

Lu SC. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. The FASEB Journal 1999; 13: 1169-1183.

Lu KL, Tsai CC, Ho LK, Lin CC, Chang YS. Preventive effect of the Taiwan folk medicine *Ixeris laevigata* var. *Oldhami* on *a-nophthyl-isothiocyanate* and carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. Phytotherapy research 2002; 16: 45-50.

Mannervik B, Board PG, Hayes JD, Listowsky I, Pearson WR. Nomenclature for mammalian soluble glutathione transferases. Methods in Enzymology 2005; 401, 1-8.

Maraşlı N, Kaya N, Güven A. Karbon tetraklorür (CCl₄) ve etil alkol'ün fare eritrosit antioksidan ve plazma lipid peroksidasyonuna etkisi. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2003; 9(1): 1-4.

Marnett LJ. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. Toxicology 2002; 181-182: 219-222.

Maxwell SRJ. Prospect for use of antioxidant therapies. Drugs 1995; 49(3): 345-61.

Meister A, Anderson ME. Glutathione. Annual Review of Biochemistry 1983; 52: 711-760.

Memişoğulları R. Diabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. Düzce Tıp Fakültesi Dergisi 2005; 3: 30-39.

Michalopoulos GK. Liver regeneration: molecular mechanism of growth control. The FASEB Journal 1990; 4: 176-87.

Michalopoulos GK, De Frances MC. Liver regeneration. Science 1997; 276: 60-66.

Moody DE, Narloch BA, Shull LR, Hammock BD. The effect of structurally divergent herbicides on mouse liver xenobiotic-metabolizing enzymes (P-450-dependent monooxygenases, epoxide hydrolases and glutathione S-transferases and carnitine acetyltransferase). Toxicology Letters 1991; 59: 175-85.

Muriel P, Alba N, Perez-Alvarez, Shibayama M, Tsutsumi VK. Kupffer cells inhibition prevents hepatic lipid peroxidation and damage induced by carbon tetrachloride. Comparative Biochemistry and Physiology Part C Toxicology & Pharmacology 2001; 130: 219-226.

Muriel P, Escobar Y. Kupffer cells are responsible for liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride. Journal of Applied Toxicology 2003; 23(2): 103-108.

Murray KR, Mayes PA, Granner DK, Rodwell VW. Harperin Biyokimyası. İstanbul: Barış kitapevi; 1993.

National Academies Press. Carbon tetrachloride toxicity. Environmental Medicine, 1995; 8: 249-266

Nishizaki T, Takenaka K, Yoshizumi T et al. Alteration in levels of human hepatocyte growth factor following hepatectomy. *Journal of The American College of Surgeons* 1995; 181: 6-10.

Odabaşoğlu F. Antioksidan vitaminler. Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde verilen konferans kitapçığı. 8 Mart 1999, Erzurum.

Özenirler S, Dinçer S, Akyol G, Öz I, Kandilci U, Babül A. CCl₄'ün oluşturduğu karaciğer hasarına Ginkgo Biloba'nın etkisi. 13. UGK, Antalya, Sözlü Bildiriler, 1996. p. 138.

Öztürk İÇ, Öztürk F, Gül M, Ateş B, Çetin A. Protective effects of ascorbic acid on hepatotoxicity and oxidative stress caused by carbon tetrachloride in the liver of wistar rats. *Cell Biochem Function* 2009; 27: 309–315.

Pena-Ilopis S, Ferrando MD, Pena JB. Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-Acetylcysteine. *Aquatic Toxicology* 2003; 65: 337- 360.

Ramos OR, Carrizales L, Yanez L, Meija J, Batres L, Ortiz D, Diaz-Barriga F. Arsenic increased lipid peroxidation in rat tissues by a mechanism independent of glutathione levels. *Environmental Health Perspectives* 1995; 103(Suppl 1): 85-88.

Reed DJ. Mechanisms of chemically induced cell injury and cellular protection, (E. Hodgson; R.C. Smart, Editörler). *Introduction to biochemical toxicology*. United States of America: Wiley and Sons Inc; 2000. s. 221-253.

Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. *Basic pathology*. 6nd Ed. W.B. Philadelphia: Saunders Company; 2000. 516-9.

Roderick P. Liver function tests: defining what's normal. *British Medical Journal* 2004; 328: 987.

Ross Mh, Kaye GI, Pawlina W. *Histology: A text and atlas*. 4nd Ed. Liipincott Williams and Wilkins; 2003. p. 533-51.

Rumevlekliođlu Y. Cep telefonunun karaciğer gelişimi üzerine teratojenik etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Gaziantep, Türkiye. 2007

Qiusheng Z, Xubo SX, Gang L, Meng S, Changhai W. Protective effects of luteolin-7-glucoside against liver injury caused by carbon tetrachloride in rats. [Pharmazie](#) 2004; 59(4): 286-288.

Quan J, Piao L, Xu H, Li T, Yin X. Protective effect of iridoid glucosides from *Boschniakia rossica* on acute liver injury induced by carbon tetrachloride in rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 2009; 73: 849-854.

Sambath Kumar R, Sivakumar T, Sivakumar P, Nethaji R, Vijayabasker M, Perumal P, Malaya Gupta, Upal Kanti Mazumder. Hepatoprotective and in vivo antioksidant effects of *Careya arborea* against carbon tetrachloride induced liver damage in rats. *International Journal of Molecular Medicine and Advance Sciences* 2005; 1(4): 418-424.

Scibior D, Czczot H. Catalase: structure, properties, functions. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 2006; 60: 170-180.

Seema D, Sharma R, Sharma A, Zimniak P, Ceci JD, Awasthi YC, Boor PJ. The course of CCl₄ induced hepatotoxicity is altered in mGSTA4-4 null (-/-) mice. *Toxicology* 2006; 218(1): 58-66.

Sen CK, Packer L. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *American Journal of Clinical Nutrition* 2000; 72 (Suppl): 653-669.

Sevgiler Y. *Oreochromis niloticus*'da karaciğer ve böbrek dokularında fenthionun NAC ve BSO modülatörlüğünde glutatyon metabolizmasına oksidatif etkileri. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, Türkiye. 2007.

a Sheweita SA, Abd El-Gabar M, Bastaway M. Carbon tetrachloride changes the activity of cytochrome p-450 system in the liver of male rats: Role of antioxidants. *Toxicology* 2001; 169: 83-92.

b Sheweita SA, Abd El-Gabar M, Bastawy M. Carbon tetrachloride-induced changes in the activity of phase II drug-metabolizing enzyme in the liver of male rats: role of antioxidants. *Toxicology* 2001; 165(2-3): 217-224.

Shimizui I. Impact of estrogens on the progression of liver disease. *Liver International* 2003; 23(1): 63-69.

Srivatave SP, Singah KP, Saxhena AK, Sethe PK. In vivo protection by protein a of hepatic microsomal mixed function oxidase system of CCl₄-administered rats. *Biochemistry Pharmacology* 1987; 36(23): 4055-4058.

Solomon EP. İnsan anatomisi ve fizyolojisine giriş. İstanbul: Birol Kitabevi; 1997.

Somayaji SN, Shenoy KA, Bairy KL. Hepatoprotective effect of Gınkgo Bıloba against carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats. *Indian Journal of Pharmacology* 2001; 33: 260-266.

Soyak G. Lenfoid löykozlu etçi anaç tavuklarda karaciğer enzim (alanin amino transferaz, aspartat amino transferaz, alkali fosfataz) düzeyleri. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye. 2006.

Staroverov VN, Davidson ER. Distribution of effectively unpaired electrons. *Chemical Physics Letters* 2000; 330: 161-168.

Suntres ZE. Role of antioxidants in paraquat toxicity. *Toxicology* 2002; 180: 65-77.

Tahan G, Tarcin O, Tahan V, Eren F, Gedik N, Sahan E, Biberoglu N, Güzel S, Bozbaş A, Tozun N, Yücel O. The effects N-Acetylcysteine on bile duct ligation-induced liver fibrosis in rats. *Digestive Diseases and Sciences* 2007; 52: 3348-3354.

Tanrıverdi G. Karbon tetraklorür (CCl₄) ile oluşturulmuş karaciğer hasarında değişik dozlardaki nikotinamidin protektif etkisinin ışık ve elektron mikroskopik olarak incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye. 2005.

Thrall KD, Vucelick ME, Gies RA, Zanger RC, Weitz KK, Poet TS, Springer DL, Grant DM, Benson JM. Comparative metabolism of carbon tetrachloride in rats, mice, and hamsters using gas uptake and PBPK modeling. *Journal of Toxicology and Environmental Health A* 2000; 60: 531-548

Tossios P, Mehlhorn U. Freie radikale und antioxidantien in der herzchirurgie. *Blickpunkt Der Mann* 2004; 2: 36-9.

Tsujii H, Okamoto Y, Kikuchi E. Prostaglandin E2 and liver regeneration. *Gastroenterology* 1993; 105: 495-9.

Üstündağ B, Bahçecioğlu İH, Şahin K, Gülcü F, Düzgün S, Özeran İH, Gürsu MF. Soy izoflavonların karbon tetraklorüre (CCl₄) bağlı karaciğer hasarı ve plazma paraoksonaz ile arilesteraz aktivite düzeylerine olan etkileri. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 2005; 19(4): 263-271.

Van Zandwijk N. N-acetylcysteine for lung cancer prevention. Chest 1995; 107(5): 73-81.

Vendemiale G, Grattagliano I, Caruso ML, Serviddio G, Valentini AM, Pirrelli M, Altomare E. Increased oxidative stress in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in the rat: effect of N-Acetylcysteine and interferon-alpha. Toxicology and Applied Pharmacology 2001; 2: 130-139.

Vinay Kumar MD, Ramzı S. Cotran MD, Stanley L. Robbins MD. Temel Patoloji. 6. Baskı. Çeviri: Uğur Çevikbaş. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2000. s. 517.

Wang H, Wei W, Wang NP. Melatonin ameliorates carbontetrachloride-induced hepatic fibrogenesis in rats via inhibition of oxidative stress. Life Sciences 2005; 77: 1902-1915.

Yalçın A, Erilaçın S, Yüce G, Onat T. CCl₄ uygulanan sıçanlarda karaciğer GSH, GST ve Selenyum Düzeyleri. Ege Tıp Dergisi 1997; 36 (1-2): 13-15.

Yanbeyi S. Aspirin ve antioksidant buthylated hydroxyanisole'ün tavşanlarda eritrosit total katalaz, süperoksit dismutaz ve glutasyon peroksidaz aktiviteleri üzerine etkileri. Doktora Tezi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye. 1999. s. 88.

Yoshoiko T, Kawada K, Shimada T. Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against active oxygen toxicity in the blood. American Journal of Obstetrics and Gynecology 1979; 135: 372-376.

Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. Cellular and Molecular Life Sciences 2003; 60: 6-20.

Zavodnik IB, Maksimchik Yu Z, Lapshina E.A, Sudnikovich Yu, Zabrodskaya SV. Protective effects of N-Acetyl-L-cysteine against acute carbon tetrachloride hepatotoxicity in rats. Cell Biochemistry and Function 2008; 26: 11-18.

Zwart LL, Hermanns RCA, Meerman JHN, Commandeur JNM, Salemink PJM, Vermeulen NPE. Evaluation of urinary biomarkers for radical-induced liver damage in rats treated with carbon tetrachloride. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1998; 148: 71-82.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında İzmir’de doğdu. İlkokulu, Meliha Akat ilkokulunda, Ortaokulu Dokuz Eylül ortaokulunda, Liseyi, Eşrefpaşa Anadolu lisesinde tamamladı. Ege Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden 2009 yılında mezun oldu. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı’nda 2009 yılında Yüksek Lisans eğitimine başladı.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmamda ilgi, yardım ve hoşgörüsünü eksik etmeyen danışmanım ADÜ Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ayşegül BİLDİK'e, çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Funda KIRAL, Doç. Dr. Pınar Alkım ULUTAŞ, Yrd. Doç. Dr. Serap Ünübol AYPAK'a, emekleri ve yardımlarından dolayı Balıkesir Üniversitesi Veteriner Fakültesi Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Hasan AKŞİT'e, deneme aşamasındaki yardımlarından dolayı ADÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Ana Bilim Dalı yüksek lisans öğrencisi Mürüvvet URAL'a, doktora öğrencileri Turgut ŞEKERLER ve Erengül BODUÇ'a sonsuz destek ve anlayışlarından dolayı teşekkür ederim.