

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**TİYOASETAMİD İLE KARACİĞER
HASARI OLUŞTURULAN RATLARDA
GENİSTEİNİN OKSİDATİF SİSTEM
ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Fatma ÖZYALIN

ELAZIĞ - 2008

ONAY SAYFASI

Prof Dr. Emine ÜNSALDI

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans/Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof Dr. Necip İLHAN

Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof Dr. Bilal ÜSTÜNDAĞ

Danışman

Yüksek Lisans/Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof Dr. Necip İLHAN

Prof Dr. İhsan HALİFEOĞLU

Prof. Dr. Bilal ÜSTÜNDAĞ

Prof. Dr. İ. Halil BAHÇECİOĞLU

Doç Dr. İsmail TEMEL

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım esnasında bana yardımcı olan danışmanım Sayın Prof Dr. Bilal ÜSTÜNDAĞ hocama; doktora eğitimim süresince emeği geçen, başta anabilim dalı başkanımız Sayın Prof Dr. Necip İLHAN olmak üzere, Sayın Prof Dr. Ferit GÜRSU, Sayın Prof Dr. İhsan HALİFEOĞLU, Sayın Doç Dr. Nevin İLHAN, Sayın Doç Dr. Nermin KILIÇ, Sayın Yrd. Doç Dr. Süleyman AYDIN, Sayın Yrd. Doç. Dr. Dilara KAMAN hocalarıma; tezimin laboratuvar çalışmaları esnasında desteklerini gördüğüm sevgili arkadaşlarım Halil İbrahim YILDIRIM' a, Biyolog Zümrüt YILMAZ'a, Biyolog Bülent AYLAZ'a, Biyolog Meral DAĞ'a ve Biyolog Dr. Özlem AYCAN KAYA'ya; asistan ve teknisyen arkadaşlarıma, ve eğitim süresi boyunca bana sabırla ve şevkatle destek veren anneme, babama ve kardeşlerime sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
KISALTMALAR.....	x
TABLOLAR DİZİNİ.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT.....	3
3.GİRİŞ ve AMAÇ.....	5
4.GENEL BİLGİLER.....	10
4.1.KARACİĞER.....	10
4.1.1. Karaciğerin Anatomisi.....	10
4.1.2. Karaciğerin Sitolojisi.....	11
4.1.2.1. Hepatositler.....	11
4.1.2.2. Endotel Hücreleri.....	11
4.1.2.3. Kupffer Hücreleri.....	12
4.1.2.4. Stellat Hücreleri.....	12
4.1.2.5. Safra Kanalı Epitel Hücreleri.....	12
4.1.3. Karaciğerin Fonksiyonları.....	12
4.1.3.1. Metabolik Fonksiyonlar.....	12
4.1.3.1.1. Protein Sentezi.....	13
4.1.3.1.2. Karbonhidrat Metabolizması.....	13
4.1.3.1.3. Lipid Metabolizması.....	13

4.1.3.1.4. Vitaminlerin ve Demirin Depo Edilmesi.....	13
4.1.3.1.5. Hormonlar ve İlaçlar Üzerine Etkileri.....	14
4.1.3.1.6. Safra üretimi.....	14
4.1.4. Karaciğer Hastalıkları.....	14
4.1.4.1. Akut Hepatit.....	14
4.1.4.2. Kronik Hepatit.....	14
4.1.4.3. Alkolik Karaciğer Hastalığı.....	14
4.1.4.4. Siroz.....	15
4.1.4.5. İlaça Bağlı Karaciğer Hastalıkları.....	15
4.1.4.6. Metabolik Karaciğer Hastalıkları.....	15
4.1.4.7. Kolestatik Karaciğer Hastalıkları.....	15
4.1.4.7.1. Primer Biliyer Siroz.....	15
4.1.4.7.2. Primer Sklerozon Kolanjit.....	16
4.1.4.8. Beslenmeye Bağlı Karaciğer Hastalıkları.....	16
4.1.4.8.1. Alkolik ve Alkolik Olmayan Steatohepatit.....	16
4.1.4.8.2. Reye Sendromu.....	16
4.1.4.8.3. Diyabet.....	17
4.1.4.9. Hepatoselüler Karsinoma.....	17
4.2. TİYOASETAMİD.....	18
4.3. SERBEST RADİKALLER.....	21
4.3.1. Serbest Radikallerin Yapıları ve Kaynakları.....	21
4.3.2. Reaktif Oksijen Türleri.....	24
4.3.2.1. Süperoksit Radikali.....	24
4.3.2.2. Hidrojen Peroksit Radikali.....	24

4.3.2.3. Hidroksil Radikali.....	25
4.3.3. Reaktif Azot Türleri.....	26
4.3.4. Serbest Radikallerin Etkileri.....	27
4.3.4.1. Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri.....	27
4.3.4.2. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri.....	29
4.3.4.3. Serbest Radikallerin Nükleik Asit ve DNA'ya Etkileri.....	29
4.3.4.4. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri.....	29
4.3.5. Reaktif Oksijen Metabolitlerin Yararlı Etkileri.....	30
4.4. ANTİOKSİDANLAR.....	32
4.4.1. Doğal Antioksidanlar.....	32
4.4.1.1. Enzimatik Antioksidan Savunma Sistemleri.....	32
4.4.1.1.1. SOD (Süperoksit Dismutaz).....	32
4.4.1.1.2. CAT (Katalaz).....	33
4.4.1.1.3. Glutasyon Redüktaz ve Glutasyon Peroksidaz.....	35
4.4.1.1.4. Glutasyon.....	36
4.4.1.2. Enzimatik Olmayan Antioksidan Savunma Sistemleri.....	36
4.4.1.2.1. Metal İyonlarının Etkisizleştirilmesini Sağlayan Antioksidanlar.....	36
4.4.1.2.2. İn vivo Sentezlenebilen Düşük Moleküler Ağırlıklı Antioksidanlar.....	37
4.4.1.2.3. Diyetle Alınan Düşük Moleküler Ağırlıklı Antioksidanlar.....	37
4.4.1.2.4. Karotenoidler ve Fenolik Yapılar.....	37
4.4.2. İlaçlar.....	38
4.4.3. Antioksidan Olarak Genistein.....	38

4.4.3.1. Genisteinin Biyokimyasal Özellikleri.....	40
4.4.3.2. Genisteinin Kanser Hücreleri Üzerine Etkileri.....	41
4.4.3.3. Hücre Döngüsünün Düzenlenmesi Üzerine Etkileri.....	41
4.4.3.4. Genisteinin Apoptozisi İndüklemesi.....	41
4.4.3.5. Genisteinin NF- κ B'in (nükleer transkripsiyon faktör) inhibisyonuna Etkisi.....	42
4.4.3.6. Anjiyogenezis ve Metastaz İnhibisyonu Üzerine Etkileri.....	42
4.5. METALLOPROTEİNAZLAR.....	43
4.5.1. Matriks Metalloproteinazlar.....	43
5. MATERYAL ve METOD.....	45
5.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Grupların Oluşturulması.....	45
5.2. Kullanılan Aletler.....	46
5.3. Kan ve Doku Örneklerinin Elde Edilmesi ve Analizlere Hazırlanması.....	46
5.4. Biyokimyasal Analizler.....	47
5.4.1. Serumların Deneye Hazırlanması.....	47
5.4.2. Dokuların Deneye Hazırlanması.....	47
5.4.3. Hemolizatların Deneye Hazırlanması.....	48
5.4.4. Nitrik Oksit (NO) Ölçümü.....	48
5.4.4.1. Kullanılan Reaktifler.....	48
5.4.4.2. Deneyin Yapılışı.....	50
5.4.5. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Ölçümü.....	55
5.4.5.1. Kullanılan Reaktifler.....	55
5.4.5.2. Deneyin Yapılışı.....	57

5.4.6. Katalaz (CAT)Aktivite Ölçümü	58
5.4.6.1. Kullanılan Reaktifler	58
5.4.6.2. Deneyin Yapılışı.....	59
5.4.7. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivite Ölçümü.....	60
5.4.7.1. Kullanılan Reaktifler	60
5.4.7. .2. Deneyin Yapılışı.....	61
5.4.8. MDA Ölçümü	63
5.4.8.1. Kullanılan Reaktifler	63
5.4.8.2. Deneyin Yapılışı.....	63
5.4.9. Total Protein Ölçümü	64
5.4.9.1. Kullanılan Reaktifler	64
5.4.9. .2. Deneyin Yapılışı.....	65
5.4.10. Hemoglobin Ölçümü	66
5.4.10.1. Kullanılan Reaktifler	66
5.4.10.2. Deneyin Yapılışı.....	67
5.4.11. AST, ALT ve LDH Enzim Düzeylerinin Ölçümü.....	67
5.4.12. Karaciğer Doku Örneklerinin Histopatolojik Muayenesi ve Metalloproteinazların Ölçümü	67
5.5. İstatistiksel Değerlendirme.....	68
6. BULGULAR.....	69
6.1. Bazal ve Çalışma Sonrası Ağırlık Ölçümleri.....	69
6.2. Biyokimyasal Ölçümler.....	69
6.2.1. Plazma MDA Düzeyleri.....	71
6.2.2. Karaciğer Dokusu MDA Düzeyleri.....	72

6.2.3. Eritrosit GSH-Px Düzeyleri.....	73
6.2.4. Karaciğer Dokusu GSH-Px Düzeyleri.....	74
6.2.5. Eritrosit SOD Düzeyleri.....	75
6.2.6. Plazma SOD Düzeyleri.....	76
6.2.7. Karaciğer Dokusu SOD Düzeyleri.....	77
6.2.8. Eritrosit CAT Düzeyleri.....	78
6.2.9. Karaciğer Dokusu CAT Düzeyleri.....	79
6.2.10. Plazma NO Düzeyleri.....	80
6.2.11. Karaciğer Dokusu NO Düzeyleri.....	81
6.2.12. Serum AST Düzeyleri.....	82
6.2.13. Serum ALT Düzeyleri	83
6.2.14. Serum LDH Düzeyleri.....	84
6.3. Histopatolojik Bulgular.....	85
6.3.1. Histopatolojik İnceleme Bulguları.....	86
7. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	90
8. KAYNAKLAR.....	98
9. ÖZGEÇMİŞ.....	108

KISALTMALAR

ASH	: Alkolik yağlı karaciğer hastalığı
ATP	: Adenozin trifosfat
BSA	: Sığır serum albumini
CAT	: Katalaz
CYP2E1	: Sitokrom p450 E1
DMSO	: Dimetil sülfoksit
ER	: Östrojen reseptörü
ESR	: Elektron spin rezonans
eNOS	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
EDTA	: Etilen diamin tetra aset asiti
FMO	: Flavin içeren monooksijenaz
GSH	: Glutatyon
GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz
GSSG	: Okside glutatyon
HBV	: Hepatit B virüsü
HCV	: Hepatit C virüsü
HDV	: Hepatit D (Delta) virüsü
HNO₂	: Nitröz asit
HO₂	: Hidroperoksil radikali
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HOCl	: Hipoklorik asit
IgG	: İmmüoglobülin G
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz

LOOH	: Lipid hidroperoksit
MDA	: Malondialdehit
MMPs	: Matriks metalloproteinazlar
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NF-κB	: Nükleer transkripsiyon faktör
NASH	: Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı
nNOS	: Nöronal nitrik oksit sentaz
NO[•]	: Nitrik oksit
NO₂	: Nitrit
NO₃	: Nitrat
NO⁺	: Nitrozil katyon
NO⁻	: Nitrozil anyon
NOS	: Nitrik oksit sentaz
O₂	: Süperoksit radikali
¹O₂	: Singlet oksijen
.OH	: Hidroksil radikali
8OHdG	: 8-hidroksideoksiguanozin
ONOO-	: Peroksinitrit
(ORT±SH)	: Ortalama±standart hata
PBS	: Primer biliyer siroz
PSK	: Primer sklerozan kolanjit
PTK	: Protein tirozin kinaz
PUFA	: Çoklu doymamış yağ asiti
ROS	: Reaktif oksijen türleri

RO·	: Alkoksi radikali
ROO·	: Peroksi radikali
ROONO	: Alkilperoksinitrit
SOD	: Süperoksit dismutaz
TAA	: Tiyoasetamid
TASO	: Tiyoasetamid sülfoksit
TASO₂	: Tiyoasetamid S-dioksit
TBARS	: Tiyobarbütirik asit reaktif maddeler
TGF-B1	: Transforming growth factor-b1
YKH	: Yağlı karaciğer hastalığı

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 1. Reaktif oksijen ve azot türleri.....	22
Tablo 2. Hücrelerde serbest radikal kaynakları.....	23
Tablo 3. Metal iyonlarını bağlayan bileşikler.....	36
Tablo 4. Düşük molekül ağırlıklı antioksidanlar.....	37
Tablo 5. Antioksidan ilaçlar.....	38
Tablo 6. Numunelerin deproteinizasyon işlemi.....	50
Tablo 7. Nitrit çalışma şeması.....	51
Tablo 8. Nitrat çalışma şeması.....	53
Tablo 9. Deproteinize edilen numunelerin kadmiyumla redükte edilmesi.....	53
Tablo 10. Redükte numunelerin Griess reaksiyonunda kullanılması.....	54
Tablo 11. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ölçümü	57
Tablo 12. Katalaz (CAT) aktivitesi ölçümü.....	59
Tablo 13. GSH-Px (glutasyon peroksidaz) aktivitesi ölçümü.....	61
Tablo 14. MDA ölçümü.....	63
Tablo 15. Lowry yöntemine göre protein ölçümü.....	65
Tablo 16. Hemoglobin ölçüm şeması.....	67
Tablo 17. Gruplara ait rat ağırlıkları ve p değerleri	69
Tablo 18. Gruplara ait serum AST, ALT ve LDH enzim düzeyleri.....	70
Tablo 19. Histopatolojik bulguların değerlendirilmesi.....	85
Tablo.20. Gruplardaki histopatolojik karaciğer hasarının değerlendirilmesi.....	89

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1. Karaciğerin anatomik yapısı.....	11
Şekil 2. Tiyoasetamidin yapısı.....	18
Şekil 3. Tiyoasetamidin karaciğer hasarına neden olduğu mekanizma....	19
Şekil 4. Nitrik oksidin L-arjininden sentezi.....	26
Şekil 5. H ₂ O ₂ konsantrasyonuna bağlı olarak katalazın katalizlediği tepkimeler.....	33
Şekil 6. Katalazın fonksiyonel döngüleri.....	34
Şekil 7. Düşük H ₂ O ₂ konsantrasyonunda katalaz etkisi.....	34
Şekil 8. Glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktaz tepkimeleri.....	35
Şekil 9. Genisteinin moleküler yapısı.....	39
Şekil 10. MMP enzimlerinin moleküler yapısı	43
Şekil 11. Nitrit standart konsantrasyon grafiği.....	52
Şekil 12. Nitrat standart konsantrasyon grafiği	54
Şekil 13. MDA standart konsantrasyon grafiği	64
Şekil 14. Lowry protein standart konsantrasyon grafiği	66
Şekil 15. Plazma MDA düzeyleri.....	71
Şekil 16. Karaciğer dokusu MDA düzeyleri.....	72
Şekil 17. Eritrosit GSH-Px düzeyleri.....	73
Şekil 18. Karaciğer dokusu GSH-Px düzeyleri.....	74
Şekil 19. Eritrosit SOD düzeyleri.....	75
Şekil 20. Plazma SOD düzeyleri.....	76
Şekil 21. Karaciğer dokusu SOD düzeyleri.....	77

Şekil 22. Eritrosit CAT düzeyleri.....	78
Şekil 23. Karaciğer dokusu katalaz düzeyleri.....	79
Şekil 24. Plazma NO düzeyleri.....	80
Şekil 25. Karaciğer dokusu NO düzeyleri.....	81
Şekil 26. Serum AST düzeyleri.....	82
Şekil 27. Serum ALT düzeyleri	83
Şekil 28. Serum LDH düzeyleri.....	84
Şekil 29. DMSO grubu ratlara ait karaciğer dokusunun histopatolojik görünümü.....	86
Şekil 30. TAA grubu ratlara ait karaciğer dokusunun histopatolojik görünümü.....	86
Şekil 31. DDG grubu ratlara ait karaciğer dokusunun histopatolojik görünümü.....	87
Şekil 32. DDG+TAA grubu ratlara ait karaciğer dokusunun histopatolojik görünümü.....	87
Şekil 33. YDG grubu ratlara ait karaciğer dokusunun histopatolojik görünümü.....	88
Şekil 34. YDG+TAA grubu ratlara ait karaciğer dokusunun histopatolojik görünümü.....	88

1. ÖZET

Karaciğer hasarı; hepatit B ve C gibi viral iltihabi hastalıklar ile karaciğer yağlanması, alkolik hepatit ve siroz gibi alkolik ve non alkolik karaciğer hastalıklarını içeren kansere kadar ilerleyen bir seri hastalıklar dizisidir. Karaciğer hasarının insidansını etkileyen bir çok faktör vardır. Bunlar yaş, cinsiyet, etnik köken gibi demografik faktörler; hepatit B ve hepatit C virusü, aflatoksin, alkol, tütün, demir birikimi, endojen ve ekzojen hormonlar, diyet, şistozomiazis, vinil klorid, arsenik, gibi çevresel faktörler; siroz, immun fonksiyon, hemokromatozis ve diğer kalıtsal metabolik hastalıklar, şişmanlık, şeker hastalığı, alkolik olmayan yağlı karaciğer, gibi konakçıdan kaynaklanan faktörler olarak sıralanmaktadır. Deneysel olarak uygulanan Tiyoasetamidde (TAA) önemli bir hepatotoksik ajandır.

Çalışmada 200-250 gram ağırlığında Sprague Dawley cinsi erkek ratlar kullanıldı ve ratlar 6 çalışma grubuna ayrıldı. 1. Grup (DMSO, n=7), %1.25 DMSO 12 hafta boyunca günlük subkutan olarak verildi. 2. Grup (TAA, n=7), 12 hafta boyunca haftada iki kez 200 mg/kg b.w. tiyoasetamid intraperitoneal olarak verildi. 3. Grup (DDG, n=7), 12 hafta boyunca günlük 0.2 mg/kg b.w. genistein subkutan. olarak verildi. 4. Grup (DDG+TAA, n=7), 12 hafta boyunca günlük 0.2 mg/kg b.w subkutan. olarak genistein+haftada iki kez 200 mg/kg intraperitoneal olarak. tiyoasetamid verildi. 5. Grup (YDG, n=7), 12 hafta boyunca günlük 0.4 mg/kg b.w. subkutan olarak genistein verildi. 6. Grup (YDG+TAA, n=7), 12 hafta boyunca günlük 0.4 mg/kg b.w., subkutan olarak. genistein+haftada iki kez 200 mg/kg intraperitoneal olarak. tiyoasetamid verildi. Çalışma sonunda ratlar anestezi

altında dekapite edilerek biyokimyasal parametreler için kan örnekleri, histopatolojik incelemeler için de karaciğer doku örnekleri alındı.

Serum örneklerinde AST, ALT, LDH, plazma örneklerinde MDA, SOD ve NO tayini yapıldı. Doku örneklerinde ise MDA, GSH-Px, SOD, CAT ve NO tayini yapıldı. Eritrositlerde de ayrıca GSH-Px, SOD, CAT düzeylerine bakılarak hem TAA oluşturduğu hasar hem de oluşan hasara karşı genisteinin düşük ve yüksek dozlardaki etkileri araştırıldı.

Çalışma sonunda TAA verilerek karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda genisteinin, karaciğer enzimleri ve lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu olduğu gözlemlendi. Diğer parametreler üzerindeki etkilerinin de zamana bağlı olarak iyileştirici olabileceği görüşüne varıldı. Bu nedenle genisteinin tüketiminin karaciğer hasarını önleme ve tedavide bir seçenek olarak kullanılabileceği düşünüldü.

Anahtar kelimeler: Karaciğer hasarı, genistein, tiyoasetamid,

2. ABSTRACT

Hepatic damage is a serious of diseases progressing to cancer which includes viral infectious diseases (such as hepatitis B and C), steatosis, alcoholic and non alcoholic liver diseases (such an alcoholic hapatitis and cirrhosis). These are many factors affecting prevalance of hepatic damage. These are demographic factors like age, ethnic origin; envariomental factors like hepatitis B and C viruses, aflatoxin, alchol, tobacco, iron deposition, endogenous and exogenous hormones; diet, schistosomiasis, viniyl chloride, arsenic cirrhosis, immune dusfunction, haemochromatosis and other hereditary metabolic diseases, host related factors such as obesity, diabetes, non alcoholic steatotis hepatic. Experimentally administered thioacetamide (TAA) is also an important hepatotoxic agent.

In the current study, male Spraque Dawley rats weighing 200-250 g were used and rats were divided into 6 groups. Grup 1 (DMSO, n=7), %1.25 DMSO were injected subcutaneously per day for 12 weeks. Grup 2 (TAA, n=7), 200 mg/kg b.w. thioacetamide were injected intraperitonally twice a week for 12 weeks. Grup 3 (DDG, n=7), 0.2 mg/kg b.w. genistein were injected subcutaneously per day for 12 weeks. Grup 4 (DDG+TAA, n=7), 0.2 mg/kg b.w. genistein were injected subcutaneously per day for 12 weeks and 200 mg/kg b.w. thioacetamide were injected intraperitonally twice a week for 12 weeks. Grup 5 (YDG, n=7), 0.4 mg/kg b.w. genistein were injected subcutaneously per day for 12 weeks. Grup 6 (YDG+TAA, n=7), 0.4 mg/kg b.w. genistein were injected subcutaneously per day for 12 weeks and 200 mg/kg b.w. thioacetamide were injected intraperitonally twice a week for 12 weeks.

At the termination, rats were decapitated under anasthesia and blood samples and liver tissue samples were taken for biochemical and histopathological parameters respectively.

AST, ALT and LDH in serum samples and MDA, SOD and NO in plazma samples were analysed whereas MDA, GSH-Px, SOD, CAT and NO analyses were conducted in tissue samples.

TAA induced damage and effect of low and high dose of genistein were investigated by analysing GSH-Px, SOD and CAT activites in eritrocities.

In conclusion, protective role of genistein aganist liver damage and lipid peroxidation in rats with TAA induced liver damage was observed. It was concluded that effects of genistein on the other parameters might be curative with time. Therefore comsumption of genistein might be an option in the prevention and the treatment of liver damage.

Key words: Liver damage, genistein, thioacetamide.

3. GİRİŞ ve AMAC

Karaciğer; karbonhidrat, protein, lipid, porfirin ve safra tuzlarının metabolizmasında görev alan çok önemli bir organ olup; demir, glikojen, lipid ve vitaminlerin depo edildiği yerdir. Aynı zamanda ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu; üre, amonyak, bilirubin gibi son ürünlerin uzaklaştırılması gibi fonksiyonları da vardır (1). Karaciğer hasarı; hepatit B ve C gibi viral iltihabi hastalıklar ile karaciğer yağlanması, alkolik hepatit ve siroz gibi alkolik ve non alkolik karaciğer hastalıklarını içeren kansere kadar ilerleyen bir seri hastalıklar dizisidir.

Karaciğer hasarının insidansını etkileyen yaş, cinsiyet, etnik köken gibi demografik faktörler; hepatit B ve hepatit C virusü, aflatoksin, alkol, tütün, demir birikimi, endojen ve ekzojen hormonlar, diyet, şistozomiazis, vinil klorid, arsenik gibi çevresel faktörler olabileceği gibi siroz, immun fonksiyon, hemokromatozis ve diğer kalıtsal metabolik hastalıklar, şişmanlık, şeker hastalığı, alkolik olmayan yağlı karaciğer, gibi konakçıdan kaynaklanan faktörlerde vardır (2). Bu faktörlerin yanında deneysel çalışmalarda sıklıkla kullanılan tiyoasetamid de (TAA) önemli bir hepatotoksin ajan olarak değerlendirilmiştir. Tiyoasetamid DNA, RNA, protein sentezini ve glutasyonu etkileyerek intrahepatik metabolik değişikliklere neden olur (3,4).

Yapılan çalışmalar, karaciğer hastalıklarındaki iltihabi durumları takiben fibrozis, siroz ve karaciğer kanserine kadar ilerleyen süreçler içerisinde serbest radikallerin önemli rol oynadığını göstermiştir. Aerobik organizmalarda, başta mitokondriyal elektron transportu, ksenobiyotik metabolizması, fagositik aktivasyon gibi çeşitli sentez ve degradasyon reaksiyonları sonucu reaktif oksijen

türleri, yani serbest radikaller meydana gelir (5). Serbest radikaller hidroksil, süperoksit, nitrik oksit ve lipid peroksit radikalleri gibi değişik kimyasal yapılara sahip bileşiklerdir (6). Serbest radikal / antioksidan dengesinin, serbest radikaller lehine kayması sonucu oksidatif stres meydana gelir (7). Artan oksidatif stres, DNA, protein ve lipid gibi makromoleküllerde oksidatif hasara yol açmaktadır. Lipid peroksidasyonu ve oksidasyona uğrayan DNA bazları, karaciğer hasarının ve karsinogenezisin anlaşılabilmesi açısından önemli biyolojik göstergelerdir (8,9). Kimyasal ajanlar, iyonize radyasyon ve U.V. ışık yayılımı sonucu hasara uğrayan DNA'da sık olarak 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG), oluşumu gözlenir. Hidroksil radikalleri ve singlet O olarak bilinen oksijen radikalleri, DNA'da 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) denilen baz hasarlarına neden olurlar (9,10).

Serbest radikaller, savunma mekanizmalarının kapasitesini aştıklarında öncelikle hücre membranlarını etkilerler. Lipidler ise membranda en çok hasara uğrayan kimyasal yapılardır. Membranda bulunan kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle reaksiyona girerek peroksidasyon ürünlerini oluştururlar. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu, tiyobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARS) yöntemiyle ölçümü yapılabilen malondialdehit (MDA) bileşikleri oluşur. Oluşan MDA, membran lipidlerini çapraz bağlayarak polimerize eder. Polimerizasyon sonucu iyon transportu ve enzim aktivitelerinde bozulma gibi membran özelliklerini etkileyen değişiklikler meydana gelir (11). Çalışmalarda TAA ile oluşturulan karaciğer sirozunda da lipid peroksidasyonunun arttığı ve antioksidan sistemlerinin yetersiz kaldığı rapor edilmiştir (12,13).

İnsan vücudunda fizyolojik veya anormal koşullara bağlı olarak üretilen serbest radikalleri engelleyen antioksidan savunma sistemleri vardır (14). Hem doğrudan hem de dolaylı olarak ksenobiyotiklere, karsinojenlere ve toksik radikal reaksiyonlara karşı hücreleri koruyan antioksidanlar; Vitamin A, C, E, beta-karoten, metallothionein, poliaminler, melatonin, NADPH, adenosin, koenzim Q-10, urat, ubiquinol, polifenoller, flavonoidler, fitoöstrojenler, sistein, homosistein, taurin, metionin, s-adenozil-L-metionin, resveratrol, nitroksidler, glutatyon, glutatyon peroksidaz, katalaz, süperoksid dismutaz, tioredoksin redüktaz, nitrik oksid sentaz, hem oksijenaz-L ve eozinofil peroksidaz olarak sıralanabilirler (15,16). Antioksidanlar, lipid peroksidasyonunu, proteinlerin çapraz bağlanmalarını ve DNA mutasyonunu önleyen bileşiklerdir. Serbest radikaller, kansere de neden olduklarından, çoğu antioksidanlar kanseri ilk basamakta durdurup tümörün ilerlemesini engellerler (17,18).

Karaciğer fibrozu, ekstrasellüler matriks bileşenlerinin artması ile karakterize olan, dinamik bir süreçtir. Ekstrasellüler matriksin yapımı ve yıkımı arasındaki denge; oluşan toksik oksijen radikallerine bağlı olarak sürekli yapımı yönünde bozulmaktadır (19). Karaciğer hasarına bağlı olarak gelişen süreç sonunda ortaya çıkan fibrozisde, matriks metalloproteinazlar (MMPs) önemli rol oynarlar. MMPs, ekstrasellüler matriks ve bazal membran bileşenlerini parçalayabilen ve aktif bölgesinde çinko içeren homolog bir enzim ailesidir. Bu enzimler dokunun yeniden yapılanması, morfogenezis, yara iyileşmesi ve normal gelişimsel süreç gibi fizyolojik durumlarda önemli rol oynarlar. Bununla birlikte tümör hücresi invazyonu, anjiyogenezis ve metastaz gibi patolojik süreçlerde de yer alırken (20) matriks glikoproteinlerini ve proteoglikanlarını yıkma işlevini de

görürler (21). Hepatositlerden salınan metalloproteinaz enzimleri, hasarlı bölgedeki fibröz dokuları parçalayıp yok ederler (22). Araştırmacılar karaciğerde meydana gelen oksidatif strese bağlı olarak ortaya çıkan karaciğer hasarı ile fibrozis arasında yakın ilişki olduğu göstermişlerdir (23, 24).

Son yıllarda karaciğer hastalıklarının tedavisinde çeşitli spesifik tıbbi ajanlar, cerrahi tedavi ve radyoterapinin yanı sıra doğal yapılı antioksidan bileşikler de kullanılmaktadır. Bu bileşikler arasında fenolik ve piron halkaları içeren benzo-gama- piron türevi olan flavonoidler de bulunmaktadır. Flavonoidler antioksidan etkilerinden dolayı kapsamlı bir şekilde önem kazanmışlardır. Çalışmalarda çok sık kullanılan flavonoidler: quersetin, luteolin, kaempferol, apigenin ve genisteindir (25-27). Genistein bitkilerde çok yaygın bir şekilde bulunan bir fitokimyasal olup izoflavonlar içinde en yüksek antioksidan aktiviteyi gösteren bileşik olarak tanımlanmaktadır (28). Hayvan hücrelerinde birçok farmakolojik etkisi gösterilen genistein bir fitoöstrojen olup kanserli hücrelerin çoğalmasında anahtar rol oynayan tirozin kinazın inhibisyonunu sağlar (29). Skibola ve ark. soy izoflovanlar [genistein (5,7,4'-trihydroxyisoflavone), daidzein (7,4'-dihydroxyisoflavone)] ve koruyucu diğer fitoöstrojenlerin, kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve osteoporozu karşı kimyasal koruyucu ajanlar olarak rol oynadıklarını rapor etmişlerdir (30). Genistein serbest radikallerin temizlenmesinde görev almakta ve DNA hasarına karşı hücreyi korumaktadır (31). Soy izoflovanların ve östrojenlerin metabolik sendrom ve yağlı karaciğer oluşumunun engellemesinde koruyucu rolü olduğunu gösteren çalışmalar vardır (32,33).

Karaciğer hasarının obezite, diyabet, hipertansiyon, hiperkolesterolemi ve hiperlipidemiye kapsayan metabolik ve insülin rezistans sendromu ile kardiyovasküler hastalıklarla çok sıkı bir birliktelik göstermesi, özellikle alkole bağımlı olmayan yağlı karaciğer (NASH) oluşumu gibi gözlenen vakalarda önemi giderek artmaktadır (34). Bu çalışmada deneysel olarak tiyoasetamid ile karaciğer hasarı oluşturulmuş ratlarda, bir soyizoflavon olan genisteinin farklı dozlarda uygulanmasının olası koruyucu etkileri ve antioksidan enzim düzeyleri ile metalloproteinazlar üzerine etkileri araştırılmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

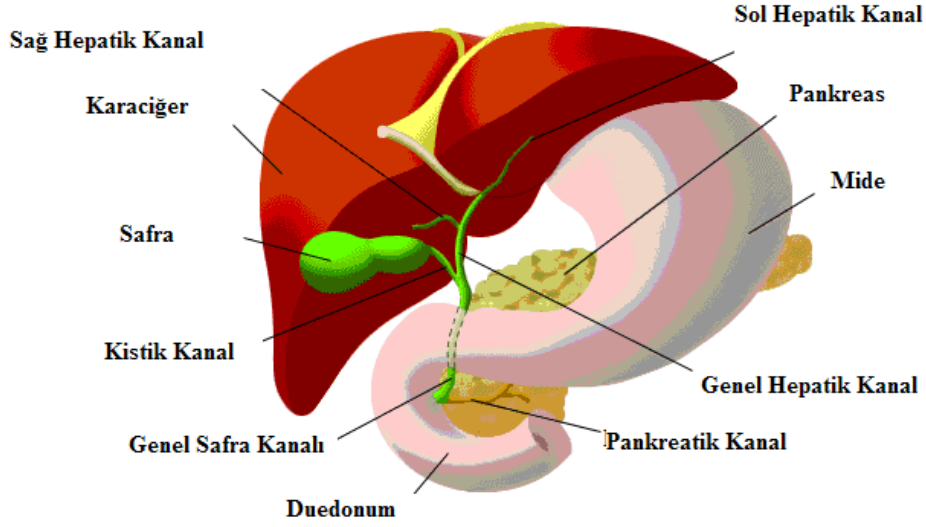
4.1. KARACİĞER

4.1.1. Karaciğerin Anatomisi: Vücuttaki en büyük organ olup yetişkinlerde ağırlığı yaklaşık olarak 1.2 ila 1.5 kg arasındadır. Karnın sağ üst çeyreğinde diyaframın altındadır (35) ve vücut ağırlığının yaklaşık % 2' sini oluşturmaktadır. Karaciğer alt yüzü sağda duodenum, kolon, sağ böbrek ve surrenal ile; solda özofagus ve mide ile komşudur (36).

Karaciğer sağ ve sol olmak üzere iki lobdan oluşur. Karaciğerin ön, arka ve alt olmak üzere üç yüzü vardır. Ön yüz diyaframın altındadır, alt yüz karın boşluğuna, arka yüzse karın duvarına bakar. Sağ lobun alt yüzünde iki küçük lob bulunur. Karaciğer 50.000-100.000 arasında değişen anatomik ünitelerden oluşur. Her lobül merkezindeki venin etrafında silindirik olarak sıralanmış hepatositlerden oluşur. Disse aralığı, sinuzoidal kapillerler ile hepatositler arasındadır (37).

Karaciğer gastrointestinal sistem ve dalaktan oluşan besin maddeleriyle zengin portal ven ve merkezi dolaşımdan karaciğere bol oksijenli kanı taşıyan hepatic arterden oluşan iki kan dolaşımına sahiptir. Sağ atrium yanındaki inferior vena kavaya giren sağ ve sol hepatic venler aracılığıyla karaciğer de venöz drenaj sağlanır. Karaciğer Glisson's kapsülü olarak bilinen ince bir bağ dokusu ile kaplıdır (35).

Biliyer Sistem



Şekil 1. Karaciğerin anatomik yapısı ve biliyer sistem (38).

4.1.2. Karaciğerin Sitolojisi: Karaciğerde beş tip hücre bulunmaktadır. Bunlar hepatositler, endotel hücreleri, kupffer hücreleri, stellat hücreleri ve safra kanalı epitelyum hücreleridir. Sinüzoidlerin iç yüzeyini endotel hücreleri ve kupffer hücreleri kaplar. (39).

4.1.2.1. Hepatositler: Hepatositler total karaciğer volümünün % 80-88'ini oluştururlar. Yağ asitleri, fosfolipidler ve trigliseridlerin metabolizmasında görev yaparlar. Kolesterol ve safra asitleri burada yapılır. (40).

4.1.2.2. Endotel Hücreleri: Karaciğerde endotel hücreleri aralıklı olarak yerleşmişlerdir. Sitoplazma ve organelleri az olup sitoplazmalarında küçük mikropinositik veziküller bulunur (41).

Damar yönünden oldukça zengin olan karaciğer endotel hücreleri açısından da zengin bir organdır. Sinüzoidler arteriyel kanın yanında venöz kanı da

içerirler. Bu nedenle barsaklardan gelen ve organizmaya zararlı olabilecek çeşitli kimyasal maddeler ve mikroorganizmalar için bir filtre görevi üstlenirler (42).

4.1.2.3. Kupffer Hücreleri: Orjin olarak monositlerden köken alan ve perisinüzoidal alanda yerleşen, lokal makrofajlardır (42). Karaciğer sinüzoidleri içerisinde çok değişik şekil ve yerleşimde bulunabilirler (43). 1980'li yıllarda Von Kupffer tarafından tanımlanan bu hücreler, karaciğerde A vitamini ve yağ depolanmasının (44) yanı sıra tümör hücrelerini fagosite ettiği de gösterilmiştir (45).

4.1.2.4. Stellat Hücreleri: Sinüzoidlerin duvarında bulunan, yüksek miktarda retinol içeren denizyıldızı görünümündeki hücrelerdir. Aktif hale geldikleri zaman Disse aralığına kollejen salgılayarak fibrotik sürecin başlamasına neden olurlar. Hepatositten salınan metalloproteinaz enzimi, hasar gören alandaki fibrotik dokuyu parçalar ve yok eder. Stellat hücrelerin apoptoza uğratılmasıyla teorik olarak, fibroz doku oluşumunun yavaşlatıldığı veya ortadan kaldırdığı düşünülmüştür (42).

4.1.2.5. Safra Kanalı Epitel Hücreleri: İki hepatositin bitişik olduğu her yerde, hücrelerin arasında tübüler bir aralık bulunur ve bu aralık safra kanalikülü olarak isimlendirilir (46). Safra kanal sisteminin ilk kısımları olan bu kanaliküller, 1-2 µm çapındaki tübüler boşluklardır.

4.1.3. Karaciğerin Fonksiyonları

4.1.3.1. Metabolik Fonksiyonlar: Karaciğer hücresi vücudun çok yönlü bir hücresidir. Bu hücreler hem endokrin hem de ekzokrin fonksiyonludur; bazı maddelerin sentezini yapar ve biriktirirken bazılarını detoksifiye eder, bazılarını da taşır.

4.1.3.1.1. Protein Sentezi: Karaciğer hücresi, kendisi için gerekli olan proteinlere ek olarak salgılamak üzere çeşitli plazma proteinlerini de (albumin, protrombin, fibrinojen ve lipoproteinler) sentezler. Karaciğer tarafından dışarıya verilen proteinin yaklaşık % 5'i makrofaj sisteminin hücreleri (Kupffer hücreleri) tarafından üretilir, geri kalan bölüm hepatositlerde sentezlenir (46).

4.1.3.1.2. Karbonhidrat Metabolizması: Besinlerle alınan ve vena porta yolu ile karaciğere ulaşan glukoz, karaciğerde glikojen şeklinde depolanır (47).

Normal kan glukoz konsantrasyonu kısa süreli açlıkta hepatik glikojen yıkımıyla, uzamış açlıkta ise hepatik glukoz sentezi ile (glukoneogenez) korunur. Metabolik süreçlerle oluşan ve başlıca enerji kaynağı olan adenosin trifosfat (ATP) ise yağ asit oksidasyonu ile sitrik asit ve Embden- Meyerhof yolları aracılığı ile glukozun hepatik metabolizması sonucu oluşmaktadır. (35)

4.1.3.1.3. Lipid Metabolizması: Karaciğer yağ asitlerinin sentez ve oksidasyonu, yağ asitlerinden trigliserid oluşumu; fosfolipid, lipoprotein ve kolesterol sentezinin yapıldığı organdır. Yağların ve yağda çözünen vitaminlerin barsaktan emilimine yardımcı olan safra tuzlarını duodenuma salgılar. Sindirim esnasında emülsifiye olmuş yağlar, pankreas lipazı, safra tuzları ve monogliserollerin etkisiyle suda çözünebilen miçellere dönüşürler. Yağ asitleri, kolesterol ve yağda çözünen vitaminler miçel oluşumuyla çözünür hale getirilerek ince barsaklardan emilirler.

4.1.3.1.4. Vitaminlerin ve Demirin Depo Edilmesi: Karaciğer vücuda 10 ay yetecek kadar A vitamini, 3-4 ay yetecek kadar D vitamini, birkaç yıl yetecek kadar B12 vitamini depo eder. Karaciğerdeki apoferritin-ferritin sistemi de demirin depo edilmesini sağlar.

4.1.3.1.5. Hormonlar ve İlaçlar Üzerindeki Etkileri: Tiroksin hormonu ve östrojen, kortizol, aldesterol gibi steroid hormonlar karaciğerde kimyasal olarak değiştirilir veya dışarı atılır. Karaciğer hasarında bu hormonlarda artış gözlenir (47).

4.1.3.1.6. Safra Üretimi: Safra tuzlarının tek sentez yeri karaciğerdir. Biyosentezleri kolesterole hidroksil gruplarının katılmasıyla başlar. Karaciğer hücreleri sürekli olarak safra sentezlerler. (46).

4.1.4. Karaciğer Hastalıkları

4.1.4.1. Akut Hepatit: Akut hepatit, karaciğerin yaygın bir hastalığıdır. Altı aydan kısa süreli olması ve sıklıkla iyileşme ile sonuçlanması önemli klinik özellikleridir. Akut hepatitin en sık sebebi, başlıca karaciğerde hastalık yapan hepatotrop virüslardır.

4.1.4.2. Kronik Hepatit: Kronik hepatit karaciğerin altı aydan uzun süren diffüz iltihabi bir hastalığıdır. Siroza ilerleyebilir veya sirotik evrede olabilir. Kronik hepatitler; kronik viral hepatit, otoimmün hepatit, ilaca bağlı kronik hepatit ve kriptojenik (sebebi bilinmeyen) kronik hepatit olmak üzere 4 ana gruba ayrılır. Viruslara bağlı kronik hepatitlere kronik viral hepatitler denir. Hepatit B virusu (HBV), hepatit D (delta) virusu (HDV) ve hepatit C virusu (HCV) kronik hepatit yaptığı bilinen başlıca virüslardır (40).

4.1.4.3. Alkolik Karaciğer Hastalığı: Alkolik karaciğer hastalığı, uzun sürede aşırı miktarda alkol tüketimini sonucu, şiddeti değişik derecede olan karaciğer hasarı ile karakterize olan bir hastalıktır. Hastalığa eğilimi olan bireylerdeki hazırlayıcı faktörler kesin belli olmamakla birlikte, içilen alkolün miktarı ve süresi en önemli sebeptir (48).

4.1.4.4. Siroz: Karaciğer sirozu, normal parenkim dokusunun kaybı, bağ dokusunun artışı, rejenerasyon nodüllerinin oluşması ve vasküler yapının bozulması ile karakterize, kronik, diffüz ve ilerleyici bir karaciğer iltihabıdır. Klinikte hepatosellüler yetersizlik ve portal hipertansiyon bulguları ile seyreden, öldürücü bir hastalıktır (40).

4.1.4.5. İlaça Bağlı Karaciğer Hastalıkları: İlaçlara bağlı hepatobiliyer hastalıklar denilince, kullanılan yüzlerce ilaç ve/veya toksik maddelere bağlı olarak meydana gelen ve değişik oranlarda hepatosellüler hasar ve/veya kolestaz bulgularının söz konusu olduğu, genellikle akut ancak bazen kronik olabilen patolojiler anlaşılmalıdır.

Hepatotoksitesi sık olan ilaçlar arasında halothan gibi anestetikler, psikotropik ve antikonvülsan (valporik asit, fenitoin) ilaçlar, trisiklik antidepresanlar, oral kontraseptif ve androjenik steroidler, kardiyovasküler ilaçlar, antihiperlipidemik ilaçlar, anti-tüberküloz ilaçlar, antibiyotikler, onkolojik ilaçlar sayılabilir (40).

4.1.4.6. Metabolik Karaciğer Hastalıkları: Hemokromatoz, Wilson hastalığı, α_1 -antitripsin eksikliği ve glukojenoz, metabolik karaciğer hastalıkları arasında sayılabilir.

4.1.4.7. Kolestatik Karaciğer Hastalıkları

4.1.4.7.1. Primer Biliyer Siroz: Primer biliyer siroz (PBS), kronik intrahepatik kolestaza yol açan başlıca semptomları sarılık, kaşıntı, hiperpigmentasyon, ksantoma, ksantelezma, hepatosplenomegali olan granümatöz bir karaciğer hastalığıdır (49). Karaciğer dokusundaki granümatöz

enflamasyon safra kanallarını tahrip ederken fibrozise yol açar ve zaman içerisinde siroz ve karaciğer yetmezliğine neden olur (50).

4.1.4.7.2. Primer Sklerozan Kolanjit (PSK): PSK tümüyle biliyer sistemi tutabilen, kronik kolestatik, diffüz inflamasyon ve fibrozis ile karakterli etiolojisi bilinmeyen, sonuç olarak biliyer siroz, portal hipertansiyon ve karaciğer yetmezliğine yol açan kronik kolestatik bir sendromdur (51).

4.1.4.8. Beslenmeye Bağlı Karaciğer Hastalıkları: Malnutrisyon; yağlı karaciğer, hepatik nekroz ve fibrozise neden olmaktadır. Klasik besinsel karaciğer hastalığı Kwashiorkor'dur, fakat diyabet, obezite ile alkolik ve alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı da besinsel karaciğer hastalığı kategorisine girmektedir. (35)

4.1.4.8.1. Alkolik ve Alkolik Olmayan Steatohepatit: Son yıllarda özellikle batı toplumlarında en çok rastlanılan karaciğer hastalığı yağlı karaciğer hastalığı (YKH) olup, sıklığı genel olarak % 15-20' lere ulaşır (52).

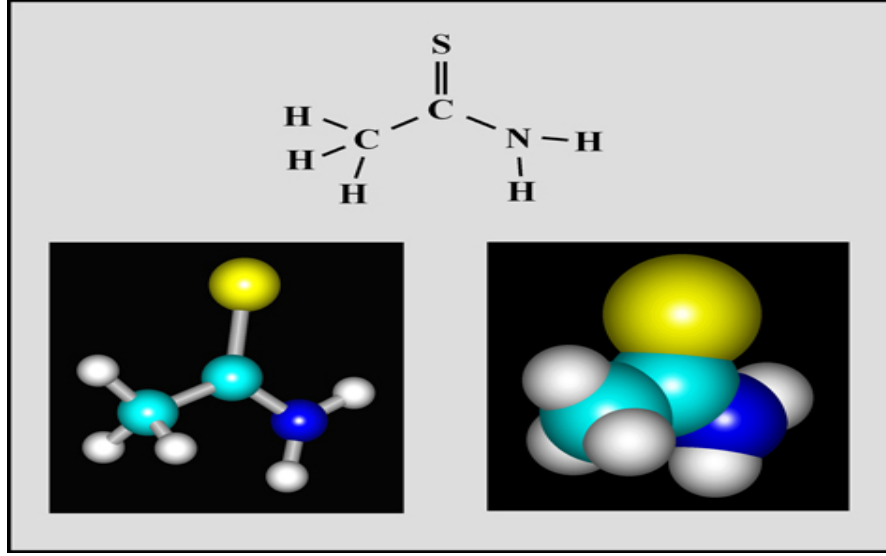
YKH, alkole bağlı yağlı karaciğer ve alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı olarak iki kısma ayrılır. Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı (NASH), hiç alkol almamış veya karaciğere zarar verecek miktarda alkol tüketimi olmayan bireylerde histolojik olarak makroveziküler yağlanmanın baskın olduğu geniş bir klinik tabloyu içeren bir hastalıktır (53, 54).

4.1.4.8.2. Reye Sendromu: Reye sendromu ensefalopati, kafa içi basınç artış sendromu ve karaciğerde yağlı dejenerasyonla karakterize olan ve 1963 yılında tanımlanan bu sendrom, influenza ve suçiçeği enfeksiyonları sırasında aspirin kullanan çocuklarda görülmektedir (55).

4.1.4.8.3. Diyabet: Tip 2 diyabet hepatomegaliye yol açar. Diyabetik hastaların yaklaşık %10 unda siroz oluşur. Alkol ve hepatit C den sonra tip 2 diyabet, karaciğer hastalıklarının en yaygın üçüncü nedenidir (35).

4.1.4.9. Hepatosellüler Karsinoma: Tüm dünyada HCC sıklığı yüksek olan tümördür. Asya ve Güney Afrika'da sıklık 100/100.000'dür. Avrupa ve ABD'de 100.000'de yıllık yeni hasta sayısı erkeklerde 3-4, kadınlarda 1-2'dir. HCC'un Asya kıtasında ve Afrika'daki sıklığı belirgin olarak yüksektir ve bu bölgelerdeki görülme sıklığı giderek artmaktadır. Bazı bölgelerde HCC tek başına en sık görülen abdominal tümördür (56).

4.2.TİYOASETAMİD (TAA)

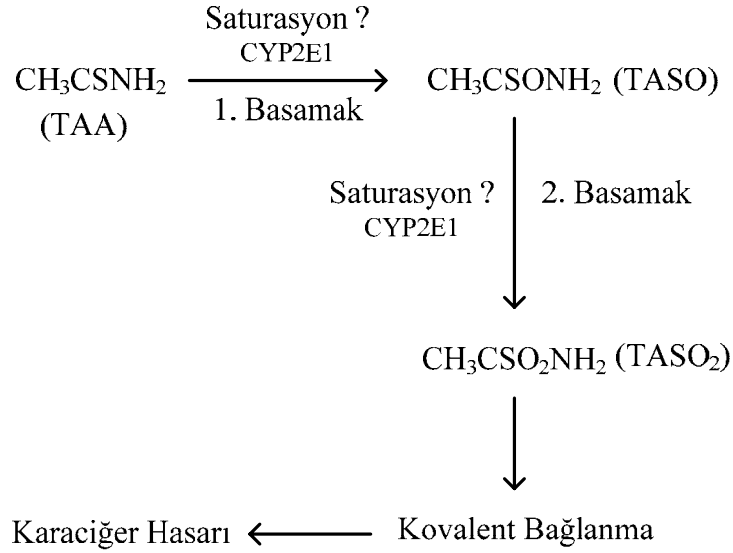


Şekil 2. Tiyoasetamidin yapısı (57).

TAA nekrojenik (58) ve kanserojen olan (59) thiono- sülfür içeren bir bileşiktir. Çoğunlukla hayvanlarda fulminant hepatik yetmezlik ve karaciğer sirozu (60,61) gibi deneysel modelleri oluşturmak için kullanılır (62). Hepatotoksik ajan olarak bilinen TAA ($\text{CH}_3\text{-C(S)NH}_2$) gerçekte mantar öldürücü (fungisit) olarak kullanılır. Deneysel çalışmalarda içme suyuyla birlikte düşük dozlarda verildiğinde kronik hepatiti takiben siroz meydana gelirken, öldürücü dozlarda verilmesi halinde karaciğerde şiddetli sentrilobüler nekroza neden olur (63,64). Uzun süreli alınması durumunda ise safra kanallarında proliferasyona ve viral hepatit enfeksiyonlarının neden olduğu sirozdakine benzer histopatolojik değişikliklere neden olur (64-68).

Tiyoasetamid thiono-sülfür içeren bir bileşiktir. TAA, NADPH ve sitokrom P 450 gerektiren mikrozomal monooksijenaz sistemi aracılığıyla yoğun metabolik işlemler sonucu (69) zararlı metabolitlerine dönüşüp hepatik

makromoleküllere kovalent bağlanması sonucunda karaciğerde hasara neden olurlar (64,70).



Şekil 3. Tiyoasetamidin karaciğer hasarına neden olduğu mekanizma (71).

Karaciğerde TAA önce CYP2E1 ile TAA sülfoksida metabolize olur. TAA sülfoksitte (TASO) ileri metabolizmalarla TAA S-dioksida (TASO₂) dönüşür. Karaciğerde asıl hasara neden olanda bu iki bileşiktir. TASO; hücre ölümü, mitokondriyal aktivitenin azalması, çekirdek volumü ve kalsiyum iyonunun hücre içi konsantrasyonunun artması, hücre zarı geçirgenliğinde değişiklikler gibi etkilere neden olur (72). TAA aynı zamanda flavin monooksijenaz 1 (FMO1) tarafından da metabolize edilir (73,74).

Yapılan çalışmalarda mikroskopik değerlendirmeler sonucu, tiyoasetamid (200 mg/kg) uygulandıktan dört saat sonra hepatik ödem olduğu, bunu takiben glikojen depolarının azaldığı ve altı saate yakın bir sürede de mitotik aktivitelerde histopatolojik değişimler olduğu bildirilmiştir (75). Ayrıca TAA verildikten üç ay

sonra karaciğerde fibrozis, rejeneratif nodüller ve ayrıca sirozun karakteristikleri olan portal hipertansiyon ve hiperdinamik sirkülasyon gözleendiği rapor edilmiştir (76).

TAA' in albumin, β -aktin, RNA polimeraz ve sitokrom P 450 monooksijenazı içeren birkaç gen ve proteinlerin salınımını etkilediği, aynı zamanda karaciğer hücrelerinde total mRNA' nın miktarını ve aktivitesini arttırdığı da gözlenmiştir (68,77).

TAA' in biyotransformasyonu esnasında hem flavin içeren monooksijenaz (FMO) (69) hem de sitokrom P450 sistemi (78) hidrojen peroksitein katalizlenmesiyle oluşan, superoksit anyonunu dioksijene çevirir. Böylece oksidatif hasarla ilişkili olarak karaciğerdeki bozulmalara öncülük eder. TAA verilmesini takiben karaciğer hücrelerinde tetraploit hücrelerin yok olduğu (79), MDA oluşumunun arttığı (80) ve glutatyonun azaldığı (81) görülmüştür. Serbest radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonunda TAA indüksiyonlu karaciğer fibrozisinin ilerlemesine neden olur.

TAA kronik olarak verildiği zaman ribozomal aktivitelere etki ederek pankreas ve karaciğerde protein sentezini inhibe eder. Sürekli olarak alınması durumunda çekirdekte genişlemelere ve nükleer RNA polimeraz aktivitesinde artışa neden olur (82).

TAA aynı zamanda pankreas (77) ve böbrekte (83) toksik etkilere neden olan bir bileşiktir. Başlıca karaciğerde metabolize olan TAA idrarla dışarıya atılır (84).

4.3. SERBEST RADİKALLER

4.3.1. Serbest Radikallerin Yapıları ve Kaynakları: Serbest radikaller dış yörüngelerinde bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron taşıyan elektrik yüklü veya yüksüz olabilen atom veya moleküllerdir. Çok reaktiftirler ve çevrelerindeki atom veya moleküllerle etkileşime girerek onlardan elektron almaya çalışırlar. Serbest radikaller organizmada hem normal metabolizmanın yan ürünü olarak hem de iyonlaştırıcı radyasyon, ilaçlar ve zararlı kimyasalların etkisi sonucunda ortaya çıkarlar (85). Diğer moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine giren bu moleküllere "oksidan moleküller" veya "reaktif oksijen türleri (ROS)" de denilmektedir (86).

Serbest radikaller hücrenin tüm fraksiyonlarında, membrana bağlı veya serbest halde bulunan pek çok enzimin katalizlediği reaksiyonlarla da oluşur. Memeli organizmasında serbest radikallerin çoğu oksijen ve azot kaynaklıdır, bu reaktif türlerinin listesi Tablo 1’de verilmiştir. Bu moleküllerin bir kısmı kendisi radikal olmakla beraber bir kısmında bazı reaksiyonlara katılıp radikallere dönüşebilme potansiyeline sahiptirler.

Tablo.1. Reaktif oksijen ve azot türleri (85)

Reaktif Oksijen ve Azot Türleri		
	Oksijen Türleri	Azot Türleri
Radikaller	Süperoksit radikali($O_2^{\cdot -}$) Hidroksil radikali(OH^{\cdot}) Peroksil radikali (LOO^{\cdot}) Alkoksil radikali (LO^{\cdot}) Hidroperoksil radikali (HO_2^{\cdot})	Nitrik oksit (NO^{\cdot}) Nitrojen dioksit (NO_2^{\cdot})
Radikal Olmayanlar	Ozon (O_3) Singlet oksijen (1O_2) Hidrojen peroksit (H_2O_2) Lipid hidroperoksit ($LOOH$) Hipokloröz asit ($HOCl$)	Nitröz asit (HNO_2) Nitrozil kation (NO^+) Nitrozil anyon (NO^-) Peroksinitrit ($ONOO^-$) Alkilperoksinitrit ($ROONO$)

Hücre içi serbest radikal oluşum mekanizmaları arasında; mitokondriyal elektron taşıma sistemi reaksiyonları, endoplazmik retikulumdaki karma fonksiyonlu oksidaz sistemi; sitoplazmada ksantin oksidaz, dopamin β -hidroksilaz, D-amino asit oksidaz, urat-oksidaz gibi enzimler; hücre zarında NADPH oksidaz, prostoglandin sentetaz ve lipoksijenaz enzimleri, peroksizomlarda ve lizozomlarda yer alan çeşitli metabolik reaksiyonlar yer almaktadır.

Tablo 2 . Hücrelerde serbest radikal kaynakları (87)

Hücrelerde Serbest Radikal Kaynakları	
Endojen Kaynaklar	Eksojen Kaynaklar
<ul style="list-style-type: none">• Mitokondriyal elektron transport zinciri• Mikrozomal elektron transport zinciri• Oksidan enzimler• Ksantin oksidaz• Indolamin dioksijenaz• Galaktoz oksidaz• Siklooksijenaz• Lipoksijenaz• Monoamin oksidaz• Fagositik hücreler• Nötrofiller• Monositler ve makrofajlar• Eozinofiller• Endotelyal hücreler• Otooksidasyon reaksiyonları (ör, Fe⁺²)	<ul style="list-style-type: none">• Redoks siklus bileşikleri (ör, paraquat)• İlaç oksidasyonları (ör, parasetamol)• Sigara• Güneş ışığı• Isı şoku• Okside glutatyon

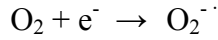
Serbest radikaller doğru yerde doğru zaman da ve doğru miktarlarda üretildikleri zaman yararlıdırlar. Fakat besinlerle yeterli antioksidanların alınmaması sonucu antioksidan savunmanın yetersiz kalışı, aktivite ve çevresel faktörlere bağlı olarak serbest radikallerin aşırı üretimi sonucu dengenin bozulması oksidatif strese yol açar. Hücrelerin yapısal bütünlüklerini koruyabilmeleri için antioksidanlar ve ROS gibi serbest radikaller arasındaki dengenin korunması esastır. Denge serbest radikaller yönüne kayacak olursa DNA, lipidler ve proteinler gibi biyolojik yapılar hasara uğrar (88).

Önemli biyolojik yapıların hasara uğraması kanser ve artrit gibi şiddetli dejeneratif hastalıkların etiolojisinde de rol oynar. Primer antioksidan savunma sistemi katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz gibi enzimleri, E ve

C vitaminlerini ve diğerk mikrobeseinleri (karatonoidler ve polifenoller gibi) içerir. Sekonder antioksidan savunma ise serbest radikal üretimine neden olan bölgeyi kesip çıkarmak veya onarmaktır (89,90).

4.3.2. Reaktif Oksijen Türleri: Canlı sistemlerde üretilen serbest radikallerin en önemlisi oksijenden türeyenlerdir. Normal fizyolojik koşullarda süperoksit radikali, hidroksil radikali ve H₂O₂ aerobik metabolizmanın ürünleri olarak sürekli üretilirler. Solunum zincirine giren oksijenin yaklaşık % 1-5 kadarı ROS üretimine yöneliktir (91,92).

4.3.1.1. Süperoksit Radikali (O₂^{-•}): Soluduğumuz oksijen iki radikalli, iki tek elektron içeren ve çok stabil olan bir moleküldür, bir dış enerji kaynağı sayesinde bir elektron kazanmakla serbest elektronlarından birisini negatif yük elde ederek çift konuma getirebilir. Bu molekül süperoksid anyonudur (O₂^{-•}) (93).



Süperoksit radikali kendisi direkt olarak zarar vermez. Bu radikal anyonun asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır (94).

4.3.1.2. Hidrojen Peroksit (H₂O₂): Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alınmasıyla veya süperoksitin bir elektron almasıyla peroksit molekülü oluşur. Peroksit molekülü de iki hidrojen atomu alarak hidrojen peroksiti oluşturur.



Biyolojik sistemlerde H₂O₂'nin üretimi O₂^{-•}'in dismutasyonu ile olur.



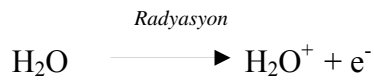
Bu dismutasyon, spontan olabildiği gibi superoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından da katalizlenebilir. H₂O₂ serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli rol oynar. Çünkü süperoksit ile reaksiyonu sonucunda, en reaktif ve en zararlı serbest oksijen radikali olan hidroksil radikalini oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılır. Bu reaksiyon “Haber-Weiss Reaksiyonu”dur. Demir katalizörlüğünde gerçekleşen ikinci şekline de “Fenton Reaksiyonu” denilmektedir (94).

4.3.1.3. Hidroksil Radikali (HO^{-•}): Hidroksil radikali çok reaktif bir radikaldir. Canlı hücrede hemen hemen bütün molekülleri (şeker molekülleri, proteinler, aminoasitler, DNA bazları ve doymamış yağ asitleri dahil tüm organik asitler) etkileyebilirler. 1934 yılında Haber ve Weiss, hidrojen peroksitin O₂ ile indirgenmesiyle hidroksil radikali oluşabileceğini göstermişlerdir:



İn vivo koşullarda hidroksil radikali meydana gelmesine neden olan önemli tepkimeler şunlardır:

- Radyasyonun suya etkisi ile;



- Fenton tepkimesi ile;



- Hidrojen peroksidin fotolizisi ile;

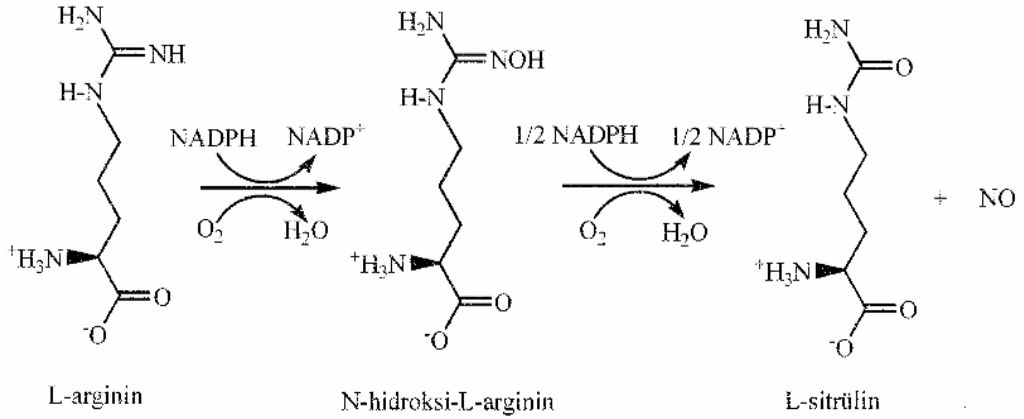


- Ozona elektron transferi ile $\text{HO}^- \bullet$ oluşabilir.
- Organik radikaller, H_2O_2 ile tepkimeye girerek $\text{HO}^- \bullet$ üretebilir.



4.3.3. Reaktif Azot Türleri: NO; suda ve yağda çözünebilen, çözelti içinde yarılanma ömrü 30 saniye olan, kolaylıkla nitrit (NO_2^-) ve nitrata (NO_3^-) dönüşebilen renksiz, stabil bir gazdır. Yağda çözünebilme özelliği sayesinde hücreler arasından kolaylıkla difüze olabilmektedir (96-98).

NO çeşitli enzimler tarafından farklı dokularda NADPH varlığında L-arjininden sentezlenir. Sentez nitrik oksit sentetaz (NOS) tarafından gerçekleştirilir. NOS kaynak aldığı dokuya göre farklı olarak isimlendirilir. Endotelyumda bulunan eNOS, santral sinir sisteminden köken alan nNOS, makrofajlar tarafından indüklenen ise iNOS adını alır (99).



Şekil 4: Nitrik oksidin L-arjininden sentezi (100)

NO, çiftleşmemiş elektron özelliği ile bir serbest radikaldir, bundan dolayı süperoksit gibi diğer radikallerle son derece reaktiftir (101).

NO, diğer pek çok radikallere oranla daha dengeli olmasına rağmen, oksijen, süper oksit radikali ve hidrojen peroksit ile reaksiyona girerek sonuçta sırasıyla NO₂, peroksinitrit (ONOO⁻) ve nitrat/nitrit (NO₃/NO₂) oluşturma eğilimine sahiptir (102).

NO sempatik sinir teminallerinden norepinefrin algılanmasını inhibe etmesiyle ve güçlü bir konstrüktör peptid olan endotelin-1 inhibisyonu ile düz kas içindeki cGMP'yi arttırarak koroner ve pulmoner tonusu ayarlar (103).

Diğer serbest radikaller her konsantrasyonda hücreler için zararlı iken NO düşük konsantrasyonlarda çok önemli fizyolojik işlevlerde rol almaktadır. Ancak aşırı ve kontrolsüz NO sentezi hücreler için zararlı olmaktadır. NO bu özellikleri ile çok ideal bir fizyolojik haberci molekülü olma özelliği kazanmaktadır (104).

NO, bakteri, parazit, tümör gibi yabancı hücreler üzerine sitotoksik ve sitostatik etkisi vardır (105).

NO, damar duvarından girişi kolaylaştırarak ve endotelial yüzeyde inflamatuvar hücreleri kendine çekerek “sitokinler” adıyla tanıdığımız hücresel adezyon moleküllerinin sentezine engel olarak antiinflamatuvar özellik gösterir (106,107).

4.3.4. Serbest Radikallerin Etkileri: Serbest radikaller, hücrelerin lipid, protein, DNA, karbohidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler. Mitokondrideki aereobik solunumu ve kapiller permeabiliteyi bozar, hücrenin potasyum kaybını ve trombosit agregasyonunu arttırırlar.

4.3.4.1. Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri: Biyomoleküllerin tüm büyük sınıfları serbest radikaller tarafından etkilenirler, fakat lipidler en hassas olanıdır. Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest

radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Poliansatüre yağ asitlerinin (PUFA) oksidatif yıkımı, lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü kendi kendine devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerlerler. Lipid peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür.

Lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan bir serbest radikal etkisi sonucu membran yapısında bulunan poliansatüre yağ asidi zincirinden bir hidrojen atomu uzaklaştırılması ile başlar. Bunun sonucu yağ asidi zinciri bir lipid radikali niteliği kazanır. Oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Molekül içi çift bağların pozisyonlarının değişmesiyle dien konjugatları ve daha sonra lipid radikalinin, moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipid peroksil radikali meydana gelir. Lipid peroksil radikalleri, membran yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksidlerine dönüşürler. Böylece olay kendi kendine katalizlenerek devam eder. Lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve indirek olarak reaktif aldehidler üreterek diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece birçok hastalığa ve doku hasarına neden olur. Lipid radikallerinin hidrofobik yapıda olması yüzünden reaksiyonların çoğu membrana bağlı moleküllerde meydana gelir. Membran permeabilitesi ve mikroviskositesi ciddi şekilde etkilenir. Peroksidasyonla oluşan malondialdehid membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna sebep olur. Bu da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir.

4.3.4.1.2. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri: Proteinler serbest radikallere karşı poliansatüre yağ asitlerinden daha az hassastırlar. Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme derecesi aminoasit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Bu etki sonucunda özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller oluşur.

4.3.4.1.3. Serbest Radikallerin DNA'ya Etkileri: İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Hidroksil radikali (OH^\bullet) deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit (H_2O_2) membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. Süperoksit ($\text{O}_2^{\bullet-}$) maruz kalan DNA molekülleri hayvanlara enjekte edildiklerinde daha fazla antijenik özellik gösterirler ki bu oldukça önemli bir etkidir.

4.3.4.1.4. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri: Serbest radikallerin karbonhidratlara etkisiyle çeşitli ürünler meydana gelir ve bunlar, çeşitli patolojik süreçlerde önemli rol oynarlar.

Diyabet ve diyabet komplikasyonlarının gelişimi, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, psöriyazis, romatoid artrit, Behçet hastalığı, çeşitli deri ve göz hastalıkları, kanser gibi birçok hastalıkta ve yaşlılıkta serbest radikal üretiminin arttığı, antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz olduğu gösterilmiştir.

Ancak bu hallerde serbest radikal artışının sebep mi yoksa sonuç mu olduğu tam olarak bilinmemektedir (94).

4.3.5. Reaktif Oksijen Metabolitlerinin Yararlı Etkileri: Birçok hastalığa neden olabilen reaktif oksijen metabolitleri, organizmada birçok fizyolojik olayda yer almaktadır. Reaktif oksijen partiküllerinin olduğunun düşünülmesine yol açan en önemli olay fagositozdur. Fagositoz yapan hücreler olan nötrofillerin yapısında çok loblu çekirdek ile çeşitli enzimleri ve proteinleri içeren primer, sekonder ve tersiyer granüller bulunmaktadır. Doku hasarında gelişen akut inflamatuvar yanıt; bölgesel arteriollerde genişlemeye neden olarak kızarıklık, ödem ve sıcaklık artışına yol açmaktadır. İnflamasyon sonrasında bölgeye ulaşan nötrofiller, makrofajlara dönüşmektedir. Makrofajların endotele yapışması ve endoteli geçerek dokuya girmesinde selektinler, kemokinler, ve integrinler etkili olmaktadır. Fagositozun başlangıcında makrofajların oksijen alımları normalin 10-20 katına kadar artmakta ve mitokondrial solunumda kullanılmayan fazla miktardaki oksijen, solunum patlamasına yol açmaktadır. Aynı anda pentoz fosfat yolunun aktivitesinin artışına bağlı olarak hücreye alınan glukoz miktarı da artmaktadır. Bu şekilde ortamdaki oksijeni alan nötrofiller anaerob bakterilerin ölmesine yol açmaktadır. Lizozomal granüllerde bulunan bazı proteinler proteaz gibi etki ederek bakteri hücre membranındaki proteinleri parçalamakta ve bakterileri öldürmektedir. Fagositozun normal olduğu kronik granülomatozda solunum patlaması olmamakta ve bu nedenle sık sık tekrarlayan enfeksiyonlar görülmektedir. Ayrıca nötrofiller yapılarındaki NADPH oksidaz ile oksijenden süperoksid radikali oluşmaktadır.



Bazı bakteriler için doğrudan öldürücü olabilen süperoksit radikali, fagositik vakuolde süperoksit radikalinden H₂O₂ oluşturabilmektedir



Asidik pH oluşmasına bağlı olarak miyeloperoksidaz ve hidrolitik enzim aktiviteleri artmakta ve membranı kolayca geçen H₂O₂ bakteriye toksik etki yapmakta veya hidroksil radikaline (OH[•]) dönüşmektedir. Bu tepkimede hipokloröz asit (HOCl) yer almaktadır. H₂O₂ ile miyeloperoksidaz klor (iyod) iyonlarını hipokloröz aside dönüştürmektedir. Çok reaktif olan hipokloröz asit birçok biyolojik molekülü oksitlemektedir.



4.4. ANTİOKSİDANLAR

ROS'ların oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta bazı savunma mekanizmaları geliştirilmiştir. Bunlar 'antioksidan savunma sistemleri' olarak bilinirler.

Antioksidan moleküller endojen ve eksojen kaynaklı yapılar olup, oluşan oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı hem hücre içi hem de hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirilirler. Hücre dışı savunma, albümin, bilirubin, transferrin, seruloplazmin, ürik asit gibi çeşitli molekülleri içermektedir. Hücre içi serbest radikal toplayıcı enzimler asıl antioksidan savunmayı sağlamaktadır. Bu enzimler süperoksit dismutaz, glutatyon-S-transferaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, katalaz ve sitokrom oksidazdır. Bakır, çinko ve selenyum gibi eser elementler ise bu enzimlerin fonksiyonları için gereklidir (109).

4.4.1. Doğal Antioksidanlar

4.4.1.1. Enzimatik Antioksidan Savunma Sistemleri

4.4.1.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD): Oksijeni metabolize eden bütün hücrelerde bulunan SOD, süperoksidin hidrojen perokside dismutasyonunu katalizleyen bir metalloenzimdir.



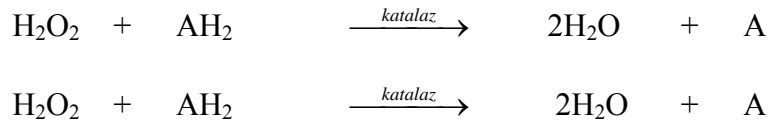
Bu güne kadar dört farklı şekilde bulunmuştur. Ökaryotik hücrelerin sitozolü ile mitokondri membranları aralığında bulunan ve molekül kütlesi 31.2 kDa olan enzim, her bir dimerik protein için birer molekül bakır ve çinko içermektedir. Çinkonun stabiliteyi sağladığı ve bakırın ise aktiviteden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Çinko tersinmez, bakır ise tersinir olarak yapıdan ayrılmaktadır. Bu enzimin önemli örneği sığır ve insan eritrositlerinde bulunan

eritrokupreindir. Rat karaciğerinde primer olarak sitoplazmik yerleşimli olduğu gösterilen CuZn-SOD, mitokondri ve peroksizomlarda ise eser miktarlarda bulunmaktadır. Lizozomlarda saptanan CuZn-SOD ise sitoplazmadan geçmektedir.

Diğer iki SOD tipi her bir molekülüne başına iki adet manganez içermektedir. Bu enzimlerden biri mitokondria matriksinde (75kDa), diğeri ise *E Coli* gibi bakterilerin sitozolünde (40kDa) bulunmaktadır. CuZn-SOD siyanür ile inhibe olmakta, Mn- SOD ise inhibe olmamaktadır.

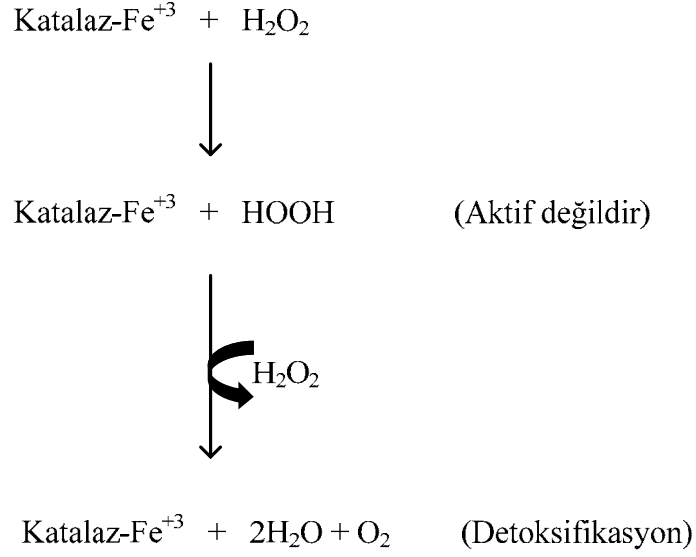
Demir içeren ve *E Coli* periplazmik aralığında bulunan VI. Tip SOD(40kDa), yapısal olarak Mn-SOD ile büyük benzerlikler göstermektedir.

4.4.1.1.2. Katalaz (CAT): Yapısal olarak bir hemoprotein olan katalazın molekül kütlesinin 248 kDa olduğu ve kovalent olmayan bağ ile bağlı protoporfirin IX Fe(hem) grubu içerdiği ortaya konulmuştur. Kan, kemik iliği, mukoz membranlar, karaciğer ve böbrekte yüksek miktarlarda bulunmaktadır. Düşük hızlarda hidrojen peroksidin olduğu durumlarda veya ortamda yüksek miktarda elektron alıcısı bulunduğunda peroksidatif, hidrojen peroksid oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda ise katalitik tepkimeyle hidrojen peroksidi suya dönüştürerek ortamdaki uzaklaştırmaktadır.



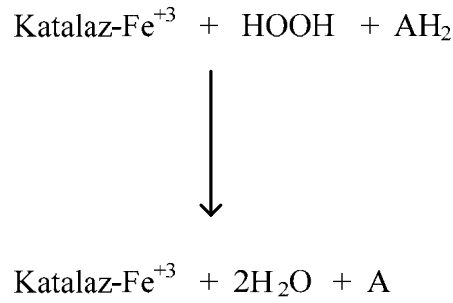
Şekil 5. H₂O₂ konsantrasyonuna bağlı olarak katalazın katalizlediği tepkimeler.

Enzimler arasında en yüksek katalitik dönüşüm hızına sahip olduğu bilinen katalazın aktivitesi için demir gerekmektedir. Aktif kısmı olan Fe^{+3} protoporfirinini iki fonksiyonel döngüsü bulunmaktadır.



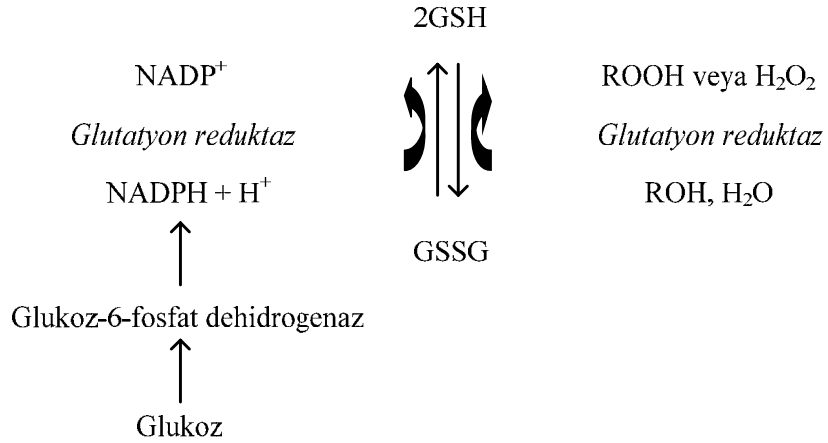
Şekil 6. Katalazın fonksiyonel döngüleri.

Ortamda H_2O_2 düzeyi çok düşük olduğunda aktif olmayan enzim bileşiği ile elektron alıcısı tepkimeye girmektedir.



Şekil 7. Düşük H_2O_2 konsantrasyonunda katalaz etkisi.

4.4.1.1.3. Glutasyon Redüktaz ve Glutasyon Peroksidaz: Glutasyon peroksidaz glutayon ile hidrojen peroksid veya lipid peroksidlerinin indirgenmesinde glutayon redüktaz ise glutatyonda oluşan disülfid bağının tekrar sülfidril yapısına indirgenmesinde görev yapmaktadır.



Şekil 8. Glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktaz tepkimeleri

Glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptid olan glutasyon (γ -glutamilsisteinilglisin), indirgenmiş (GSH) ve yükseltgenmiş (GSSG) şeklinde bulunmaktadır.

Hücresinin yükseltgenme ve indirgenme dengesini koruyan önemli bir indirgen ve antioksidan olan glutasyon, hücreleri endojen ve eksojen kaynaklı oksidanların zararlı etkilerinden korumaktadır. Proteinlerdeki $-\text{SH}$ gruplarının korunması ve amino asitlerin hücre içine taşınmasında rol oynamaktadır. Glutasyon (GSH) selenyum içeren glutasyon peroksidaz ile yükseltgenmektedir (GSSG). Glutasyon sentezi iki enzim (γ -Glutamilsistein sentaz ve glutasyon sentataz) ile gerçekleşmektedir (108).

4.4.1.1.4. Glutasyon: Karaciğerde yoğun konsantrasyonlarda bulunan, karaciğer için özgül nitelikte olan bir antioksidandır. Proteinlerin yapısındaki sülfidril gruplarını indirgeyerek pek çok enzim ve proteinin aktivasyonunu sağlayan GSH, serbest radikallerle reaksiyona girip hücreleri oksidatif strese karşı korur (110).

4.4.1.2. Enzimatik Olmayan Antioksidan Savunma Sistemleri

4.4.1.2.1. Metal İyonlarının Etkisizleştirilmesini Sağlayan

Antioksidanlar: Bu grupta metal iyonlarını bağlayarak elektron transferini engelleyen bileşikler bulunmaktadır.

Tablo 3. Metal iyonlarını bağlayan bileşikler

Metal İyonlarını Bağlayan Bileşikler	
Demir Bağlayan Bileşikler	Transferin, Laktoferrin, Ferritin
Bakır Bağlayan Bileşikler	Seruloplazmin, Albumin
Hem Proteinleri	Hemoglobin, Haptoglobulin, Hemopeksin
Diğerleri	Metallotioneinler

4.4.1.2.2. In vivo Sentezlenebilen Düşük Moleküler Ağırlıklı Antioksidanlar

Tablo 4. Düşük Molekül Ağırlıklı Antioksidanlar.

Düşük Molekül Ağırlıklı Antioksidanlar	
Ürik asid	O ₂ ^{·-} , OH [·] ve peroksit radikal tutucusu
Ubikinon (koenzim Q)	Serbest radikal tutucusu
Bilirubin	Peroksil radikali ve singlet oksijeni yok etmektedir.
α- Keto asidler	Pirüvat ve α- ketoglutarat H ₂ O ₂ ile nonenzimatik tepkimeye girmektedir.
Cinsiyet hormonları	Dişi cinsiyet hormonları (östradiol, östron ve östriol) lipid peroksidasyonunu inhibe etmektedir.
Melatonin	Antioksidan enzim sentezini uyarmaktadır.
Lipoik Asid	
Melaninler	Melanin polimerleri yapılarındaki eşlenmemiş elektronlar ile uv radyasyonun absorbe edilmesini sağlamaktadır.
Histidin içeren dipeptidler	Bakır iyonlarını şelatlayan karnozin, homokarnozin, ve anserin lipid peroksidasyonunu önlemektedir.
Tiyol içerenler (Glutasyon, N-asetilsistein, metilyonin, kaptoril)	Serbest radikal ve HOCl tutucusu

4.4.1.2.3. Diyetle Alınan Düşük Moleküler Ağırlıklı Antioksidanlar: E

vitamini ve analogları lipid peroksidasyon zincirini kırmaktadır. Süperoksit radikali (O₂^{·-}) ve hidroksil radikali (OH[·]) tutucusu olan C vitamini, E vitaminini rejenere etmektedir. Hücre büyümesi, farklılaşması ve görme için esansiyel bir vitamin A vitamini peroksiller üzerine doğrudan etkili olmaktadır.

4.4.1.2.4. Karotenoidler ve Fenolik Yapılar: Karotenoidler A vitamini

öncülüdürler. Epikateşin (yeşil ve siyah çay), kateşin (kırmızı şarap), kamferol (brokoli, greyfurt ve siyah çay), kuarsetin (soğan, brokoli, çilek), antosiyaninler

(renkli meyveler, kırmızı şarap, çilek, vişne), kafeik asit (zeytin ve kahve) gibi bazı bitkisel fenolik maddeler diyetle bulunmaktadır. Fenollerin LDL oksidasyonunu önlediği de gösterilmiştir.

4.4.2. İlaçlar: Bazı ilaçların antioksidan etkileri vardır. Bunlar Tablo 5’de gösterilmiştir.

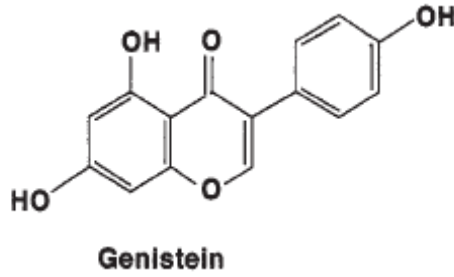
Tablo 5. Antioksidan ilaçlar (108)

Antioksidan İlaçlar
Rekombinant-SOD
21-Aminosteroidler
Sitokinler
Mannitol
Trimetazidin
Ebselen
Demir şelatörleri (deferroksamin, dimetil tiyoüre)
Ksantin oksidaz (allopurinol, oksipurinol)
Barbitüratlar
İndapamid
H ₂ reseptör blokerleri

4.4.3. Antioksidan Olarak Genistein: Fitoöstrojenler yapısal olarak insan östradiolüne benzeyen östrojenik ve/veya antiöstrojenik etkilere sahip bitkisel orjinli kimyasallardır (111). Fitoöstrojenlerin büyük bir kısmı flavonoidler adı verilen fenol grubu içeren bileşiklerden oluşmaktadır (112). Flavonoidler; flavanol, flavanone, flavonol, flavone, izoflavonlar, anthocyanidinler olmak üzere altı gruba ayrılırlar. Flavonoidler süperoksit, alkoksil, peroksil ve nitrik oksit gibi radikalleri temizleme, demir ve bakır şelasyonu, α - tokoferol rejenerasyonu gibi fonksiyonlarının yanı sıra; vazodilatatör, immünstimulan, antiallerjik, östrojenik,

antiviral etkileri de sahiptirler. Fosfolipaz-A₂, siklooksijenaz, lipooksijenaz enzimlerinin inhibisyonu sonucunda antiinflamatuvar özellikler de gösterirler. Ayrıca, ksantin oksidaz, glutatyon redüktaz, NADH-oksidad ve protein kinaz enzimlerini inhibe ettiklerine gösteren bilgiler de mevcuttur (113).

İzoflavonların en önemli kaynağı diyetle alınan soya fasülyesi ve soya ürünleridir. İzoflavonlar arasında en iyi bilinenler genistein, daidzein ve glisiteindir (114). Genistein (4',5,7,-trihidroksiizoflavon), anti-oksidad, anti-tümör ve anti-inflamatuvar özellikleri bulunan, izoflavon yapıda bir fitoöstrojen olarak bilinir (115).



Şekil 9- Genistein'in (4',5,7,-trihidroksiizoflavon) yapısı

Hayvanlardaki biyolojik östrojenlere benzer yapılarından dolayı, östrojen reseptörlerine bağlanabilirler. Böylece ya hücre çoğalmasına neden olurlar ya da potansiyel östrojen bağımlı antagonistik aktivitelerine dayanarak kanser hücrelerinin hormona bağı gelişimini önlerler. Genistein ve daidzeinin yapılarının birbirlerine çok benzemelerine rağmen östrojen reseptörlerine (ER) bağlanabilme kapasiteleri birbirlerinden farklıdır (116). Kuipfer ve arkadaşları, östradiolle mukayese edildiğinde genisteinin ER- α ' ya % 4, ER- β 'ye ise % 87 daha fazla bağlanma ilgisi olduğunu belirtmişlerdir. Yine bu oranın daidzein de ER- α ' da % 0,1 ve ER- β 'de % 0.5 olduğu rapor edilmiştir. Bağlanma affinitelerindeki bu

farklıklar genistein ve daidzeinin kanser hücrelerinde farklı biyolojik aktiviteye sahip olabilecekleri fikrini vermiştir (117).

Diğer izoflavonlarla birlikte alım ve sindirimden sonra, genistein barsak enzimleri vasıtasıyla metabolize edilerek glikozitlerle birlikte konjuge edilir. İnsanlarda genistein, dihidrogenistein ve 6' hidroksi-O-dezmetilangolensin olarak metabolize edilir. Çeşitli ölçüm metodları kullanılarak genisteinin ve metabolitlerinin plazmada, prostatik sıvılarda, meme aspirasyon ve kist sıvılarında, idrarda ve gaitada buldukları tespit edilmiştir (118,119).

4.4.3.1. Genisteinin Biyokimyasal Özellikleri: Genisteinin en önemli biyokimyasal etkisi, kanseri önleyici bir bileşik olmasıdır. Daha önce de belirtildiği gibi genistein, bir fitoöstrojen olup, ER bağlanma açısından 17- β -östradiolle yarışmaktadır. Çünkü yapı olarak 17- β -östradiole benzemektedir. Bununla beraber genisteinin konsantrasyonlara bağlı olarak hem agonistik hemde antagonistik etkileri vardır. Genisteinin $\leq 1 \mu\text{M}$ konsantrasyonlarda östrojene bağımlı meme kanser hücrelerini uyarıp bir agonist gibi etkisi olduğunu gösteren çalışmalar vardır. $5 \mu\text{M} \geq$ konsantrasyonlarda ise bir anti östradiol olan tamoksifenle kullanıldığında ise 17- β -östradiolle uyarılmış hücre çoğalmasını engellediği gözlenmiştir. Yapılan deneysel çalışmalarda genisteinin östrojen veya androjen reseptörü hem negatif hemde pozitif olan meme ve prostat kanser hücrelerinde büyümeyi inhibe ettiği rapor edilmiştir. Özellikle östrojen kaynaklı meme kanser hücrelerinin büyümesini engellediği görülmüştür (116).

Genistein stresle ilişkili genlerin ekspresyonunu inhibe ederek ve organizmadaki serbest radikalleri temizleyerek reaktif oksijen metabolitlerine karşı hücreleri koruyarak antioksidan etki gösterirler (120,121).

Yapılan çalışmalarda genisteinin hücrenin canlılığı açısından önemli olan NF- κ B ve Akt sinyal yolunda güçlü bir inhibitör olduğu bulunmuş ve burada apoptozis yoluyla yaptığı görüşüne yer verilmiştir.

4.4.3.2. Genisteinin Kanser Hücreleri Üzerine Etkileri: Genistein, protein tirozin kinaz (PTK) inhibitörü olarak bilinen bir bileşiktir. PTK, karsinogenez, hücre büyümesi ve apoptozisde önemli roller oynayan bir enzimdir. Genisteinin hücre proliferasyonunun ve onkogenezinin potansiyel bir inhibitörü olduğu, yine yapılan deneylerle lösemi, lenfoma, nöroblastoma, mide, meme ve prostat kanser hücrelerini içeren kanser türlerinde de inhibitör görevi üstlendiği rapor edilmiştir (122).

4.4.3.3. Hücre Döngüsünün Düzenlenmesi Üzerine Etkileri: Genistein hücre döngüsünü engellemesinden dolayı kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ederek hücre çoğalmasını engeller. Genisteinin meme, gastrik adenokarsinoma ve insan melanoma kanser hücrelerinde G2/M hücre döngüsünü engellediği yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (123,124). Fare fibroblast ve melanom hücrelerinde yapılan çalışmalarda da hücre döngüsündeki G0/G1 fazının genistein tarafından engellendiği ortaya konulmuştur (125).

4.4.3.4. Genisteinin Apoptozisi İndüklemesi: Genisteinin hücre siklusu üzerine olan etkilerine ek olarak, programlı hücre ölümü olarak bilinen apoptozis üzerine de etkileri vardır. Laboratuvarlarda yapılan çalışmalarda MDA-MB-231, MDA-MB-435 ve MCF-7 meme kanser hücrelerinde, PC3 ve LNCaP prostat kanser hücrelerinde, H460 ve H322 küçük hücreli olmayan akciğer kanser hücrelerinde ve HN4 baş ve boyun skumöz karsinoma hücrelerinde apoptozisi uyardığı gösterilmiştir (126-129).

4.4.3.5. Genisteinin NF-κB (nükleer transkripsiyon faktör)

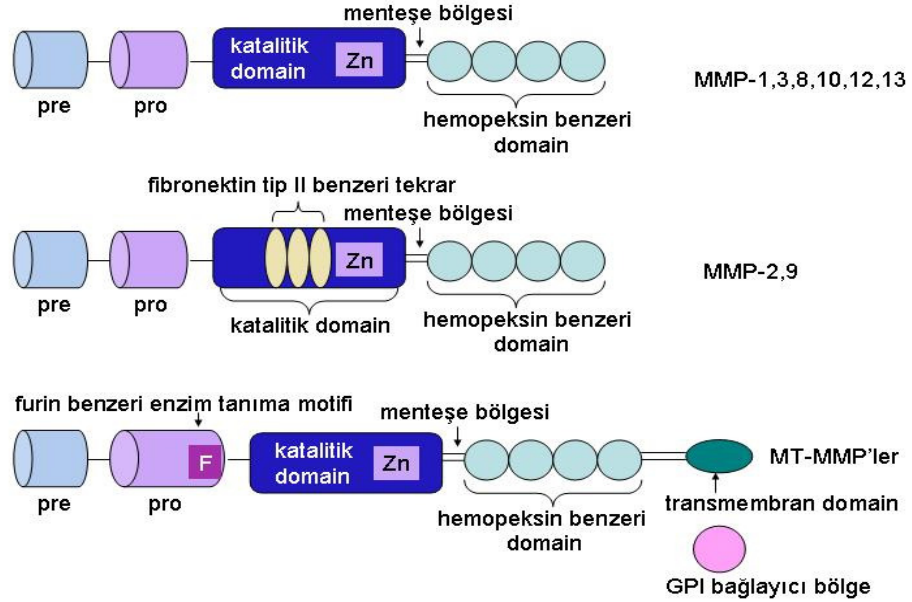
İnhibisyonuna Etkisi: Hücre büyümesi ve çoğalmasında ortaya çıkan anahtar basamaklardan biri, genlerin transkripsiyonudur. Hücrelerde gen transkripsiyonun başlangıç ve düzenlenmesinde transkripsiyon faktörleri önemli rol oynarlar. Bu faktörlerden biriside NF-κB (nükleer transkripsiyon faktör)'dir. NF-κB immün ve inflamatuvar yanıt, hücre adezyonu, hücre çoğalması gibi olaylarda oluşan çok sayıdaki genleri kontrol eder. Genistein, NF-κB 'in DNA'ya bağlanma aktivitesini düşürerek etki eder. Bunun yanında toksik ajanlarla birlikte verildiğinde NF-κB' inaktive olmasını da engeller (116).

4.4.3.6. Anjiyogenezis ve Metastaz İnhibisyonu Üzerine Etkileri:

Genisteinin potansiyel olarak invaziv ve metastatik kanser hücrelerini azalttığına ilişkin çalışmalar mevcuttur. Kanser ilerlemesinde ve uzak bölgelere yayılımında birkaç genin sorumlu olduğu bildirilmiştir. Bu anahtar moleküllerden birisi c-erbB-2' dir. c-erbB-2' nin yüksek seviyelerde salınımı ile meme, yumurtalık, akciğer ve prostat kanser hücrelerinin invazyon ve metastazı arasında pozitif bir korelasyon bulunmuştur (130).

4.5. METALLOPROTEİNAZLAR

4.5.1. Matriks Metalloproteinazlar



Şekil 10. MMP enzimlerinin moleküler yapısı (131, 132)

Matriks metalloproteinazlar, ekstrasellüler matriksin birçok komponentini yıkma yeteneğine sahip çinko içeren büyük bir enzim grubu olarak tanımlanır. MMP' ların genel özellikleri, aktif olabilmeleri için katalitik bölgelerinde çinko içermeleridir ve sentezleri inaktif zimojenler gibidir (133).

MMP dokunun tamirinde ve gelişmesinde önemli bir yere sahiptir. Normal olarak MMP' lar yalnızca, plasenta gelişimi esnasında endometriyal stroma içerisinde, trofoblast invazyonu, kemikleşme esnasında kıkırdaktan kemiğe geçiş, rahim ve meme involüsyonu, yara iyileşmesi, embriyonik gelişim süreci gibi çeşitli birbirini takip eden süreçlerde, dokuların biçiminin değişimi gibi durumlarda ne zaman ve nerede ihtiyaç olursa ortaya çıkan yapılardır. Bununla

birlikte, çeşitli MMP'ların da patolojik olarak, periondontitis, romatoid atrit ve tümör hücre invazyonu ve metastazı gibi çeşitli durumlarda ortaya çıktığı bilinmektedir (134).

İnsan MMP gen ailesi, primer yapı ve substrat özelliklerine göre;

1. Kolojenazlar: (MMP-1, MMP-8 ve MMP-13)

2. Jelatinazlar: (MMP-2, MMP-9)

3. Stromelizinler: (MMP-3, MMP-7, MMP-10, MMP-11, MMP-12)

4. Membran tipi metalloproteinazlar: (MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP ve MT4-MMP).

5. Sınıflandırılması yapılmamış MMP' lar olarak beş grupta incelenir (135).

5. MATERYAL ve METOD

5.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Grupların Oluşturulması

Çalışmada kullanılacak olan ratlar, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezinden etik kurul onayı alındıktan sonra temin edilerek çalışma başlatıldı. Bu çalışmada ağırlıkları ortalama 250 gram olan 42 adet Sprague-Dawley cinsi erkek rat kullanıldı. Ratlar bir grupta 7 tane olmak üzere toplam 6 grup halinde işleme tabi tutuldu. Ratlar 22±1 °C sıcaklık ve 12 saat gün ışığı gören ortamdaki kafeslerde etik kurallara uygun olarak muhafaza edildi. Hayvanların beslenmesinde, standart pellet yemi ve çeşme suyu kullanıldı. Tüm deney süresince ratların kiloları takip edildi.

Genistein (Bonistein, DSM, Switzerland) 100 mikrolitre DMSO (%1.25) ve PEG-400 (% 98.75) karışımında çözümlenerek hazırlandı ve ratlara subkutanöz yoldan uygulama yapıldı (136).

Tiyoasetamid TAA (Sigma-Aldrich Chemical Co. USA) de literatüre uygun olarak 12 hafta boyunca haftada iki kez 200 mg/kg olacak şekilde hazırlanıp intraperitoneal olarak uygulandı. Bu maddenin hazırlanmasında çözücü olarak distile su kullanıldı (137).

1. Grup DMSO (Dimetil Sülfoksit): Bazal diyet+12 hafta boyunca günlük subkutanöz. olarak % 1.25 DMSO verildi.

2. Grup TAA (Tiyoasetamid): Bazal diyet+12 hafta boyunca haftada iki kez 200 mg/kg intraperitoneal olarak tiyoasetamid verilerek karaciğer hasarı oluşturuldu.

3. Grup DDG (Düşük Doz Genistein): Bazal diyet+12 hafta boyunca günlük 0.2 mg/kg b.w. subkutanöz olarak genistein verildi.

4. Grup DDG+TAA (Düşük Doz Genistein+Tiyoasetamid): Bazal diyet+12 hafta boyunca, günlük 0.2 mg/kg b.w subkutanöz olarak genistein+haftada iki kez 200 mg/kg intraperitoneal olarak tiyoasetamid verilerek karaciğer hasarı oluşturuldu

5. Grup YDG (Yüksek Doz Genistein): Bazal diyet + 12 hafta boyunca günlük 0.4 mg/kg b.w. subkutanöz olarak genistein verildi.

6. Grup YDG+TAA (Yüksek Doz Genistein+TAA): Bazal diyet+12 hafta boyunca günlük 0.4 mg/kg b.w. subkutanöz olarak genistein + haftada iki kez 200 mg/kg intraperitoneal olarak tiyoasetamid verilerek karaciğer hasarı oluşturuldu.

5.2. Kullanılan Araçlar

Çalışma esnasında kimyasal analizler için aşağıda gösterilen aletler kullanıldı:

Ultra Turrax T25 Basic homojenizatör (Almanya), LKB Biochrom Ultraspec Plus 4054 uv/visible marka spektrofotometre (Cambridge- İngiltere), Rotina 46R marka santrifuj (Almanya), Sartorius AG BP 310 S marka hassas terazi (Almanya), Kötterman Labortechnik marka benmari (Almanya), Hanna Instruments HI 8521 marka pH metre ve Labinco BV L 46 marka vorteks (Hollanda) kullanıldı.

5.3. Kan ve Doku Örneklerinin Elde Edilmesi ve Analizlere Hazırlanması: Deney protokolünün 12. haftası tamamlandıktan sonra ratlar genel anestezi altında sakrifiye edildi. Sıçanlara 75 mg/kg ketamin ve 5mg/kg ksilazin periton içine uygulanarak genel anestezileri yapıldı. Kalp atımı devam eden sıçanların karın derisi ve deri altı dokuları açılarak, barsaklar dışarı alındı.

Enjektörle kalplerinden biyokimyasal analizler için yaklaşık 5 ml kan örnekleri alındı. Toraks boşlukları makasla ile kesilerek karaciğer dokuları doku bütünlüğü bozulmadan çıkartıldı. Çıkartılan karaciğer dokusu serum fizyolojik ile yıkanarak sağ ve sol loblara ayrıldıktan sonra sağ lob % 10' luk formaldehit çözeltisine konularak patolojik incelemeler için ayrıldı. Sol lob biyokimyasal analizlerde kullanılmak amacıyla dört eşit parçaya bölündükten sonra alimünyum folyaya sarılarak etiketlenip biyokimyasal analizlerinin yapılacağı güne kadar -70 °C' de muhafaza edildi.

Alınan kan örnekleri ise EDTA' lı ve normal biyokimya tüplerine konularak bekletilmeden 3500 rpm de 10 dk santrifüj edildi. Üstte kalan plazma ve serum örnekleri eppendorf tüplere alındı. Lökosit tabakası otomatik pipetle uzaklaştırıldı. Dipte kalan eritrositler üç kez fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkayıp her defasında 3500 prm' de 5' er dakika santrifüj edildi.. Son yıkama ve santrifüj sonrası dipte bulunan eritrositlerden 0.4 ml alınıp ependorff tüplere aktarılarak üzerlerine yine aynı miktar PBS eklenip analiz yapılacağı güne kadar -70 °C' de muhafaza edildi.

Serum ve plazma örnekleri biyokimyasal analizlerinin yapılacağı güne kadar -70 °C' de muhafaza edildi.

5.4. Biyokimyasal Analizler:

5.4.1. Serumların Deneye Hazırlanması: Deneyden bir gece önce derin dondurucudan çıkarılan serum örnekleri buzdolabının +4 °C olan bölümüne alınarak çözünmesi sağlandı

5.4.2. Dokuların Deneye Hazırlanması: Ratlara ait karaciğer dokuları ise derin dondurucudan çıkartılarak buzdolabının +4 °C bölümüne alınıp çözünmesi

sağlandı. Daha sonra dokular serum fizyolojik ile yıkanıp kurulandı ve bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrıldı. Doku ağırlığının tespiti için tartıldıktan sonra içlerinde 2 ml tris-HCl (pH 7.4) olan cam tüplere alınıp daha sonra buz dolu kaplara yerleştirildi. Teflon uçlu homojenizatör ile 16.000 devir/ dk hızda 1dk' lik homojenizasyondan sonra 15 sn ara verilerek 3 dk boyunca homojenize edildi. Son hacim tris tamponu ile 1/10 (w/v) dilusyon olacak şekilde tamamlandı. Homojenatın bir kısmı NO ve MDA ölçümü için eppendorf tüplere alındıktan sonra, kalan homojenat daha sonra +4 °C' de ve 5000 rpm devirde 20 dk. santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar GSH-Px, SOD, CAT ve GSH-Px tayininde kullanıldı.

5.4.3. Hemolizatların Deneye Hazırlanması: Daha önceden hazırlanan hemolizatlar derin dondurucudan çıkartılarak buzdolabının +4°C kısmına alınıp çözünmesi sağlandı.

5.4.4. Nitrik Oksit (NO) Ölçümü: Damar endotelinde ve dokularda üretilen NO çok kısa sürede spontan olarak oksitlenip NO₂ ve NO₃'e dönüşür. Bu nedenle NO₂ ve NO₃ çalışılıp, NO ise hesaplamayla bulunur. Nitrat doğrudan ölçülemediğinden nitrite dönüştürülerek dolaylı yoldan miktarı tespit edilmektedir (138).

5.4.4.1. Kullanılan Reaktifler

- 1. Kadmiyum Granülleri:** Kadmiyum granülleri (Fluka) bir tel kesici kullanılarak 20-40 mg'lık küçük parçalara bölündü. 0.2 N H₂SO₄ (Merck) çözeltisi içinde muhafaza edildi.
- 2. 0.2 N H₂SO₄:** 2.8 ml derişik H₂SO₄ alınır ve içinde 250 ml distile su olan balon jöjeye karıştırılarak aktarılır ve son hacim 500 ml' ye tamamlanır.

3. **55 mM'lık NaOH:** 1.1 gr NaOH (Merck) alınıp bir miktar distile su ile çözülüp son hacim 500 ml' ye tamamlanır.
4. **0.1 M'lık NaOH:** 3.2 gr NaOH tartılıp 40 ml suda çözüldü.
5. **0.2 mol/l Glisin-NaOH tamponu:** 7.5 gram glisin (Sigma) bir 100 ml kadar deiyonize suda çözüldü. 0.1 M'lık NaOH solüsyonu ile glisinin pH' sı 9.7'ye ayarlandı. Daha sonra çözelti 500 ml'ye tamamlandı. Bu tampon çözelti 4-8 °C'de buzdolabında saklanarak bir ay içinde kullanıldı .
6. **58 mM'lık Sülfanilamid Çözeltisi:** 66.2 ml 3M HCl alınıp bir mezür içerisinde hacmi 250 ml'ye tamamlanıp 2.5 gr sülfanilamid (Sigma) eklendi. Sülfanilamid sıcak HCl içinde iyice çözüldü. Bu çözelti oda sıcaklığında saklandı.
7. **0.77 M'lık N-Naftiletillen Diamin (NNDA) Çözeltisi:** 50 mg NNDA (Sigma) tartıldı, 250 ml deiyonize suda çözüldü.
8. **5 mM'lık CuSO₄ Çözeltisi:** 250 mg CuSO₄ 5H₂O bir miktar distile suda çözülüp son hacim 200 ml'ye tamamlandı.
9. **75 mM'lık ZnSO₄ Çözeltisi:** 10.8 gr alınıp ZnSO₄ alınıp distile suda çözüldü ve son hacim 500ml'ye tamamlandı.
10. **Standart Sodyum Nitrit (NaNO₂) Çözeltisi:** 760 mg Na₂B₄O₇ alınıp bir miktar distile suda çözülüp son hacim 200 ml' ye tamamlanarak 10 mM'lık çözelti hazırlandı. 69 mg NaNO₂ bir miktar Na₂B₄O₇ içerisinde çözüldü. Son hacim 100 ml olacak şekilde Na₂B₄O₇ çözeltisi ile tamamlandı. Çözeltinin nitrit konsantrasyonu 10 mmol/L' dir.

11. Standart Sodyum Nitrat (NaNO₃) Çözeltisi: 760 mg Na₂B₄O₇ alınıp bir miktarda distile suda çözülüp son hacim 200 ml' ye tamamlanarak 10 mM'lık çözelti hazırlandı. 102 mg NaNO₃ bir miktar Na₂B₄O₇ içerisinde çözüldü. Son hacim 100 ml olacak şekilde Na₂B₄O₇ çözeltisi ile tamamlandı. Çözeltinin nitrat konsantrasyonu 10 mmol/L' dir.

5.4.4.2. Nitrik Oksit Deneyinin Yapılışı

Deproteinizasyon: Bu işlem için her bir serum veya doku homojenatından 0.5 ml alınıp üzerine 2 ml ZnSO₄ çözeltisi ve 2.5 ml NaOH çözeltisi eklenip 10 dk oda sıcaklığında bekletildi. 3500 g'de 10 dk santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant kısmı alınıp deneyin bir sonraki aşamasında kullanıldı.

Nitrit Deneyinin Yapılması ve Nitrit Standartları Çalışması:

Numuneler ve standart çözeltiler olarak hazırlanan 5 µM, 10 µM, 50 µM ve 100 µM nitrit çözeltileri (S₁, S₂, S₃, S₄) tablo 6'daki gibi propilen tüplere pipetlendi.

Tablo 6: Numunelerin deproteinizasyon işlemi

	Kör	Numune	Std 1 (5 µM)	Std 2 (10 µM)	Std 3 (50 µM)	Std 4 (100 µM)
Plazma veya homojenat (ml)	---	0.5	--	---	---	---
Standart(ml)	---	---	0.5	0.5	0.5	0.5
NaOH(ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
ZnSO ₄ (ml)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Distile Su(ml)	0.5	---	---	---	---	---

Tablo 7. Nitrit çalışma şeması.

	Kör	Numune	Std 1 (5 µM)	Std 2 (10 µM)	Std 3 (50 µM)	Std 4 (100 µM)
Süpernatant (ml)	2	2	2	2	2	2
NNDA (ml)	1	1	1	1	1	1
Sülfanilamid (ml)	1	1	1	1	1	1

Pipetlemeden sonra tüpler vortekslendi ve 3000xg'de 15 dk santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar, Griess Reaksiyonunda kullanıldı.

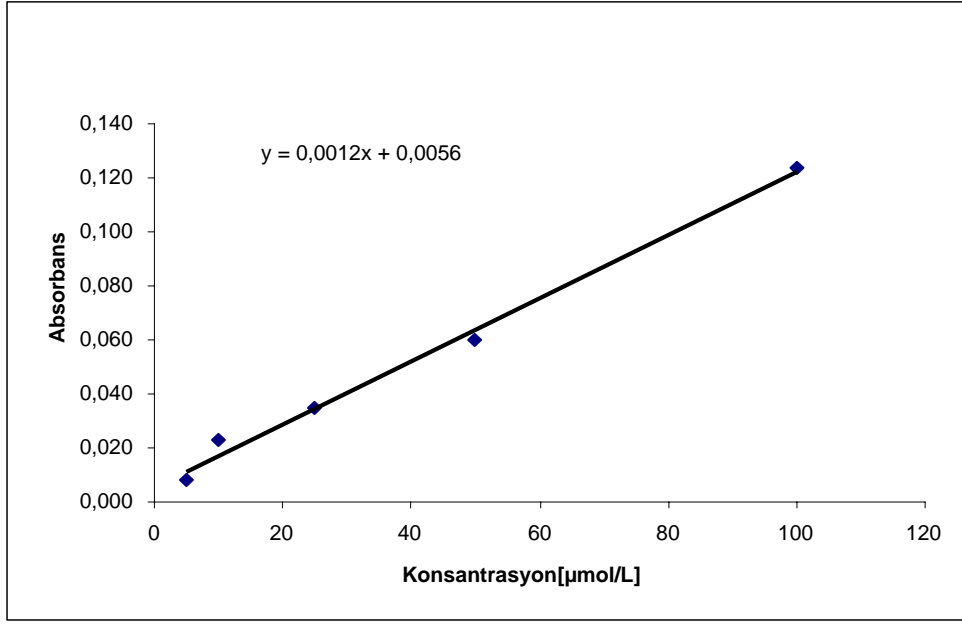
20 dk' lik inkübasyonda sülfonilamid, NNDA ve nitritle pembe renkli kompleks oluşturuldu. Bu renkli kompleksin nitrit konsantrasyonunun artmasıyla koyuluğu fazlalaşır. Bunların optik dansiteleri spektrofotometrede 545 nm dalga boyunda köre karşı okundu.

Hesaplama:

Standart konsantrasyonları, 545 nm deki absorbanlarına bölünerek faktör (F) hesaplanır. Numunenin absorbanı bu faktörle çarpılarak numunedeki mevcut nitrit miktarları hesaplanır. Veya nitrit standart konsantrasyon grafiği hazırlanarak, numunelerin konsantrasyonları bu grafikten hesaplanır.

$$\frac{\text{Numunenin Konsantrasyonu}}{\text{Numunenin absorbanı}} = \frac{\text{Standartın Konsantrasyonu}}{\text{Standartın absorbanı}} = \text{Faktör (F)}$$

$$\text{Numunenin konsantrasyonu} = F \times \text{Numunenin absorbanı}$$



Şekil 11. Nitrit standart konsantrasyon grafiği

Nitrat Deneyinin Yapılması ve Nitrat Standartları Çalışması:

Kadmiyum Granüllerinin Deneye Hazırlanması: Kadmiyum granüllerinin aktivasyonu için 12 saat süreyle 0.1 M H₂SO₄ içinde muhafaza edilen kadmiyum granülleri rejenere edildi. Asitten çıkarıp deiyonize su ile 3 kere yıkanarak asidi uzaklaştırıldı. Üzerine 2 ml CuSO₄ çözeltisi konulup 2 dk bekletildi. Glisin-NaOH tamponu ile 3 kere durulanıp, kurutma kağıdı ile kurutuldu. Nitrat deneyinde kullanılması için hazır hale getirildi (139).

Nitrat Çalışması: Numuneler ve standart çözeltiler olarak hazırladığımız 5 µM, 10 µM, 50 µM ve 100 µM'lık nitrat çözeltileri (S₁, S₂, S₃, S₄) tablo 8'de gösterildiği gibi tüplere pipetlendi.

Tablo 8: Nitrat çalışma şeması.

	Kör	Numune	Std 1 (5 µM)	Std 2 (10 µM)	Std 3 (50 µM)	Std 4 (100 µM)
Plazma veya homojenat (ml)	---	0.5	---	---	---	---
Standart (ml)	---	---	0.5	0.5	0.5	0.5
NaOH (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
ZnSO₄ (ml)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Distile Su (ml)	0.5	---	---	---	---	---

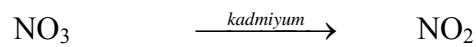
Pipetlemeden sonra tüpler vortekslendi ve 3000 g' de 15 dk santrifüj edildi. Deproteinize süpernatantlar deneyde kullanıldı.

Tablo 9: Deproteinize edilen numunelerin kadmiyumla redükte edilmesi.

	Kör	Numune	Std 1 (5 µM)	Std 2 (10 µM)	Std 3 (50 µM)	Std 4 (100 µM)
Süpernatant (ml)	1	1	1	1	1	1
Glisin NaOH (ml)	1	1	1	1	1	1
Kadmiyum (g)	2.5-3	2.5-3	2.5-3	2.5-3	2.5-3	2.5-3

Kadmiyumla 90 dk boyunca santrifüj edilerek redüksiyon işlemi gerçekleştirildi. Redüksiyon işleminden sonra süpernatantlar alınarak, Griess reaksiyonunda kullanıldı.

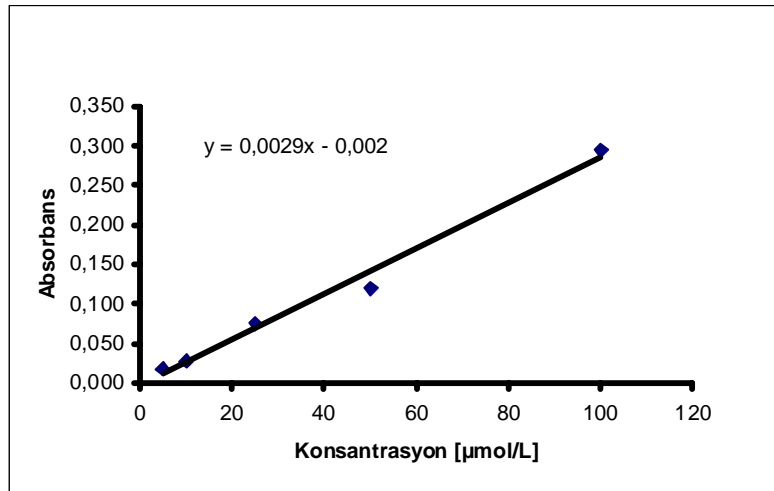
Bakır kaplı kadmiyum granülleri nitratları nitrite dönüştürdü:



Tablo 10: Redükte numunelerin Griess reaksiyonunda kullanılması

	Kör	Numune	Std 1 (5 µM)	Std 2 (10 µM)	Std 3 (50 µM)	Std 4 (100 µM)
Süpernatant (ml)	2	2	2	2	2	2
NNDA (ml)	1	1	1	1	1	1
Sülfanilamid (ml)	1	1	1	1	1	1

Tüpler iyice karıştırıldı daha sonra 20 dk inkübasyona tabi tutularak 545 nm dalga boyunda köre karşı okutuldu. Nitrit deneyinde olduğu gibi standartların konsantrasyonu bilindiğinden absorbans değerleri kullanılarak faktör hesaplandı. Faktör, numunelerin absorbansları ve dilüsyon oranları kullanılarak nitrat konsantrasyonları belirlendi.



Şekil 12. Nitrat standart konsantrasyon grafiği.

Çalışma sonunda plazma için nitrik oksit düzeyleri.(nitrit+nitrat) µmol /L , doku nitrik oksit düzeyleri ise µmol/g protein olarak ifade edildi.

5.4.5. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Ölçümü: SOD (EC 1.15.1.1)

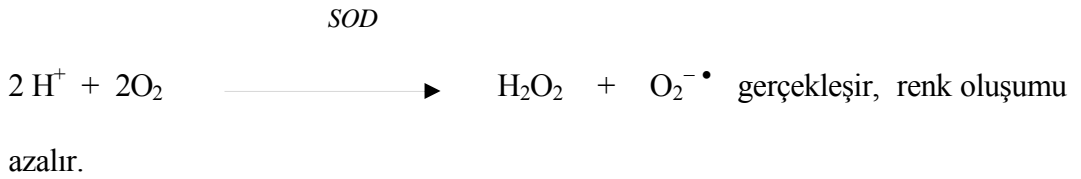
aktivite ölçümü nitroblue tetrazolium (NBT) ile ortaya çıkan süperoksitin indirgenmesi esasına dayanan Sun ve arkadaşlarının belirttiği metoda (140) ve Durak ve arkadaşlarının tarif ettiği (141) modifikasyona göre yapıldı. SOD enziminin olmadığı ortamda oluşan süperoksit radikalleri NBT'yi indirgeyerek mavi-mor renk oluşturmaktadır. Eğer ortamda SOD varsa NBT indirgenmesi meydana gelmez ve mavi mor renk görülmez. Olayı aşağıdaki şekilde formüle edebiliriz



Ortamda SOD'ın bulunmaması durumunda;



Ortamda SOD varlığında ise;



5.4.5.1. Kullanılan Reaktifler

1. Ölçüm Reaktifi

- **0.3 mmol/L Ksantin:** 9.13 mg ksantin (Sigma) bir miktar distile suda çözüldükten sonra son hacim 200 ml' ye tamamlandı.

- **0.6 mmol/L Etilendiamin Tetraasetik asit-2 Na Tuzu (EDTA):** 25 mg EDTA bir miktar distile suda çözüldükten sonra son hacim 100 ml' ye tamamlandı.

- **150 µmol/L Nitrobluetetrazolyum (NBT):** 12.3 gr NBT (Serva) bir miktar distile suda çözüldükten sonra son hacim 100 ml' ye tamamlandı.

- **400 mmol/L Na₂CO₃:** 2.54 gr Na₂CO₃ bir miktar distile suda çözüldükten sonra son hacim 60 ml' ye tamamlandı.

- **1 g/ L Sığır Serum Albumin (BSA):** 30 mg BSA (Qbiogene) üzerine yaklaşık 15 ml distile su ilave edildi. Köpürmeden alt üst edilerek karıştırıldı. Bir gece oda sıcaklığında bekleyerek çözülmesi sağlandı. Son hacim distile su ile 30 ml' ye tamamlandı. Tekrar karıştırıldı ve koyu renkli şişede +4 °C' de saklandı.

Yukarıdaki çözeltilerin tamamı hazırlandıktan sonra karıştırıldı. Toplam hacimi 490 ml' olan ölçüm reaktifi hazırlanarak, koyu renkli şişede +4 °C' de saklandı.

2. **167 U/L Ksantin Oksidaz (XO):** 10 µL XO (Serva) alınıp üzerine, 2 mol/L' lik (NH₄)₂SO₄' den 1 mL eklendi. Tüp birkaç kez altüst edilerek karıştırıldı. Enzim çözeltisi çalışma esnasında hazırlandı.

3. **Kloroform Etanol (CE):** 3/5 v/v oranlarında hazırlandı.

4. **2 mol/L (NH₄)₂SO₄:** 2.64 gr (NH₄)₂SO₄ alınıp 10 ml distile suda çözüldü.

5. **8 mmol/L CuCl₂ Çözeltisi:** 10.8 mg CuCl₂ bir miktar distile suda çözüldükten sonra son hacim 100 ml' ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı :

Tablo 11: Süperoksit dismutaz (SOD) aktivite ölçümü

	Kör	Numune
Ölçüm reaktifi (ml)	2.45	2.45
Numune (ml)	-	0.5
Distile su (ml)	0.5	-
Ksantin oksidaz (ml)	0.05	0.05

Karıştırıldı ve 25 °C'de 20 dk inkübe edildikten sonra CuCl₂ eklendi.

CuCl₂ (ml)	1	1
------------------------------	---	---

Spektrofotometre 560 nm de ölçüm reaktifi ile sifira ayarlanarak, kör ve numunelerin absorbansları kaydedildi.

SOD Aktivitesinin hesaplanması:

Bir SOD ünitesi; NBT redüksiyonunu % 50 oranında inhibe eden enzim aktivitesidir.

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{\text{Kör'ün absorbans (Ak)} - \text{Numune'nin absorbansı (An)}}{\text{Kör'ün absorbansı (Ak)}} \times 100$$

O zaman;

$$\ddot{U} = \frac{\% \text{ inhibisyon}}{\% 50 \text{ inhibisyon}}$$

Bir mililitredeki ünite miktarı formülüne edilirse (0,5 mL numune 10 kat sulandırılmıştır).

$$\text{Ü /ml SOD} = \frac{\% \text{ inhibisyon} \times 1}{\% 50 \text{ inhibisyon} \times 0.5} \times 10$$

Serumda gram protein başına SOD aktivitesi (spesifik aktivite) ise

$$\text{Spesifik aktivite (Ü/gr protein)} = \frac{\text{Ü/ml SOD}}{\text{gr/ml protein (0,5)}}$$

olarak hesaplanır.

Dokuda SOD aktivitesi U/g protein olarak ifade edildi. Eritrositlerde gram Hb başına düşen SOD aktivitesi hesaplanarak, sonuçlar spesifik aktivite cinsinden U/g Hb, plazmada ise U/ml olarak verildi.

5.4.6. Katalaz (CAT) Aktivite Ölçümü: Katalaz ölçümü Aebi metoduna dayanarak yapıldı (142).

Numune, köre karşı 240 nm'de okundu. 60 sn boyunca absorbanstaki düşüş kaydedildi. Bu metoda göre numunedeki mevcut katalaz enzimi substrattaki H₂O₂' yi H₂O ve O₂ 'ye parçalamaktadır.

Katalaz değerleri gerekli dilüsyon faktörleri ile çapılarak, eritrosit için gr Hb başına (µmolH₂O₂/g Hb), doku için (µmolH₂O₂/g protein) spesifik aktivite cinsinden verildi. Eritrosit hemolizati distile su ile 100 kat dilue edildi.

5.4.6.1. Kullanılan Reaktifler

1. Substrat Çözeltisi: 100 mL fosfat tamponu içerisine yaklaşık 100 µL % 30' luk H₂O₂ çözeltisi eklendi. Çözeltinin 240 nm dalga boyunda distile suya karşı absorbansı 0.500-0.600 nm arasında bir optik dansitede olması beklenir.

2. 0.05 mol/L' lik Fosfat Tamponu (pH=7.0): A $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ alınıp 500 ml distile suda çözülerek 50mM' lık $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi hazırlandı.

B. 17.907 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ alınıp 100 ml distile suda çözülerek 50mM' lık $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi hazırlandı.

Na_2HPO_4 ve KH_2PO_4 çözeltileri hazırlandı. Sonra 600 ml A + 400 ml B çözeltileri karıştırılarak hazırlanan fosfat tamponuna, 2.08 g EDTA ilave edildi. Sonuçta pH sı 7.0 olan 50 mM'lık EDTA'lı fosfat tamponu elde edildi.

3. % 30' luk H_2O_2 çözeltisi hazırlandı.

5.4.6.2. Deneyin Yapılışı :

Eritrosit hemolizati distile su ile 100 kat sulandırıldı.

Tablo 12. Katalaz (CAT) aktivite ölçümü

	Kör	Numune
Substrat çözeltisi (ml)	---	2.990
Numune (ml)	---	0.010
Fosfat Tamponu (ml)	3	

Fosfat tamponu ile 240 nm dalga boyunda sıfır ayarı yapıldı. 2.999 ml substrat çözeltisi eklenip 3 dk boyunca 10 sn aralıklarla absorbans azalmaları kaydedildi.

Katalaz Aktivitesinin Hesaplanması:

$$K = \frac{1}{\Delta t} \times \ln \frac{A_1}{A_2} = \frac{2.3}{\Delta t} \times \log \frac{A_1}{A_2} =$$

$\Delta t = 60$ sn olduğundan

$$K = \frac{2.3}{60} \times \log \frac{A_1}{A_2} = 0.0383 \times \log \frac{A_1}{A_2}$$

100 kat dilue edilen 1 ml' lik numuneden 10µl numune kullanıldığından 10000 ile bu formüldeki değerin çarpılması gerekir.

$$K=0.0383 \times \log \frac{A1}{A2} \times 10000 \text{ bu değer ml' deki hemoglobine}$$

bölünürse

$$0.0383 \times \log \frac{A1}{A2}$$

$$K= \frac{\text{---}}{\text{gHb/mL}}$$

şeklinde hesaplanır.

Dokuda ise k/gr protein=k/[(g/mL protein) x1000] olarak ifade edilir.

Bir katalaz ünitesi: bir mikromol hidrojen peroksidi bir dakikada yıkan enzim miktarıdır.

5.4.7. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivite Ölçümü: Plazma ve dokudaki GSH-Px aktivitesi, GSH-Px tarafından katalizlenen bir reaksiyonda H₂O₂ ile glutasyonun (GSH) oksidasyon hızının ölçülmesi esasına dayanan Paglia ve Valentine'nin enzimatik yöntemi ile ölçüldü. (143)

5.4.7.1. Kullanılan Reaktifler:

1- 50 mM EDTA'lı Fosfat Tamponu: ((pH=7.0).):

2-150 µM Redükte Glutasyon (GSH): 100 mg GSH alındı, son hacim 2 ml olacak şekilde EDTA'lı fosfat tamponunda çözüldü

3-Sodyum Azid (NaN₃ = 1 M): 65 mg alındı, son hacim 1 ml olacak şekilde EDTA'lı fosfat tamponunda çözüldü.

4-NADPH (3 mM): 10 mg alındı, 2 ml EDTA'lı fosfat tamponunda çözüldü.

5-GSH Redüktaz. (enzim sıvı formda ise = 1 U/10mikrolt):
Elimizde bulunan sıvı form (100 Ü/mL) 10 mikrolitresinde 1 ünite içerdiği için direkt olarak kullanıldı.

6-H₂O₂ Çözeltisi (50 mM): 15 mikrolitle hidrojen peroksit alınarak, 5 ml EDTA'lı fosfat tamponuna pipetlendi.

7-Amonyum Sülfat Çözeltisi [(NH₄)₂SO₄ 3.2 M]: 4.22 gr amonyum sülfat alındı ve son hacim 10 ml olacak şekilde distile suda çözüldü.

5.4.7.2. Deneyin yapılışı:

Tablo 13. GSH-Px (Glutasyon peroksidaz) aktivite ölçümü

	Test küveti	Kör küveti
EDTA'lı Fosfat tamponu (ml)	2.65	2.67
Reclükte GSH (ml)	0.10	0.10
NADPH (ml)	0.10	0.10
GSH Redüktaz (ml)	0.01	0.01
NaN ₃ (ml)	0.01	0.01
Numune (serum, plazma, hemolizat, ekstrakt) (ml)	0.02	-

Test tüpleri iyice karıştırıldıktan sonra, oda ısısında 10 dk inkübe edildi. Bu arada spektrofotometre 340 nm de fosfat tamponu ile sıfırlandı. Sürenin sonunda her tüpe 0.10 ml H₂O₂ (hidrojen peroksit) çözeltisi ilave edilerek reaksiyon başlatıldı,

H ₂ O ₂ (ml)	0.100
------------------------------------	-------

Spektrofotometrede 340 nm'de numunelerin absorbans değerleri 5 dk boyunca 15 saniyede bir kaydedildi. Düzenli olarak absorbans azalması görülen aralığın 1 dk'lık süresi esas alınarak hesap yapıldı. Ya da 3 dk süreyle absorbans

azalması takip edildi. Absorbans azalmasının bu süre içerisinde tam bir lineerite gösterdiği tespit edildi.

C)- Enzim Aktivitesinin Hesaplanması.

1 Ünite = Bir dakikada okside edilen NADPH'nin mikromol cinsinden miktarıdır.

$$\ddot{U} / L \text{ (mikromol / min/ L)} = \frac{\Delta A / t \times V_t \times 10^6}{E \times V_s \times L}$$

E = NADP'nin ekstinksiyon sabiti (6.22 x 10³ L. mol.cm)

V_t = Total reaksiyon volumü (ml)

V_s = Total reaksiyon içindeki numune volumü (ml)

L = Küvet çapı (l cm)

A / t = Dakikadaki absorbans değişimi

10⁶ = mol'ü, mikromole çevirim sabiti.

$$\ddot{U} / L = \frac{\Delta A / t \text{ dk} \times 3 \times 10^6}{6.22 \times 10^3 \times 0.02 \times 1}$$

$$= A / t / \text{dk} \times \frac{3 \times 10^6}{124.4}$$

$$\ddot{U} / L = A / t / \text{dk} \times 24115$$

$$= \frac{A(\text{ilk}) - A(\text{son}) \times \text{sulandırma faktörü} \times 24115}{3 \text{dk}}$$

Sulandırma faktörü serum GSH-Px'i için 10 alınmıştır.

Sonuçta; \ddot{U} / L cinsinden GSH-Px aktivitesi, gr protein/L'ye bölündü ve

\ddot{U} / gr protein cinsinden spesifik aktivite hesaplandı.

$$\text{Spesifik aktivite(U/g protein)} = \frac{\ddot{U} / L \text{ GSH - Px}}{\text{gr/L protein}}$$

GSH-Px değerleri gerekli dilüsyon ile çapılarak, eritrosit için gr Hb başına

(U/g Hb), doku için (nmol/min/g protein) spesifik aktivite cinsinden verildi.

5.4.8. MDA Ölçümü: MDA düzeyi ölçümünde Yagi tarafından geliştirilen yöntem kullanıldı. Bu yöntem lipid peroksidasyon yıkım ürünlerinden biri olan MDA'nın 532 nm'de tiyobarbitürik asit ile reaksiyona girmesi oluşan pempe renkli bileşiğin ölçümü esasına dayanır (144).

5.4.8.1.Kullanılan Reaktifler:

1. 20 mmol/L stok standart: 1,1,3,3 tetrametoksiopropan (Sigma) standart hazırlamada kullanıldı. 329 µl 1,1,3,3 tetrametoksiopropan alınıp etanolle 100 ml' ye tamamlandı.1µmol/L, 2µmol/L, 6µmol/L, 10 µmol/L' lik standartlar hazırlandı.

2. % 15 TCA Çözeltisi: 0.25 mol/L HCl içerisinde % 15' lik triklorasetik asit hazırlandı.

3. % 37' lik TBA Çözeltisi: 0.25 mol/L HCl içerisinde 3.7 g/L tiyobarbitürik asit (TBA) çözüldü.

5.4.8.2. Deneyin Yapılışı: Numune ve kör tüpü ve standart tüpleri tablo 14' deki gibi hazırlandı, sonra vorteksle iyice karıştırıldı. 45 dk kaynar su banyosunda ağzları kapatılarak inkübe edildi. Musluk suyu altında soğutulup, içi buz dolu kaba sporla yerleştirildi, üzerine 3 mL n-bütanol eklenip karıştırıldı ve 2000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant n-bütanola karşı 535 nm'de okutuldu.

Tablo 14. MDA ölçümü

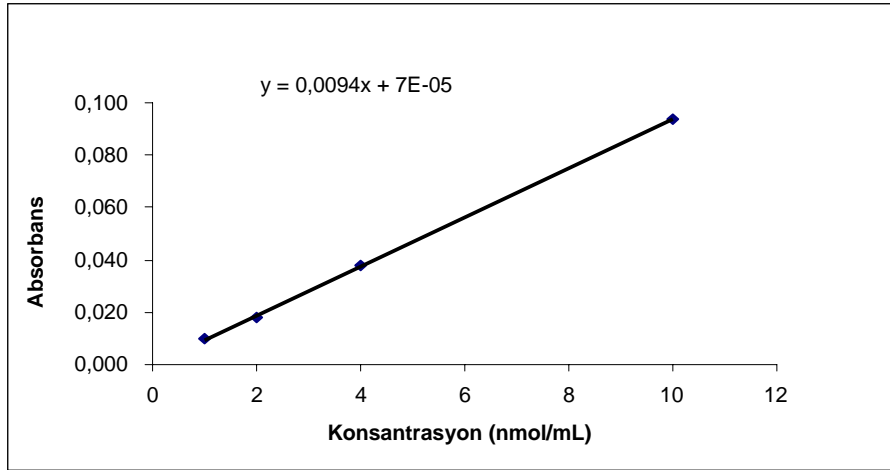
	Numune	Kör	Std1 1 (1 µM)	Std 2 (2 µM)	Std 3 (6 µM)	Std 4 (10 µM)
Plazma veya homojenat (µl)	250	---	---	---	---	---
Distile Su (µl)	---	250	---	---	---	---
Standart (µl)			250	250	250	250
TCA (ml)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
TBA (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

Hesaplama: Körün absorbansı numunenin absorbansından çıkartılarak net absorbanslar bulundu. 535 nm.'de okunan örnek absorbansları dilüsyon faktörü de dikkate alınarak nmol/mL cinsinden elde edilen standart konsantrasyon grafiği ile değerlendirildiği gibi,.

$$\text{MDA (nmol /ml)} = \frac{\text{Numune Absorbansı} \times \text{Standart Konsantrasyonu}}{\text{Standart Absorbansı}}$$

formülü ile de hesaplanabilir.

Doku MDA konsantrasyonları ise nmol/g protein cinsinden verildi.



Şekil 13. MDA standart konsantrasyon grafiği.

5.4.9. Total Protein Ölçümü: Doku protein düzeyleri Lowry yöntemine göre ölçüldü (145). Bu metod alkali çözeltide bakır-protein kompleksi oluşturarak fosfomolibdat-fosfotungstat (Folin-Ciocalteu-Fenol reaktifi) reaktifinin indirgenmesi ile koyu mavi renk oluşturulması esasına dayanır. Rengin koyuluğu protein konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak değişir.

5.4.9.1. Kullanılan Reaktifler: Deneylerde $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Na_3Sitrat , Na_2CO_3 , NaOH , Folin-Ciocalteu-Fenol reaktifleri kullanıldı.

- 1. A reaktifi:** 0.5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1.0 g Na_3Sitrat (susuz form) tartılıp 100 ml distile suda çözüldü.
- 2. B reaktifi:** 20 g Na_2CO_3 ve 4 g NaOH , 1 L distile suda çözüldü.
- 3. C reaktifi:** 50 ml B çözeltisine 1 ml A çözeltisinden eklenerek hazırlandı.
- 4. D reaktifi** 10 ml Folin-Ciocalteu-Fenol reaktifine 10 ml distile su eklendi.

5.4.9.2. Deneyin Yapılışı

Tablo 15. Lowry yöntemine göre protein ölçümü.

	Kör	Numune
Numune (μl)	-	10
Distile Su (μl)	500	490
C reaktifi (ml)	2.5	2.5

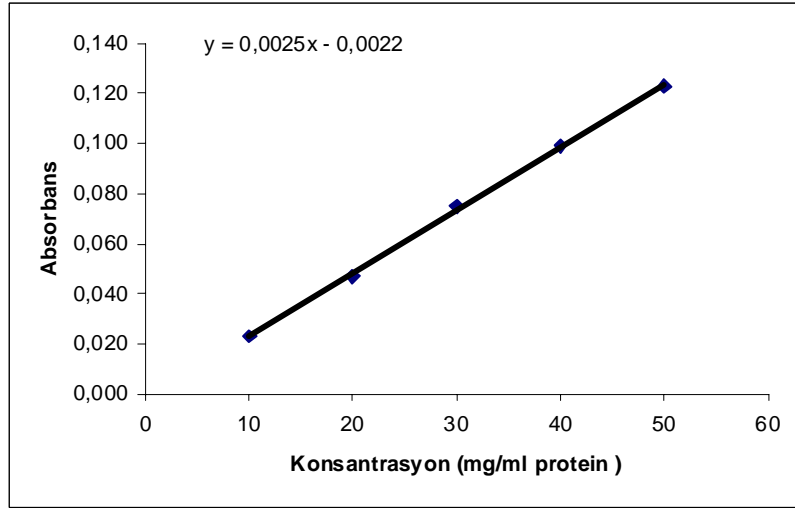
Tüpler oda ısısında, karanlıkta 15 dk inkübe edildikten sonra

D reaktifi (ml)	0.25	0.25
-----------------	------	------

eklenerek tüpler karıştırıldı. Tüpler oda ısısında, karanlıkta 30 dk inkübe edildi. 750 nm'de köre karşı absorbans ölçüldü. BSA'nın ölçülen absorbansı, standart olarak kullanıldı. Absorbans-mg/ml protein konsantrasyonu ile standart grafiği çizilerek protein değerleri bu grafikten okundu.

Hesaplama: Protein (mg/ml)=grafikten okunan değer x faktör (F)

$$F = \frac{\text{Standart Hacmi}}{\text{Numune Hacmi}}$$



Şekil 14. Lowry protein standart konsantrasyon grafiği.

5.4.10. Hemoglobin Ölçümü: Hemoglobin ölçümünde siyanomethemoglobin oluşumu esasına dayanan Drabkin yöntemi kullanıldı (146). Ferrisiyanür, hemoglobindeki demiri oksitleyerek iki değerlikli demiri üç değerlikli demire çevirerek methemoglobine dönüşmesini sağlar. Bunu takiben potasyum siyanid ile kararlı bir pigment olan siyan methemoglobin oluşur. Oluşan siyanmethemoglobinin absorbansı spektrofotometrik olarak 546 nm dalga boyunda okunur.

5.4.10.1. Kullanılan Reaktifler

1. Drabkin Çözeltisi: 50 mg KCN, 200 mg K₃Fe(CN)₆ ve 1 gr NaHCO₃ distile su ile 1 litreye tamamlandı.

2. Hemoglobin Standartı: 18 gr/dl

5.4.10.2. Deneyin Yapılışı

Tablo 16. Hemoglobin ölçümü

	Kör	Standart	Numune
Drabkin çözültisi (ml)	5.0	5.0	5.0
Hemoglobin standartı (ml)	-----	0.02	-----
Hemolizat (ml)	-----	-----	0.02
Distile su (ml)	0.02	-----	-----

Tüpler iyice karıştırıldı ve oda ısısında 20 dk bekletildikten sonra 546 nm’de köre karşı absorbansları alındı.

Hesaplama:

$$\text{Hemoglobin (g/dl)} = \frac{\text{Örnek absorbans} \times \text{Standart Konsantrasyonu (18 g/dl)}}{\text{Standart Absorbans}}$$

5.4.11. AST, ALT ve LDH Düzeylerinin Ölçümü: Serum aspartat amino transferaz (AST), alanin amino transferaz (ALT) ve laktat dehidrogenaz (LDH) enzim düzeyleri Olympus AU640 (Olympus Optical Co. Ltd, Tokyo-Japan) otoanalizöründe Olympus marka ticari kitler kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü. Birimler U/l cinsinden verildi.

5.4.12. Karaciğer Doku Örneklerinin Histopatolojik Muayenesi ve Metalloproteinazların Ölçümü: Doku örneklerinin alınması esnasında tüm karaciğerlerde sağ ve sol loblar ayrıştırıldı. Sol loblar % 10 formalaldehit içerisinde konularak patolojik muayene için patoloji laboratuvarına gönderildi. %10 formaldehit içinde tespit edilen karaciğer dokuları daha sonra parafin takibine alındı. Parafin bloklarından hazırlanan preparatlar eosin ve hemotoksilen boyaları ile boyandı. Ve bu preparatlarda karaciğer dokularının histopatolojik değerlendirmeleri yapıldı.

5.5. İstatistiksel Değerlendirme: Elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS paket programı (11.0 *for Windows*) ile yapıldı. Değerlendirmede Kruskal-Wallis varyans analizi, Mann-Whitney U testi testi kullanıldı. Tüm sonuçlar Ortalama±Standart Hata (ORT±SH) olarak gösterildi. İstatistiksel olarak $p<0,05$ anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. Bazal ve Çalışma Sonrası Ağırlık Ölçümleri: Gruplar arasında rat ağırlıkları arasındaki ilişki Tablo 17’de verilmiştir.

Tablo 17: Gruplara ait rat ağırlıkları ve p değerleri

Ağırlıklar	Bazal Değerler	Çalışma Sonrası Değerler	İki Grup Arasındaki Fark	P
DMSO (n=7)	243±7.25	312.42±12.28	69.42±15.59	^a p< 0.01 (Grup 1-2,4,6)
TAA (n=7)	260.4±3.97	201.4±3,51	59.00±4.30	^a p< 0.01 (Grup 2-3,4,5,6)
DDG (n=7)	247.66±10.15	303.83±9.34	56.16±11.47	^a p< 0.01 (Grup 3-4) ^b p< 0.05 (Grup 3-6)
DDG+TAA (n=7)	266.85±10.15	299.57±5.06	32.71±9.65	^a p< 0.01(Grup 4-5)
YDG (n=7)	247.85±9.58	307.71±6.04	59.85±12.33	^a p< 0.01(Grup 5-6)
YDG+TAA (n=7)	260.14±17.32	297.57±10.78	37.42±13.07	

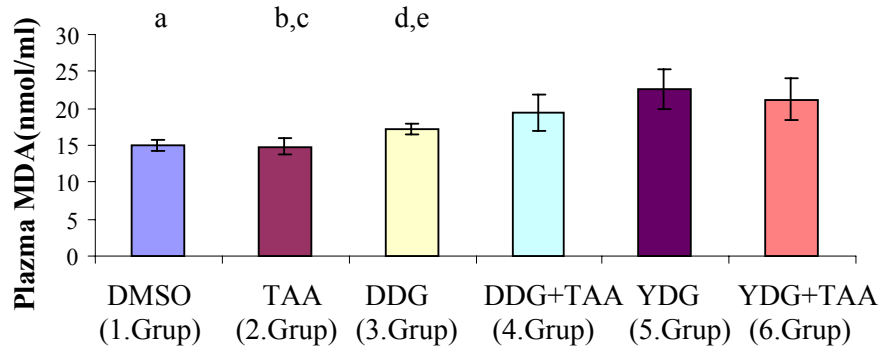
6.2. Biyokimyasal Ölçümler: Tüm gruplara ait doku, eritrosit, serum ve plazmada MDA, GSH-Px, SOD, CAT, NO, AST, ALT, LDH aktivitelerinin istatistiksel sonuçları (ortalama±standart hata) tabloda gösterildi. Çalışmamızda öncelikle gruplar arasında anlamlılık açısından karşılaştırma yapıldı ve plazma MDA, doku MDA, Doku GSH-Px, Eritrosit SOD, Doku SOD, doku CAT, doku NO, AST, ALT aktivitelerinin değerlerinde anlamlılık tespit edildi (p<0,01 ve p<0,05)

Tablo- 18. Gruplara ait plazma NO, doku NO, AST, ALT ve LDH düzeyleri.

	Grup 1 (DMSO)	Grup 2 (TAA)	Grup 3 (DDG)	Grup 4 (DDG+TAA)	Grup 5 (YDG)	Grup 6 (YDG+TAA)	P
Plazma NO	56.28±20.89	68.68 ± 13.89 ^a	53.91±41.7	45.17±15.16	50.02±18.69 ^b	63.14 ±13.29	^a p < 0.05 (Grup 2-4, 5) ^b p < 0.05 (Grup 5-6)
Doku NO	0.017±0.010 ^a	0.015±0.006 ^b	0.01±0.005	0.012 ±0.004 ^c	0.0067±0.002 ^d	0.011±0.003	^a p < 0.01 (Grup 1-5) ^b p < 0.05 (Grup 2-5) ^c p < 0.05 (Grup 4-5) ^d p < 0.05 (Grup 5-6)
AST	167±33 ^{a,b}	541±235 ^c	123±18 ^d	371±231 ^e	139 ±26	270±210	^a p < 0.01 (Grup 1-2) ^b p < 0.05 (Grup 1-4) ^c p < 0.01 (Grup 2-3,5) ^d p < 0.01 (Grup 3-4) ^e p < 0.05 (Grup 4-5)
ALT	55±11 ^{a,b}	245 ± 122 ^c	62 ±7 ^d	154±121 ^e	56 ± 7,3 ^f	123±76	^a p < 0,01 (Grup 1-2,4) ^b p < 0,05 (Grup 1-6) ^c p < 0,01 (Grup 2-3,5) ^d p < 0,05 (Grup 3-4) ^e p < 0,05 (Grup 4-5) ^f p < 0,05 (Grup 5-6)
LDH	1759±816	2045 ± 467 ^a	1808 ± 475 ^b	2178 ±1132 ^c	1631± 642	1101 ± 550	^a p < 0,05 (Grup 2-6) ^b p < 0,05 (Grup 3-6) ^c p < 0,05 (Grup 4-6)

Tabloda verilen bulguları değerlendirmek amacıyla çalışılan her bir parametre ayrı bir grafik hazırlanıp aşağıda gösterilmiştir.

6.2.1. Plazma MDA Düzeyleri:



Şekil 15. Plazma MDA Düzeyleri

^ap < 0.01 (Grup 1-3, 4, 5, 6)

^bp < 0.01 (Grup 2-3, 5, 6)

^cp < 0.05 (Grup 2-4)

^dp < 0.05 (Grup 3-4)

^ep < 0.01 (Grup 3-5,6)

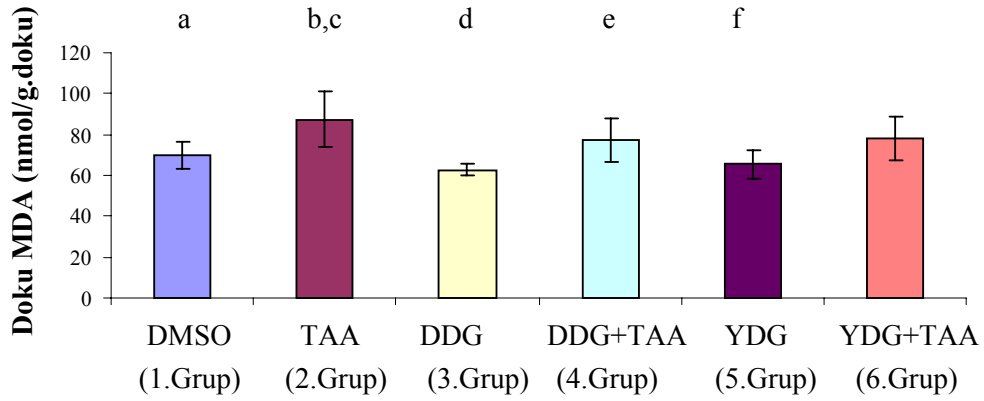
Plazma MDA düzeyinin DMSO grubunda; (14.92±0.7), TAA grubu hariç diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı olarak azaldığı görüldü. Bu karşılaştırma DDG grubunda (17.28±0.769) (p<0.01), DDG+TAA grubunda (19.50±2.44) (p<0.01), YDG grubunda (22.67±2.7) (p<0.01), YDG+TAA grubunda ise (21.26±2.76) (p<0.01), olarak ifade edildi.

Yine TAA grubu da, DDG, DDG+TAA, YDG ve YDG+TAA gruplarıyla karşılaştırıldığında MDA düzeyinin azaldığı görüldü. Bu azalma istatistiksel olarak anlamlı olup DDG grubunda (17.28±0.769) (p<0.01), DDG+TAA

grubunda (19.50±2.44) (p<0.05), YDG grubunda (22.67±2.7) (p<0.01), YDG+TAA grubunda (21.26±2.76) (p<0.01) olarak bulundu.

DDG grubu da, DDG+TAA, YDG ve YDG+TAA gruplarıyla karşılaştırıldığında MDA düzeylerinin azaldığı görüldü. Bu azalma istatistiksel olarak anlamlıydı ve bu fark sırasıyla DDG+TAA grubunda (19.50±2.44) (p<0.05), YDG grubunda (22.67±2.7) (p<0.01) ve YDG+TAA grubunda (21.26±2.76) (p<0.01), şeklinde ifade edildi.

6.2.2.Karaciğer Dokusu MDA Düzeyleri



Şekil 16. Karaciğer Dokusu MDA Düzeyleri

^ap < 0.01 (Grup 1-2)

^bp < 0.01 (Grup 2-3)

^cp < 0.05 (Grup 2-5)

^dp < 0.01 (Grup 3-4,6)

^ep < 0.05 (Grup 4-5)

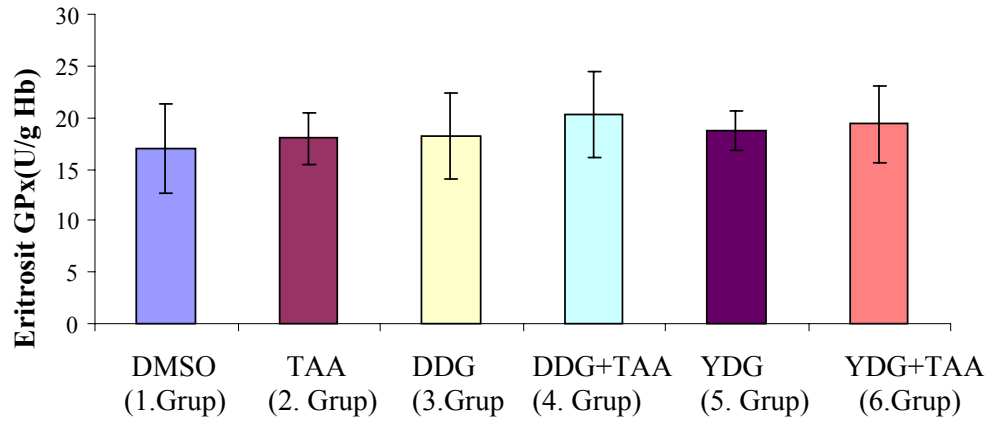
^fp < 0.05 (Grup 5-6)

DMSO grubu (69.9±6.9), TAA grubu ile karşılaştırıldığında (87.47±13.41) (p<0.01) şeklinde anlamlı olarak azaldığı kaydedildi. TAA grubu

(87.47±13.41), DDG ve YDG gruplarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi. Bu artış DDG grubunda (62.86±2.54) (p<0.01), YDG grubunda (65.52±7.2) (p<0.05) şeklindedir.

DDG grubu (62.86±2.54), DDG+TAA grubu (77.19 ± 10.77) (p<0.01) ve YDG+TAA grubu (78.22±10.72) (p<0.01) ile karşılaştırıldıklarında MDA düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi. DDG+TAA grubu (77.19±10.77), YDG grubu (65.52±7.2) (p<0.05) ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak arttığı gözlemlendi. YDG grubu (65.52±7.2) ise YDG+TAA ile (78.22±10.72) (p<0.05), şeklinde anlamlı azalma gösterdi.

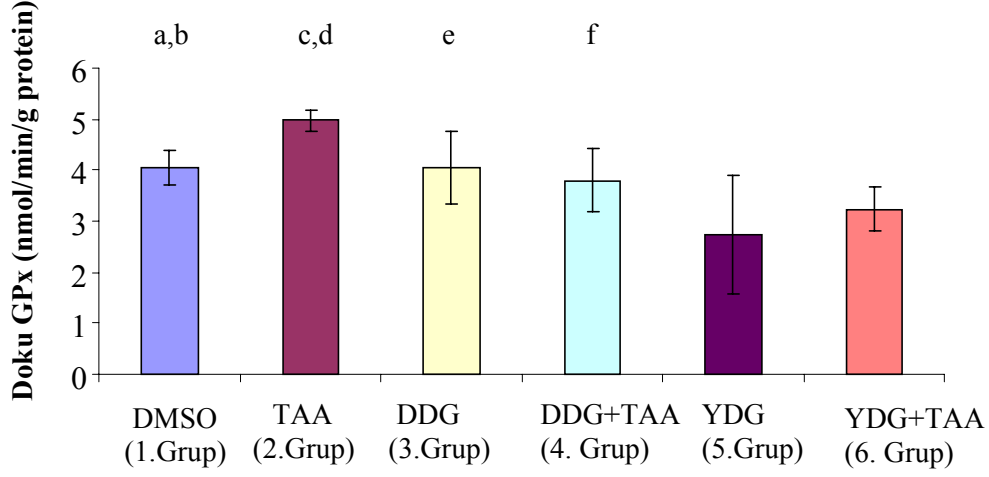
6.2.3. Eritrosit GSH-Px Düzeyleri



Şekil 17. Eritrosit GSH-Px düzeyleri

Yapılan istatistiklerde, eritrosit GSH-Px bakımından gruplar arasında ve grup içinde anlamlılık saptanamadı.

6.2.4. Karaciğer Dokusu GSH-Px Düzeyleri



Şekil 18 Karaciğer dokusu GSH Px düzeyleri

^ap < 0.01 (Grup 1-2, 6)

^bp < 0.05 (Grup 1-5)

^cp < 0.01 (Grup 2-4, 6)

^dp < 0.05 (Grup 2-3,5)

^ep < 0.05 (Grup 3-5)

^fp < 0.05 (Grup 4-5)

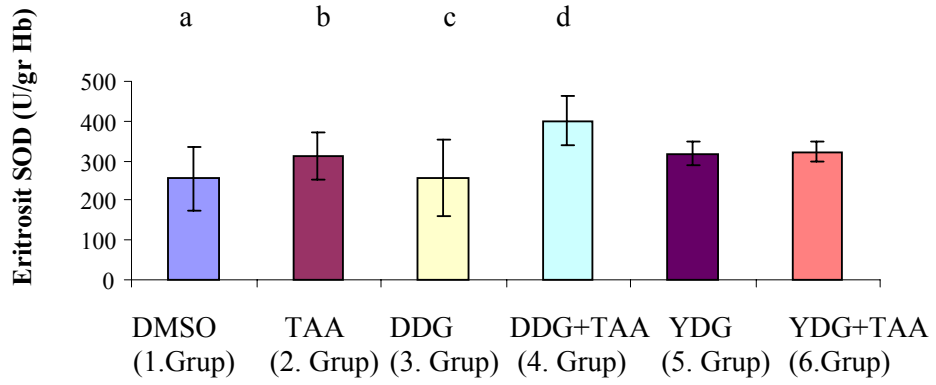
Doku GSH-Px aktivitesi bakımından DMSO grubu, (4.06±0.3) TAA grubu (4.98±0.20) (p<0.01) ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azalırken, yüksek doz genistein uygulanan YDG+TAA grubuna (3.24±0.44) (p<0.05) göre anlamlı olarak artmıştır. DMSO grubu (4.06±0.3), YDG grubu (2.73±1.16) (p<0.05), ile karşılaştırıldığında ise anlamlı olarak artmıştır.

TAA grubu ise DDG, DDG+TAA, YDG ve YDG+TAA gruplarıyla karşılaştırıldığında doku GSH-Px bakımından yüksek düzeyde olduğu gözlemlendi. Düzeydeki bu artış istatistiksel olarak anlamlıydı. TAA grubu (4.98±0.20), DDG

ile (4.05 ± 0.72) ($p < 0.05$), DDG+TAA grubu ile (3.80 ± 0.62) ($p < 0.01$), YDG (2.73 ± 1.16) ($p < 0.05$), ve YDG+TAA (3.24 ± 0.44) ($p < 0.01$) grubu ile anlamlı istatistiksel farklılıklar gösterdi.

DDG grubu (4.06 ± 0.3), YDG grubuna göre (2.73 ± 1.16) ($p < 0.05$), anlamlı artış gösterdi. DDG+TAA grubunda ise YDG+TAA grubuna göre (3.24 ± 0.44) ($p < 0.05$), anlamlı azalmalar kaydedildi.

6.2.5. Eritrosit SOD Düzeyleri



Şekil 19. Eritrosit SOD düzeyleri

^a $p < 0.01$ (Grup 1-4)

^b $p < 0.05$ (Grup 2-4)

^c $p < 0.05$ (Grup 3-4)

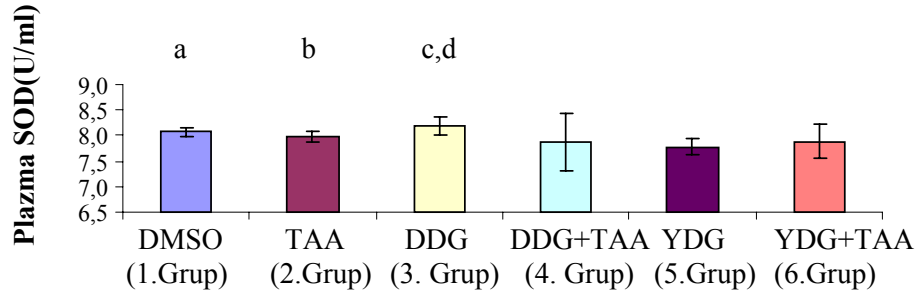
^d $p < 0.05$ (Grup 4-5, 6)

Eritrosit SOD aktivitesi bakımından DMSO grubu (254.8 ± 78.75), DDG+TAA uygulanan grup (401 ± 60.90) ($p < 0.01$), ile karşılaştırıldığında düşük bulundu.

TAA grubu (311 ± 59.37), DDG+TAA grubu (401 ± 60.90) ($p<0.05$), ile karşılaştırıldığında düşük bulundu.

DDG grubu (257.2 ± 98.07), DDG+TAA grubu (401 ± 60.90) ($p<0.05$), ile karşılaştırıldığında düşük bulundu. DDG+TAA grubunun (401 ± 60.90), YDG grubu (318.7 ± 31.31) ($p<0.05$), ve YDG+TAA grubu (322.8 ± 26.61) ($p<0.05$), ile yapılan karşıtırlmalarında ise sırasıyla şekilde anlamlı artışlar gözlemlendi.

6.2.6. Plazma SOD Düzeyleri



Şekil 20. Plazma SOD Düzeyleri

^a $p < 0.01$ (Grup 1-5)

^b $p < 0.05$ (Grup 2-3)

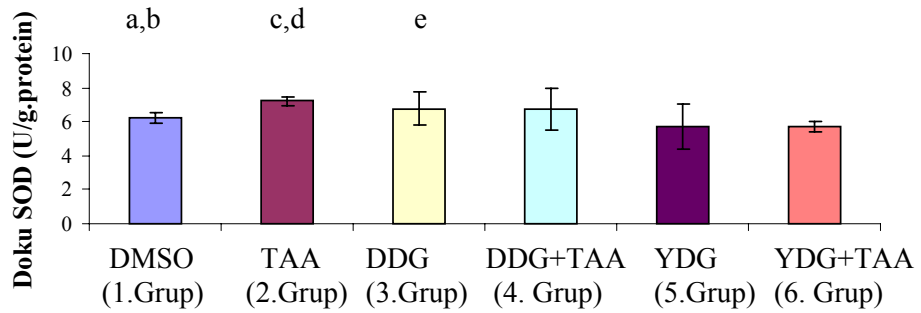
^c $p < 0.01$ (Grup 3-5)

^d $p < 0.05$ (Grup 3-6)

DMSO grubunda (8.07 ± 0.09), YDG ile karşıtırıldığında plazma SOD düzeyinin yüksek olduğu gözlemlendi. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı (7.77 ± 0.16) ($p<0.01$) ifade edildi. TAA grubunda (7.97 ± 0.10) DDG grubu (8.20 ± 0.17) ($p<0.05$) ile karşıtırıldığında plazma SOD düzeyinin düşük olduğu gözlemlendi.

DDG (8.20±0.17), YDG (7.77±0.16) ve YDG+TAA (7.89±0.32) karşılaştırıldığında SOD düzeyinde artış olduğu gözlemlendi. Bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı. Karşılaştırma sonucu TAA grubu (7.97±0.10), YDG grubu (7.77±0.16) (p<0.01) ve YDG+TAA grubuna (7.89±0.32) (p<0.05) göre anlamlı olarak arttığı tespit edildi.

6.2.7. Karaciğer Dokusu SOD Düzeyleri



Şekil 21. Karaciğer Dokusu SOD düzeyleri

^ap < 0.01 (Grup 1-2)

^bp < 0.05 (Grup 1-5)

^cp < 0.05 (Grup 2-5)

^dp < 0.01 (Grup 2-6)

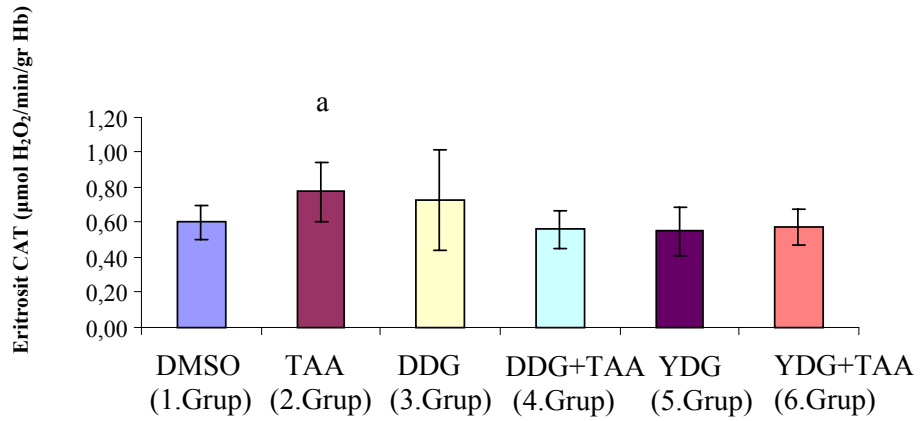
^ep < 0.05 (Grup 3-6)

Doku SOD aktivitesi bakımından TAA grubu (7.2±0.29) DMSO grubu (6.18±0.30) (p<0.01) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi.

YDG grubu (5.72±1.29), DMSO ve TAA gruplarıyla karşılaştırıldığında ise doku SOD aktivitelerinin YDG grubunda azaldığı tespit edildi. Bu azalma

istatistiksel olarak anlamlı bulundu ve DMSO grubunda (6.18 ± 0.30) ($p < 0.05$), TAA grubunda (7.2 ± 0.29) ($p < 0.05$) ($p = 0.042$) olarak ifade edildi. YDG+TAA grubunda (5.72 ± 0.62), TAA ve DDG gruplarıyla yapıldığı karşılaştırmada SOD düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı görüldü. TAA grubunda bu fark (7.2 ± 0.29) ($p < 0.01$) DDG grubunda (6.78 ± 0.9) ($p < 0.05$) olarak ifade edildi.

6.2.8. Eritrosit CAT Düzeyleri

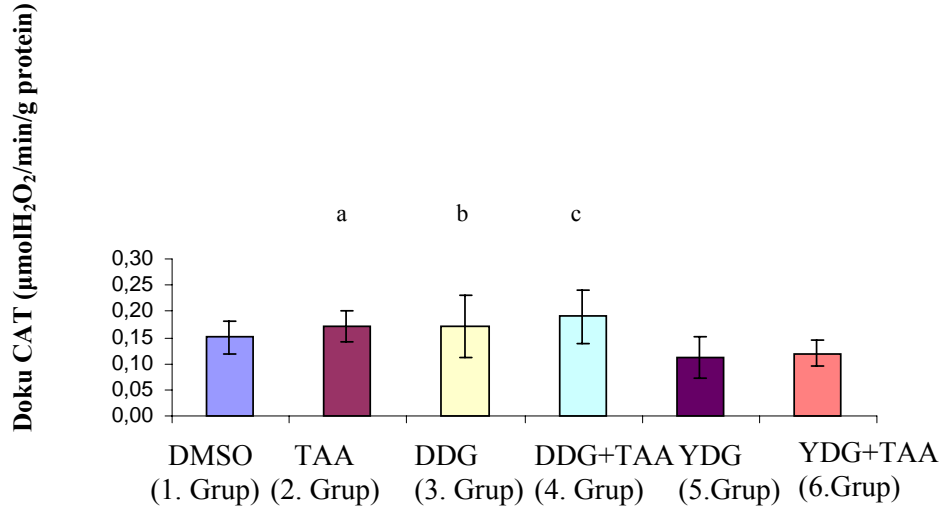


Şekil 22. Eritrosit CAT düzeyleri

^a $p < 0.05$ (Grup 2-4, 5)

TAA grubu (0.776 ± 0.167), DDG+TAA ve YDG grubu ile karşılaştırıldığında eritrosit katalaz düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı arttığı gözlemlendi. Bu artış DDG+TAA ile yapılan karşılaştırmada (0.562 ± 0.107) ($p < 0.05$) ve YDG ile yapılan karşılaştırmada (0.551 ± 0.138) ($p < 0.05$) olarak ifade edildi.

6.2.9. Karaciğer Dokusu CAT Düzeyleri



Şekil 23. Karaciğer dokusu katalaz düzeyleri.

^ap < 0.05 (Grup 2-5, 6)

^bp < 0.05 (Grup 3-5)

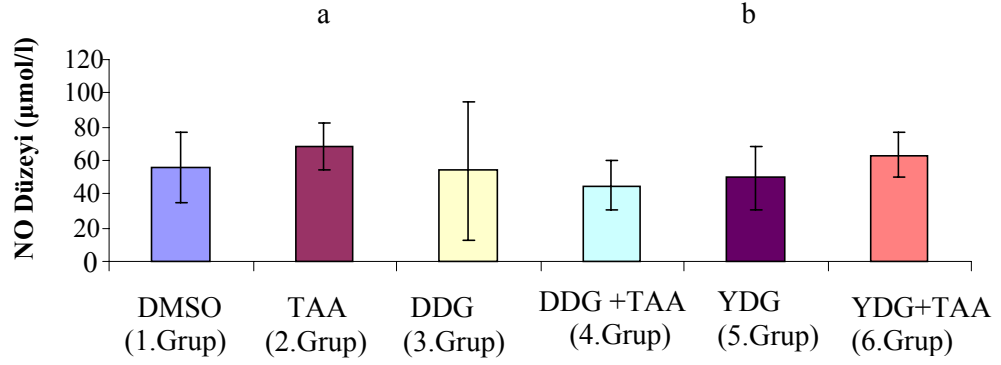
^cp < 0.05 (Grup 4-5,6)

Doku katalaz düzeyi, TAA grubu (0.172±0.030) YDG ve YDG+TAA grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak arttığı görüldü. Bu istatistiksel anlamlı fark YDG grubunda (0.112±0.039) (p<0.05), YDG+TAA grubunda (0.120±0.025) (p<0.05) olarak bulundu.

DDG grubunun (0.171±0.059), YDG grubu (0.112±0.039) (p<0.05), ile yapılan karşılaştırılmasında ise anlamlı olarak azalmalar kaydedildi.

Yine DDG+TAA (0.190±0.051) ile YDG+TAA karşılaştırıldığında (0.120±0.025) (p<0.05) istatistiksel farkla, DDG+TAA grubunda doku katalaz düzeyi yüksek bulundu.

6.2.10. Plazma NO Düzeyleri



Şekil 24. Plazma Nitrik Oksit (NO) düzeyleri

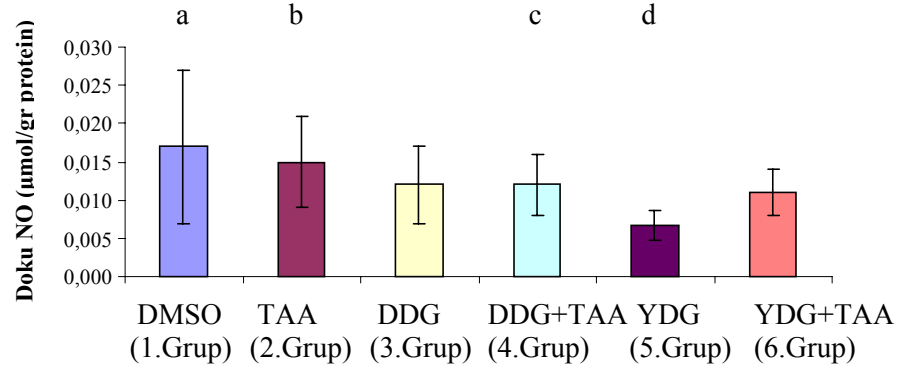
^ap < 0.05 (Grup 2-4, 5)

^bp < 0.05 (Grup 5-6)

Plazma NO düzeyi, TAA grubunda en fazla artışı gösterdi. Fakat bu artma TAA (68.68±13.89) ile DDG+TAA grubunda ve TAA ile YDG grubunda istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Bu anlamlı farklılıklar sırasıyla, (45.17±15.16) (p<0.05) ve (50.02±18.69) (p<0.05) olarak ifade edildi.

Ayrıca plazma NO düzeyinin YDG (50.02±18.69) ve YDG+TAA grubunda yapılan karşılaştırmasında, YDG+TAA grubunda artış gözlemlendi. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı olup (63.14 ±13.29) (p<0.05) olarak ifade edildi.

6.2.11. Karaciğer Dokusu NO Düzeyleri



Şekil 25. Karaciğer dokusu NO düzeyleri.

^ap < 0.01 (Grup 1-5)

^bp < 0.05 (Grup 2-5)

^cp < 0.05 (Grup 4-5)

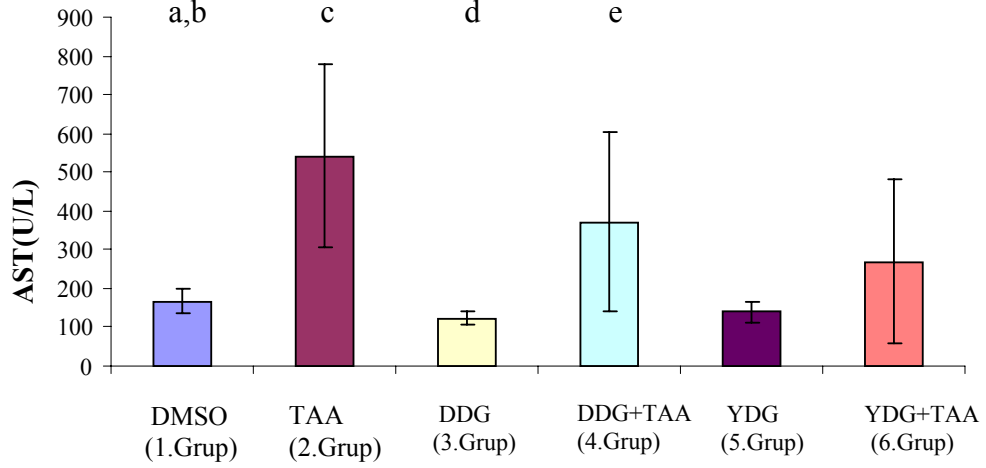
^dp < 0.05 (Grup 5-6)

Doku NO düzeyi bakımından DMSO grubu (0.017±0.010), YDG grubuna (0.0067±0.002) (p<0.01) göre anlamlı olarak arttı.

TAA uygulan grupta da (0.015±0.006) YDG grubu (0.0067±0.002) (p<0.05) ile yapılan karşılaştırma sonucu anlamlı artış gözlemlendi.

DDG+TAA grubunda (0.012±0.004), YDG grubu (0.0067±0.002) (p<0.05) ile yapılan karşılaştırılmasında sonucu anlamlı artış gözlemlendi. Fakat YDG grubunun (0.0067±0.002), YDG+TAA (0.011±0.003) (p<0.05) uygulanan grup ile yapıldığı karşılaştırılmada istatistiksel olarak anlamlı artış kaydedildi.

6.2.12. Serum AST Düzeyleri



Şekil 26. Serum AST düzeyleri

^ap < 0.01 (Grup 1-2)

^bp < 0.05 (Grup 1-4)

^cp < 0.01 (Grup 2-3,5)

^dp < 0.01 (Grup 3-4)

^ep < 0.05 (Grup 4-5)

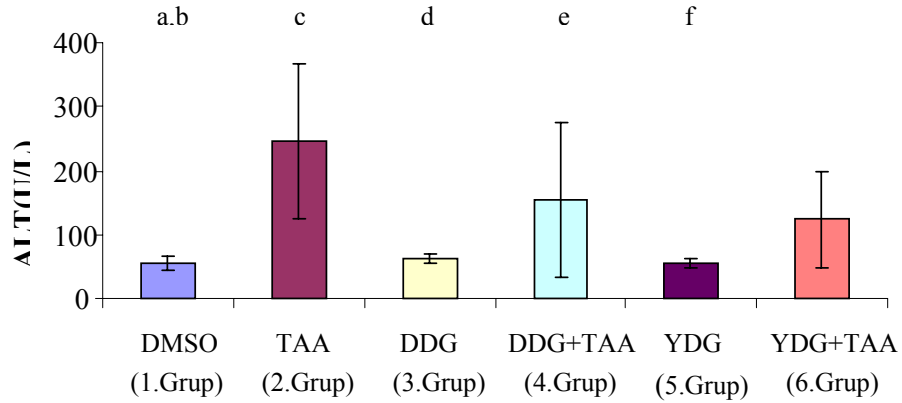
AST aktivitesi yönünden DMSO grubunun (167±33) TAA grubu (541±235) (p<0.01) ve DDG+TAA grubu (371±231) (p<0.05) ile yapılan karşılaştırmalarında anlamlı olarak düşük bulundu.

Yine TAA grubu AST aktivitesinin DDG ve YDG grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olup arttığı gözlemlendi. Bu anlamlı farklılıklar DDG grubunda (123±18) (p<0.01), YDG grubunda (139±26) (p<0.01) olarak bulundu.

DDG grubunun (123±18), DDG+TAA (371±231) (p<0.01) ile yapılan karşılaştırmasında AST seviyesi düşük bulundu. DDG+TAA grubunun (371±231)

YDG grubu (139 ± 26) ($p < 0.01$) ile yapılan karşılaştırmasında AST seviyesi yüksek bulundu.

6.2.13. Serum ALT Düzeyleri



Şekil 27. Serum ALT düzeyleri.

^a $p < 0.01$ (Grup 1-2,4)

^b $p < 0.05$ (Grup 1-6)

^c $p < 0.01$ (Grup 2-3,5)

^d $p < 0.05$ (Grup 3-4)

^e $p < 0.05$ (Grup 4-5)

^f $p < 0.05$ (Grup 5-6)

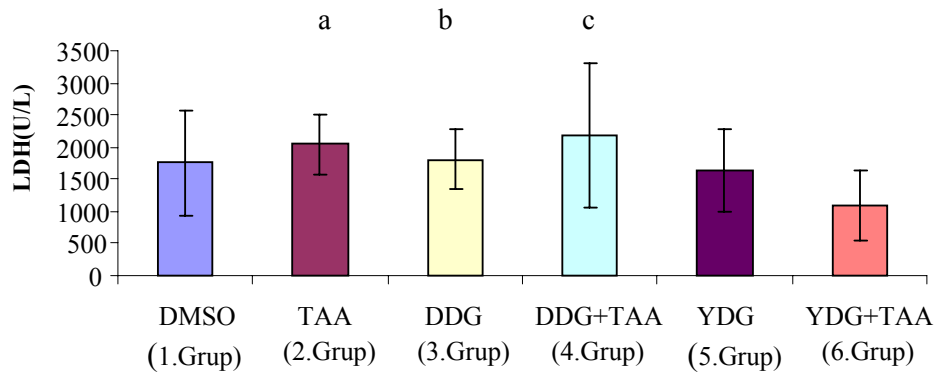
ALT aktivitesi bakımından karşılaştırmalar yapıldığında DMSO grubunun (55 ± 11), TAA grubu (245 ± 122) ($p < 0.01$), DDG+TAA grubu (154 ± 121) ($p < 0.01$) ve YDG+TAA (123 ± 76) ($p < 0.05$) grubuna göre anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi.

TAA grubunda (245 ± 122) yine AST aktivitesinde olduğu gibi ALT aktivitesi bakımından DDG ve YDG gruplarında istatistiksel olarak anlamlı

artışlar gözlemlendi. DDG grubunda (62 ± 7) ($p<0.05$), YDG grubunda (56 ± 7.3) ($p<0.01$) bulundu.

DDG+TAA grubunun (154 ± 121) YDG grubu (56 ± 7.3) ($p<0.01$) ile yapılan karşılaştırmasında AST seviyesi yüksek bulundu. YDG grubunun (56 ± 7.3), YDG+TAA grubu (123 ± 76) ($p<0.05$) ile yapılan karşılaştırılmasında AST seviyesi düşük bulundu.

6.2.14. Serumda LDH Düzeyleri:



Şekil 28. Serum LDH Düzeyleri.

^a $p < 0.05$ (Grup 2-6)

^b $p < 0.05$ (Grup 3-6)

^c $p < 0.05$ (Grup 4-6)

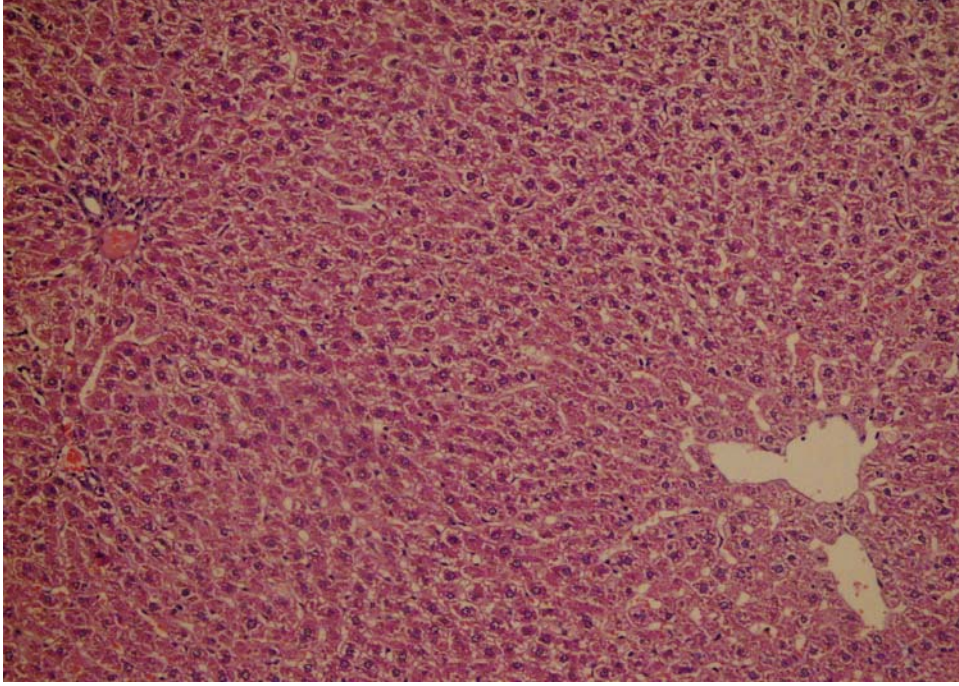
LDH aktivitesinin YDG+TAA grubunda (1101 ± 550); TAA grubu, DDG ve DDG+TAA grubuna göre anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi. Bu farklılıklar sırasıyla (2045 ± 467) ($p<0.05$), (1808 ± 475) ($p<0.05$) ve (2178 ± 1132) ($p<0.05$) olarak ifade edildi.

6.3.Histopatolojik Bulgular:

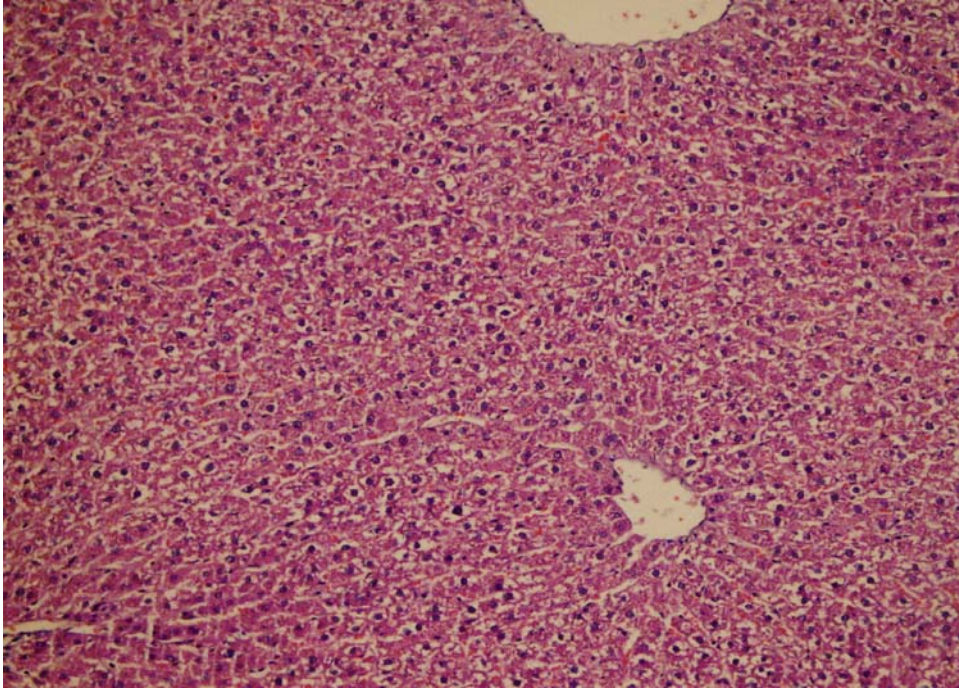
Tablo 19: Histopatolojik bulguların değerlendirilmesi

Grup Adı	Hidrofobik dejenerasyon			Portal alanlarda iltihabi hücre infiltrasyonu			Fibrozis			Displazi		
	Hafif	Orta	Şiddetli	Hafif	Orta	Şiddetli	Hafif	Orta	Şiddetli	Hafif	Orta	Şiddetli
DMSO												
1	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TAA												
1	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-
2	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-
3	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-
4	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
5	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
6	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-
7	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-
DDG												
1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DDG +TAA												
1	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
2	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-
3	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
4	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
5	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
6	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
7	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-
YDG												
1	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
YDG+TAA												
1	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
2	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-
3	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
4	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
5	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
6	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
7	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-

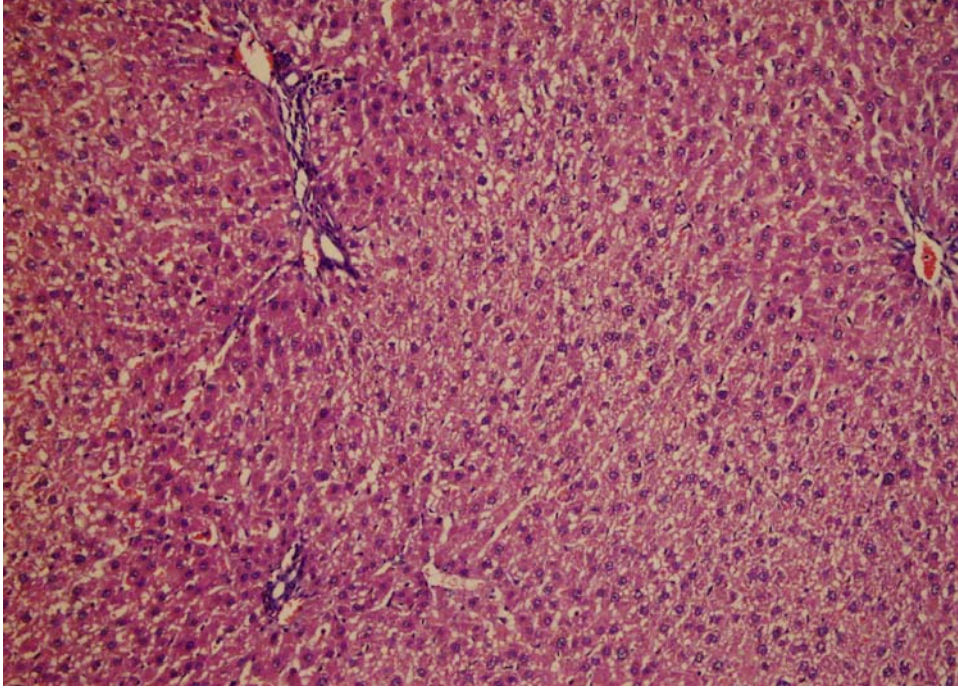
6.3.1.Histopatolojik İnceleme Bulguları



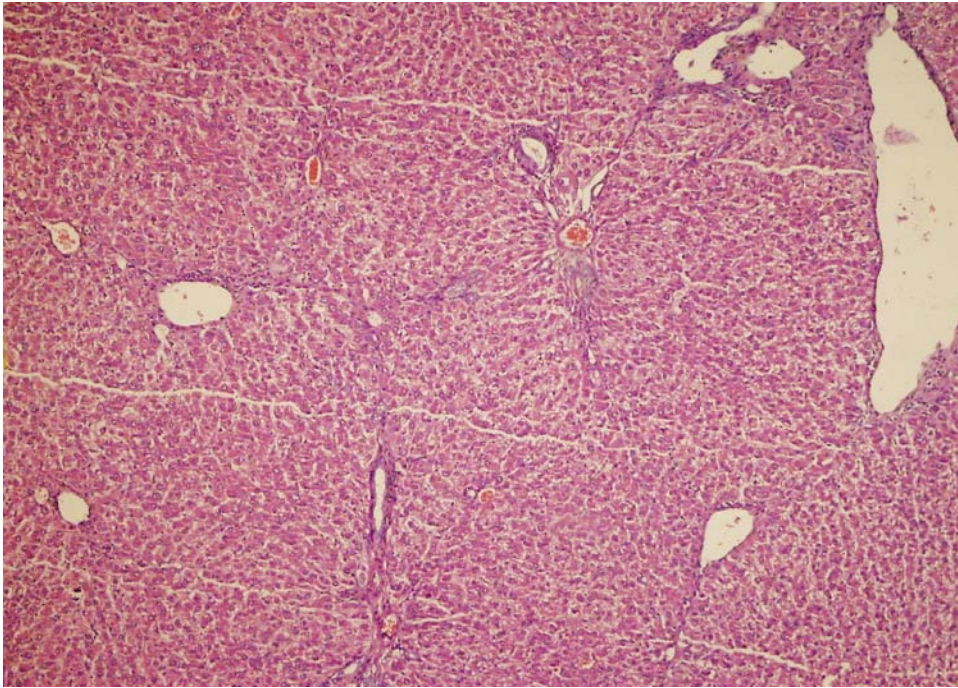
Şekil 29. DMSO kontrol grubu ratlara ait karaciğer dokusunun histopatolojik görünümü (Hematoksilen-eozin, x100)



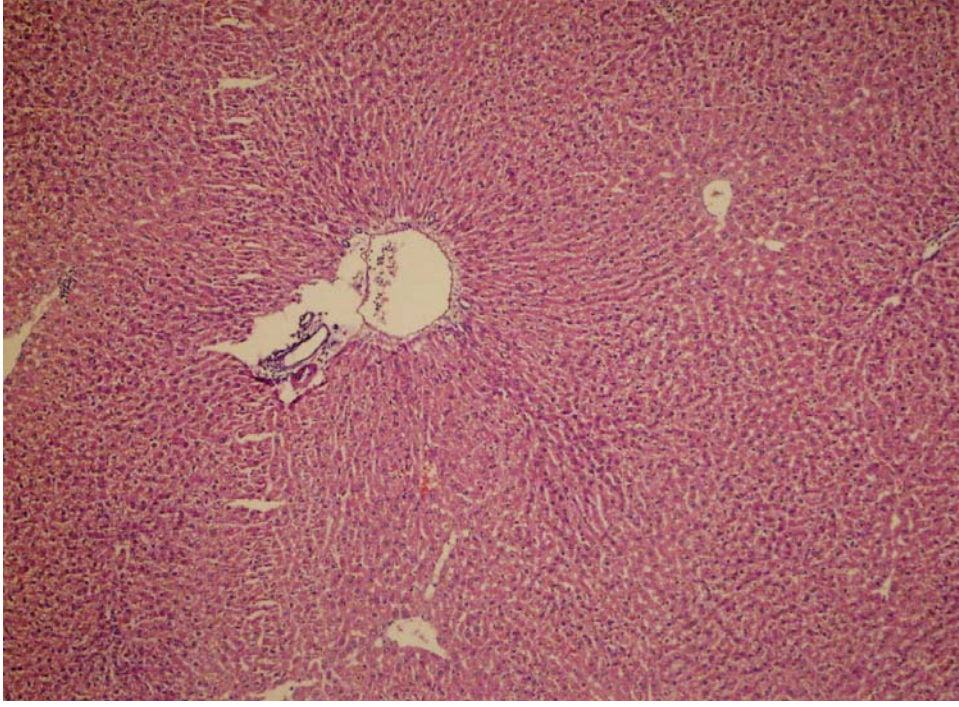
Şekil 30. TAA kontrol grubu ratlara ait karaciğer dokusunun histopatolojik görünümü (Hematoksilen-eozin, x100)



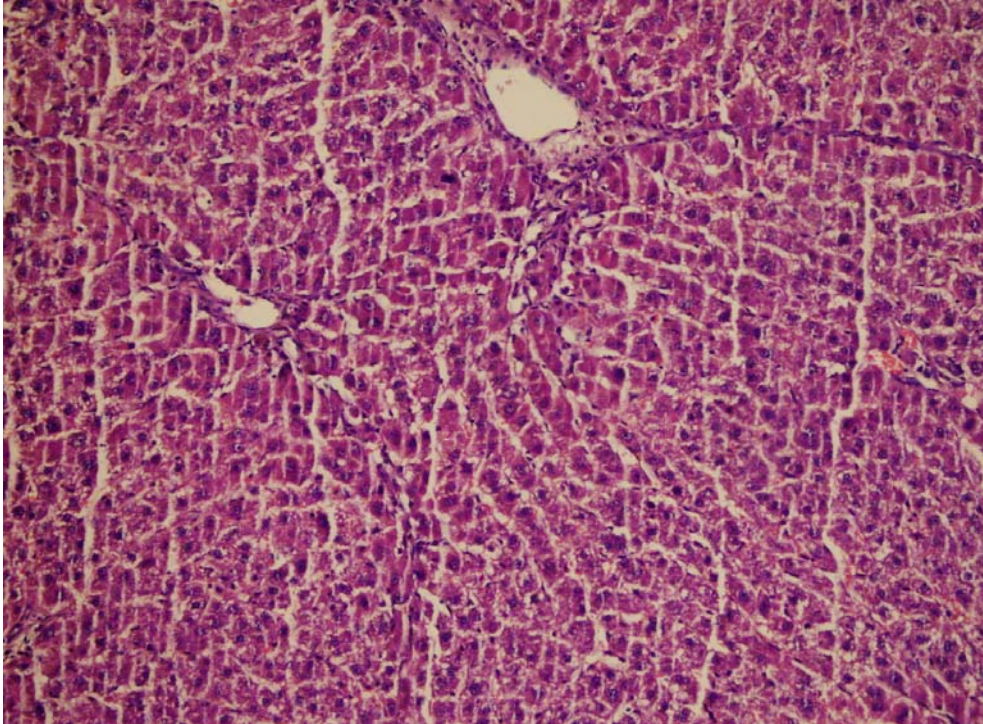
Şekil 31. DDG grubu ratlara ait karaciğer dokusunun histopatolojik görünümü (Hematoksilen-eozin, x100)



Şekil 32. DDG+TAA grubu ratlara ait karaciğer dokusunun histopatolojik görünümü (Hematoksilen-eozin, x40)



Şekil 33. YDG grubu ratlara ait karaciğer dokusunun histopatolojik görünümü (Hematoksilen-eozin, x40)



Şekil 34. YDG+TAA grubu ratlara ait karaciğer dokusunun histopatolojik görünümü (Hematoksilen-eozin, x100).

Tablo 20. Gruplardaki histopatolojik karaciğer hasarının değerlendirilmesi

Grup Adı	Hidrofobik dejenerasyon			Portal alanlarda iltihabi hücre infiltrasyonu			Fibrozis			Displazi		
	Hafif	Orta	Şiddetli	Hafif	Orta	Şiddetli	Hafif	Orta	Şiddetli	Hafif	Orta	Şiddetli
DMSO (n:7)	%42	-	-	%14	-	-	-	-	-	-	-	-
TAA (n:7)	-	-	%100	%14	%71	%14	-	-	%100	%85	-	-
DDG (n:7)	%28	-	-	%14	-	-	-	-	-	-	-	-
DDG+TAA (n:7)	%14	%85	-	%57	%42	-	%28	%28	%42	%14	%14	-
YDG (n:7)	%28	-	-	%28	-	-	-	-	-	-	-	-
YDG+TAA (n:7)	%57	%42	-	%85	%14	-	%71	%28	-	-	%28	-

Bu çalışmada, gruplar arasında histopatolojik olarak önemli değişiklikler görüldü. TAA grubunda %100 şiddetli hidrofobik dejenerasyon ve fibrozis izlendi. Ayrıca bu grupta % 85 displazinin gerçekleşmesiyle de mevcut deneyimizde TAA hepatotoksik etki göstererek hasar oluşturduğu gözlemlendi.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde karaciğer hasarı; alkol kullanımı, viral hepatitler, Wilson hastalığı, bazı ilaçların sürekli veya aşırı dozda kullanımı gibi birçok nedene bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Yapılan deneysel modellerde karaciğer hasarının etkilerini yok etmek ya da daha aza indirmek için birçok antioksidan özellikle maddelere yer verilmiştir. Çalışmamızda birçok deneysel modelde kullanılan ve hepatotoksik bir ajan olan TAA ile oluşturduğumuz karaciğer hasarının önlenmesinde genistein kullanmayı uygun bulduk. Genistein; protein tirozin kinaz aracılı sinyal yolunu inhibe ederek, kanser hücrelerinin gelişimine neden olan protein tirozin kinaz enzimini inhibe etmesi (116); enzim faaliyetini durdurucu ve antioksidan ve östrojenik etkilere sahip bir bileşik olması, aynı zamanda neoplastik hastalıkları tedavi edici ve bu hastalıklardan koruyucu etkilerinde bulunması, epidemiyolojik çalışmalarda yer alması nedeni ile tercih edilmiştir (147,148).

Ratlarla yapılan bu deneysel çalışmada histopatolojik incelemelerde de görüldüğü gibi TAA ile başarılı bir şekilde karaciğer hasarı oluşturuldu. TAA'ın dozu, hasar oluşturma süresi ve şekli deney öncesinde yapılan ön çalışmalarla optimize edildi. TAA uygulanan sıçanlarda üç aylık sürenin sonunda hasar olduğu gözlemlendi. Kontrol grubu ve TAA uygulanan gruplardaki plazma AST, ALT LDH ve histopatolojik incelemeler hasarı tam olarak destekledi. Genisteinin yüksek ve düşük uygulandığı gruplarda da lipid peroksidasyonu ve nitrik oksit seviyelerinde iyileşmeler gözlemlendi.

AST, ALT ve LDH karaciğer hasarının değerlendirilmesinde kullanılan önemli enzimlerdir. Çalışmada TAA uygulanan gruplardaki AST düzeylerinin

diğer gruplara oranla arttığı gözlemlendi. DMSO grubunun, TAA grubu ve DDG+TAA gruplarıyla ($p<0.05$) olan karşılaştırılmalarında istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlemlendi. TAA uygulanan grupta ise AST enzim düzeyi DDG grubuna ($p<0.01$) ve ($p<0.01$) grubuna göre anlamlı olarak arttı. Çalışmamızda ALT enzim düzeyi de TAA verilen grupta, DDG grubu ($p<0.01$) ve YDG grubuna göre ($p<0.01$) anlamlı olarak arttı. Genistein ve TAA' in birlikte uygulandığı her iki grupta da ALT düzeylerinin YGD grubu ile yapılan karşılaştırmalarında anlamlı olarak arttığı görüldü. Bu anlamlılık DDG+TAA grubunda ($p<0.05$) YDG+TAA grubunda ise ($p<0.05$) olarak ifade edildi. LDH aktivitesinin YDG+TAA grubunda; TAA grubu ($p<0.05$), DDG grubu ($p<0.05$) ve DDG+TAA grubuna göre ($p<0.05$) anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi. Bizim bulgularımızda olduğu gibi ratlarda TAA'in karaciğer enzimlerinin düzeylerini arttırdığına dair yapılan çalışmalar vardır. Kai ve ark. Leptin ve TAA kullanarak yaptıkları çalışmada TAA uygulaması yapılan TAA grubunda AST ve ALT düzeylerinin anlamlı olarak arttığını rapor etmişlerdir (149). Benzer bir çalışmayı Isaac Tu'nez ve ark yapmışlardır. Araştırmacılar ratlara TAA vererek melatoninin etkisini araştırmışlar ve TAA verilen grupta AST, ALT ve LDH enzim düzeylerinde anlamlı artışlar olduğunu ve melatoninin de artan bu enzim düzeylerini anlamlı olarak azalttığını bulmuşlardır (150). Çalışmamızda ölçülen düzeylerin gruplardaki ortalamalarına baktığımızda TAA uygulanan gruplarda AST, ALT ve LDH düzeylerinin, genisteinle birlikte TAA uygulanan gruplardaki enzim düzeylerine göre daha fazla arttığını bulduk. Fakat bu artış yapılan istatistiksel karşılaştırmada anlamlı değildi. Sadece yüksek doz genisteinle birlikte TAA uygulanan grupla TAA kontrol grubu arasında ile yapılan istatistiksel karşılaştırma sonucu LDH

düzeşinin anlamlı olarak azaldığı görüldü. Bu nedenle genisteinin yüksek dozda uygulandığı bu grupta iyileştici etki gösterdiği, zaman ve doza bağılı olarak bu etkilerini diğer karaciğer enzim düzeyleri üzerinde de göstereceğı kanaatine vardık.

Çalışmamızda oksidatif stres markerı olarak kabul edilen MDA hem karaciğer homojenatında hem de plazmada çalışıldı. Doku homojenatında TAA uygulanan grupta MDA düzeyinin, en yüksek seviyede olduğı görüldü. Doku MDA düzeyleri TAA grubunda, DMSO grubu ($p<0.01$), DDG grubu ($p<0.01$) ve YDG grubuna ($p<0.05$) göre anlamlı olarak artış gösterdi. DDG grubunda da DDG+TAA grubu ($p<0.01$) ve YDG+TAA grubuna ($p<0.01$) göre anlamlı olarak düşük bulundu. Yine YDG grubunda, DDG+TAA grubu ($p<0.01$) ve YDG+TAA grubuna ($p<0.05$) göre anlamlı olarak azaldı. Karaciğer dokusundaki MDA düzeyindeki bu artış, TAA'ın lipid peroksidasyonuna ve dolayısıyla oksidatif hasara yol açtığını ortaya koydu. Çalışma sonunda lipid peroksidasyonu bakımından elde ettiğimiz bilgiler daha önce yapılan çalışmalar ile aynı doğrultuydu. Örneğın Borai ve arkadaşları ratlarla yaptıkları çalışmalarında TAA uygulamasının lipid peroksidasyonunu arttırdığı görüşüne yer vermişlerdir (151). Çalışmamızda TAA' ın neden olduğı artan lipid peroksidasyonunda, düşük ve yüksek doz genistein uygulamalarının peroksidasyonunu azaltıcı yönde etkin olduğı sonucuna varıldı. Doku MDA düzeylerinin TAA kontrol grubu değerlerinden daha düşük olması, genisteinin oksidatif stresi azaltan bir bileşik olmasından kaynaklandığı görülmektedir. Çünkü genistein fenol hidroksil kalıntılarını içerir ve bu yapıda genisteine potansiyel bir radikal temizleyicisi özelliğı kazandırır. Yapılan diğer çalışmalarda fenolik bileşiklerin, lipit

peroksidasyonu esnasında oluşan lipidlerin polimer zincir reaksiyonlarını kırarak, ROS'u dokulardan uzaklaştırıp antioksidan özellik gösterdikleri ortaya konulmuştur (152). Jha ve ark yaptıkları çalışmada genisteinin lipid peroksidasyonunu inhibe edici bir bileşik olduğunu rapor etmişlerdir (153). Çalışmamızda farklı dozlarda verilen genistein, karaciğer MDA düzeyinde etkinliğini açıkça gösterdi. Fakat plazmada yaptığımız çalışmalarda bu durum farklı gözlemlendi. Plazma MDA düzeyleri bakımından en fazla lipid peroksidasyonun YDG grubunda olduğu gözlemlendi. Bu durumun lipid peroksidasyonunun plazma konsantrasyonuna bağlı olabileceğine karar verdik.

Karaciğer hasarı gözlenen ratlarda SOD, GSH-Px aktivitelerindeki azalma ve serbest radikal düzeylerinde artmanın bir sonucu olarak hücresel hasarda artış meydana gelmektedir. Abul H ve ark TAA ile oluşturdukları sirotik ratlarda GSH-Px, SOD ve ürik asit düzeylerinin azaldığını rapor etmişlerdir (154). Bu çalışmada ise eritrosit ve dokuda GSH-Px düzeylerine bakıldı ve eritrosit GSH-Px enzim düzeyi bakımından anlamlı bir fark gözlenmedi. Fakat doku GSH-Px düzeyleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlemlendi. Yapılan diğer çalışmaların aksine bizim çalışmamızda, TAA uygulanan grupta dokuda GSH-Px düzeyi diğer gruplarla karşılaştırıldığında en yüksek seviyede bulundu. Doku GSH-Px düzeyi bakımından DMSO grubu, TAA grubuna göre ($p<0.01$) istatistiksel olarak azalırken, YDG+TAA grubuna ($p<0.01$) göre istatistiksel olarak arttı. TAA grubu ise DDG grubu ($p<0.05$), DDG+TAA grubu ($p<0.01$), YDG grubu ($p<0.05$) ve YDG+TAA grubuna ($p<0.01$) göre anlamlı olarak arttı. DDG grubu doku GSH-Px düzeyi ise, YDG grubuna ($p<0.05$) göre anlamlı olarak artmıştır. Bu anlamlı artış DDG+TAA grubu, YDG grubu ($p<0.05$)

ile karşılaştırıldığında da gözlenmiştir. Literatürlere uygun olarak tiyoasetamitle oluşturulmuş hepatotoksisite modellerinde TAA'in karaciğerde histolojik bozukluğu ve lipid peroksidasyonunu arttığına dair bulgularımıza rağmen, beklenilenin aksine GSH-Px enzim aktivitesi bakımından artan seviyelerin olması, bizim modelimizde kullandığımız TAA dozuyla ve süreyle ilişkili olabilir. Modeldeki TAA konsantrasyonu ve uygulama süreleri arttırılarak yapılacak bir çalışmada GSH-Px seviyesinde anlamlı değişiklikler olacağı kanaatindeyiz..

SOD aktivitesi eritrosit, doku ve plazmada bakıldı. Eritrosit SOD aktivitesi bakımından yapılan karşılaştırmada DMSO grubu, DDG+TAA grubu ($p<0.01$) ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azaldı. DDG grubunda, DDG+TAA ($p<0.05$) ile karşılaştırıldığında düşük bulundu. DDG+TAA grubu ile YDG grubu ($p<0.01$) ve YDG+TAA grubu ($p<0.01$) karşılaştırıldı ve anlamlı artış kaydedildi. Burada önemli olarak genisteinin DDG+TAA uygulanan grupta eritrosit SOD aktivitesini arttırdığını gözledik.

Çalışmamızda plazma SOD enzim aktivitesi, DMSO grubu, YDG grubu ($p<0.01$) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir. TAA grubu da DDG grubu ($p<0.05$) ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azalmıştır. DDG grubunda YDG grubu ($p<0.01$) ve YDG+TAA grubu ($p<0.05$) ile yapıldığı karşılaştırmada SOD düzeyi yüksek bulunmuştur.

Çalışma sonucunda doku SOD aktivitesi bakımında gruplar arasında anlamlı farklılıklar gözlendi. TAA grubunda plazmadaki SOD düzeyinin aksine SOD'düzeyinin arttığı ve bununda YDG ($p<0.05$) ve YDG+TAA gruplarıyla ($p<0.01$) anlamlı olduğu görüldü. Aynı zamanda DMSO grubu da TAA grubu ($p<0.01$) ve YDG ($p<0.05$) grubuna göre anlamlı olarak azaldı. DDG grubunda,

YDG+TAA grubuna ($p<0.05$) göre anlamlı olarak arttığı gözlemlendi. Dokuda yapılan SOD çalışmasında yine doku GSH-Px düzeyi ile benzer durumda olup, etkisi süre ve doza bağımlı olabilir görüşüne varıldı. Reddy ve ark. TAA induksiyonlu ratların mitokondrilerinde SOD aktivitesinin arttığını rapor etmişlerdir (155). Bu H_2O_2 'nin birikimine yol açar. H_2O_2 demir gibi geçiş elementlerinin varlığında oksijen radikallerinden daha toksik olan hidroksil radikallerine dönüşerek lipid peroksidasyonunu başlatır (156).

Katalaz ve glutatyon peroksidaz, H_2O_2 'nin parçalanmasından sorumlu enzimlerdir. Bu enzimler tükenmeye başladığında intrasellüler H_2O_2 birikir. Van Remmen ve ark. rat hepatosit kültürlerinde TAA uygulanması sonucu katalaz ve GSH-Px ekspresyonunun azalmasıyla GSH/GSSG oranında azalma ve lipid peroksidasyonunda artma olduğunu göstermişlerdir (157). Çalışmamızda ise doku katalaz düzeyleri TAA grubunda, YDG grubu ($p<0.05$)ve YDG+TAA grubuna ($p<0.05$) göre anlamlı olarak yüksek bulundu. DDG grubunda yine YDG grubuna göre ($p<0.05$) anlamlı olarak yüksek bulundu. DDG+TAA grubunda da doku katalaz düzeyi YDG grubu ($p<0.05$) ve YDG+TAA grubuna ($p<0.05$) göre anlamlı olarak arttı. Eritrosit katalaz düzeylerine baktığımızda ise TAA grubunda DDG+ TAA grubu ($p<0.05$) ve YDG+ TAA grubuna ($p<0.05$) göre anlamlı olarak yüksek bulundu.

TAA' in NO miktarını arttırdığına dair çalışmalar vardır. W. Laleman ve ark TAA indüksiyonlu ratlarla yaptıkları çalışmada 18 haftalık uygulama sonucunda TAA uygulanan grupta NO miktarlarının kontrol gruplarına göre anlamlı artış gösterdiğini rapor etmişlerdir (158). Çalışmamızda da TAA uygulanan ikinci grupta NO düzeyleri hem dokuda hem de plazmada yapılan çalışmada yüksek

bulundu. Plazmada yaptığımız NO çalışmasında TAA grubu, DDG+TAA grubu ($p<0.05$) ve YDG grubuna ($p<0.05$) göre anlamlı artış kaydedildi. DDG+TAA grubunda genisteinin NO'ı azaltarak etkili olduğu görüldü. Doku NO düzeylerine bakıldığında ise yine TAA grubunun, YDG grubuna ($p<0.05$) göre anlamlı olarak arttığı gözlemlendi. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda NO'nun aşırı üretimi sonucu bozulan endotelial fonksiyonların soy isoflavonlarla tekrar düzeltilebileceği rapor edilmiştir. Bu olayı izoflavonlar direkt olarak eNOS sistemine etki ederek gerçekleştirirler.

Proteolitik enzimler olarak bilinen matriks metalloproteinazlar kanser invazyonu, morfojenезisi organ gelişimi ve doku hasarı esnasında hücrel ve ekstrasellüler bileşenlerin yıkılmasında önemli rol oynadığından çalışmamıza yer vererek düşük ve yüksek dozlarda etkilerini incelemek istedik. İncelemeyi özellikle histopatolojik incelemelerle, pretümoral ve prometastatik markerlar olarak çalışmalarda yoğun olarak kullanılan MMP-2 Ve MMP-9 üzerinde yaptık. Fakat genisteinin hem düşük hem de yüksek dozlarda bu metalloproteinazlar üzerine etkileri olmadığı görüşüne vardık. Yapılan bir çok çalışmalarda MMP-2 ve MMP-9'un aşırı salınımının tümör büyümesi ve metastazını kolaylaştırdığına dair bilgiler mevcuttur. Buna dayanarak çalışma süresini ve uygulamasını yaptığımız her iki maddenin de dozlarını artırdığımız zaman bu etkilerin değişeceği görüşündeyiz.

Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı (NASH), alkolik yağlı karaciğer hastalığı (ASH), hepatit, neoplazi, fibrozis, siroz gibi karaciğer hastalıklarını içeren karaciğer hasarları, dünyada yüksek oranda görülmektedir. Bu yüzden karaciğer hasarının tedavisi ve ilerlemesinin durdurulabilmesi önemlidir. Son

dönemlerde yapılan çalışmalarda karaciğer hasarına yönelik tedavilerin büyük bir çoğunluğunun riskli veya daha az yanıt veren tedaviler olduğu öne sürülmüştür. Çalışmada kullandığımız genistein ve diğer isoflavonlar çok yönlü etkiye sahip doğal bir antioksidanlardır ve birçok hastalığın tedavisinde kullanılırlar. Soyada çok miktarda bulunan genistein, karaciğer hastalıklarının tedavisinde ve hasarların önlenmesinde önemli bir etkiye sahip olabilir. Bu nedenle karaciğer hasarlarına karşı genisteinin, tedavide kullanımına yönelik araştırmaların daha ileri düzeylerde yapılması gerekmektedir.

8. KAYNAKLAR

1. Kaplan LA, Pesce JA, Kazmierczak SC. (2003). Clinical Chemistry, Theory, Analysis. Correlation. Mosby 8: 493-497.
2. McGlynn K, London W. (2005). Epidemiology and natural history of hepatocellular carcinoma. Best Pract Res Clin Gastroenterol 19(1): 3-23.Review.
3. Dashti H, Jeppson B, Haggerstrand I. (1989). Thioacetamide- and carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis. Eur Surg Res 21: 83-91.
4. Zimmerman T, Muller A, Machmik G. (1987) Biochemical and morphological studies on production and regression of experimental liver cirrhosis induced by thioacetamide in Uie: WIST rats. Z Vercuchtierkd 30: 165-180.
5. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J.(2003) Oxidative DNA damage: Mechanisms, mutation, and disease. FASEB J 17: 1195-1214.
6. Cochran CG. (1991) Cellular injury by oxidants. Am. J. Med 92: 235-305.
7. Evans MD, Cooke MS. (2004). Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. BioEssays 26: 533-542.
8. K. Frenkel. (1992). Carcinogen-mediated oxidant formation and oxidative DNA damage. Pharmacol. Ther 53: 127-166.
9. R.A. Floyd. (1990). The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. Carcinogenesis 11: 1447-1450.
10. R.A. Floyd, M.S. West, K.L. Eneff, J.E. Schneider (1989). Methylene blue plus light mediates 8-hydroxyguanine formation. Arch Biochem Biophys 273(1): 106-11.
11. Wu D, Cederbaum A.I.(2003) Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. Alcohol Research and Health. Washington 27(4): 277-84.
12. Muller D, Sommer M, Kretzschmar M et al. (1991). Lipid peroxidation in thioacetamide-induced macronodular cirrhosis. Arch Toxicol 65: 199–203.
13. Abul H, Mathew TC, Dashti HM et al. (2002) Level of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and uric acid in thioacetamide- induced cirrhotic rats. Anat Histol Embryol 31: 66–71.
14. Akyol Ö. (2004). Şizofrenide Oksidatif Stres. Kocatepe Tıp Dergisi 5: 15-25.
15. Gültekin F, Delibaş N, Yaşar S, Kılınç İ. (2001). In vivo changes in antioxidant systems and protective role of melatonin and a combination of vitamin C and vitamin E on oxidative damage in erythrocytes induced by chlorpyrifos-ethyl in rats. Arch. Toxicol 75: 88-96.
16. Matés JM. (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. Toxicology 153: 83-104.
17. Rauha, J.P., Tammela, P., Summanen, J., Vuorela, P., Kahkonen, M., Heinonen, M., Hopia, A., Kujala, T., Pihlaja, K., Törnquist, K. and Vuorela, H. (1999). Action of some plant

extracts containing flavonoids and other phenolic compounds on calcium fluxes in clonal rat pituitary GH₄C₁ cells. *Pharm. Pharmacol. Lett* 9: 66-69.

18. Summanen J, Vuorela P, Rauha J.-P, Tammela P, Marjamaki K, Pasternack M, Törnquist K and Vuorela H. (2001). Effects of simple aromatic compounds and flavonoids on Ca⁺² fluxes in rat pituitary GH₄C₁ cells. *Eur. J. Pharmacol* 414: 125-130.
19. Curan, S., and Murray, G.I. (2000). Matrix metalloproteinases: Molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur. J. Cancer* 36: 1621-1630.
20. Nelson, A. R., Fingleton, B., Rothenberg, M. L., and Matrisian, L.M. (2000). Matrix metalloproteinases: Biologic activity and clinical implications. *J. Clin. Oncol* 18: 1135-1144
21. Heslin MJ, Yan J, Johnson MR, Weis H, Diasio RB, Urist MM. (2001) Role of matrix metalloproteinases in colorectal carcinogenesis. *Ann Surg* 233: 786-792.
22. Lee RG. (1994). Fibrosis and cirrhosis. *Diagnostic Liver Pathology*. Mosby-year Book Inc 1: 280-304.
23. Shimiziu I. (2001). Antifibrogenic therapies in Chronic HCV infection. *Current Drug Targets Infectious Disorders* 1 (2): 227-240.
24. Shimiziu I. (2003). Impact of estrogens on the progression of liver disease. *Liver International* 23 (1): 63-69.
25. A. Mora, M. Paya, J.L. Rfos, M.J. Alcaraz. (1990). Structure-activity relationships of polymethoxyflavonoids and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol* 40: 793-797.
26. I. Morel, G. Lescoat, P. Cogrel, O. Sergent, N. Padeloup, P. Brissot, P. Cillard, J. Cillard. (1993). Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures, *Biochem. Pharmacol* 45: 13-19.
27. K. Shimoi, S. Masuda, B. Shen, M. Furugori, N. Kinae. (1996). Radioprotective effects of antioxidative plant flavonoids in mice. *Mutat. Res* 350 153-161.
28. Knight DC. (1996). Eden JA. A Review Of The Clinical Effects Of Phytoestrogens. *Obstet Gynecol* 87: 897-904.
29. Dixon RA, Ferreira D. (2002). Genistein. *Phytochemistry* 60: 205-211.
30. Skibola, C. F., and Smith, M. T. (2000). Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radical Biol. Med* 29: 375-383.
31. Wei H, Frenkel K, Bowen R & Barnes S. (1993). Inhibition of tumour-promoter induced hydrogen peroxide formation by genistein in vitro and in vivo. *Nutr Cancer* 20: 1-12.
32. Peluso MR, Winters TA, Shanahan MF, Banz WJ. (2000) A cooperative interaction between soy protein and its isoflavone-enriched fraction lowers hepatic lipids in male obese Zucker rats and reduces blood platelet sensitivity in male Sprague-Dawley rats. *J Nutr* 130: 2333-2342.

33. Ozgonul M, Oge A, Sezer ED, Bayraktar F, Sozmen EY. (2003). The effects of estrogen and raloxifene treatment on antioxidant enzymes in brain and liver of ovariectomized female rats. *Endocr Res* 29: 183–189.
34. Anne B, Michael RL. (2004). Non-alcoholic fatty liver disease, non-alcoholic steatohepatitis and orthotopic liver transplantation. *American Journal of Transplantation* 4: 686-693.
35. Burtis CA, Ashwood ER . (1999). *Teietz Textbook of Clinical Chemistry*. W.B. Saunders Company 3: 1125-1177.
36. John L. Cameron (2001). Liver, anatomy. *Current surgery* 309-321.
37. <http://www.itfanestezi.org/notlar/kc.htm>. Son erişim tarihi 12/10/2007.
38. <http://medicalcenter.osu.edu/patientcare/healthinformation/otherhealthtopics/LiverbiliaryPancreaticDis4540/TheLiverAnatomyandFunction4542/> Son erişim tarihi 23/05/2007.
39. Garner LP, Hiatt JL. (2001). *Color Textbook of Histology* . Philadelphia: WB. Saunders company,;420-12.
40. Ökten A.(2001). Temel ve Klinik Bilimler Ders Kitapları.Gastroenterohepatoloji. Nobel tıp Kitapevleri 311-314.
41. Leeson TS, Leeson CR, Paparo AA. (1988). *Text/Atlas of Histology*. W.B. Saunders company 475-496.
42. Şentürk H. Serbest radikal hasarının hepatobilier sistem hastalıklarındaki rolü (2004). *Kocatepe Tıp Dergisi* 5: 1-8.
43. Jones AL, Spring-Mills E. (1988). *The Liver and Gallbladder, Cell and Tissue Biology A textbook of Histology*'de, 6.Ed., Ed. Weiss L. München, Urban&Schwarzenberg Inc.,; 696.
44. Wake K, Kawai Y, Smedsrod B. (2001). Re-evaluation of the reticulo-endothelial system. *Ital J Anat Embryol* 106 (1): 261-269.
45. Kan Z, Ivancev K, Lunderquist A, McCuskey PA, McCuskey RS, Wallace S. (1995). In vivo microscopy of hepatic metastases: dynamic observation of tumor cell invasion and interaction with Kupffer cells. *Hepatology* 21: 487-494.
46. Junquera C, Carneiro J, Kelly RO. Sindirim Kanalına Bağlı Bezler. (1998). *Temel Histoloji* 8: 302-322.
47. Yıldırım M. (2000). İnsan Anatomisi. Beta Basım Yayım Dağıtım A.Ş. 5: 159-184.
48. You M., Crabb DW.(2004). Recent advances in alcoholic liver disease II. Minireview: molecular mechanisms of alcoholic fatty liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver physiol* 287(1): 1-6, Review.
49. Wallaert B, Bonniere P, Prin L, et al. (1986). Primary biliary cirrhosis, subclinical inflammatory alveolitis in patients with normal chest roentgenograms. *Chest* 90: 842-8.
50. Yoshida EM, Erb SR, Ostrow DN, et al. (1994) Pulmonary hypertension associated with primary biliary cirrhosis in the absence of portal hypertension: a case report. *Gut* 35: 280-2.
51. Şentürk Ö. (2003). Uraz S. Kolestatik Karaciğer Hastalıklarında Doğal Seyir ve Prognostik İndeksler (2) *Güncel Gastroenteroloji Sayı* 7(4): 279-284.

52. Alba ML, Lindor K. (2003). Review article: non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 17: 977-986.
53. Brunt EM, Elizabeth M. (2001). Nonalcoholic steatohepatit: Definition and pathology. *Semin Liver Dis* 21: 3-16.
54. Arthur J, McCullough. (2002). Update on nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol* 34(3): 255-262.
55. Tunaoğlu S. (2002). Aspirin ve Çocukluk Çağı Romatizmal Hastalıklarında Kullanımı. *Klinik Pediatri* 1(1): 26-34.
56. Göksoy E, Kapan M. (2002). Karaciğerin Primer Habis Tümörleri. *Hepato-Bilier Sistem ve Pankreas Hastalıkları Sempozyum Dizisi* 28: 159-182.
57. <http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/artmay04/bjthio.html> Son erişim tarihi 25/02/2008
58. Landon, E. J., Naukam, R. J., Rama Sastry, B. V. (1986). *Biochem. Pharmacol.* 35:697–705.
59. Kizer, D. E., Clouse, J. A., Ringer, D. P., Hanson-Painton, O. *et al.* (1985). *Biochem. Pharmacol.* 34:1795–1800
60. Li, X. N., Huang, C. T., Wang, X. H., Leng, X. S. *et al.* (1990). *Chin. Med. J. (Engl.)*103: 970–977.
61. Li, X., Benjamin, I. S., Alexander. (2002). B., *J. Hepatol* 36: 488–493.
62. Bruck, R., Aeed, H., Schey, R., Matas, Z. *et al.* (2002). *J. Hepatol* 36:370–377.
63. Müller A, Machnik F, Zimmermann T, Schubert H. (1988). Thioacetamideinduced cirrhosis-like liver lesions in rats—usefulness and reliability of this animal model. *Exp Pathol* 34: 229–236.
64. Hunter AL, Holscher MA, Neal RA. (1977). Thioacetamide-induced hepatic necrosis. I. Involvement of the mixed-function oxidase enzyme system. *J Pharmacol Exp Ther* 200: 439–48.
65. Tsukamoto, H., Matsuoka, M., French, S.W.(1990) Experimental models of hepatic fibrosis: a review. *Semin. Liv. Dis.* 10:56–65.
66. Ledda-Columbano, G.M., Coni, P., Curto, M., Giacomini, L., Faa, G., Oliverio, S., Piacentini, M., Columbano, A. (1991). Induction of two different models of cell death, apoptosis and necrosis, in rat liver after a single dose of thioacetamide. *Am. J. Pathol.* 275, 1099–1109.
67. Torres, M.I., Fernandez, M.I., Gil, A., Rios, A. (1998). Dietary nucleotides have cytoprotective properties in rat liver damaged by thioacetamide. *Life Sci.* 62, 13–22.
68. Waters, N.J., Waterfield, C.J., Farrant, R.D., Holmes, E., Nicholson, J.K. (2005). Metabonomic deconvolution of embedded toxicity: application to thioacetamide hepato and nephrotoxicity. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 639–654.
69. Chieli, E., Malvaldi, G., (1984). Role of the microsomal FAD-containing monooxygenase in the liver toxicity of thioacetamide-S-oxide. *Toxicology* 31, 41–51.
70. Porter WR, Neal RA. (1978). Metabolism of thioacetamide and thioacetamide S-oxide by rat liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 6:379-388

71. Wang T, Shankar K, Ronis MJ.J., Mehendale HM, (2000). Potentiation of Thioacetamide Liver Injury in Diabetic Rats Is Due to Induced CYP2E1. 294: 473-479.
72. Bruck R, Aeed H, Avni Y, Shirin H, Matas Z, Shahmurov M, et al. (2004) J Hepatol 40: 86.
73. Wang, T., Shankar, M.J.J. Ronis, and H.M.Mehendale. (2000b). Potentiation of Thioacetamide Liver Injury in Diabetic Rats Is Due to Induced CYP2E1. J. Pharmacol. Exp. Ther. 294: 473-479.
74. Shashi K. Ramaiah, Udayan Apte, and Harihara M. Mehendale (2001). Cytochrome P4502E1 Induction Increases Thioacetamide Liver Injury in Diet-Restricted Rats Drug Metabolism and Disposition 29(8):1088-1095,
75. Gupta, D.N. (1956). Acute changes in the liver administration of thioacetamide. J. Path. Bact., 72: 183-192
76. Hori N, Okanoue T, Sawa Y, Mori T, Kashima K. (1993). Hemodynamic characterization in experimental liver cirrhosis induced by thioacetamide administration. Dig Dis Sci 38:2195–2202.
77. Barker, E.A., Smuckler, E.A., (1972). Altered microsomes function during acute thioacetamide poisoning. Mol. Pharmacol 8:318–326.
78. Lee, J.W., Shin, K.D., Lee, M., Kim, E., Han, S.S., Han, M.Y., Ha, H.J., Jeong, T.C., Koh, W.S., (2003). Role of metabolism by flavin-containing monooxygenase in thioacetamide-induced immunosuppression. Toxicol. Lett. 136:163–172.
79. Diez-Fernández, C., Boscá, L., Fernández-Simón, L., Alvarez, A., Cascales, M.,(1993). Relationship between genomic DNA-ploidy and parameters of liver damage during necrosis and regeneration induced by thioacetamide. Hepatology 18, 912–918.
80. So, E.C., Wong, K.L., Huang, T.C., Tasi, S.C., Liu, C.F., (2002). Tetramethylpyrazine protects mice against thioacetamide-induced acute hepatotoxicity. J. Biomed. Sci. 9:410–414.
81. Sanz, N., Diez-Fernández, C., Andrés, D., Cascales, M., (2002). Hepatotoxicity and aging: endogenous antioxidant systems in hepatocytes from 2-, 6-, 12-, 18- and 30-month-old rats following a necrogenic dose of thioacetamide. Biochim. Biophys. Acta 1587:12–20.
82. Adams, H.R. and H. Busch. (1963) Effects of thioacetamide on incorporation of orotic acid-³C¹⁴ into RNA fractions in liver. Cancer Res, 23: 576-582.
83. Al-Bader, A.A., et al. (2003). Thioacetamide induced changes in trace elements and kidney damage. Journal of Trace Elements in Exp Medicine (in press)..
84. Nygaard, O., L. Eldjarn, and K.F. Nakken. (1954). Studies on the metabolism of thioacetamide- S³⁵ in the intact rat. Cancer Res. 14: 625-628.
85. Yalçın A. S. (2000). Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma Sistemi. Aktüel Tıp Dergisi. 7:1-7.
86. Halliwell B. (1991). Drug antioxidant effects. Drugs 42(4): 569 - 605.
87. Aksoy Y. (2002). Antioksidan mekanizmada glutatyonun rolü. T.Klin Tıp Bilimleri 22: 442-448.
88. Halliwell, B. (1994) Free radicals and antioxidants: a personal view. Nutr. Rev. 52: 253–265.

89. Block, G., Patterson, B. & Subar, A. (1992) Fruit, vegetables and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr. Cancer* 18: 1–29.
90. Keli, S. O., Hertog, G. L., Feskens, E.J.M. & Kromhout, D. (1996) Dietary flavanoids, antioxidant vitamins, and the incidence of stroke. *Arch. Int. Med.* 154: 637–642.
91. Wei YH, Lu CY, Ma YS, Lee HC. (2001). Oxidative stress in human aging and mitochondrial disease-consequences of defective mitochondrial respiration and impaired antioxidant enzyme system. *Chin J Physiol.* 44(1): 1-11. Review.
92. Halliwell B, Gutteridge JMC. (1995) Free radicals in biology and medicine. Clarendon Pres 2: 1-81.
93. Deby C, Pincemail J.(1988). Oxygen toxicity, free radicals and defense mechanisms. In:Rökan (Ginkgo Biloba). Recent result in pharmacology and clinic. Ed: Fünfgeld EW. Springer- Verlag, Berlin pp:57-70.
94. Akkuş İ. (1995). Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri.Mimoza Yayınları-Konya-38, sağlık dizisi(5).
95. Kılınç K. (1985). Oksijen radikalleri: üretilmeleri, fonksiyonları ve toksik etkileri, *Biyokimya Dergisi*, Sayı 2:60-89
96. Halliwell B, Gutteridge JMC,et al. (1996.) Free Radicals in Biology and Medicine.Oxford: 2nd Edition Clarendon Pres;
97. Hofseth LJ, Hussam SP,Wogan GN,Haris CC,et al. (2003). Nitric oxide in cancer and chemoprevention. *Free Radical Biology & Medicine* 34(8): 955-968.
98. Lala PK, Chakraborty C. (2001). Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. *The Lancet Oncology* 2: 149-156.
99. Garvey EP, Furfine ES, Shernian PA,et al.(1996). Purification and inhibitor screening of human nitric oxide synthase isoenzymes. *Methods Enzymol* 268: 339-349.
- 100.Burgner D,Rockett K, Kwiatkowski D,et al. (1999). Nitric oxide and infectious diseases. *Arch Dis Child* 81: 185-188.
- 101.Brede DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH. (1991). Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P 450 reductase *nature* 351:714-718
- 102.Henry, Y., Ducrocq, C. Drapier, C ., Servent, D ., Pellat, C & Guissani, A. (1991). Nitric oxide a biological effector electron paramagnetic resonance detection of nitrosyl-iron protein complexes in whole cells. *Eur Biophys J.* 20: 1-
- 103.Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. (1988). Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine *Nature* 333: 664-666 (Medline)
- 104.Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. (1994). Nitric oxide; A physiologic messenger. *Ann Intern Med.* 120:227-237.
- 105.Cendan JC, Topping DL. Pruitt J, Snowdy J, Copeland EM, Lind DS. (1996). Inflammatory mediators stimulate arginine transport and arginine-derived nitric oxide production in a murine breast cancer line. *J Surg Res. USA.* 60(2): 248-288.

106. Bath PMW, Hassal DG, Gladwin A-M, Palmer RMJ, Martin JF. (1991). Nitric oxide and prostacyclin: divergence of inhibitory effects on monocyte chemotaxis and adhesion to endothelium in vitro. *Arterioscler Thromb* 11:254-260 (Medline).
107. De Caterina R, Libby P, Deng H-B, Thanickal VJ, Rajavasthish TB, Gimbrone MA, JR, et al. (1995). Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines, *J.Clin. Invest.* 96: 60-68.
108. Sözmén EY. (2002). Yaşlanma Biyokimyası. In Onat T, Emerk K, Sözmén EY (Eds) İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık, Ankara pp: 665-674..
109. Halliwell B. (1995). Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology* 49(10):1341-1348.
110. Kaya H, Oral B, Ozguner F, Tahan V, Babar Y, Delibas N. (1999). The effect of melatonin application on lipid peroxidation during cyclophosphamide therapy in female rats. *Zentralbl Gynakol* 121: 499-502.
111. Satchell KD, Cassidy A. (1999). Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *The Journal of Nutrition* 129: 758-767.
112. Collins BM, McLachlan JA, Arnold SF. (1997). The estrogenic and antiestrogenic activities of phytochemicals with the human estrogen receptor expressed in yeast. *Steroids.* 62: 365-372.
113. Çimen M.B.Y. (1999). Flavonoidler ve Antioksidan Özellikleri *T Klin J Med Sci* 19: 296-304
114. Cassidy A, Hanley B, Raventos R. (2000). Isoflavones, Lignans And Stilbens-Origins, Metabolism And Potential Importance To Human Health. *Journal Of The Science of Food And Agriculture* 80: 1044-1062.
115. Polkowsky K, Mazurek AP. (2000). Biological properties of genistein. A review of in vitro and in vivo data. *Acta Pol Pharm* 8: 739-745.
116. Sarkar FH, Li Y. (2002). Mechanisms of cancer chemoprevention by soy isoflavone genistein. *Cancer Metastasis Reviews.* 21(3-4): 265-280.
117. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der BB, Gustafsson JA. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139: 4252-4263.
118. Adlercreutz H, Markkanen H, Watanabe S. (1993). Plasma concentrations of phyto-oestrogens in Japanese men. *Lancet.* 342: 1209-1210.
119. Zava DT, Dollbaum CM, Blen M. (1998). Estrogen and progestin bioactivity of foods, herbs, and spices. *Proc Soc Exp Biol Med* 217: 369-378.
120. Ruiz-Larrea MB, Mohan AR, Paganga G, Miller NJ, Bolwell GP, Rice-Evans CA. (1997). Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones. *Free Radic Res* 26: 63-70.
121. Zhou Y, Lee AS. (1998). Mechanism for the suppression of the mammalian stress response by genistein, an anticancer phytoestrogen from soy. *J Natl Cancer Inst* 90: 381-388,
122. Chen, C., Kong, A.N., (2004). Dietary chemopreventive compounds and ARE/EpRE signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 1505-1516.

123. Pagliacci MC, Smacchia M, Migliorati G, Grignani F, Riccardi C, Nicoletti I: Growth-inhibitory effects of the natural phyto-oestrogen genistein in MCF-7 human breast cancer cells. *Eur J Cancer* 30A: 1675–1682, 1994.
124. Casagrande F, Darbon JM. (2000). p21CIP1 is dispensable for the G2 arrest caused by genistein in human melanoma cells. *Exp Cell Res* 258: 101–108.
125. Kuzumaki T, Kobayashi T, Ishikawa K. (1998). Genistein induces p21(Cip1/WAF1) expression and blocks the G1 to S phase transition in mouse fibroblast and melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 251: 291–295.
126. Davis JN, Singh B, Bhuiyan M, Sarkar FH. (1998). Genistein induced upregulation of p21WAF1, downregulation of cyclin B, and induction of apoptosis in prostate cancer cells. *Nutr Cancer* 32: 123–131.
127. Alhasan SA, Pietraszkiewicz H, Alonso MD, Ensley J, Sarkar FH. (1999) Genistein-induced cell cycle arrest and apoptosis in a head and neck squamous cell carcinoma cell line. *Nutr Cancer* 34: 12–19.
128. Lian F, Li Y, Bhuiyan M, Sarkar FH. (1999). p53-independent apoptosis induced by genistein in lung cancer cells. *Nutr Cancer* 33: 125–131.
129. Alhasan SA, Ensley JF, Sarkar FH. (2000). Genistein induced molecular changes in a squamous cell carcinoma of the head and neck cell line. *Int J Oncol* 16: 333–338.
130. Tan M, Yao J, Yu D. (1997). Overexpression of the c-erbB-2 gene enhanced intrinsic metastasis potential in human breast cancer cells without increasing their transformation abilities. *Cancer Res* 57: 1199–1205.
131. Visse R, Nagase H. (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry. *Circ Res*;92:827-39.
132. Kuzuya M, Iguchi A. (2003) Role of matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *J Atheroscler Thromb* 2003;10:275-82.
133. Preston A. Matrix Metalloproteinases. *Extracellular matrix proteases @Proteins Technical Guide*. 2002;2: 1-20.
134. Brown PD. Matrix metalloproteinases in gastrointestinal cancer. *Gut* 1998;43(2): 161-163.
135. A.R. Nelson, et. Al. (2000). Matrix metalloproteinases:biologic activity and clinical implications: *J Clin Oncol* 18: 1135.
136. Squadrito F, Altavilla D, Squadrito G, Saitta A, Cucinotta D, Minutoli L, Deodato B, et al. (2000) Genistein supplementation and estrogen replacement therapy improve endothelial dysfunction induced by ovariectomy in rats. *Cardiovasc Res* 45: 454-462
137. Reif S, Weis B, and Aeed H. (1999) The Ras antagonist, farnesylthiosalicylic acid (FTS), inhibits experimentally-induced liver cirrhosis in rats. *J Hepatol* 331: 1053-1061.
138. Cortas NK, Wakid NW. (1990). Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem* 36(8): 1440-1443.

139. Henriksen A, Selmer-Olsen A.R. (1970) Automatic methods for determining nitrate and nitrite in water and soil. *Analyst*; 95: 514-518 .
140. Bories PN and Bories C. (1995). Nitrate determination in biological fluids by enzymatic one-step assay with nitrate reductase. *Clin Chem* 41(6): 904-907.
141. Sun Y, Oberley LW, Li YA. (1998). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin. Chem* 34:497-500.
142. Durak I, Yurtaslan Z, Canpolat O, Akyol O. (1993). A methodological Approach to superoxide dismutase activity assay based on inhibition of nitroblue tetrazolium (NBT) reduction. *Clin. Chem. Acta.* 214: 103-104.
143. Aebi H: (1984). Catalase in vitro. *Enzymol* 105: 121-6
144. Paglia DE, Valentina WN. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70: 158-169.
145. Yagi K. (1984). Assay for blood plasma or serum. *Methods in Enzymology*, 105: 328-337.
146. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Far AL, Randall RJ, et al. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
147. Frankel, S., Reitman, S. and Sonnenwirth, A.C. (1970). *Grandwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis*, Seventh edition, 1: 403- 404.
148. Shahidi, F. and Ho, C.-T. (2000) *Phytochemicals and Phytopharmaceuticals*, Campaign, Illinois: AOAC Press
149. Moll, M.N. and Montalban, E.B. (2001) Phytoestrogens: Therapeutical possibilities. *Revista de Fitoterapia*, 1(3), 165-180.
150. Kai Dai, Jun-Ying Qi, De-Ying Tian. (2005). Leptin administration exacerbates thioacetamide-induced liver fibrosis in mice. *World J Gastroenterol* 11(31): 4822-4826
151. Isaac Tuñez, M. Carmen Muñoz, Francisco J. Medina, Manuel Salcedo, Montserrat Feijó and Pedro Montilla. (2007). Comparison of melatonin, vitamin E and L-carnitine in the treatment of neuro- and hepatotoxicity induced by thioacetamide. *Cell Biochem Funct* 25:119–127.
152. El Borai MS, Ibrahim WM, Hessien M, El-keey MM. (2005). Effect of Alpha-Tocopherol on Tissue Transglutaminase and Reversibility of Thioacetamide-Induced Liver Fibrosis in rats. *Turkish Journal of Biochemistry* 31 (1):13–20.
153. Marquete F, Di Mambro V, Georgetti S, Casagrande R, Valim Y, Fonseca M. (2005). Assessment of the antioxidant actives of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. *Journal of pharmaceutical and Biomedical Analysis* 39, 2455-2462.
154. Jha, H. C., Von Recklinghouse, G. & Zilliken, F. (1985) Inhibition of in vitro microsomal lipid peroxidation by isoflavonoids. *Biochem. Pharmacol.* 34: 1367-1369.
155. Abul H, Mathew T. C, Dashti H. M, Al-Bader A (2002) Level of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and uric acid in thioacetamide-induced cirrhotic rats. *Anat Histol Embryol*. 31(2): 66-71.

- 156.**Reddy PVB, Murthy ChRK, Reddanna P.(2004) Fulminant hepatic failure induced oxidative stress in non synaptic mitochondria of cerebral cortex in rats. *Neurosci Lett* 368: 15–20.
- 157.**Herman D. The ageing process; a major risk factor for health and disease. (1991) *Proc Natl Acad Sci* 1991;88: 5360–3.
- 158.**Van Remmen, H., Williams, M. D., Heydari, A. R., Takahashi,R. *et al.*, (1996). *J. Cell Physiol.*, 166: 453–460.
- 159.**W. Laleman, I. Vander Elst, M. Zeegers, R. Servaes, L. Libbrecht, T. Roskams, J. Fevery and F. Nevens. (2006). A stable model of cirrhotic portal hypertension in the rat: thioacetamide revisited. *European Journal of Clinical Investigation* 36, 242–249.

9. ÖZGEÇMİŞ

26.06.1972 yılında Malatya’ da doğdum. İlk, orta, lise ve üniversite eğitimimi Malatya’ da tamamladım. 1997 yılında İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezum oldum. Aynı yıl Malatya Turgut Özal Tıp Merkezi Biyokimya Laboratuvarında biyolog olarak göreve başladım ve hala görevime laboratuvar personel sorumlusu olarak devam etmekteyim. İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya (Tıp Programı) Anabilim Dalında “İntrauterin gelişme Geriliği Olan Bebeklerin Kordon Kanında ve Anne Kanında NO, IL-1b, IL-2R, IL-6, IL-8 ve TNF-a Düzeyleri” konulu tezle yüksek lisansımı 2001 yılında tamamladım. 2002 yılı güz döneminde Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü (Tıp Biyokimya) Doktora Programına başladım.