

**T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**KARBON TETRAKLORÜR İLE OLUŞTURULAN
DENEYSEL KARACİĞER HASARINDA BENFOTİAMİN'İN
KARACİĞER DOKUSU ÜZERİNE KORUYUCU ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Bülent KARAKAYA**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Emir DÖNDER**

**ELAZIĞ
2015**

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. İrfan ORHAN

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Emir DÖNDER

İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Emir DÖNDER

Danışman

Uzmanlık Tezi Değerlendirme Jüri Üyeleri

.....

.....

.....

.....

.....

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince akademik bilgi, beceri ve deneyimlerini aktararak mesleki gelişimime büyük katkılar sağlayan tez danışmanım; ayrıca İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı olan değerli hocam Prof. Dr. Emir DÖNDER'e, İç Hastalıkları Anabilim Dalındaki tüm hocalarıma ve tezimin her aşamasında gerekli imkanların hazırlanması ve kullanılmasında gösterdiği anlayış, bilimsel destek ve yardımlarından ötürü Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Tuncay KULOĞLU'na,

Uzmanlık eğitimim süresince birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarıma, yan dal asistan arkadaşlarıma, klinik ve polikliniklerimizde çalışan tüm hemşire ve personellerimize,

Bugünlere gelmemde büyük katkı ve emekleri olan, bana sonsuz sabır gösteren, sevgi ve şefkatlerini esirgemeyen sevgili Annem, Babam ve kardeşlerime; hayatıma anlam katan nişanlım Dr. İrem Karakaşlı' ya,

Katkılarından dolayı Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi (FÜDAM)' ne,

Projemizi destekleyen Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (FÜBAP)' ne,

Teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

ÖZET

Karbon tetraklorür'ün tekrarlayan uygulamaları serbest radikal üretimine neden olarak karaciğer hasarı yapmaktadır. Karbon tetraklorür (CCl_4) prooksidan aktiviteye sahip olmasının yanı sıra seçici hepatotoksik etkisinden dolayı deney hayvanlarında karaciğer hasarı oluşturmak amacıyla kullanılır. Benfotiamin, hücre içerisindeki oksidan ajanların etkisini azaltmaktadır ve hücre içinde etkin görev alan proteinleri oksidasyon reaksiyonuna karşı koruyarak antioksidan özellik göstermektedir. Bu çalışmada karbon tetraklorür ile oluşturulan deneysel karaciğer hasarında benfotiaminin karaciğer dokusu üzerine koruyucu etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada, 30 adet 8-10 haftalık Wistar albino cinsi erkek sıçanlar kullanıldı. Deney hayvanları her grupta 6 hayvan olacak biçimde 5 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna deney süresi olan 14 gün boyunca herhangi bir uygulama yapılmadı. Benfotiamin grubuna 14 gün boyunca Benfotiamin 70 mg/kg/gün dozunda oral verildi. Zeytinyağı grubuna deneyin 1. ve 8. günlerinde iki defa intraperitoneal (i.p.) yolla 2 ml/kg zeytinyağı verildi. CCl_4 grubuna deneyin 1. ve 8. günlerinde iki defa i.p yolla 1ml/kg CCl_4 : zeytin yağı (1:2) oranında verildi. CCl_4 + Benfotiamin grubuna ise deneyin 1. ve 8. günlerinde iki defa 1 ml/kg CCl_4 : zeytin yağı (1:2) oranında karışımı ve oral yolla 70 mg/kg/gün benfotiamin verildi.

Deneyin sonunda tüm gruplardaki sıçanlar ketamin (75 mg/kg) + xylazine (10 mg/kg) i.p. uygulanarak anestezi altında dekapite edildi. Dekapitasyonun ardından sıçanların karaciğer dokuları hızla çıkarılıp % 10 formaldehit ile tespit edildikten sonra histolojik ve histokimyasal incelemeler için parafin bloklar hazırlandı. Karaciğer dokusunda MDA (Malondialdehid) çalışması için dokular çalışmanın sonuna kadar -80°C de saklandı.

Çalışmamızda kontrol grubu, Benfotiamin ve zeytinyağı grupları arasında bakılan parametrelerde anlamlı bir farklılık yoktu. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında CCl_4 grubunda, MDA, apoptozis ve bax immünreaktivitesinde anlamlı olarak artış izlendi. CCl_4 grubu ile karşılaştırıldığında CCl_4 + Benfotiamin grubunda ise MDA, apoptozis ve bax immünreaktivitesinde anlamlı olarak azalma gözlemlendi.

Sonuç olarak, CCl₄'ün karaciğer dokusunda MDA, apoptozis ve bax immünreaktivitesini arttırdığı, tedavi olarak verilen benfotiamin'in bu parametreleri azalttığı görüldü. Gelecekte yapılacak daha ileri ve ayrıntılı çalışmalarla başta siroz olmak üzere karaciğer hasarının olduğu durumlarda benfotiamin ile ilişkili tedavi yaklaşımları denenebileceği kanaatine varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Sıan, karbon tetraklorür, benfotiamin, apoptozis.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF BENFOTIAMIN'S PROTECTIVE EFFECTS ON LIVER TISSUE IN EXPERIMENTAL CARBON TETRACHLORIDE INDUCED LIVER INJURY

Repeated applications of carbon tetrachloride causes liver damage with free radical production. In addition to CCl₄'s prooxidant activity it is used create liver damage due to selective hepatotoxic effects at experimental animals. Benfotiamine, reduces the effectiveness of the oxidizing agents in the cell and shows antioxidant properties by protecting active proteins against oxidation reaction. In this study, we aimed to investigate the protective effect of Benfotiamine on experimental liver injury caused by carbon tetrachloride on the liver tissue.

In this study, 30 male Wistar albino rats were used. The rats were divided into 5 groups that have 6 animals in each groups. No application was made to control group at test period of 14 days. To the Benfotiamine group, Benfotiamine was given 70 mg / kg / day for 14 days orally. To the olive oil group, olive oil was given 2 ml / kg twice on days 1st and 8th day intraperitoneal (ip). To CCl₄ group, 1ml / kg CCl₄: olive oil (1: 2) was given to the experimental animals twice on days 1st and 8th day. In the CCl₄ + Benfotiamine group, 1 ml / kg CCl₄: olive oil (1: 2) mixture ratio twice at 1st and 8th day and orally 70 mg / kg / day Benfotiamine was given.

At the end of the experiment, rats in all groups were decapitated under anesthesia procedure of ketamine (75 mg / kg) + xylazine (10 mg / kg) ip. After decapitation, rat liver tissues were rapidly removed and fixed in 10 % formalin and then paraffin blocks were prepared for histological and histochemical examination. Tissues were stored at – 80 °C until the end of the study for investigating MDA in liver.

In our study, there were no significant differences at examined parameters between the control, Benfotiamine and olive oil groups. Compared with the control group, it was observed that there was as a significantly increase in MDA, apoptosis and bax immunoreactivity in the CCl₄ group. Compared with CCl₄ group, there was as a significantly decrease in MDA, apoptosis and bax immunoreactivity in the CCl₄ + Benfotiamine group.

As a result, it was observed that CCl₄ increases MDA, apoptosis and bax immunoreactivity at liver tissue, but benfotiamin given as treatment, reduces these parameters. We believe with further and detailed studies, treatment approaches associated with Benfotiamine can be used at cases with liver damage, including cirrhosis.

Keywords: Rat, carbon tetrachloride, Benfotiamine, apoptosis

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
BAŞLIK SAYFASI	i
DEKANLIK ONAYI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
TABLO LİSTESİ	xi
ŞEKİL LİSTESİ	xii
KISALTMALAR LİSTESİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler	2
1.1.1 Karaciğer	2
1.1.1.1 Karaciğerin Makroskopik Anatomisi	2
1.1.1.2 Karaciğerin Mikroskopik Anatomisi	4
1.1.1.2.1. Klasik Karaciğer Lobülü	5
1.1.1.2.2. Portal Lobül	5
1.1.1.2.3. Karaciğer Asinüsü	5
1.1.1.3. Karaciğer Fizyolojisi	6
1.1.1.3.1. Karaciğerin Görevleri	6
1.1.1.3.1.1. Karbonhidrat Metabolizması	6
1.1.1.3.1.2. Protein Metabolizması	7
1.1.1.3.1.3. Lipid Metabolizması	7
1.1.1.3.1.4. Safra Sentezi ve Salgılanması	7
1.1.1.3.1.5. İmmunolojik Fonksiyonu	7
1.1.1.3.1.6. Hormon ve İlaç Metabolizması	7
1.1.1.3.1.7. Karaciğerin Diğer Metabolik Fonksiyonları	7
1.1.1.3.2. Karaciğer Fonksiyonlarının Değerlendirilmesi	8
1.1.1.4. İlaç ve Toksik Maddelere Bağlı Karaciğer Hasarı	8

1.1.1.4.1. İntrensek Hepatotoksinler	9
1.1.1.4.2. İdiosenkrazik Hepatotoksinler	10
1.1.1.4.3. Karaciğer Hasarının Mekanizması	10
1.1.1.4.4. Morfolojik Değişiklikler	11
1.1.2. Karbon Tetraklorür (CCl ₄)	11
1.1.2.1. Genel Özellikleri	11
1.1.2.2. Karaciğer Hasarı Oluşturma Mekanizması	12
1.1.3. Serbest Radikaller ve Oksidatif stres	13
1.1.3.1. Tarihsel Süreç	13
1.1.3.2. Oksidatif Stres	14
1.1.3.3. Oksidan Kaynakları	15
1.1.3.4. Serbest radikaller	16
1.1.3.4.1. Reaktif Oksijen Türevleri	18
1.1.3.4.1.1. Süperoksit Radikali (O ₂ ⁻)	18
1.1.3.4.1.2. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	18
1.1.3.4.1.3. Hidroksil radikali (·OH)	19
1.1.3.4.1.4. Singlet Oksijen (¹ O ₂)	20
1.1.3.4.1.5. Hidroperoksil Radikali (HO ₂ ·)	20
1.1.3.4.1.6. R· (Alkil radikali, organik radikaller)	20
1.1.3.4.1.7. Hipokloröz Asit (HOCl)	20
1.1.3.4.2. Reaktif Nitrojen Türevleri	20
1.1.3.4.2.1. Nitrik Oksit (NO·)	20
1.1.3.5. Serbest Radikallerin Hücreler Üzerindeki Etkileri	21
1.1.3.5.1. DNA ve Nükleik Asitler Üzerine Etkileri	21
1.1.3.5.2. Karbonhidratlar Üzerine Etkileri	21
1.1.3.5.3. Proteinler Üzerine Etkileri	21
1.1.3.5.4. Lipidlerde Meydana Gelen Yapısal değişiklikler	22
1.1.3.5.4.1. Malondialdehid (MDA)	22
1.1.3.6. Hastalıkların Serbest Radikallerle İlişkisi	23
1.1.4. Antioksidan Savunma Sistemleri	24
1.1.5. Apoptozis ve Nekroz	25
1.1.5.1. Nekroz	25

1.1.5.2. Apoptozis	27
1.1.5.2.1. Apoptozisin Morfolojisi	27
1.1.5.2.2. Hastalıklarda Apoptozisin Rolü	29
1.1.5.2.3. Apoptozisin Düzenlenmesi	30
1.1.5.2.3.1. Bcl-2/Bax	30
1.1.5.2.3.2. Bax Proteini	30
1.1.5.2.4. Apoptozis Mekanizmaları	31
1.1.5.2.5. Apoptozis'in belirlenmesinde kullanılan yöntemler.	31
1.1.5.2.5.1. TUNEL Yöntemi	32
1.1.6. Tiamin	33
1.1.6.1. Benfotiamin	33
1.1.6.1.1. Biyokimya ve Farmakokinetik	34
1.1.6.1.2. Etki Mekanizması	35
2. GEREÇ VE YÖNTEM	38
2.1. Deney Hayvanları	38
2.2. Çalışma Gruplarının Oluşturulması ve Deneysel Uygulama	38
2.3. Dokuların Alınması	39
2.3.1. İmmünohistokimyasal İnceleme	39
2.3.2. TUNEL Metodu	41
2.3.3. Malondialdehid (MDA) Çalışması	42
2.4. İstatistiksel Analiz	43
3. BULGULAR	44
3.1. İmmünohistokimyasal Bulgular	44
3.1.1. Bax İmmünreaktivitesi	44
3.2. TUNEL Bulguları	47
3.3. MDA Bulguları	51
4. TARTIŞMA	53
5. KAYNAKLAR	57
6. ÖZGEÇMİŞ	75

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Karaciğer fonksiyon testleri	8
Tablo 2. Oksijen kaynaklı reaktif bileşikler	17
Tablo 3. Apoptozis ile nekroz arasındaki farklar	26
Tablo 4. Hastalıklarda Apoptozisin Rolü	29
Tablo 5. Deney hayvanlarına verilen sıçan yeminin terkibi	38
Tablo 6. İmmünohistokimyasal boyama prosedürü	40
Tablo 7. İmmünohistokimyasal boyanma yaygınlığının derecesi	41
Tablo 8. TUNEL boyama prosedürü	42
Tablo 9. Bax İmmünreaktivitesi	44
Tablo 10. Apoptotik indeks	48
Tablo 11. Doku MDA değerleri	52

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	Couinaud sınıflamasına göre KC'in segmental dağılımı	4
Şekil 2.	Karaciğerde lobül yapısı	6
Şekil 3.	Oksidatif Stres	15
Şekil 4.	Lipid Peroksidasyon Şeması	23
Şekil 5.	Apoptozise uğrayacak hedef hücrede görülen morfolojik değişiklikler	28
Şekil 6.	Benfotiaminin kimyasal yapısı	34
Şekil 7.	Kontrol grubuna ait karaciğer dokusunda bax immunreaktivitesi	45
Şekil 8.	Benfotiamin verilen gruba ait karaciğer dokusunda bax immunreaktivitesi.	45
Şekil 9.	Zeytinyağı verilen gruba ait karaciğer dokusunda bax immunreaktivitesi	46
Şekil 10.	CCl 4 verilen gruba ait karaciğer dokusunda bax immunreaktivitesi.	46
Şekil 11.	CCl4+benfotiamin grubuna ait karaciğer dokusunda bax immunreaktivitesi	47
Şekil 12.	Negatif kontrol	47
Şekil 13.	Kontrol grubuna ait karaciğer dokusunda TUNEL pozitif hücreler.	48
Şekil 14.	Benfotiamin verilen gruba ait karaciğer dokusunda TUNEL pozitif hücreler.	49
Şekil 15.	Zeytinyağı verilen gruba ait karaciğer dokusunda TUNEL pozitif hücreler.	49
Şekil 16.	CCl4 verilen gruba ait karaciğer dokusunda TUNEL pozitif hücreler.	50
Şekil 17.	CCl4 + benfotiamin grubuna ait karaciğer dokusunda TUNEL pozitif hücreler.	50
Şekil 18.	TUNEL negatif kontrol.	51
Şekil 19.	TUNEL pozitif kontrol. Meme dokusu	51

KISALTMALAR LİSTESİ

AGE	: Advanced glycation end products
AI	: Apoptotik indeks
AIF	: Apoptosis inducing Factor
ALE	: Advanced lipoxidation end products
ALP	: Alkalen fosfataz
ATP	: Adenozin trifosfat
CAT	: Katalaz
CCl₃OO	: Triklorometil peroksil
CCl₄	: Karbon tetraklorür
cGMP	: Siklik guanozin monofosfat
CML	: Carboxymethyl lysine
CV	: Santral ven
DAB	: Diaminobenzidine
DNA	: Deoksiribonükleik asit
GAPDH	: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GSH	: Redükte glutatyon
GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz
HOCl	: Hipokloröz asit
IL	: Interlökin
IVC	: İnfior vena cava
i.p.	: İnta peritoneal
LP	: Lipid peroksidasyonu
MDA	: Malondialdehid
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat

NF-κB	: Nükleer faktör kappa
·OH	: Hidroksil radikali
PARP	: Poli ADP- riboz polimeraz
PBS	: Phosphate buffered saline
PKC	: Protein kinaz C
PS	: Portal alan
RNA	: Ribonükleik asit
RNT	: Reaktif nitrojen türleri
ROT	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
TNF-α	: Tümör nekrozis faktör –α
TPP	: Tiamin pirofosfat
TUNEL	: Terminal deoxynucleotidyl Transferase biotin – dUTP Nick End Labeling
UDP-GlcNAc	: UDP-N-asetilglukozamin

1. GİRİŞ

Vücut ağırlığının yaklaşık % 2'sini oluşturan karaciğer, organizmada bulunan en büyük bezdir ve çok önemli metabolik fonksiyonları yerine getirmektedir (1). Anatomik lokalizasyonu, fizyolojik ve biyokimyasal görevleri nedeniyle pek çok toksik, zararlı madde ve ilaçlara sıkça maruz kalmaktadır. Karaciğer hasarı, belirtilerinin çok geç ortaya çıkmasından dolayı tedavisi zor olan patolojik bir durumdur (2, 3). Değişik sebeplerle oluşan karaciğer hasarı önemli bir sağlık sorunu oluşturur. Dolayısıyla, mortalite ve morbiditeyi önemli oranda düşürmesi, sağkalım oranlarını önemli yönde etkilemesi ve yüklü tedavi maliyetlerinin azaltılması sebebiyle hepatoprotektif yani karaciğeri koruyucu etkisi olan ajanların kullanımı önem arz etmektedir. Günümüzde akut veya kronik karaciğer hasarını önlemek amacıyla çeşitli farmakolojik ajanlar denenmektedir. Karaciğer hasarı antioksidanlar, serbest radikal temizleyicileri ve lipid peroksidasyonunu önleyen ajanlarla önlenmektedir (4). Farklı şekillerdeki karaciğer hasarları oksidatif stres ve bunu takiben ortaya çıkan serbest radikallerle oluşmaktadır (5-8). Toksik, okside ve hidroksi radikallerin, lipid peroksidasyonu veya diğer başka yollarla hepatositlerin hücre membranlarında hasara neden oldukları aynı zamanda bu radikallerin hem in vitro hem de in vivo ortamlarda karbonhidratlar, proteinler, lipidler ve DNA (deoksiribonükleik asit) üzerinde hasara yol açtıkları gösterilmiştir (6-12).

Karaciğer fonksiyon testleri (KCFT) tanı koyma, tanısız çalışmalarını yönlendirme, hastalığın ağırlığını tahmin etme, prognozu saptama ve tedaviyi değerlendirmek için gereklidir. Tüm bu sorunları çözebilecek bir test yoktur. Bu testlerin hepsi ayrı ayrı metabolik reaksiyonları yansıtmaktadır. Karaciğer hastalığı bulunan hastanın takip ve tedavisinde laboratuvar testleri zorunlu olmakla birlikte, bunların belli bir sınırlılığı vardır (13).

Karbon tetraklorür (CCl_4) aracılığıyla hepatotoksisite çeşitli ilaç ve bitki ekstraktlarının karaciğeri koruyucu etkilerinin araştırılması amacıyla sıkça kullanılan bir modeldir (14, 15). Karbon tetraklorür serbest radikalleri açığa çıkararak karaciğer hasarı yapan bir maddedir. Bu etkinin ortaya çıkması için sırasıyla şu aşamalar gerçekleşmektedir. CCl_4 molekülü sitokrom-P450 enzim sistemi aracılığıyla triklorometil (CCl_3) serbest radikale dehalojenize edilir. CCl_3 oksijen moleküllerinin eklenmesiyle triklorometil peroksil (CCl_3OO) radikalini oluşturur.

Oluşan bu reaktif molekül birkaç aşamadan sonra lipid peroksidasyonunu başlatır. Lipid peroksidasyonu sonucunda oluşan toksik peroksidasyon ürünleri hücre membran hasarı meydana getirir. Bu membran hasarı önlenemez ise hücre ölümü gerçekleşir (5, 12, 16, 17).

Karbon tetraklorür aynı zamanda karaciğerde hidropik dejenerasyon ve hepatosellüler zone-3 nekrozuna neden olmaktadır (18, 19).

Benfotiamin, Vitamin B1 in yağda çözünen bir formudur (20). Bazı çalışmalar Benfotiamin'in reaktif oksijen ürünleri üzerinde baskılayıcı özellikte olduğunu göstermiştir (21, 22). İndirgenmiş olan glutatyon hücre içerisindeki oksidan ajanların etkisini azaltmaktadır ve hücre içinde etkin görev alan proteinleri oksidasyon reaksiyonuna karşı koruyarak antioksidan özellik göstermektedir. Bunun sonucunda glutatyon molekülü oksitlenir. Glutatyon molekülünün fonksiyonunu yerine getirebilmesi için yeniden redükte edilmesi gerekir. Bu amaçla NADPH (Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat) kullanılmaktadır. NADPH üretiminde pentoz fosfat yolu önemlidir. Bu yolakta tiamin etkili görev aldığı için antioksidan olarak kabul edilmektedir (23, 24).

Bu çalışmamızda karbon tetraklorür ile oluşturulan deneysel karaciğer hasarında benfotiamin'in karaciğer dokusu üzerine koruyucu etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

1.1. Genel Bilgiler

1.1.1 Karaciğer

1.1.1.1 Karaciğerin Makroskopik Anatomisi

Sağ hipokondrium ve epigastriumdan sol hipokondriuma doğru uzanan karaciğer, 1200-1600 gr arasında değişen ağırlığı ile vücut ağırlığının yaklaşık olarak % 2'sini oluşturmaktadır. Bu haliyle karaciğer, deri dışında vücudun en büyük organı ve bezidir (25). Normal uzunluğu 20-25 cm olan karaciğerin yüksekliği 14-17 cm ve önden arkaya doğru genişliği 10-14 cm'dir (26).

Karaciğer, hem endokrin, hem de ekzokrin fonksiyonları olan bir bezdir. Yaşamak için gerekli olan birçok kimyasal olay burada meydana gelmektedir. Embriyolojik dönemde karın boşluğunda, mesenterium ventrale denilen bir karın zarı aracılığıyla karın ön duvarına bağlanmış durumdadır (27).

Peritonla kaplı bir organ olan karaciğerin; safra kesesi yatağı, porta hepatis ve arka yüzeyinde inferior vena cava (IVC)'nin sağ komşuluğundaki diyafram ile temas halinde bulunan bölgesi peritonsuzdur. Güçlü bir bağ dokusu halinde olan periton bu şekliyle Glisson Kapsülü olarak adlandırılmaktadır (28, 29).

Karaciğerin üstte diyafram ile komşu Diafragmatik; hepatik fleksura, transvers kolon, safra kesesi, duodenum, mide, özefagus ile komşu Visseral olmak üzere iki yüzü vardır (30, 31).

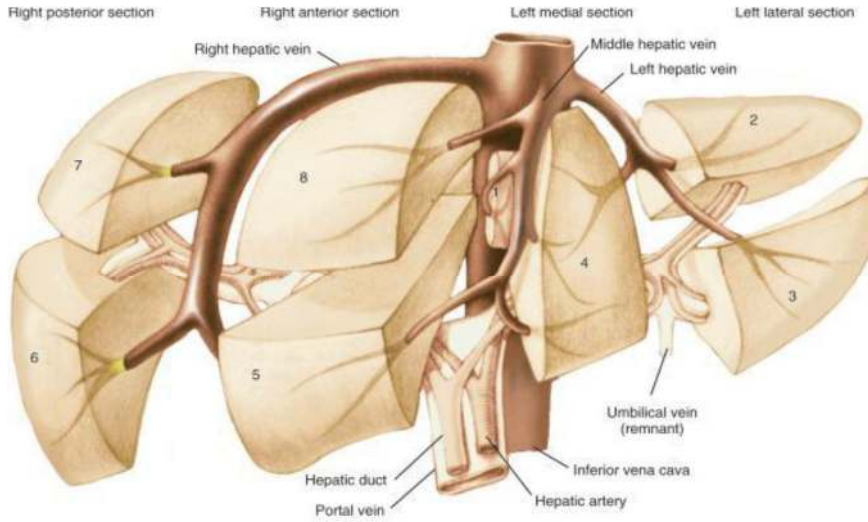
Periton zarı karaciğer üzerinden yansıdıktan sonra ligaman denilen katlantıları oluşturmaktadır. Diafragmatik ve visseral yüzeyden ilerledikten sonra arkada diyafram ile komşu olan peritonsuz bölgeye geldiğinde kendi üzerinde dönerek öncelikle anterior daha sonra posterior koroner ligamanları oluşturmaktadır. Anterior koroner ligaman karaciğer yüzeyiyle karının ön duvarı arasında uzanım gösteren bir katlantı yaparak falsiform ligamanı oluşturmaktadır. Bu ligaman karın ön duvarına, umblikusa ve diyaframa doğru uzanmaktadır. Falsiform ligamanın yaprakları arasında embriyonik dönemde aktif olarak görev yapan umblikal venin kalıntısı olan ligamentum teres bulunmaktadır (28, 32).

Ayrıca; karaciğerin posteriorunda solda portal ven ve hepatik ven arasında uzanan embriyonik dönemde aktif sinüs venosus'un kalıntısı olan ligamentum venosum bulunur (28).

Periton karaciğer üzerinden devam ederek portal hilusu da içine aldıktan sonra duodenum ve midenin küçük kurvaturuna uzanım göstermektedir. Birlikte küçük omentum (omentum minus)'u oluşturan bu iki yapıya sırasıyla hepatoduodenal ve hepatogastik ligaman denir (32).

Karaciğerin klasik olarak 4 lobu vardır. Bunlar sağ, sol, kaudat ve quadrat loblardır. Geleneksel olarak bu tanımlama karaciğerin segmental anatomisini açıklamakta yetersiz kalmaktadır. Karaciğer portal triadın dalları tarafından kanlanan segmentlere ayrılır ve hepatik venler aracılığıyla drene olur. Bu anatomik ayırım 1957 yılında Couinaud tarafından tanımlanmıştır. Sağ ve sol loblar arasındaki anatomik ayırım safra kesesi yatağının medial kenarından arkada IVC'ye olan hattı takip eder. Bu sınıflamaya göre üç segmentli sol lob; sol medial segment (segment IV) ve sol lateral segmentleri (segment II ve III) içerir. Sağ lob portal ven ve hepatik arterin dallarına göre dört segmente ayrılır. Bunlar anterior-inferior (segment V),

posterior-inferior (segment VI), posterior-süperior (segment VII) ve anterior-süperior (segment VIII) segmenttir. Kaudat lob (segment I) arkada sağ ve sol hepatik loblar arasında ayrı vasküler yapılar ile yerleşmiştir. Segmentler arasında üç ana hepatik ven karaciğerin üst kısmında IVC'ye açılır (25).



Şekil 1. Couinaud sınıflamasına göre KC'in segmental dağılımı (33).

1.1.1.2 Karaciğerin Mikroskopik Anatomisi

Karaciğer, sindirim ve dolaşım sistemleri arasında alışverişi sağlayan bir geçiş bölgesidir. Sindirim sistemi aracılığıyla vücuda giren sıvı, elektrolit ve gıda maddeleri karaciğer tarafından işlenerek hücre ve dokuların kullanımına uygun hale getirilir. Karaciğer bu maddelerin depolanıp, gerektiği durumda kana verilmesi yanında oluşan metabolitlerin ve açığa çıkan toksinlerin nötralizasyonu ve atılması aşamalarında da önemli rol oynamaktadır. Bu fonksiyonları yerine getirebilmesi için sindirim sistemi ile dolaşım sisteminin birleşim noktasında bulunmaktadır (34).

Yetişkinlerdeki karaciğer dokusunun yaklaşık % 80'i ışınal kordonlar şeklinde düzenlenmiş hepatositlerden oluşan parankim yapısındadır. Geriye kalan % 20'lik kısım ise, organı dıştan saran Glisson Kapsülü ve parankimayı destekleyen stromadır (35).

Karaciğer parankimini hepatosit hücreleri oluşturur. Bu parankimin organizasyonu ile ilgili olarak kabul edilen üç histofizyolojik karaciğer lobül modeli vardır. Bunlar; klasik karaciğer lobül kavramı, portal lobül kavramı ve karaciğer asinüsü kavramıdır (36-38).

1.1.1.2.1. Klasik Karaciğer Lobülü

Köşelerinde portal alanların, merkezinde terminal hepatik venülün (santral ven) bulunduğu poligonal birimlere klasik karaciğer lobülü denilmektedir. Bir portal alanda portal ven, hepatik arterin dalları ile safra kanalı bulunur. Karaciğer parankimini oluşturan hepatositler, biri diğerinin üzerinde olacak şekilde kordonlar halinde portal alandan santral vene doğru uzanır. Bu kordonların (Remark kordonları) arasındaki mesafe sinüzoid olarak adlandırılmaktadır. Sinüzoidler endotel hücreler ile çevrilidir. Endotel hücreleri ile hepatositler arasındaki mesafede disse aralığı bulunmaktadır (39, 40). Sinüzoidlerde kanın akış yönü portal alanlardan (periferden) santral vene (merkeze) doğrudur (36-38).

1.1.1.2.2. Portal Lobül

Bu model hepatositler tarafından salgılanan safranin salgılanışı göz önünde bulundurularak tasarlanmıştır. Üç klasik karaciğer lobülünün vena sentralislerinin birleştirilmesi ile meydana gelen üçgenden oluşur. Bu modele göre, bu üç lobülde oluşan safra ortada bulunan portal alandaki ortak safra kanalına akmaktadır (39, 40).

1.1.1.2.3. Karaciğer Asinüsü

Karaciğerin fonksiyonel anatomik birimidir (41). Bu modele göre, bir lobüldeki hepatositler, dağıtıcı damarlardan aldıkları farklı içerik ve miktardaki kanlanmaya göre 3 zona ayrılırlar;

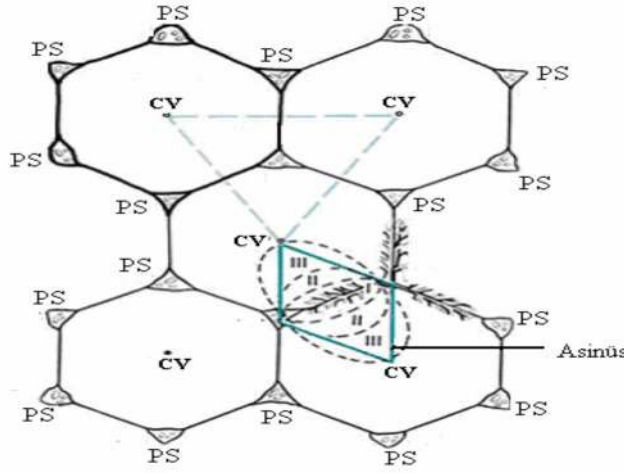
- **Periferik zon (Zon I);** kan damarları lobülün periferinden merkezine doğru ilerlediği için bu bölgedeki hücreler oksijen ve besin maddelerinden en zengin kanla karşılaşmaktadırlar. Aynı zamanda lobüldeki fonksiyonel olarak en aktif hücrelerdir (39, 40).

Açlık durumunda kana ilk glikozu veren ve glikojenin en çok depolandığı hepatositler bu zonda bulunur. Aynı zamanda bu zondaki hepatositler en son ölen ve ilk rejenere olan hücrelerdir (37, 40, 42).

-**Ara zon (Zon II);** orta bölgede bulunan ve orta düzeyde aktiviteye sahip hücrelerdir.

-**Santral zon (Zon III);** santral veni çevreleyen en içte kalan hücre gruplarından oluşur. Periferik zondaki hücrelere göre daha az aktiftirler. Bu bölgedeki hücreler düz endoplazmik retikulumdan zengindir. Perfüzyon azaldığında

zon I ve II' deki hepatositlere göre daha erken iskemik nekroza girerler ve patolojik değişiklikler bu zonda daha erken saptanır (36-38).



Şekil 2. Karaciğerde lobül yapısı (43) (PS: Portal Alan; CV: Santral Ven)

Bu şekilde zonlara ayrılarak yapılan tanımlama ile hepatositlerin çeşitli toksik maddelere karşı farklı derecelerde gördükleri hasarın nedeni açıklanmaya çalışılmıştır (37, 40, 42).

1.1.1.3. Karaciğer Fizyolojisi

1.1.1.3.1. Karaciğerin Görevleri

Karaciğer vücudun hemen her türlü metabolik fonksiyonunda rol oynayan bir organdır. Karaciğerin organizma için ne kadar vazgeçilmez fonksiyonları olduğunu anlamak için, kanlanmasına ve genel dolaşım içerisinde yerleştiği stratejik konuma bakmak yeterlidir. Özofagusun abdominal parçasından itibaren, mide duodenum-jejunum-ileum, kalın bağırsakların tümü ve hatta dalak ve pankreasın tüm venöz kanı, içindekilerle beraber kalbe dönmeden önce işlenmek üzere karaciğerden geçmek zorundadır. Bu durum karaciğeri, metabolik faaliyetlerin merkezi konumuna getirmektedir (44). Bundan dolayı aşağıda belirtildiği gibi birçok metabolizma yolunda fonksiyon gösteren önemli bir organdır (1).

1.1.1.3.1.1. Karbonhidrat Metabolizması

Glukoz homeostazı ve kan şeker düzeyinin korunması karaciğerin ana görevidir. Glikojenoliz ve glukoneojenez reaksiyonlarıyla kan şekeri düzeyini ayarlar; aynı zamanda besinlerle alınan galaktoz, mannoz ve fruktoz gibi şekerleri glukozla dönüştürür (1).

1.1.1.3.1.2. Protein Metabolizması

Gama globülinler hariç dolaşımdaki bütün proteinler başlıca karaciğerde sentezlenirler. Transferrin ve serüloplazmin gibi taşıyıcı proteinler, akut faz yanıtında görevli ve diğer proteinler; ayrıca bütün pıhtılaşma faktörleri karaciğerde sentezlenir. Aminoasitlerin transaminasyon ve oksidatif deaminasyon yoluyla yıkılması sonucu açığa çıkan amonyak, üreye dönüştürülür ve böbreklerden atılır. Azotlu atıkların başlıca atılma yoludur (1).

1.1.1.3.1.3. Lipid Metabolizması

Karaciğer lipoprotein metabolizmasında önemli rol oynamaktadır. Bunun yanı sıra endojen trigliserit sentezi, kolesterol sentezi ve yağ asitlerinin de novo sentezi karaciğerde gerçekleşmektedir (1).

1.1.1.3.1.4. Safra Sentezi ve Salgılanması

Safrada su, elektrolitler, safra asitleri, kolesterol, fosfolipidler ve konjuge bilirubin bulunmaktadır. Hepatositlerin kandaki maddeleri alıp dönüştürerek safra kanalikülleri içine salgılamaları karaciğerin ekzokrin fonksiyonudur (1).

1.1.1.3.1.5. İmmunolojik Fonksiyonu

Karaciğer portal sistem tarafından getirilen bakteri ve diğer antijenler için bir süzgeç gibi davranmaktadır. Endotele bağlı makrofajlar olan kupffer hücreleri bu antijenleri fagosit ederek uzaklaştırırlar (1).

1.1.1.3.1.6. Hormon ve İlaç Metabolizması

İlaç ve toksinler Faz I ve II reaksiyonları aracılığıyla suda çözünür hale getirilerek idrar ve safra yoluyla atılırlar. İnsülin, glukagon, östrojen, büyüme hormonu, glukokortikoidler ve parathormon karaciğerde katabolize edilmektedir (1).

1.1.1.3.1.7. Karaciğerin Diğer Metabolik Fonksiyonları

Karaciğerin iyi bir vitamin kaynağı olduğu bilinmektedir. Özellikle A vitamini başta olmak üzere, D ve B12 vitaminleri de depolanır. A vitamini eksikliğini on ay, D vitamini eksikliğini üç-dört ay, B12 vitamini ise en az bir yıl ya da daha uzun süre eksikliklerini önleyecek kadar depo edilebilir. Bunun yanı sıra kanın pıhtılaşması işleminde kullanılan maddelerin çoğu karaciğerde yapılır. Bu maddeler fibrinojen, globülin, faktör V, VII, IX ve faktör X' dur. K vitamini yokluğunda bu maddelerin konsantrasyonu çok fazla düştüğünden pıhtılaşma nerdeyse tamamen ortadan kalkar (45).

Hemoglobinde bulunan demir dışında, demirin en büyük kısmı normalde karaciğerde ferritin şeklinde depolanır. Karaciğer hücrelerinde, demirle az ya da çok miktarlarda birleşebilen bir protein olan apoferritin bol miktarda bulunur. Vücut sıvılarında demir miktarı arttığı zaman, apoferritinle birleşerek ferritini oluşturur ve gerektiğinde başka bir yerde kullanılmak üzere saklanır. Dolaşımdaki vücut sıvılarında demir düşük bir düzeye indiğinde ferritin demiri serbestlenir. Bu şekilde, karaciğerdeki apoferritin-ferritin sistemi bir demir deposu görevi yapar (45).

1.1.1.3.2. Karaciğer Fonksiyonlarının Değerlendirilmesi

Karaciğer fonksiyon testleri olarak da bilinen laboratuvar testleri, karaciğer fonksiyon bozukluğu olan hastada tanı koyma, hastalığın şiddetini tahmin etme, prognozu belirleme ve tedaviye yön vermek açısından gereklidir. Tüm bu sorunları çözecek tek bir test olmamakla birlikte bu testlerin her biri ayrı ayrı metabolik yolları yansıtmaktadır.

Tablo 1. Karaciğer fonksiyon testleri (46)

Karaciğerde sentezlenen maddelere dayanan testler

Albumin, kolinesteraz, koagülasyon faktörleri

Karaciğerde metabolize edilen maddelere dayanan testler

İlaçlar, ksanobiyotikler, bilirübin, kolesterol, trigliseritler

Hasarlı dokudan salıverilen maddelere dayanan testler

Hasarlı hepatositlerden salınan endojen bileşikler; AST ve ALT

Kanaliküler membran, safra kanalı epiteli ve merkezi ve periportal venlerin epitelinden salınan veya sentezi artan endojen bileşikler; ALP, γ -GGT, 5'- nükleotidaz

Plazmadan karaciğer vasıtasıyla temizlenen maddelere dayanan testler

Endojen metabolitler; safra asitleri, bilirübin, amonyak

Eksojen bileşikler; aminopirin, lidokain, kafein

1.1.1.4. İlaç ve Toksik Maddelere Bağlı Karaciğer Hasarı

Birçok ilaç veya kimyasal maddelere bağlı gelişen toksik olaylar, karaciğer hasarının en sık nedenlerinden biridir. Çünkü birçok ilaç veya kimyasal ajanın metabolizmasının gerçekleştiği esas organdır (47). Toksik hepatit nedenlerini genel olarak üç başlık altında toplamak mümkündür. Bunlar; ilaçlar, doğal toksik ajanlar ve kimyasal maddelerdir. Klasik tedavi amaçlı kullanılan ilaçlar, vitaminler, kokain, ekstazi, mantar, alkol, endüstriyel kimyasal ilaçların yanı sıra özellikle son yıllarda

bazı şifalı bitkilerin de karaciğerde toksik olaylara neden olabileceği belirtilmiştir. (17, 48-53).

Toksik karaciğer hasarı 2 farklı yolla gerçekleşir. Bu yollar bazen karaciğerde oluşan toksik etkidenden tek tek sorumlu iken her iki mekanizmanın birden işlediği durumlar da olabilir. Ayrıca aynı ilaç farklı kişilerde farklı lezyonlarla karşımıza çıkabilir. Hepatotoksisiteyi önceden tahmin etmek her zaman kolay olmamaktadır. Çünkü kişinin duyarlılığı ve kullanılan ilaca bağlı olarak hepatotoksisite değişkenlik gösterir. Genellikle insanda ve hayvan modellerinde benzer toksisite gözlenir. Hepatotoksinlere dolaylı olarak maruz kalan kişilerde sınırlı toksisite gözlenir. Bunun sebebi ilaçların metabolize edilmesini sağlayan genlerdeki polimorfizmdir. (54-58).

Karaciğer hasarı, toksik maddelerin karaciğerdeki makro molekülleri değiştirmesi, oksijen radikalleri üretmesi ve membran lipidlerini peroksidasyona uğratması sonucunda ortaya çıkar (59). Bu toksik maddeleri iki grupta incelemek mümkündür:

1.1.1.4.1. İntrensek Hepatotoksinler

İntrinsik hepatotoksinler, alındıktan kısa bir süre sonra (birkaç gün içinde) akut hepatite benzer reaksiyon yaparlar (47). Karaciğerde toksik etki oluşturan intrinsik mekanizmanın başlıca özellikleri şunlardır;

- Önceden tahmin edilebilir
- Aşırı dozda ortaya çıkar
- Deneysel çalışmalarla gösterilir
- Zedelenme direkt, indirekt olabilir
- Direkt; hücre ve organellerde hasar
- İndirekt; metabolik yollarla veya immun mekanizma

Bu yolla etkili ilaçlardan bazıları CCl₄, valproat, asetaminofen, metotreksat, kontraseptif steroidler, vinil klorid, kokain, niasin, siklofosfamid olarak sayılabilir. (54, 55).

İntrensek hepatotoksinler lobülün herhangi bir bölgesinde toplanan hücre nekrozuna yol açarlar. İlaç ve toksinlerin metabolitleri sitokrom P-450 enzimleri aracılığıyla meydana gelmektedir. Bu maddelerin oluşturduğu hasar ise sıklıkla

sitokrom P-450 enziminin çok olduğu ve hipoksinin fazlaca etkilediđi sentrilobüler bölgede görülür (59).

1.1.1.4.2. İdiosenkrazik Hepatotoksinler

İdiosenkrazik hepatotoksinler, alındıktan birkaç ay sonra reaksiyonları ortaya çıkan hepatotoksinlerdir. İlaç metabolitleri hücre zarı ile neoantijen oluşturarak karaciğer hasarına yol açar. Ateş, eklem ağrısı, vücutta kızarıklık ve eozinofili gibi viral hepatit benzeri reaksiyonlara yol açarlar (54, 59). İdiosenkrazik mekanizmanın başlıca özellikleri şunlardır;

- En sık görülen form
- Doz ile ilişkili değil
- Önceden tahmin edilemez
- Bireye göre değişir
- Genetik ve çevresel farklılıklar var
- Deneysel gösterilemez
- İlaç alımı- hasar süresi uzun olabilir.

Bu yolla etkili ilaçlara örnek olarak izoniazid, klorpromazin, fenilbutazon, diklofenak, halotan, fenitoin, asetilsalisilik asit, tetrasiklin, eritromisin, amoksisilin-klavulonik asit gibi ilaçlar verilebilir (17, 54, 60, 61).

1.1.1.4.3. Karaciğer Hasarının Mekanizması

1. Hücre içi iyon dengesinin bozulması: Ca (kalsiyum) dengesi bozulur. Hücrede şişme, zarda parçalanma ve sonuçta hücre yıkımı gerçekleşir.

2. Apoptozis: İmmun sistem sitokinleri uyarır, kaspas aktive olur

3. Safra kanalikül hasarı: Transport proteinini etkiler

4. Mitokondriyal disfonksiyon: Yağ asit oksidasyonu inhibisyonu, solunum zinciri inhibisyonu, mitokondriyal DNA etkilenmesi. Sonuçta hücre içi yağlanması gerçekleşir.

5. İmmün mekanizma: Biyotransformasyon ile oluşan ara metabolit enzimlere bağlanır ‘‘addükt’’ oluşur. Antijen antikor reaksiyonu gelişir (62).

Yukarıda tanımlanan mekanizmalar göz önüne alındığında toksik karaciğer hastalıkları özellikle hepatositleri, safra kanallarını, vasküler sistemi, sinuzoidal hücreleri ve Kupffer hücrelerini etkileyerek karaciğerde çeşitli morfolojik değişikliklerin ortaya çıkmasına neden olur (48-50).

1.1.1.4.4. Morfolojik Değişiklikler

İlaç ve toksik maddelere bağlı oluşan karaciğer hasarları geniş bir morfolojik spektrumu kapsamaktadır. Karaciğer hastalığının tüm histolojik paternleri görülebilir. Bu histolojik şekiller: akut ve kronik hepatit, konfluent nekroz (zonal, multilobüler), akut ve kronik kolestaz, mikro ve makroveziküler yağlanma, granülomlar, vasküler bozukluklar (hepatoportal skleroz, peliozis hepatit, venooklüziv hastalık, Budd Chiari sendromu, sinüzoidal dilatasyon), fibrozis, siroz ve neoplazmlardır (hepatosellüler adenom, hepatosellüler karsinom, anjiosarkom, kolanjiokarsinom) (63, 64).

Histopatolojik olarak hepatositlerde görülen balonlaşma dejenerasyonu karaciğer hasarının tipik göstergesidir. Hepatosit nekrozu, steatozis, portal ve lobüler inflamasyonlar ise karaciğer hasarında toksik ajandan bağımsız histopatolojik bulgulardır (65, 66).

1.1.2. Karbon Tetraklorür (CCl₄)

1.1.2.1. Genel Özellikleri

Karbon tetraklorür (CCl₄), renksiz, berrak, uçucu sıvı bir maddedir. Doğal olarak bulunmakla birlikte, pek çok kimyasal reaksiyonun bir sonucu olarak da ortaya çıkabilir. Güçlü bir kimyasal stabiliteye sahiptir. Buna bağlı olarak 30 ile 60 yıl arasında değişen bir yarılanma ömrüne sahiptir (67-70).

Daha önceleri yangın söndürme, kuru temizleme, tahıl dezenfeksiyonu ve böceklerle mücadelede yararlanılan bu madde; kloroflorokarbonlu bileşiklerin sentezinde, soğutucu ekipmanların ısı transferlerinde, müzelerde sergilenen eşyaların dış ortamın zararlı etkilerinden korunmasında kullanılmaktadır. İyi bir kimyasal çözücü olması nedeniyle endüstriyel alanlarda yağ, vernik, pestisit, parafin ve rezin çözücüsü olarak kullanılır; ayrıca evlerde giyecek, mobilya ve halılardan lekelerin çıkarılmasında kullanılmaktadır. Anti helmintik ve anti histaminik etkileri vardır. İnsan vücuduna çevreden ortalama 0,1 µg/ gün CCl₄ girişi olmaktadır. Birleşik Devletler Çevre Koruma Dairesi CCl₄' ü insan için olası kanserojen sınıfına dahil etmiştir (67-70).

Kullanım alanları göz önüne alınacak olursa, CCl₄' ün kullanıldığı veya üretildiği tesislerde çalışan işçiler, tesis çevresinde yaşayan insanlar, kuru temizleme

sektöründe çalışanlar ve böcek ilaçlaması yapan kişilerin CCl_4 ’ e maruz kalma riski oldukça fazladır (71).

Karbon tetraklorür oral, solunum ve deri yoluyla vücuda alınır. En hızlı emilim oral yolla olur. İnsanlarda CCl_4 ’ ün önemli bir kısmı yağ dokusuna yerleşir. Vücuttaki yarılanma ömrü yaklaşık 24 saattir. Vücutta biriken CCl_4 ’ ün %4’ ü akciğere ulaşır, daha sonra solunum yoluyla atılır. Vücutta protein ve hücre içi moleküllerle etkileşimi sonucu oluşan ürünler ise idrar ve feçes yoluyla atılır (69).

Zehirlenme belirtileri emilimi takiben hemen ortaya çıkar. Merkezi sinir sisteminin baskılanmasına bağlı olarak baş ağrısı, baş dönmesi, halsizlik, ataksi, görme bulanıklığı, uyuklama hali, bilinç kaybı gibi belirtiler ortaya çıkabilir. İlk günden itibaren bulantı, kusma ve karın ağrısı görülür. Uzun süreli düşük miktarlarda solunması huzursuzluk, aşırı hareketlilik, bağırsaklarda düzensiz kasılmalara neden olur. Maruz kalma süresi uzadıkça ciltte kuruma, ciltten kabarık kırmızı lekeler, tırnaklarda kuruma ve kırılmalar ortaya çıkar (72).

1.1.2.2. Karaciğer Hasarı Oluşturma Mekanizması

Karbon tetraklorür’ün tekrarlayan uygulamaları serbest radikal üretimine neden olarak karaciğer hasarı yapmaktadır. CCl_4 prooksidan aktiviteye sahip olmasının yanı sıra seçici hepatotoksik etkisinden dolayı deney hayvanlarında karaciğer hasarı oluşturmak amacıyla kullanılır (73-77).

Karbon tetraklorür’ün metabolize olmasıyla meydana gelen reaktif bileşikler veya metabolitler; DNA, lipid, protein ve karbonhidrat gibi hedef moleküllerle kovalent olarak bağlanarak (primer) ya da sekonder ilişki yoluyla (lipid peroksidasyon, ROT (reaktif oksijen türleri) oluşumu, GSH/GSSG oranında değişiklik) hedef moleküllerde değişiklik oluşturarak toksisite meydana getirir (15).

Karbon tetraklorür, akut veya gecikmiş tipte karaciğer toksikasyonlarına yol açmaktadır. Histopatolojik olarak balonlaşma dejenerasyonu, komşu hepatosit yağ başkalaşımı, hücre iltihabı, santral ven çevresinde lenfosit ve kupffer hücre infiltrasyonu ve nekroz gözlenir. CCl_4 sitokrom P450 monoksijenaz enzim sistemi tarafından triklorometil (CCl_3) ve triklorometilperoksil (CCl_3O_2) radikallerine dönüştürülür. Bu radikaller oldukça aktif olup karbon tetraklorürün karaciğerde, özellikle sentrilobüler bölgede neden olduğu nekrozdan sorumludurlar. Triklorometil radikali hem makromoleküllerle kuvvetli adduct oluşturur; hem de oksijenle

birleşerek daha aktif bir metabolit olan CCl_3O_2 radikalini meydana getirir. Bu radikal lipid peroksidasyonunun temel başlatıcısıdır. Lipid peroksidasyonu, lipoprotein sentezinde gerekli olan yapıları da hasara uğratarak hepatik lipidozise katkıda bulunur. Aşırı lipid birikimi karaciğerde fonksiyon bozukluğuna neden olur ve siroza doğru ilerleyen değişimler ortaya çıkar (78-82).

Oluşturduğu karaciğer dejenerasyonu, insandaki siroz gelişim sürecine benzerlik gösterdiği için CCl_4 , kemirgenlerde deneysel çalışmalarda en çok kullanılan kimyasal ajandır. CCl_4 'e bağlı karaciğer toksisitesinin oluşmasında oksidatif stres önemli rol oynar (83).

Karbon tetraklorür, lipid peroksidasyonuna neden olarak oksidatif hasara yol açmaktadır. Oksidatif hasarda karaciğer stellat hücreleri ve fibroblastlar uyarılır; dolayısıyla ekstrasellüler matriks ve kollajen sentezi gerçekleşir. Bunun yanında kupffer hücrelerinin uyarımı, proinflamatuvar sitokinler, $\text{TNF-}\alpha$ (Tümör nekrozis faktör- α) ve $\text{IL-1}\beta$ (interlökin 1 β) üretimine neden olur. Bu hasara bağlı olarak süreç devam ederse karaciğer fibrozu ve siroz oluşabilir. Toksik oksijen radikallerine bağlı olarak ekstrasellüler matriks yapımı ve yıkımı arasındaki dengenin yapım yönünde bozulmasıyla karaciğer fibrozu oluşur. Yapılan birçok çalışmada karaciğer hastalıklarında artan oksidatif stres ile karaciğer hasarı ve fibrozu arasındaki ilişki gösterilmiştir (43, 72, 84-89).

Karbon tetraklorür metabolize edildikten sonra oluşan ara ürünler DNA'ya kovalent olarak bağlanırlar. Oluşan reaktif oksijen türleri DNA ile etkileşime girerek doğrudan DNA kırıklarının oluşmasına sebep olurlar. Oksidatif DNA hasarı, insanlardaki birçok hastalığın oluşumunda önemli bir faktördür (90, 91).

Karbon tetraklorür'e bağlı karaciğer hasarının gelişim basamakları şu şekilde özetlenebilir; redüktif dehalojenasyon, radikallerin kovalent bağlanması, protein sentezinin inhibisyonu, yağ birikim, kalsiyum sekestrasyonunda kayıp, apoptozis ve fibrozistir (92).

1.1.3. Serbest Radikaller ve Oksidatif stres

1.1.3.1. Tarihsel Süreç

Serbest radikallerin kimyasal olarak mevcudiyeti konusunda, yaklaşık 100 yıl önce bir sonuca ulaşılmakla birlikte, varlıkları ilk 30-40 yıl boyunca dünya çapında

kabul görmemiştir. Serbest radikallerin biyolojik sistemlerdeki varlığı ve önemi 1950'lerin ortalarına kadar kabul görmese de, reaktif oksijen biyokimyasını kuran bir grup bilim adamının katkıları ile varlıkları ve önemleri aydınlatılmıştır. Yirminci yüzyılın ikinci yarısının büyük bir kısmında, reaktif oksijen türevlerine, doku hasarı ve hastalığına yol açan bir tür biyokimyasal “oksitleyici ajan” gözüyle bakılmıştır. Yirmibirinci yüzyıla girerken reaktif oksijen biyokimyası bir disiplin olarak olgunlaşmış ve biyomedikal bilimler arasındaki önemi yerleşmiştir. Günümüzde hemen her hastalığın bir dereceye kadar oksidatif strese bağlı olduğu kabul edilmektedir. Ayrıca günümüzde, reaktif oksijen türevlerinin (ROT) homeostazisini devam ettirmeye yardımcı olmak üzere, normal ve sağlıklı dokuların hücrelerinde sıkı-kontrollü bir şekilde oluştuğu kabul görmeye başlamıştır. Ortaya çıkan yeni teknolojilerin, özellikle proteomik teknolojilerin, reaktif oksijen biyokimyası alanında ilerideki gelişmeleri kolaylaştıracağı konusu bilimsel çevrelerce tartışılmaktadır (93).

1.1.3.2. Oksidatif Stres

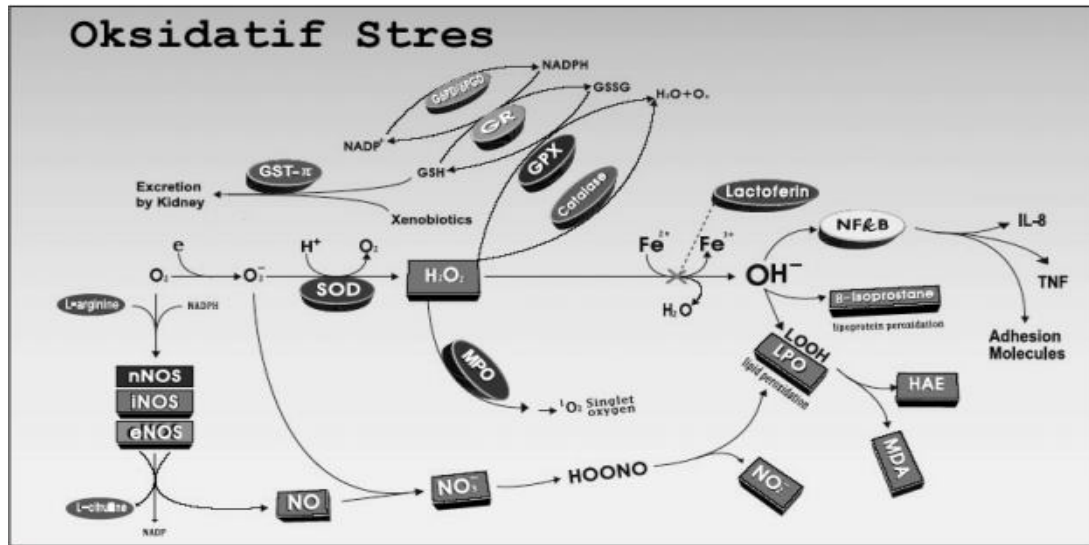
Oksidanlar radikal ve nonradikal olmak üzere iki grupta toplanabilir. Radikal olanlar (süperoksit radikali, hidroksil radikali, alkoksil radikali, peroksil radikali ve hiperoksi radikali), tek elektron eksikliklerinden dolayı başka moleküllerle kolayca elektron alışverişi yapabilirler. Nonradikal olanlar (hidrojen peroksit, nitrik oksit ve hipoklorit) ise, elektron eksiklikleri olmamasına rağmen başka moleküllerle radikallerden daha zayıf bir şekilde birleşebilirler (94-97).

Normal fizyolojik şartlarda oluşan serbest radikaller, biyolojik koruma sistemleri tarafından ortamdan uzaklaştırılmaktadırlar. Serbest radikallerin fazla üretilmesi veya detoksifikasyon mekanizmalarının yetersiz kalması ile akut hücre hasarı meydana gelir. Bir başka deyişle oksidatif stres oksidan maddelere maruziyette artış ya da antioksidan kapasitede azalma olarak tanımlanabilir. Organizmada, radikaller antioksidan savunma sistemleri ile dinamik bir denge halindedir. Bu denge korunduğu sürece organizma için faydalıdır. Örnek olarak; serbest radikal üretimi mikroorganizmaların fagositik hücreler tarafından öldürülmesinin ana mekanizmasıdır. Ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, steroid yapıdaki çok sayıdaki bileşiklerin ve eikozanoidler gibi biyolojik aktif moleküllerin sentezi, çok sayıdaki oksidaz ve hidroksilaz enzimlerin etkileri için ve sitotoksik

etkilere sahip hücrelerin fonksiyonları için radikal yapımı olmazsa olmaz bir koşuldur. Serbest radikaller apoptozisin regülasyonunda görev alarak aşırı hücre çoğalmasını önler ve bu şekilde homeostaziste yer alır. Antioksidan savunmanın azalması da apoptozisi tetikler. Ayrıca; serbest radikaller transkripsiyon faktörlerini aktive ederek ikinci haberci olarak da görev yaparlar (98, 99).

Oksidatif stresin oluşumu, serbest radikallerin üretim hızına, aktivitesine ve antioksidan savunma sistemine bağlıdır. Serbest radikallerin fazla üretilmesi ile oksidazlar, hem içeren proteinazlar ve metalloproteinaz gibi birtakım enzimlerin hücre dışına çıkması; demir, bakır gibi bazı maddelerin serbest radikallerle kompleksler oluşturması ve savunma sistemindeki bozukluklar oksidatif stresin artmasına neden olur (100).

Herhangi bir nedenle oksidan maddelerin organizmada aşırı miktarlarda sentezlenmesi, nükleik asitler, lipidler, proteinler, enzimler ve karbonhidratlarla etkileşmesine; aynı zamanda kalsiyum metabolizmasına etki ederek hücre içi kalsiyumun kontrolsüz yükselmesine, dolayısıyla hücre hasarı ve ölümüne neden olmaktadır (101,102).



Şekil 3. Oksidatif Stres (103)

1.1.3.3. Oksidan Kaynakları

Serbest radikaller hücrelerde endojen veya eksojen kaynaklı faktörlere bağlı olarak oluşmaktadır; eksojen kaynaklı etmenler arasında: Parakuat (1,1'dimethyl-4,4'dipyridylum), alloksan gibi kimyasal maddelerin etkisinde kalma; iyonize ve ultraviyole radyasyon; karbon tetraklorür, parasetamol gibi ilaç toksikasyonları; hava

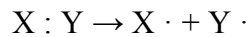
kirliliği yapan fitokimyasal maddeler; sigara dumanı, solventler gibi çevresel faktörler, alkol ve uyuşturucu gibi alışkanlık yapıcı maddeler ve antineoplastik ajanlar bulunur. Endojen kaynaklı etmenler arasında ise: Mitokondriyal elektron transport zinciri komponentleri, endoplazmik retikulum, araşidonik asit metabolizması, redoks döngüsü, fagositik hücreler (monosit, makrofaj, nötrofil, eozinofil), endotelyal hücrelerdeki oksidatif reaksiyonlar, ksantin oksidaz, NADPH oksidaz, indolamin dioksijenaz, triptofan dioksijenaz, galaktoz oksidaz, siklooksijenaz, lipooksijenaz, monoamin oksidaz gibi enzim sistemleri ve otooksidasyon reaksiyonları en önemli kaynakları oluşturmaktadır (104, 105).

1.1.3.4. Serbest radikaller

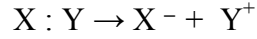
Atomlar; proton ve nötronlardan oluşan bir çekirdek ve çekirdeğin etrafında bulunan elektronlardan oluşurlar. Her atomda değişik sayıda elektron bulunmaktadır. Atomda mevcut elektronlar orbita olarak adlandırılan yörüngelerde çift sayıda bulunurlar. Stabil moleküller, bu şekilde dış yörüngelerinde, birbirine zıt yönde dönen elektron bulundurulur. Yapılarında bulunan uyarılmış elektronlar sebebiyle (çiftlenmemiş tek elektron) kolaylıkla elektron alışverişi yapabilen ve bu şekilde etkileşime girdiği moleküllerin yapısını bozan moleküllere “serbest radikaller” denmektedir. Radikal oluşuktan sonra tek elektronunu başka bir moleküle verebilir (redüksiyon), bir elektron alarak çift hale gelebilir (oksidasyon) ya da radikal olmayan bir yapıya eklenebilir. Tüm bu durumlar nonradikal yapının radikal hale gelmesine neden olur (106, 107). Kimyasal ve biyokimyasal tepkimelerin tümü atomların dış orbitallerinde bulunan elektronlar sayesinde gerçekleşmektedir. Dış orbitallerde paylaşılmamış elektron bulunması serbest radikallerin reaktivitesini olağanüstü düzeyde arttırır. Bu nedenle serbest radikaller, kimyasal aktifliği yüksek moleküllerdir (16, 108).

Serbest radikallerin oluşumunda üç temel mekanizma rol oynar (109): Bunlar;

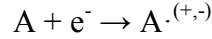
1. Kovalent bağ taşıyan normal bir molekülün homolitik yıkımı sonucu oluşurlar (Bölünme sonrası her bir parçada ortak elektronlardan biri kalır).



2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı ya da bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi ile oluşurlar. Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron, atomlardan birisinde kalır.



3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile oluşurlar.



Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötr; ayrıca organik veya inorganik moleküller şeklinde de olabilirler. Cu^{+2} , Fe^{+3} , Mn^{+2} , Mo^{+3} gibi bazı geçiş metalleri de serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar. (110).

Aerobik organizmalar için esansiyel olan O_2 aynı zamanda oksidan bir ajandır. Normal şartlarda, sitokrom sistemi gibi hücre içi sistemlerde tetravalan redüksiyona uğrayan moleküler oksijenin bir kısmı, bu yoldan sızarak biyolojik yapılarda univalan redüksiyona uğrar ve serbest oksijen radikalleri olarak adlandırılan birçok reaktif ürün ortaya çıkar. Aerobik organizmalarda en fazla oksijen radikalleri bulunmaktadır (107).

Reaktif oksijen türlerinin (ROT) ve reaktif nitrojen türlerinin (RNT) oluşması için oksijen molekülü gereklidir. Süperoksit ($O_2^{\cdot -}$), hidroksil radikali ($\cdot OH$), alkoksil radikali ($RO^{\cdot}$), peroksil radikali ($ROO^{\cdot}$) ve hidroperoksil radikali ($OOH^{\cdot}$) serbest oksijen radikallerine örnek olarak verilebilir. Nitrik oksit ($NO^{\cdot}$) ve nitrojen dioksit ($NO_2^{\cdot}$) radikalleri de RNT' ni oluşturur. Oksijen ve nitrojen serbest radikalleri, hidrojen peroksit (H_2O_2), peroksinitrit ($ONOO^-$), hipokloröz asit ($HOCl$), hipobromöz asit ($HOBr$) gibi diğer reaktiflere dönüşebilir (111).

Tablo 2. Oksijen kaynaklı reaktif bileşikler (112).

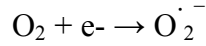
Radikaller	Radikal Olmayanlar
Süperoksit ($O_2^{\cdot -}$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Hidroksil ($\cdot OH$)	Hipokloröz asit ($HOCl$)
Peroksil ($ROO^{\cdot}$)	Singlet oksijen (1O_2)
Alkoksil ($RO^{\cdot}$)	Ozon (O_3)
Nitrik oksit ($NO^{\cdot}$)	Peroksinitrit ($ONOO^-$)
Azot dioksit ($NO_2^{\cdot}$)	Lipid hidroperoksit ($LOOH$)

1.1.3.4.1. Reaktif Oksijen Türevleri

1.1.3.4.1.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot -}$)

Oksijenli ortamda yaşamın, oksidatif fosforilasyon ile ATP (adenozin trifosfat) üretimi açısından önemli ölçüde yararı olduğu gibi olumsuz bazı yönleri de bulunmaktadır. Oksidatif fosforilasyonun ana bileşeni olan oksijene bir elektron eklenmesi ile süperoksit radikali oluşur (113). Süperoksit anyonu canlılarda olduğu ilk gösterilen radikaldir. Başlıca şu mekanizmalarla üretilmektedir:

1) İndirgeyici özellikteki biyomoleküller oksijene tek elektron verip kendileri oksitlenirken süperoksit radikali oluşur. Örnek olarak; hidrokinonlar, flavinler, tiyoller ve indirgenmiş nükleotidler gibi çok sayıda biyolojik molekülün aerobik ortamda oksitlenirken süperoksit yapımına neden olması sayılabilir.



2) Enerji metabolizması sırasında mitokondride kullanılan oksijenin % 1-5 kadarı süperoksit yapımı ile sonlanmaktadır. Bu duruma NADH (nikotinamid adenin dinükleotit) dehidrojenaz ve koenzim Q gibi elektron taşıyıcılardan oksijene elektron kaçağının olması sebep olur.

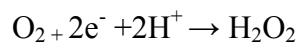
3) Yüzlerce enzimin katalitik etkisi sırasında süperoksit radikali oluşabilir.

4) Aktifleşen fagositik lökositler bol miktarda süperoksit üretir. Ürettikleri süperoksitleri fagozom içine ve bulundukları ortama vererek antibakteriyel etki gösterirler. Aynı zamanda bu olay daha reaktif türlerin oluşumunu da başlatır.

Süperoksit radikalının yarılanma ömrü hücrelerin farklı yerlerinde bulunan SOD (Süperoksit dismutaz)' ın varlığına bağlı olmakla beraber genellikle milisaniye düzeyindedir (114).

1.1.3.4.1.2. Hidrojen peroksit (H_2O_2)

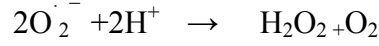
Moleküler oksijenin, çevresinde bulunan moleküllerden $2e^-$ veya $O_2^{\cdot -}$ ' ın bir e^- alması ile oluşur.



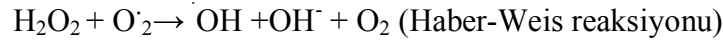
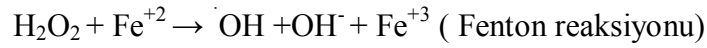
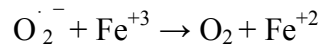
Membranlardan kolayca geçebilir. Uzun ömürlü bir oksidan molekül olan H_2O_2 , biyolojik sistemlerde esas olarak süperoksitin dismutasyonu ile üretilir. İki

süperoksit molekülü iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar.

SOD



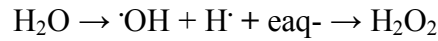
H₂O₂ bir radikal olmamasına rağmen reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü süperoksit radikali ile reaksiyona girerek yıkılır. Bu reaksiyon sonucunda en reaktif ve en zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikalini oluşturur.



Peroksizomlar yüksek konsantrasyonlarda oksidaz içerdikleri için hidrojen peroksitin en önemli kaynağıdır (1, 110).

1.1.3.4.1.3. Hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$)

Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten oluşmaktadır. Major oluşumu suyun yüksek enerji ile iyonizasyonudur.



Son derece reaktif bir oksidan radikal olup tüm biyolojik moleküllerle reaksiyona girebilir. Çok kısa bir yarılanma ömrüne sahiptir. Hızlı üretilip hızlıca ortamdan uzaklaştırılmasına karşın meydana getirdiği yıkıcı hasar oldukça büyüktür (115).

Proteinler, nükleik asitler ve lipidlerle girdiği tepkimeler neticesinde binlerce farklı ara ürün oluşabilir. DNA ile tepkimesi sonucunda baz modifikasyonları, baz delesyonları ve zincir kırılmalarına yol açabilir; daha ileri derecedeki DNA hasarları tamir edilemediğinden hücre ölümüne neden olur. Proteinler üzerinde yapı değişimlerine neden olduğundan, proteinler proteolitik yıkıma götürülür (116, 117). Hidroksil radikalının ($\cdot\text{OH}$) başlıca hedefi yağ asitleridir. Hücre zarındaki lipidlerin peroksidasyonu zarın yapısını bozar ve buna bağlı olarak geçirgenliğin artması hücre ölümüne neden olabilir (115, 118, 119).

1.1.3.4.1.4. Singlet Oksijen (1O_2)

Oksijen elektronlarından birinin dışarıdan enerji alması sonucu kendi dönüş yönünün tersi yönde olan farklı bir yörüngeye yer değiştirmesi neticesinde meydana gelebileceği gibi; süperoksit radikalının nitrik oksit ile reaksiyonu ya da hidrojen peroksitin hipoklorit ile reaksiyonu sonucunda da oluşabilir (120).

1.1.3.4.1.5. Hidroperoksil Radikali ($HO_2^{\cdot}$)

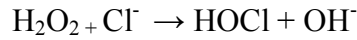
Süperoksit radikalının ($O_2^{\cdot-}$) protonlanmasıyla oluşur. Biyolojik membranları kolaylıkla geçer. Düşük dansiteli lipoproteinlerin lipid içeriğinin peroksidasyonunu başlatarak oksidatif etki gösterir (110).

1.1.3.4.1.6. $R^{\cdot}$ (Alkil radikali, organik radikaller)

Hidroksil radikali; yağ asitleri, nükleik asitler, karbonhidratlar ve proteinler gibi çeşitli moleküllerden bir proton çıkarıp karbon merkezli organik radikallerin oluşmasına neden olur (121).

1.1.3.4.1.7. Hipokloröz Asit (HOCl)

Nötrofillerin primer granüllerinde bol miktarda bulunan myeloperoksidaz (MPO) enzimi tarafından hidrojen peroksit ve klor iyonlarından sentezlenir (122).

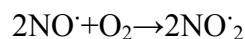


1.1.3.4.2. Reaktif Nitrojen Türevleri

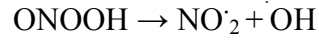
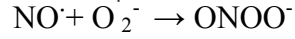
Biyolojik sistemler tarafından üretilen reaktif nitrojen türlerinin en önemlisi nitrik oksittir (123).

1.1.3.4.2.1. Nitrik Oksit ($NO^{\cdot}$)

Yarı ömrü 10-20 saniyedir. Damar endotellerinde nitrik oksit sentetaz aracılığıyla L-arjininden sentezlenir. Bir atom azot ile bir atom oksijenin çiftleşmemiş elektron vererek birleşmesiyle oluştuğu için radikal tanımına uymaktadır. Üretimi hakkında fikir sahibi olabilmek için NO_2 ölçümleri yapılmaktadır. Düz kaslarda cGMP (siklik guanozin monofosfat) sentezini uyarak damar gevşemesini sağlar. Nitrik oksit metabolize olurken moleküler oksijen ile bağlanıp azot dioksit ($NO_2^{\cdot}$)'i oluşturur:



Nitrik oksit vücuttaki reaktif oksijen türleri ile reaksiyon vererek güçlü bir oksidan molekül olan peroksinitrit ($ONOOH$)'i; bu da ileri dekompozisyonla hidroksil ($^{\cdot}OH$) radikalini meydana getirir:



Peroksinitrit, tirozin gibi fenolik amino asitleri nitrolayarak toksik nitro türevlerini oluşturmaktadır. NO[•], ateroskleroz, endotel hücre disfonksiyonu, hipertansiyon, kalp damar hastalıklarında rol oynayabilir (123).

1.1.3.5. Serbest Radikallerin Hücreler Üzerindeki Etkileri

1.1.3.5.1. DNA ve Nükleik Asitler Üzerine Etkileri

Özellikle iyonize radyasyon, artmış oksijen konsantrasyonu, ksantin oksidaz ve çeşitli kimyasal maddeler olmak üzere DNA'nın yapısında oksidatif hasara sebep olan çok sayıda faktör vardır. İyonize edici radyasyonla meydana gelen OH radikali başta olmak üzere serbest radikaller, dipirimidinler, siklobutan pirimidin dimerleri, tek zincir kırılmaları, DNA- protein çapraz bağları oluştururlar. DNA polimeraz inhibisyonuna neden olurlar. Tüm bu olaylarla hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Hidroksil radikalının deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyon verebilmesinden dolayı, DNA serbest radikallerden kolaylıkla etkilenir. Bazı radikaller ise DNA tamirinden sorumlu enzimleri inhibe ederek hasara neden olurlar (124).

1.1.3.5.2. Karbonhidratlar Üzerine Etkileri

Serbest radikaller glikolitik yolla ATP sentezinin azalmasına veya ATP kullanımının artmasına neden olurlar. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucunda hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehitler oluşur. Okzoaldehit grubundan olan glikozil antimitotik aktivite gösterir. Bu da DNA ve RNA (ribonükleik asit) arasında çapraz bağ oluşturma özelliğinden kaynaklanır. Süperoksit ve hidrojen peroksitin in vitro ortamda hiyaluronik asiti parçaladıkları bildirilmiştir (125).

1.1.3.5.3. Proteinler Üzerine Etkileri

Proteinlerin serbest radikal hasarından etkilenme dereceleri amino asit kompozisyonlarına bağlı olarak değişir. Doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Proteinler üzerine olan serbest radikal hasarı birikmiş ise ya

da belirgin proteinlerin spesifik bölgesi üzerinde yoğunlaşmışsa hücrenin canlılığını devam ettirmesi açısından zararlı etkiler doğurur (105).

1.1.3.5.4. Lipidlerde Meydana Gelen Yapısal değişiklikler

Lipidler, serbest radikal hasarından en fazla etkilenen biyomoleküllerdir. Çoklu doymamış yağ asitleri birden çok çift bağ içermelerinden dolayı, serbest radikallerle kolayca etkileşime girerler (126).

Lipid peroksidasyonu (LP), kuvvetli oksidleyici bir radikalın membran yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asidi zincirindeki metilen gruplarından bir hidrojen atomunu uzaklaştırması ile başlamaktadır. Lipid peroksidasyonunu başlatan başlıca radikal, hidroksil radikalidir. LP membran yapı ve bütünlüğünün bozulması, oluşan serbest radikallerin çeşitli hücre bileşenlerine etkisi ve son ürünlerin sitotoksik etkileri gibi farklı yollarla hücre hasarına neden olduğu biliniyor (127).

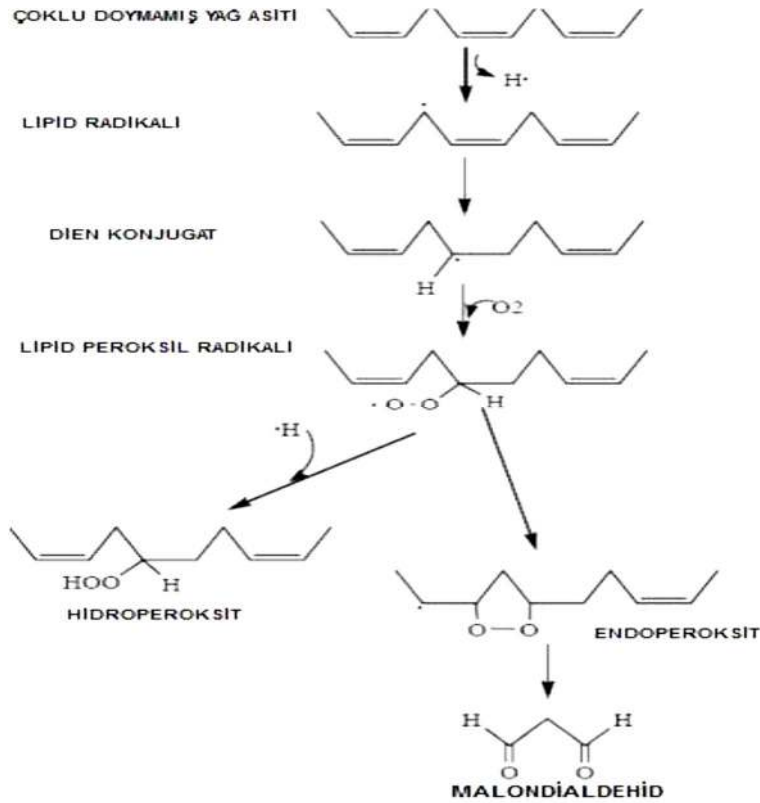
Serbest radikallerin membranda bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini etkilemesiyle kimyasal süreç başlamış olur. Lipid peroksidasyonu bir zincir reaksiyonu şeklinde başlar ve daha ileri aşamalarındaki peroksidasyonu başlatacak serbest radikaller açısından sürekli bir kaynak oluşturur. Bu zincir reaksiyonlarının membranda oluşturduğu hasar geri dönüşümsüzdür (15, 128).

Hücre membranındaki yağ asitleri ve kolesterolün doymamış bağları serbest radikallerle reaksiyona girerek peroksidasyona neden olabilir. Öncelikle yağ asidi, hidrojen ve kendi üzerinde birer elektron kalacak şekilde parçalanır ve lipid radikalini oluşturur. Sonrasında oksijenle reaksiyona giren lipid radikali, lipid peroksil radikalini oluşturur. Lipid peroksil radikali de diğer doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girer. Böylece zincirleme bir reaksiyon başlamış olur. Bununla birlikte lipid peroksiller ortamda bulunan hidrojen atomları ile reaksiyona girerek lipid hidroperoksidleri de oluştururlar (129). Lipid peroksidler daha sonra malondialdehid (MDA) ve 4-hidroksi nonenal gibi yıkım ürünlerine dönüşürler. Bu yıkım ürünleri de DNA veya proteinlerle reaksiyona girebilir ve mutajeniktirler. (129, 130).

1.1.3.5.4.1. Malondialdehid (MDA)

Malondialdehid, üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu meydana gelir. Bu da tiyobarbutirik asid ile reaktif maddeler olarak ölçülmektedir. MDA düzeyi lipid peroksidasyonunun şiddetiyle orantılıdır;

ancak spesifik değildir. Lipid peroksidasyonunun nispeten stabil bir son ürünü olan MDA, lipid peroksidasyon belirteci olarak kullanılabilir. Uzun ömre ve yüksek reaktiviteye sahip olup hücre içi ve dışındaki protein, nükleik asit gibi birçok biyomolekülü etkileyerek geri dönüşümü mümkün olmayan hücre hasarlarına neden olur. Ayrıca membran akıcılığının azalmasına, membran fonksiyonlarının yavaşlamasına, membran reseptör ve enzimlerinin inaktive olmasına ve Ca^{+2} iyonlarının membran geçişlerinin artmasına neden olmaktadır (129-132). Ayrıca, nükleusa diffüze olabildiğinden DNA'nın nitrojen bazlarıyla da reaksiyona girmektedir. MDA, tüm bu özelliklerinden ötürü mutajenik, genotoksik ve karsinojenik bir bileşiktir (133).



Şekil 4. Lipid Peroksidasyon Şeması (134)

1.1.3.6. Hastalıkların Serbest Radikallerle İlişkisi

Oksidatif stresin, pek çok hastalıkta sebep mi yoksa primer hastalık sürecinin bir sonucu mu olduğu kesinlik kazanmamış olmakla birlikte; enzimlerin ve yapısal proteinlerin oksidatif modifikasyonlarının hastalıkların etyolojisinde rol oynayabileceği kesinlik kazanmıştır (135).

Oksidatif stresle ilişkili hastalıklara şu örnekler verilebilir; astım, ateroskleroz, serebral vasküler hastalıklar, kronik obstrüktif pulmoner hastalık, konjestif kalp yetmezliği, diyabet, hipertansiyon, grip, miyokard enfarktüsü, pnömoni, hepatit, kanser ve inflamatuvar hastalıklar (136).

1.1.4. Antioksidan Savunma Sistemleri

Canlı hücrelerde, lipid, karbonhidrat, protein ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidanlar; bu olaya da antioksidan savunma denir. Oksidanları tutarak daha zayıf bir moleküle dönüştürmektedirler. Antioksidan savunma elemanları hücre içi ve hücre dışı ortamda farklıdır. İnsanda belli başlı hücre içi antioksidanlar; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimleridir. SOD'un yapısında bakır, çinko ve manganez; GSH-Px'de ise selenyum iyonu bulunduğundan bu enzimler 'metalloenzim' olarak da adlandırılırlar. Hücre içi ortamın aksine hücre dışı ortamda antioksidan savunmadan E ve C vitamini, transferrin, haptoglobulin, seruloplazmin, albumin, bilirubin, β - karoten ve α -1 antitripsin sorumludur. Antioksidanlar, aşağıda belirtilen mekanizmalarla oksidanları etkisizleştirir:

1. Toplayıcı etki; antioksidan enzimler bu şekilde fonksiyon görürler. Serbest oksijen radikallerini tutarak veya daha zayıf moleküllere dönüştürerek etki gösterirler.

2. Zincir kırıcı etki; serbest oksijen radikallerinin zincirlerini kırıcı etki gösterirler. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.

3. Bastırıcı etki; serbest oksijen radikallerine bir hidrojen ekleyip aktivitelerini azaltarak veya inaktif hale dönüştürerek etki gösterirler. Bu özellikteki antioksidanlara vitaminler ve flavanoidler örnek olarak verilebilir.

4. Onarıcı etki; serbest radikallerin meydana getirdiği hasarı onarıcı etkiye sahiptirler.

5. Enzimatik etki; SOD gibi antioksidan enzimler ile enzimatik olmayan antioksidanların sentezini arttırarak etkilerini gösterirler.

6. Hücresel kinaz kayıplarını önleme; oksidasyon reaksiyonlarını durdururlar.

Antioksidanlar, lipid peroksidasyonunu, proteinlerin çapraz bağlanmasını ve DNA mutasyonunu engeller (137).

1.1.5. Apoptozis ve Nekroz

Tüm organizmalarda, yaşamın devamlılığı için canlıyı oluşturan hücrelerin sayısal dengesi oldukça önemlidir. Bu bağlamda canlılarda yeni hücreler oluşurken, diğer taraftan mevcut hücrelerin bir kısmı da hücre ölümü ile ortadan kaldırılmakta ve böylece sabit denge korunmaktadır. Varolan bu hücrelerin bir kısmı apoptozis denilen fizyolojik, programlanmış hücre ölümü; bir kısmı ise nekroz adı verilen patolojik hücre ölümü tipleriyle ortadan kaldırılmaktadır (138, 139).

1.1.5.1. Nekroz

Genler tarafından kontrol edilemeyen, rastgele gelişen, düzensiz bir süreç olup en sık nedeni hipoksidir. Nekroz sırasında reaktif oksijen türlerinin üretimi artar, apoptotik olmayan proteazlar aktive olur. Dışarıdan gelen ısı, yanma, toksik maddeler gibi fiziksel ve kimyasal uyarılar hücrenin iyon dengesini bozar. Nükleusta bulunan ve DNA' nın tamirinden sorumlu PARP (Poli ADP- riboz polimeraz) enzimi NAD^{+} ı ikiye bölerek NAD kaybına sebep olur. Bu durumda meydana gelen ATP eksikliği, iyon pompasında yetersizliğe neden olur. Kalsiyum kanalları açılır. Böylece hücre sıvı alır ve organeller şişer. Plazma membran bütünlüğü bozulur ve osmotik basıncın etkisiyle hücre patlar. Sonuç olarak hücre içeriğinin interstisyel aralığa salınması enflamasyon (iltihaplanma)' a neden olur. Makrofaj ve nötrofillerin nekrotik dokuya göç etmesi bu olayın karakteristik özelliğidir. Göç eden bu hücreler nekrotik dokuyu fagosite eder. Bundan dolayı enflamasyon nekrozun önemli bir belirteçidir (140, 141).

Plazma membranının permeabilizasyonu olmadığı için nekroza spesifik biyokimyasal belirteç yoktur ve sadece elektron mikroskopunda izlenebilir. Nekroz lokal inflamasyona neden olduğu ve tümör gelişimini teşvik ettiği için, patolojik hücre ölümü olarak değerlendirilmektedir (142).

Nekroz, eş zamanlı gerçekleşen iki olaydan kaynaklanır (143).

1- Hücrenin enzimatik sindirimi

- Hücrenin kendi enzimleri tarafından sindirimi (otoliz)
- Hücrenin lökositler tarafından sindirimi (heteroliz)

2- Protein denatürasyonu

Koagülasyon nekrozu, likefaksiyon nekrozu (kollikuasyon nekrozu, erime nekrozu), kazeöz nekroz, yağ nekrozu, kangrenöz nekroz, fibrinoid nekroz olmak üzere bazı tipleri vardır (140, 141).

Tablo 3. Apoptozis ile nekroz arasındaki farklar (144)

Özellik	Nekroz	Apoptozis
Yol Açan Nedenler	- Hipoksi - İskemi - Hipertermi - Şiddetli oksidatif stres - Litik viral enfeksiyon - Toksik maddelerin yüksek konsantrasyonları	- Büyüme faktörü eksikliği - Hücre yaşlanması - HIV - Çok şiddetli olmayan oksidatif stres - Kanser ilaçları - Radyasyon - Yüksek doz glukokortikoid - Fas veya TNFR-1 reseptörlerinin aktivasyonu - Sitotoksik T lenfositler
Morfolojik Özellikler	- Hücre membranı bütünlüğünün kaybı - Kromatin“flocculation”u - Hücre şişmesi - Organellerin disintegrasyonu - Endoplazmik retikulumun dilatasyonu - Büyük vakuollerin oluşumu - Hücre lizisi	- Intakt hücre membranı; fakat membranda “bleb” lerin oluşumu - Hücre küçülmesi - Organellerde disintegrasyon yok - Membranlarda tomurcuklanmalar görülür - Kromatinin nükleer membran civarında toplanıp yoğunlaşması - Hücrenin intakt mitokondri, ribozom, nükleus parçaları, ve diğer organelleri içeren membranla kaplı apoptotik cisimciklere parçalanması
Biyokimyasal Özellikler	- ATP gerekmez +4 derecede gerçekleşebilir - Bozulmuş iyon homeostazisi - DNA rastgele parçalanır - Postlitik DNA fragmentasyonu	- ATP gerekir +4 derecede gerçekleşemez - İyi kontrollü, bazı aktivasyonların ve enzimatik basamakların olması - DNA internükleozomal alanlarda 180 kb çiftinin katları olacak şekilde kırılır mono ve oligonükleozomlara ayrılır. Agaroz jel elektroforezinde apoptozise özgü merdiven paterni bulgusunu verir - Prelitik DNA fragmentasyonu
Diğer özellikler	- Patolojik etkiler sonucu gerçekleşir - Hücreler gruplar halinde ölür - Lizozomal enzimler salınır - İnflamasyona neden olur	- Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir - Hücreler tek tek veya birkaçı bir arada ölür - Apoptotik cisimcikler komşu hücreler veya makrofajlarca fagosite edilir - İnflamasyon görülmez

1.1.5.2. Apoptozis

Apoptozis; gelişmiş organizmalarda hücrelerarası ilişkilerin bir gereği olarak, gereksinim duyulmayan ve işlevleri bozulan hücrelerin, çevreye zarar vermeden programlı bir şekilde ölümü olarak tanımlanabilir. 1972’de Kerr ve arkadaşları; apoptotik bir hücrenin, plazma membranıyla çevrili fragmanlara bölünmesini, bir ağacın yapraklarını dökmesine benzeterek Yunanca’da “düşmek, dökülmek” anlamına gelen Apoptozis terimini ilk kez kullanmışlardır (145, 146).

Tüm yaşam boyunca programlı hücre ölümü (apoptozis) vardır. Bazı hücreler yıllarca yaşarken, bir kısmı ise sadece birkaç saat yaşar. Gastrointestinal sistem, deri ve immün sistem gibi pek çok dokuda devamlılık apoptozis ve hücre yenilenmesiyle sağlanır (145).

Apoptozis fizyolojik hücre ölümü olarak da tarif edilmektedir. İnflamasyon olmaksızın hücrelerin kendilerini yok ettikleri, protein sentezi ve enerjiye gereksinimi olan ve organizmada homeostazı koruyan, genlerle düzenlenen programlı bir olaydır (147).

Apoptozis, normal gelişim esnasında ve olgunlaşmış organizmadaki çeşitli hücre tiplerinin tahribi sırasında spesifik hücrelerin kaybindan sorumlu fizyolojik bir olaydır. Organizmanın sağlıklı ya da hasta oluşunu apoptotik hücre sayısı belirler. Bu nedenle apoptozisin fonksiyonel mekanizmaları hücrede denge unsurudur (148). Apoptozisin oksidatif stresle modüle olduğu ve antioksidanların bunun engellenmesinin bir kısmına karıştığı gösterilmiştir (149).

Apoptozisin işaretleri olarak görülen karakteristik strüktürel özellikleri;

1. Sitoplazmik ve nükleer kondenzasyon (piknozis)
2. Nükleer fragmentasyon (karyorekzis)
3. Sitoplazmik organellerin normal morfolojik görünümü
4. Plazma membranının bütünlüğü olarak tanımlanmıştır (150-152).

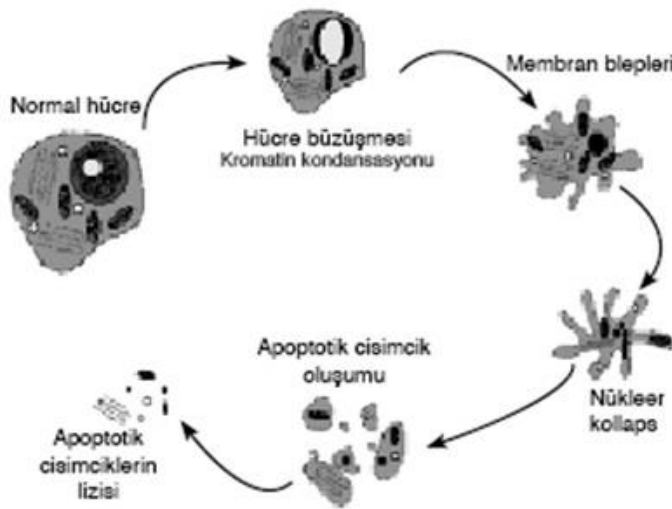
1.1.5.2.1. Apoptozisin Morfolojisi

İçeriden ya da dışarıdan gelen bir faktörle apoptozis başlatılır. DNA hasarı, hücre içi kalsiyum seviyesinde artış, hücre içi pH’da düşme, metabolik bozukluklar ve hücre siklus bozuklukları ortaya çıkar. Apoptoziste esas morfolojik olay nükleusun yoğunlaşması ve sonrasında parçalara ayrılmasıdır. Normal şartlarda mikst kondens bir yapı nedeniyle daha diffüz bir görünüme sahip olan kromatin,

apoptoziste süperkondens bir hal alır. Bu şekilde nükleus membranı altında kresentik bir görünüm oluşur. DNA, floresan boyamada boncuklanmalar şeklinde görülür. Bunun sebebi, DNA' nın endonükleaz etkisiyle karakteristik bir şekilde internükleozomal bölgelerden 180-200 bp (baz çifti) büyüklüğünde parçalara ayrılmasıdır. İmmün elektroforez yapıldığında “ladder patern” olarak adlandırılan merdiven benzeri bir görünüm oluşur. Normalde bir hücrede birbirini takip eden 7 kırılma onarılrken, apoptoziste yaklaşık 300 000 kırılma meydana gelir ve hücre onarımı yapılamaz (153-155).

Apoptozisin erken evresinde hücreler birleşme bölgelerinden ayrılır, özelleşmiş yüzey organellerini kaybeder ve belirgin şekilde büzülür, birkaç dakikada hacimlerinin 1/3'ünü kaybederler. Bu görünüm, muhtemelen plazma membranında bulunan iyon kanalları ve pompalarında aktivasyonun bozulmasına bağlıdır. Daha sonra plazma membranında tomurcuklanmalar oluşur ve hücre, sitoplazma ile çevrilmiş kromatin parçalarından oluşan apoptotik cisimciklere parçalanır; ancak hücre henüz yaşamaya devam etmektedir (156).

Komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınan apoptotik hücreler fagosite edilirler. Apoptotik hücrelerin tanınması hücre zarındaki değişikliklerle olur. Normalde hücre zarının iç tabakasında yer alan fosfatidil serin, aminofosfolipid transferaz enzimi aracılığıyla zarın dış yaprağına göç eder. Fagositik hücrelerin vitronektin, lektin özelliğine sahip reseptörleri fosfatidil serin ile bağlanır ve fagositozu uyarır (145).



Şekil 5. Apoptozise uğrayacak hedef hücrede görülen morfolojik değişiklikler (153)

1.1.5.2.2. Hastalıklarda Apoptozisin Rolü

Tablo 4. Hastalıklarda Apoptozisin Rolü (155).

Apoptozisin Azalmasıyla İlgili Hastalıklar	Apoptozisin Artmasıyla İlgili Hastalıklar
Kanser	Nörodejeneratif Bozukluklar
Lösemi	Parkinson hastalığı
Lenfoma	Alzheimer hastalığı
Karsinom	Creutzfeld-Jakop hastalığı
Blastom	Amyotrofik lateral skleroz
Sarkom	Huntington hastalığı
Malign gliom	Retinitis pigmentosa
Seminom	Spinal muskular atrofi
Premalign Hastalıklar	Hematolojik Bozukluklar
Ataxia telangiectasia	Aplastik anemi
Paroksimal nokturnal hemoglobinüri	Fanconi anemisi
Myeloblastik sendromlar	Polycythemia vera
Xeroderma pigmentosum	Hodgkin hastalığı
	Myelodisplastik sendromlar
Otoimmün Bozukluklar	Otoimmün Bozukluklar
Otoimmün lenfoproliferatif sendrom (tip I ve II)	Fulminant hepatit
Sistemik lupus erythematosus	Graft-versus-host hastalığı
	Hashimoto tiroiditis
	İnsüline bağımlı diyabet
	Multipl skleroz
	Romatoid artrit
	Skleroderma
	Sjögren sendromu
Ateroskleroz	İskemik Yaralanma
Metabolik Bozukluklar	İskemi ve reperfüzyon
	Miyokardial enfarktüs
	Böbrek enfarktüsü
	İnme
Nimann-Pick hastalığı	Toksinlere Bağlı Hastalıklar
Osteoporozis	
Wilson hastalığı	
Viral Enfeksiyonlar	Alkole bağlı hepatit
Adenovirüsler	Pulmoner fibrozis
Epstein-Barr virüs	Sepsis
Herpesvirüsleri	
Poxvirüsler	Bakteriyel ve Viral Enfeksiyon
Prematur ve Fizyolojik Yaşlanmada Apoptozis	AIDS
	Ebola virüsü
	Chlamydia trachomatis
Down sendromu	Helicobacter pylori
Xeroderma pigmentosum	Neisseria meningitis
	Salmonella typhimurium
	Shigella flexneri
	Diğerleri
	Travmatik spinal kord yaralanması
	Tümör karşı atağı (immün ayrıcalık)

1.1.5.2.3. Apoptozisin Düzenlenmesi

1.1.5.2.3.1. Bcl-2/Bax

Bcl-2, 26kDa büyüklüğünde, mitokondriyal, endoplazmik redikulum ve çekirdek çevresi membranlarda yerleşmiş proteinlerdir. Bcl-2 özellikle mitokondri dış membranında bulunmakta ve iyon transportunu düzenlemektedir. Bcl-2 ailesi, üyelerinin bir kısmının pro-apoptotik olduğu yani apoptozisi uyardığı (Bax, Bad, Bid, Bcl-Xs); bir kısmının ise anti-apoptotik olduğu yani apoptozisi inhibe ettiği (Bcl-2, Bcl-Xl) geniş bir ailedir. Proapoptotik olanlar sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salıverilmesini indüklerler. Anti-apoptotikler ise sitokrom c salıverilmesini baskırlarlar. Bu iki zıt etkili grubun işleyişi yapılarında bulunan iki bölgeye (hidrofobik cep ve amfipatik α -heliks) bağlıdır. Yapılarındaki BH1, BH2 ve BH3 bölgeleri hidrofobik cebi oluşturur. Amfipatik α -heliks, BH3 bölgesinde yer alır. Hidrofobik cep sayesinde bir diğer bcl-2 ailesi üyesinin BH3 bölgesine bağlanırlar. Pro-apoptotik üyeler kendi içinde iki alt gruba ayrılırlar. Bu alt grublardan biri yapılarında her üç bölgeyi (BH1, BH2, BH3) de içeren üyelerden (örn; Bax, Bak), diğeri ise sadece BH3 bölgesini içeren üyelerden (Bid, Bad, Bim) oluşur. Anti-apoptotik üyelerde ayrıca BH4 bölgesi bulunur ve apoptozisin diğeri hücrel yollarla ilişkisini kurduğu düşünölmektedir. Anti-apoptotik üyeler, sitokrom c'nin salıverilmesini baskılama özelliğine sahiptir. Pro-apoptotik üyelerin anti-apoptotik üyelerle bağlanması durumunda inhibitör bu etki ortadan kalkar ve sitokrom c salıverilmesi gerçekleşir. Bu yüzden, yaşam ile ölüm arasındaki seçeneği, pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerin dengesi belirler. Anti-apoptotik üyelerin aşırı ekspresyonlarının apoptozisi baskıladığı, buna karşın pro-apoptotik üyelerin aşırı ekspresyonunun ise hücreleri öldürdüğü görölmektedir. Anti-apoptotik bcl-2 ailesi üyelerinin en iyi bilinenleri: Bcl-2, Bcl Xl, Mcl-1, pro-apoptotik olanları ise; Bax, Bcl-Xs, Bad, Bim, Bak, Bok, Bid'dir (156, 157).

Bcl-2'nin mitokondri ile olan ilişkisinden ötürü antioksidan bir etkiye sahip olduğu ve böylece oksidatif stresin sebep olduğu apoptozisi baskılayabildiğı bildirilmiştir (156, 157).

1.1.5.2.3.2. Bax Proteinini

Bcl-2 ailesi üyelerinden pro-apoptotik bir protein olan, Bcl-2 ile ilişkili x-protein (Bcl-2 associated x-protein, Bax), 21 kDa ağırlığında bir proteindir. Bax geni,

19. kromozom üzerinde 19q13.3-q13.4 pozisyonunda lokalizedir. Altı ekzon ve üzerinde dört adet p53 bağlanma bölgesi bulunan bir promotor bölgeden oluşmaktadır. Bax proteini BH1, BH2 ve BH3 bölgelerinde Bcl-2'ye benzerlik gösterir ve pro-apoptotiktir. Sitozolde bulunur ve apoptotik uyarılar sonucu mitokondri membranına bağlanıp “pore” oluşmasını sağlar, böylece selektif iyon permeabilitesi kaybolur sonuçta sitokrom-c ve AIF (Apoptosis Inducing Factor) gibi faktörlerin sitoplazmaya geçmesine neden olur. Difteri toksininin yapısal olarak tam benzeri olan Bax proteininin bazı bakteri toksinlerinin por oluşturan proteinlerine benzerlik göstermesi hücre içi zarlarda (mitokondri, endoplazmik retikulum ve çekirdek zarı) kanallar oluşturma potansiyeli olabileceğini düşündürür. Bax, Bcl-2 ile heterodimerize ve kendisi ile homodimerize olur. Bax hücrede aşırı yapıldığında apoptotik ölüm artarken, Bcl-2 aşırı yapıldığında Bax ile heterodimerize olur ve apoptotik ölüm baskılanır (158).

1.1.5.2.4. Apoptozis Mekanizmaları

Apoptozis, evrimsel olarak korunmuş 2 ayrı biyokimyasal yolakla meydana gelir; bunlar ölüm reseptörleri aracılığıyla gerçekleşen ekstrinsik yolak ve Bcl-2 ailesi proteinleri aracılığı ile gerçekleşen intrinsik yolak. İster hücre içi, isterse hücre dışı mekanizmayla başlamış olsun, apoptotik süreç, kaspazlar adı verilen proteolitik enzimler tarafından gerçekleştirilir (159).

1.1.5.2.5. Apoptozis'in belirlenmesinde kullanılan yöntemler (160).

Morfolojik görüntüleme yöntemleri

1. Işık Mikroskobu

a. Hematoksilen Boyama

b. Giemsa Boyama

2. Floresan Mikroskobu / Lazerli Konfokal Mikroskop

a. Propidium İyodür (PI)

b. Hoechst Dye

3. Elektron Mikroskobu

4. Faz Kontrast Mikroskobu

İmmunohistokimyasal yöntemler

1. Anneksin V Yöntemi

2. TUNEL Yöntemi

3. M30 Yöntemi

4. Kaspaz-3 Yöntemi

Biyokimyasal yöntemler

1. Agaroze Jel Elektroföze

- DNA fragmantasyonu

2. “Western Blotting”

- Substrat kırılmaları
- Aktif kaspaz’ın belirlenmesi
- Sitokrom c saliverilmesi

3. “Flow” Sitometri

İmmunolojik yöntemler

1. ELISA

- DNA Fragmantasyonu
- M30 Düzeyi

2. Fluorimetrik Yöntem

- Kaspaz Aktivasyonu

Moleküler biyoloji yöntemleri

- DNA Microarrays

1.1.5.2.5.1. TUNEL Yöntemi (Terminal deoxynucleotidyl Transferase biotin – dUTP Nick End Labeling)

Doku kesitlerinde apoptotik hücrelerdeki DNA sarmal kırıklarının in situ saptanmasında kullanılan en duyarlı ve en hızlı metoddur. İlk defa 1992 yılında Gavrieli ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Bu yöntem temelinde apoptotik hücrelerdeki DNA sarmal kırıklarını serbest 3'-OH uçlarında enzimatik bir reaksiyon ile tespit etmeye dayanarak apoptozise giden hücrelerin görüntülenmesi sağlanmaktadır. Çalışmalarda testin sensitivitesi % 60–90 aralığında, spesifitesi %87 olarak belirtilmekte olup, nekrotik hücre ölümünün indüklenmesi ile spesifitenin %70'lere kadar düştüğü belirtilmektedir (161-163). Bu metodla, parafin bloklar, donmuş kesitler, kültürü yapılmış solüsyon halindeki veya "plate"lere ekilmiş ya da lameller üzerinde büyütölmüş hücrelerde apoptozisin varlığı saptanabilir (164). Bu teknikte apoptotik hücrelerin yüzdelerini flowsitometri ile ölçmek mümkündür (165, 166).

1.1.6. Tiamin

Vitamin B1 olarak da bilinen tiamin ilk önce anti-beriberi faktörü olarak tanınmıştır. Beriberi Sinhala dilinde bir kelimedir ve anlamı aşırı yorgunluk demektir. Hastalık özellikle 19. yüzyıldan önce görülmüştür. 1912 yılında Casimir Funk anti-beriberi faktörünü pirinçten izole etmiştir. Bu, bir vitamin olarak adlandırılan ilk bileşiktir; yaşam için önemli bir amindir ve bu nedenle vitamin B1 olarak belirtilmiştir. Vitamin B1'in kimyasal formülü 1931 yılında Robert R. Williams tarafından tanımlanmış ve tiamin olarak adlandırılmıştır. Vücudun tiamin depoları azdır (sadece 30 mg) ve vitaminin enerji üretiminde önemli rolü olması nedeniyle depoların çoğu kaslarda yerleşmiştir (167). Vitaminin aktif formu tiamin pirofosfattır (TPP). Vitamin için en sık endikasyonlar sinir bozukluklarının tedavisi ve alkolizm, siroz, gastrointestinal hastalık, artmış karbonhidrat alımı, hipertiroidizm ve infeksiyon gibi bozukluklarda eksiklikten korunmadır (168). Güncel bir çalışmada, 120 genç erişkin kadına tiamin desteği verilmiş ve karar verme zamanları ile duygu-durumlarında iyileşme saptanmıştır (169). Vitamin aynı zamanda kalp yetmezliğinin önlenmesi ve tedavisinde de yararlıdır (170). İnsan vücudunda tiamine birçok enzimatik reaksiyonlar için ihtiyaç vardır. En önemlisi vitaminin piruvat dehidrogenaz (enerji üretiminde önemli bir enzim), transketolaz (lipid, glukoz ve dallı amino asit metabolizmasında görev alan bir enzim ve aynı zamanda sinir hücreleri çevresinde miyelin kılıf oluşturulması ve idamesinde de görev alır) ve 2-okzoglutarat dehidrogenaz (asetil kolin, GABA ve glutamat sentezinde görev alır) fonksiyonlarında yer almasıdır (171).

1.1.6.1. Benfotiamin

Nörolojik bozukluklar, özellikle diyabetik nöropati, uzun bir zamandır vitamin B1 (tiamin) ile tedavi edilir, fakat oral alınan suda çözünebilen tiamin tuzlarının biyoyararlanımı yağda çözünen analoglarına kıyasla daha düşüktür. Tedavinin başarılı olması için hem kanda hem de dokularda yüksek miktarlarda tiamin gereklidir. 1954 yılında Fujiwara bir grup yağda çözülebilen tiamin türevini keşfetti ve ardından bunlara “allitiaminler” adını verdi. Çünkü bunlar Alyum ailesi sebzelerde; közlenmiş sarımsak, kuru soğan, pırasa, arpacık soğanı vb. doğal olarak oluşmaktadır. Bunlar arasında benfotiamin en etkili olanıdır ve mükemmel bir

güvenlilik profiline sahiptir. Benfotiaminin oral alımı kan ve dokularda tiamin seviyelerini suda çözünür tuzlarına kıyasla daha fazla derecede artırır (172).

Benfotiamin yeni, yüksek derecede emilebilen, yağda çözünen bir vitamin B1 kaynağıdır. Tiamin ile benzer uygulama alanlarına sahiptir, fakat normal tiaminden yaklaşık 5 kat daha fazla emilebilir ve direkt olarak hücre membranlarından geçebilir. Daha iyi emilir, dokulara daha rahat girer ve dokularda daha uzun süre kalır (171).

Benfotiaminin, allitiamin ailesindeki diğer lipid tiamin türevlerine göre daha iyi olduğu ve lipidte çözülebilen türdeşleri içerisinde en güçlüsü olduğu bildirilmiştir (173).

1.1.6.1.1. Biyokimya ve Farmakokinetik

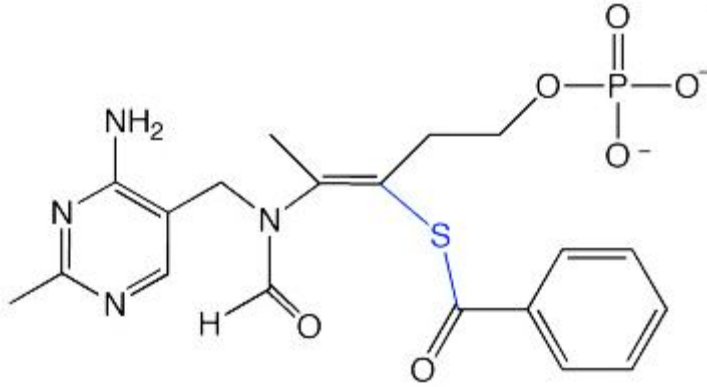
Görünüm: Beyaz

Kimyasal Adı: S-[(Z)-2-[(4-amino-2-methylpyrimidin-5-yl)methylformylamino]-5-phosphonooxypent-2-en-3-yl] benzenecarbothioate.

Moleküler ağırlığı: 466,45 g/mol

Cas No : 22457-89-2

Ticari adları: S-Benzoylthiamine O-monophosphate (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO. A.B.D.) (174).



Şekil 6. Benfotiaminin kimyasal yapısı (175)

Benfotiamin ince bağırsak mukozasından pasif difüzyonla emilir. Tiaminin aksine, benfotiaminin yapısındaki açık tiyazol halkası emilim olduğunda kapanır ve hızlı bir şekilde biyolojik olarak aktif tiamine çevrilir. Oral benfotiamin alımından sonra pik plazma tiamin konsantrasyonları, suda çözünen tiamin tuzlarının oral alımından sonra gözlenenenden en az 5 kez daha fazladır. Benfotiaminin yarı ömrü tiamin tuzlarına benzerdir, fakat benfotiamin alımını takiben sekiz gün sonra

biyoyararlanım orijinal dozun yaklaşık %25'idir; bu da bir tiamin tuzunun oral alımından sonraki miktarından yaklaşık 3,6 kat daha fazladır (172).

1.1.6.1.2. Etki Mekanizması

Benfotiamin yararlı etkilerini bir dizi mekanizma ile gösterir. Diyabet vakalarında benfotiamin transketolaz aktivitesini (glukoz metabolizmasında önemli bir enzim) artırır ve bunun sonucu olarak hiperglisemik hasara yol açan üç majör moleküler yolağı bloke eder. UDP-N-asetilglukozamin (UDP-GlcNAc) artışını engeller ve ileri evre glikasyon son ürünlerinin (AGE) oluşmasına yol açan zarar verici glukoz metabolitlerinin oluşmasını azaltan heksozamin yolak aktivitesini artırır. Benfotiamin aynı zamanda protein kinaz C (PKC) aktivitesini normale döndürür ve diyabetiklerin retinalarında nükleer faktör kappa B (NF-κB) aktivitesini engeller. Ek olarak, benfotiamin aldoz redüktaz aktivitesi, sorbitol konsantrasyonları ve intrasellüler glukozu azaltarak polyol yolağındaki dengesizliği düzeltir (172).

Vitaminin bu modern formu, yeni tehdit olan AGE/ALE (advanced glycation end products/Advanced lipoxidation end products) oluşumuna karşı umut vaat etmektedir. Benfotiamin protein glikasyonu/lipooksidasyonunu önleyebilir ve hücrel yapılar verdikleri zararları azaltabilir. Bu özellikler benfotiamin için eşsizdir ve normal tiamin ile gözlenmez. Vitaminin antioksidan aktivitesi vardır ve yapısına göre bir AGE kırıcı olarak kabul edilir (176). İnsan umbilikal ven hücrelerinin yüksek glukoz ortamında kültürünün yapıldığı çalışmalar, çözeltiye eklenen benfotiaminin normal fizyolojik glukoz durumlarındakine benzer şekilde AGE oluşumunu azalttığı gösterilmiştir (24). Fakat tiamin diyabetik sıçanlarda AGE oluşumunu engellemez (177). Diyabetik sıçanlarda tiamin ve benfotiamin desteklerinde sinir iletimi ve sinir gliko-oksidasyonunun değerlendirildiği bir çalışmada sonuçlar benfotiaminin net bir şekilde üstün bir AGE inhibitörü olduğunu göstermiştir. Diyabet indüksiyonundan üç ay sonra sinir iletimi %10,5 oranında düşmüş ve glikasyon ürünü CML (Carboxymethyl Lysine) 3,5 kat ve deoxyglucosone AGE oluşumu 5,1 kat artmıştır. Benfotiamin desteğinin 6. ayından sonra sinir iletim hızı neredeyse normale dönmüştür. Tiamin desteği aynı zamanda sinir uyarı iletimini de iyileştirir, fakat benfotiamin kadar düzeltmez. Daha önemlisi, benfotiamin diyabetin indüklediği CML ürünlerini tümüyle önlemiş, fakat tiamin AGE seviyelerini anlamlı olarak azaltmamıştır (178). Diyabetik polinöropatisi olan

14 hastada yapılmış başka bir çalışmada (sinir hasarı ağrı, karıncalanma veya uyuşma olarak hissedilir) benfotiamin ve vitamin B6 kombinasyonunun 6 hafta kullanılması ağrı şiddetini 8,2'den 2,3'e anlamlı derecede azaltmıştır. Aynı zamanda önemli bir nokta da, destek vakaların %93'ünde vibratuvar hassasiyet ve genel iyileşmelere yol açmıştır (171). Başka bir çalışmada benfotiaminin diyabetik kırmızı kan hücrelerine etkisi incelenmiştir. Sonuçlar etkileyicidir: CML seviyelerinde %40 azalma ve intrasellüler methylglyoxal türevli AGE' lerde nerede ise %70 oranında düşüş gözlenmiştir (179). Benfotiamin defektif hücresel replikasyonu düzeltmiş ve AGE oluşumunu azaltmıştır. Vitamin aynı zamanda diyabetik sıçanlarda diyabetik retinopatiji önlemiş ve retinada asellüler kapiller segmentin sayısının artışını engellemiştir (180). Asellüler kapiller segmentler daha fazla proliferate olamayan ve kendisini onaramayan vasküler endotelin sonucu gelişir (181). AGE oluşumunu önlemede benfotiaminin etkinliği glikolizi normale döndürmesi ile ilişkili olabilir. Hızlanmış glikoliz gliseraldehit-3-fosfat (G-3-P) ve früktoz-6- fosfat gibi proteinlerle yüksek derecede reaksiyon veren (Glukoza kıyasla G-3-P proteinlerle 200 kere daha fazla reaktiftir) intermediyer metabolitlerin daha fazla oluşmasına yol açabilir (182). Aynı zamanda glisemik durumlarda, hücrelerde önemli ölçüde hasara yol açabilecek, aşırı miktarda süperoksitler-reaktif oksijen bileşenleri mitokondriden salınır. Bu süperoksit daha sonra glikolitik enzim GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)'yi inhibe eder ve glikoliz metabolitlerinin diğer dört glukoz yolağından birisine düşmesine yol açar; böylelikle hiperglisemik hasar oluşur. Benfotiamin transketolaz enzimini aktifler ve glukoz metabolitleri proteinler ile etkileşime geçmeden önce transforme olurlar (183). Bazı çalışmalar Benfotiamin'in reaktif oksijen ürünleri üzerinde baskılayıcı özellikte olduğunu göstermiştir (21, 22). İndirgenmiş olan glutatyon hücre içerisindeki oksidan ajanların etkisini azaltmaktadır ve hücre içinde etkin görev alan proteinleri oksidasyon reaksiyonuna karşı koruyarak anti-oksidan özellik göstermektedir. Bunun sonucunda glutatyon molekülü oksitlenir. Glutatyon molekülünün fonksiyonunu yerine getirebilmesi için yeniden redükte edilmesi gerekir. Bu amaçla NADPH kullanılmaktadır. NADPH üretiminde Pentoz fosfat yolu önemlidir. Bu yolda tiamin etkili görev aldığı için bir antioksidan olarak kabul edilmektedir (23, 24).

Yüksek glikoz maruziyetine bağı gelişen apoptozisin göstergelerinden olan DNA fragmantasyon artışı ve Caspaz 3 aktivitesinin, endotel hücreleri ve perisitlerde benfotiamin uygulamasıyla engellendiğı bildirilmiştir (184).

Glikoz konsantrasyonlarındaki artışlar poliol yolunun aktifleşerek sorbitol üretimine sebep olur. Bu yolda düzenleyici enzim olan aldoz redüktazın aktivitesi için NADPH kullanılır. Hücre içi NADPH' ın tüketilmesi glutatyonun redükte forma dönüşmesinde ve nitrik oksit sentezinde azalmaya yol açar. Dolayısıyla hücrenin antioksidan kapasitesi sınırlanır. Benfotiamin, aldoz redüktazı inhibe ederek NADPH' ın tüketilmesini engeller (185, 186).

Benfotiaminin, alkolik polinöropati, diyabetik kardiyomiyopati, vasküler endotelyal disfonksiyon, diyabetik retinopati, üveitis, diyabetik nöropati, kardiyak anjiyopati, diyabetik nefropati gibi diyabet ve diyabetle ilişkisi olmayan patolojik koşulların önlenmesinde çok yönlü tedavi edici potansiyeli vardır (187).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nde ve çalışmanın etik onayı, 02.02.2012 tarih ve 15 sayılı kararı ile Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulundan alınarak yapıldı.

2.1. Deney Hayvanları

Deneylerde kullanılan en az 8 haftalık erişkin Wistar albino cinsi erkek sıçanlar, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Hayvanların bulundukları ortamın sıcaklığı 22-25°C arasında sabit tutuldu ve hayvanlar 12 saat ışık altında ve 12 saat karanlıkta takip edildi. Ratlar havalandırma sistemi bulunan bir ortamda özel olarak hazırlanmış ve her gün altları temizlenen kafeslerde beslendi. Yemler özel çelik kaplarda, su ise paslanmaz çelik bilyeli biberonlarda normal çeşme suyu olarak verildi. Deney hayvanları Elazığ Yem Fabrikası'nda özel olarak hazırlanan pelletler halindeki rat yemleriyle beslendi. Ratlara verilen yemin bileşiminde bulunan katkı maddeleri Tablo 5'de belirtilmiştir. Ratların deneysel uygulama yapılacak safhaya kadar bakımlarına bu şekilde devam edildi.

Tablo 5. Deney hayvanlarına verilen sıçan yeminin terkibi

Buğday (%)	15
Mısır (%)	10
Arpa (%)	27
Kepek (%)	8
Soya (%)	29,4
Balık Unu (%)	8
Tuz (%)	0,6
Kavimix VM 23-Z (%) *	0,2
Methionin (%)	0,2
DCP (%)**	1,6

* 1 gramında: 4800 IU A, 960 IU D₃, 12 mg E, 0,8 mg K₃, 0,8 mg B₁, 2,4 mg B₂, 1,2 mg B₆, 0,006 mg B₁₂ vitaminleri, 16 mg Nicotin amid, 3,2 mg Cal. D. Panth. 0,32 mg Folic acid, 0,02 mg D-Biotin, 50 mg Cholin Chloride, 20 mg Zinc Bacitracin, 32 mg Mn, 16 mg Fe, 24 mg Zn, 2 mg Cu, 0,8 mg I, 0,2 mg Co, 0,06 mg Se, 4 mg Antioksidan ve 200 mg Ca. ** % 18 fosfor, % 25 kalsiyum, % 0,2 flor'dan oluşur

2.2. Çalışma Gruplarının Oluşturulması ve Deneysel Uygulama

Çalışmada 200-250 gr ağırlığında Wistar albino cinsi erkek ratlar kullanılmıştır. Çalışmamızda kullanılan sıçanlar ; kontrol (grup I), CCl₄ (grup II) , CCl₄ + benfotiamin (grup III), benfotiamin (grup IV) ve Zeytinyağı (grup V) olmak üzere 5 gruba ayrıldı.

Çalışmada her grupta 6 sıçan (n=6) olmak şartıyla 5 grup oluşturuldu.

Grup I (n=6): Kontrol grubuna 14 gün boyunca herhangi bir işlem yapılmadı.

Grup II (n=6): Bu gruptaki deney hayvanlarına 1. ve 8. günlerde olmak üzere iki defa i.p yolla 1ml/kg CCl₄: zeytin yağı (1:2) oranında verildi.

Grup III (n=6): Bu gruptaki deney hayvanlarına 1. ve 8. günlerde olmak üzere iki defa 1 ml/kg CCl₄: zeytin yağı (1:2) oranında karışımı ve oral yolla 70 mg/kg/gün benfotiamin verildi.

Grup IV (n=6): Bu gruptaki deney hayvanlarına 14 gün boyunca oral yolla sadece Benfotiamin 70 mg/kg/gün dozunda verildi.

Grup V (n=6): Bu gruptaki deney hayvanlarına 1. ve 8. günlerde olmak üzere iki defa i.p. yolla 2 ml/kg zeytinyağı verildi.

2.3. Dokuların Alınması

Deneyin sonunda tüm gruptaki sıçanlar ketamin (75 mg/kg) + xylazine (10 mg/kg) i.p. uygulanarak anestezi altında dekapite edildi. Dekapitasyonun ardından sıçanların karaciğer dokuları hızla çıkarılıp % 10 formaldehit ile tespit edilip ardından histolojik ve histokimyasal incelemeler için parafin bloklar hazırlandı. Karaciğer dokusunda MDA çalışması için dokular çalışmanın sonuna kadar - 80°C’de saklandı.

2.3.1. İmmünohistokimyasal İnceleme

Karaciğer dokusunda bax immünreaktivitesinin belirlenmesi için Avidin-Biotin-Peroksidaz Kompleksi yöntemi uygulandı. Boyama metodu aşağıdaki Tablo 6’da ayrıntılı olarak verilmiştir.

Tablo 6. İmmünohistokimyasal boyama prosedürü

Sıra	İşlem	Süre
1	Xylol I	10 dakika
2	Xylol II	10 dakika
3	Xylol	10 dakika
4	% 100 Alkol	10 dakika
5	% 96 Alkol	10 dakika
6	% 80 Alkol	10 dakika
7	Distile su	5 dakika
8	Mikrodalga	7+5 dakika
9	Oda ısısında soğutma	20 dakika
10	PBS (Phosphate Buffered Saline)	3X5 dakika
11	H ₂ O ₂	10 dakika
12	PBS	3X5 dakika
13	Normal blok solüsyonu	5 dakika
14	Primer antikor	60 dakika
15	PBS	3X5 dakika
16	Sekonder antikor	30 dakika
17	PBS	3X5 dakika
18	Streptavidin ALP (Alkalen fosfataz)	20 dakika
19	PBS	3X5 dakika
20	Fast Red	5 dakika
21	Distile su	5 dakika
22	Zıt boya olarak Mayer's hematoksilen	10 saniye
23	Akarsu	5 dakika
24	Özel kapatma maddesi ile kapatma	

Parafin bloklardan 5–6 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamalara alındı. Deparafinize edilen dokular dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildikten sonra endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için H₂O₂ ile muamele edildi. Zemin boyasını engellemek için Ultra V Block solüsyonu ile muameleden sonra primer antikor (Bax mouse monoclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology, sc-7480, California, USA) ile 60 dakika inkübe edildi. Primer antikor uygulanmasından sonra sekonder antikor (biyotinli anti-mouse /rabbit IgG, Diagnostic BioSystems, KP 50A, Pleasanton, USA), Streptavidin ALP ve 3 Fast Red kromojeni uygulandıktan sonra Mayer's hematoksilenle zıt boyama yapıldı. Negatif kontrol için hazırlanan dokularda primer antikor yerine phosphate buffered saline (PBS) kullanıldı, diğer basamaklar aynı şekilde uygulandı. PBS ve distile sudan geçirilen dokular uygun kapatma solüsyonu ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Novel N-800M mikroskobunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı.

İmmünohistokimyasal boyanmanın değerlendirilmesinde boyanmanın yaygınlığı esas alındı. Sitoplazmik immün boyanmanın yaygınlığı 0'dan +3'e kadar sayı ile semi-kantitatif olarak skorlanarak istatistiksel analizleri yapıldı (Tablo 7).

Tablo 7. İmmünohistokimyasal boyanma yaygınlığının derecesi

Derece	Anlamı
0	Yok
+1	Az
+2	Orta
+3	Şiddetli

2.3.2. TUNEL Metodu

Parafin bloklardan 5-6 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon, cat no: S7101, USA) kullanılarak apoptoza giden hücreler belirlendi.

Xylene ile deparafinize edilen dokular, dereceli alkol serilerinden geçirilerek phosphate buffered saline (PBS) ile yıkandı. 0.05% 'lik proteinase K ile 10 dakika inkübe edilen dokular, endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için % 3 hydrogen peroxide ile 5 dakika inkübe edildi. PBS ile dokular yıkandıktan sonra, 6 dakika Equilibration Buffer ile inkübe edilip, 37°C' de nemli ortamda çalışma solüsyonu (%70µl Reaction Buffer + %30 TdT Enzyme) ile 60 dakika inkübe edildi. Stop/Wash Buffer'da 10 dakika bekletilen dokular, Anti-Digoxigenin-Perosidaz ile 30 dakika muamele edildi. Diaminobenzidine (DAB) substratı ile apoptotik hücreler görüntülendi. Harris hematoksilen ile zıt boyası yapılan kesitler uygun kapatma solüsyonu ile kapatıldı. Pozitif kontrol için meme dokusu kullanıldı. Negatif kontrol dokusunda Tdt enzimi yerine Reaction Buffer kullanıldı.

Hazırlanan preparatlar Novel N-800M mikroskobunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı. TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde Harris hematoksilen ile maviye boyanmış çekirdekler normal, kahverengi nükleer boyanma gösteren hücreler apoptotik olarak değerlendirildi. Kesitlerde 10'luk büyütmede rastgele seçilen alanlarda, normal ve apoptotik en az 500 hücre sayıldı. Apoptotik hücrelerin, toplam (normal + apoptotik) hücrelere oranlanması ile Apoptotik indeks

(AI)'i hesaplanarak istatistiksel analizleri yapıldı. Skala bar: 50µm. Boyama metodu aşağıdaki tabloda ayrıntılı olarak verilmiştir (Tablo 8).

Tablo 8. TUNEL boyama prosedürü

İşlem	Süre
1 60°C etüv	Bir gece
2 Xylol	3X15 dakika
3 %100, %96, %80, %70 etil alkol	3'er dakika
4 PBS	5 dakika
5 Kesitlerin çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizilir.	
6 1:500 dilüsyondaki Protinaz K solüsyonu	20 dakika
7 PBS	3X5 dakika
8 Endojen peroksit blokajı (% 3 H ₂ O ₂)	3 dakika
9 PBS	3X5 dakika
10 Equilibration tampon solüsyonu	10 dakika
11 Çalışma solüsyonu (%70 µl Reaction Buffer + %30 TdT Enzyme) 37°C'de	60 dakika
12 Stop/Wash Buffer (2ml) + Distile su (68ml) Oda sıcaklığında	10 dakika
13 Anti-Digoxigenin-Peroxidase	30 dakika
14 PBS	3X5 dakika
15 DAB Dilution Buffer + DAB Substrate	5-10 dakika
16 PBS	3X5 dakika
17 Distile su	5 dakika
18 Harris hematoksilen	1-5 dakika
19 Distile su	5 dakika
20 %80, %96 ve %100 etil alkol	1'er dakika
21 Xylol	2X5 dakika
22 Kapatma medyumunu kullanılarak lamel ile kapatma.	

2.3.3. Malondialdehid (MDA) Çalışması

0.42 gr Tris-Base + 1.43 gr Tris-HCl + 3 gr KCl ve 0.5 ml Tween 20, 250 ml distile suda hazırlandı. Hazırlanan bu tampon örneklerin homojenatında kullanıldı. X gr doku üzerine 5 ml tampon ilave edildi ve parçalandı. Homojenat 5000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısımdan 1 ml başka bir tüpe alındı. Alınan 1ml örnek üzerine 1ml %10 'luk TCA (10 gr TCA 100 ml distile suda hazırlandı) ilave edildi. Üzerine 1ml %0.6 TBA (0.6 gr TBA 100 ml distile suda hazırlanır, hazırlanan TBA +4°C'de en fazla bir gün saklanabilir) ilave edildi. Üzerine 1ml distile su ilave edildikten sonra, son olarak 0.5 ml %4 HCl ilave edildi (4ml HCl 100 ml distile suda hazırlanır, asit ve su şiddetli reaksiyona girdiği için mümkünse asit damlalar şeklinde suya ilave edilmelidir). Hazırlanan karışım 90-95°C'de 120 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası tüpler oda sıcaklığında soğutuldu ve

üzerine 3 ml bütanol ilave edilip vortekslendi. Daha sonra tüpler 5 dk 5000 rpm'de santrijüj edilerek oluşan (bütanol faz) süpernatanttaki kırmızı-pembe renk spektroküvetine pipet yardımıyla alındı ve bütanole karşı 532 nm'de okundu. Okunan absorbans değeri $x: (okunan_{ABS} + 0.0344)/0.0492$ formülüyle hesaplandı. Bulunan değer 5 ile çarpıldı (nedeni doku homojenatı 5ml tamponda hazırlandı), çıkan sonuç homojenatta kullanılan doku ağırlığı kadardır.

2.4. İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak belirlendi. İstatistiksel analiz için SPSS version 22 programı kullanıldı. Gruplar arası değerlendirme One-way ANOVA ve posthoc tukey testi ile yapıldı. $p < 0.05$ değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. İmmünohistokimyasal Bulgular

3.1.1. Bax İmmünreaktivitesi

Bax immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; bax immünreaktivitesi kontrol (Şekil 7), benfotiamin (Şekil 8) ve zeytinyağı (Şekil 9) gruplarında benzerdi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında CCl₄ grubunda (Şekil 10) bax immünreaktivitesinde belirgin bir artış vardı ($p<0.05$). Benfotiamin'in tedavi olarak verildiği CCl₄ + benfotiamin grubunda (Şekil 11) ise CCl₄ grubuna göre bax immünreaktivitesinin belirgin azaldığı, kontrol grubuna yakın olduğu izlendi ($p<0.05$). Negatif kontrolde herhangi bir boyanma saptanmadı (Şekil 12).

Tablo 9. Bax İmmünreaktivitesi

GRUP	Bax İmmünreaktivitesi
KONTROL	1.16 ± 0.40
BENFOTİAMİN	1.33 ± 0.51
ZEYTİNYAĞI	1.16 ± 0.40
CCl ₄	2.83 ± 0.40 ^a
CCl ₄ + BENFOTİAMİN	1.83 ± 0.40 ^b

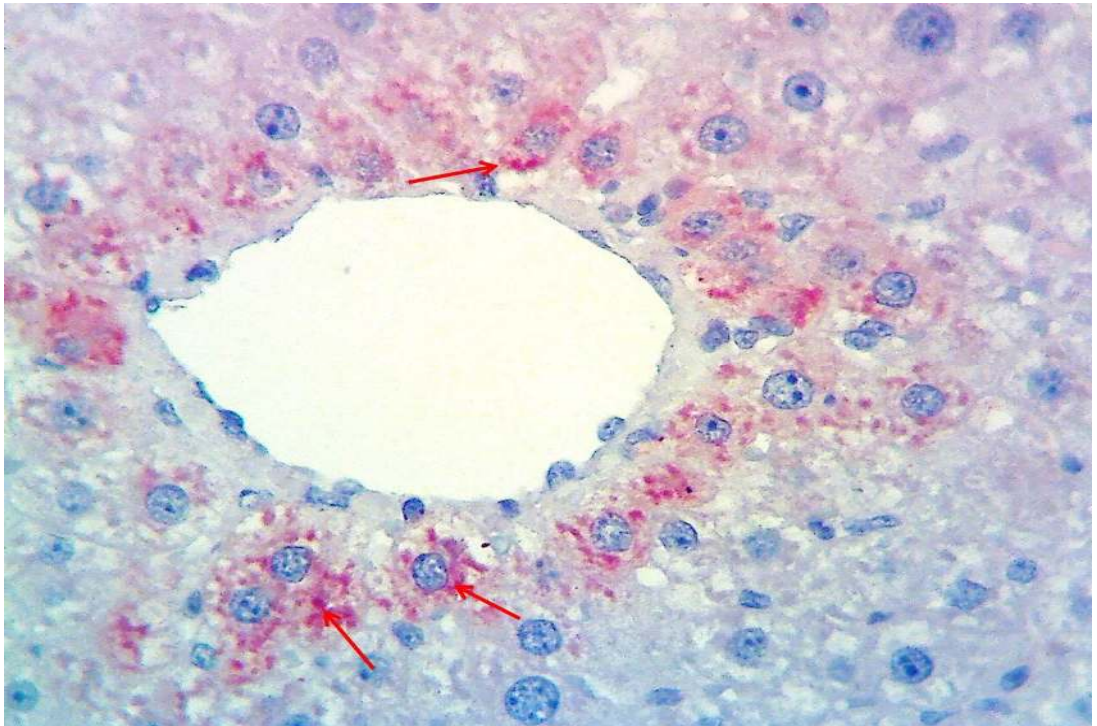
Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

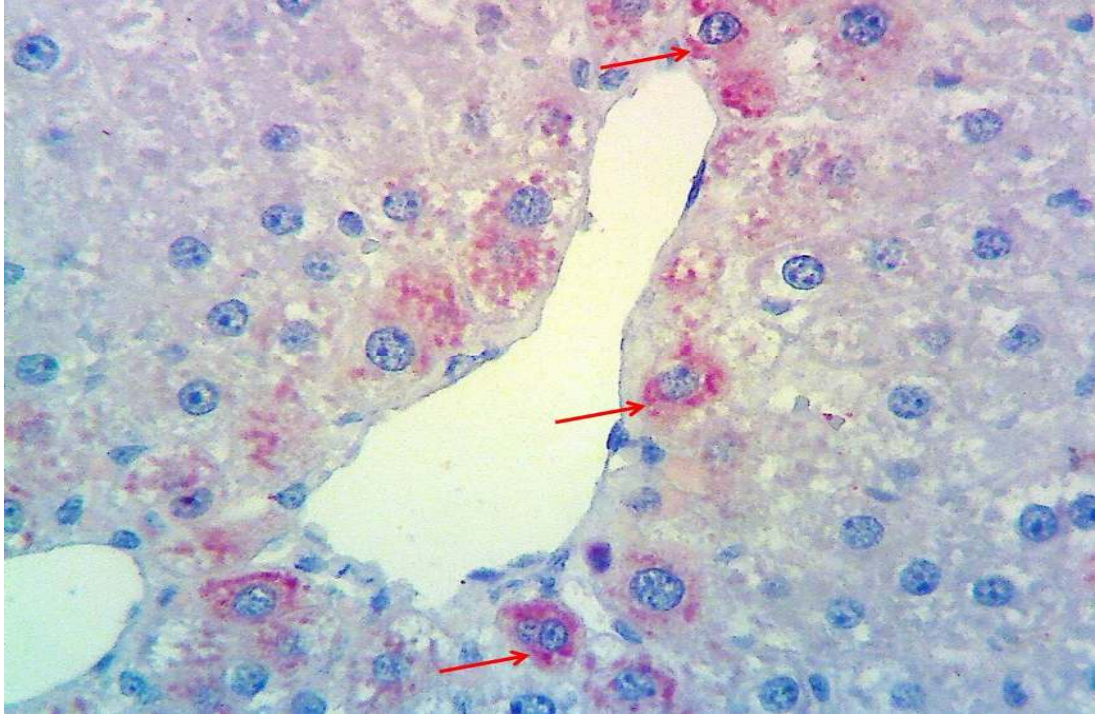
^b CCl₄ grubuna göre karşılaştırıldığında, ($p<0.05$).



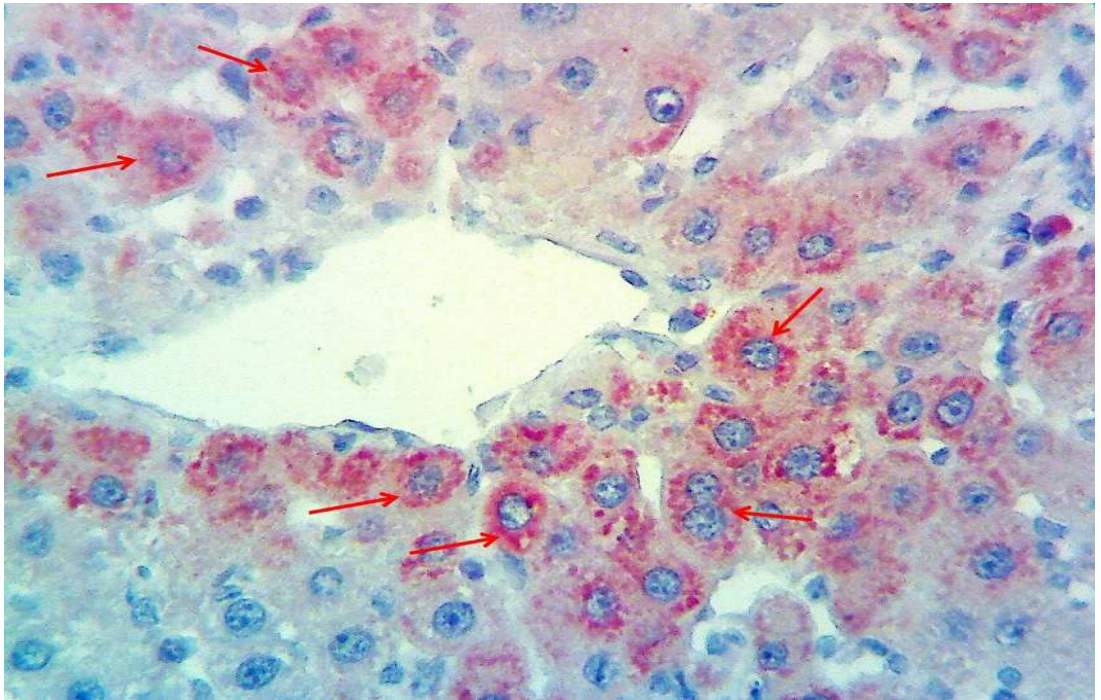
Şekil 7. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusunda bax immunreaktivitesi.(→)



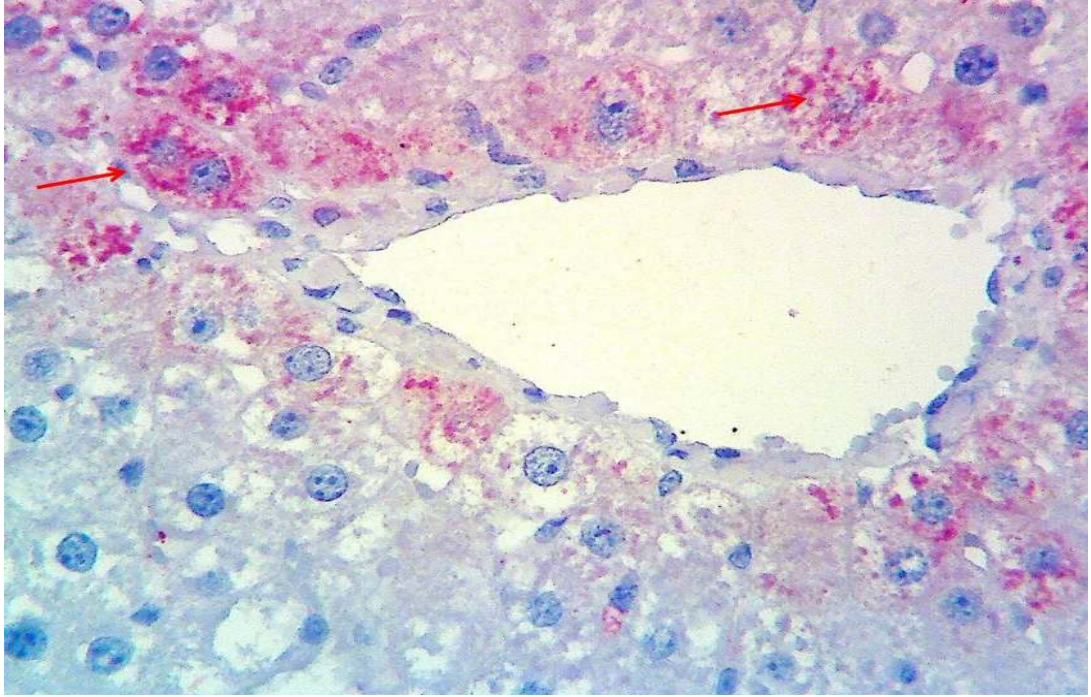
Şekil 8. Benfotiamin verilen gruba ait karaciğer dokusunda bax immunreaktivitesi.(→)



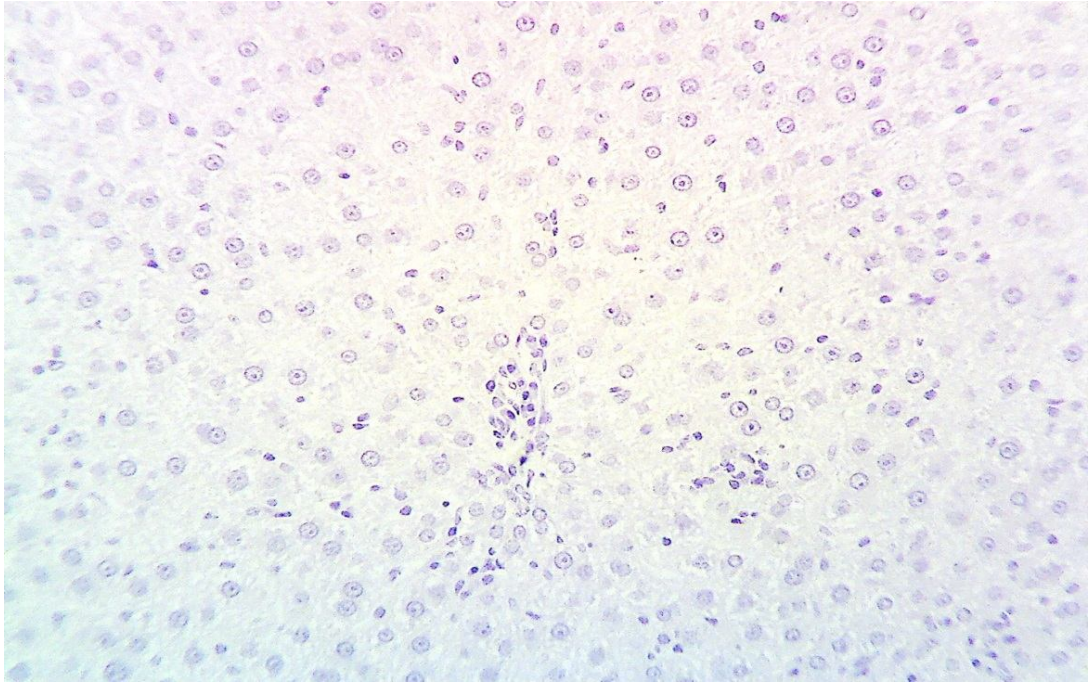
Şekil 9. Zeytinyağı verilen gruba ait karaciğer dokusunda bax immunreaktivitesi. (→)



Şekil 10. CCl₄ verilen gruba ait karaciğer dokusunda bax immunreaktivitesi. (→)



Şekil 11. CCl₄+benfotiamin grubuna ait karaciğer dokusunda bax immunreaktivitesi. (→)



Şekil 12. Negatif kontrol

3.2. TUNEL Bulguları

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; TUNEL pozitifliği karaciğer dokusunda sinüzoidal hücrelerde (kırmızı ok) izlendi. TUNEL pozitifliği kontrol (Şekil 13),

benfotiamin (Şekil 14) ve zeytinyağı (Şekil 15) gruplarında benzerdi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında CCl₄ grubunda (Şekil 16) anlamlı bir artış vardı ($p<0.05$). CCl₄ grubu ile karşılaştırıldığında CCl₄ + benfotiamin grubunda (Şekil 17) anlamlı bir azalma vardı ($p<0.05$). Negatif kontrolde (Şekil 18) TUNEL pozitifliğine rastlanmadı. Pozitif kontrol (Şekil 19) için sıçan meme dokusu kullanıldı (Tablo 10).

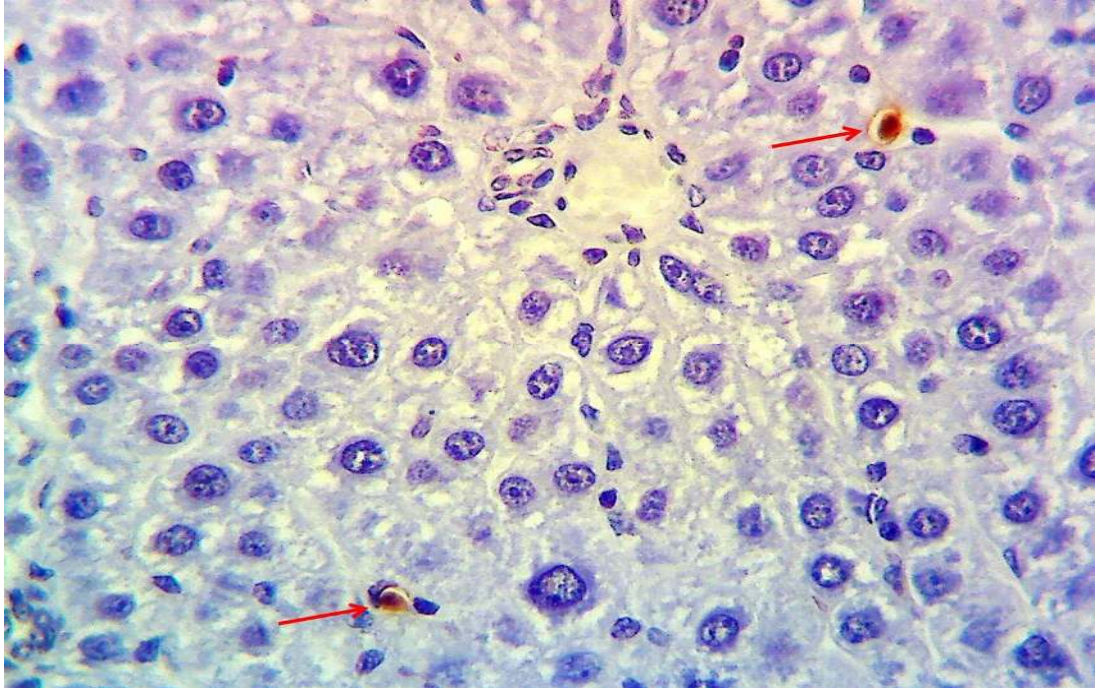
Tablo 10. Apoptotik indeks (%)

GRUP	Apoptotik İndeks (%)
KONTROL	2.16 ± 0.40
BENFOTİAMİN	1.83 ± 0.40
ZEYTİNYAĞI	1.66 ± 0.51
CCl ₄	6.66 ± 1.21^a
CCl ₄ + BENFOTİAMİN	3.16 ± 0.40^b

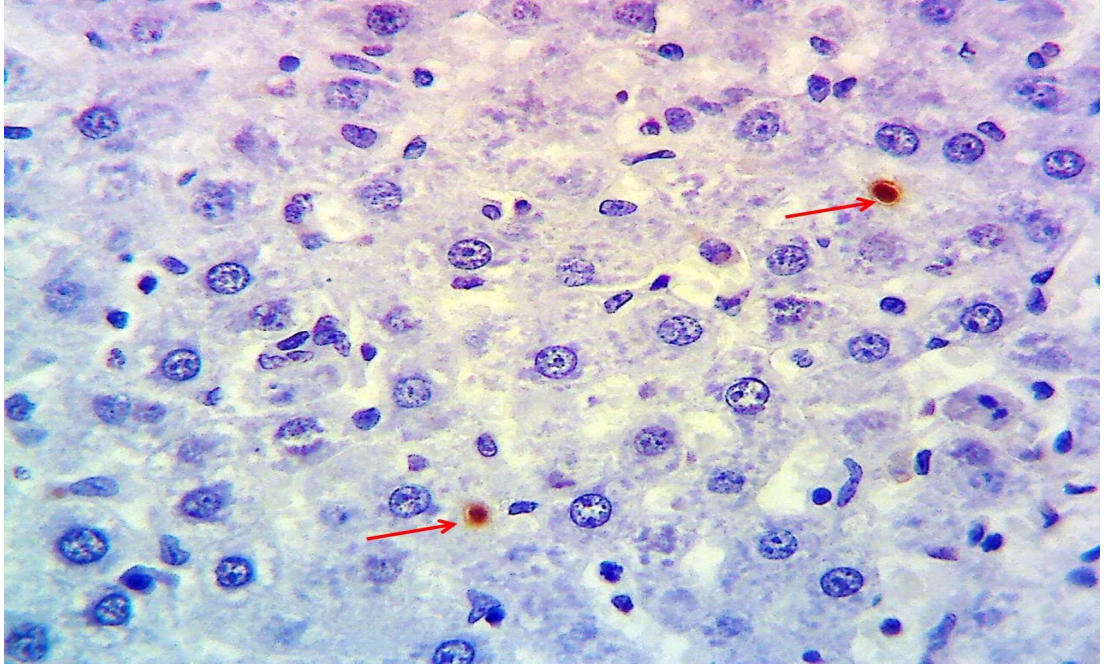
Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

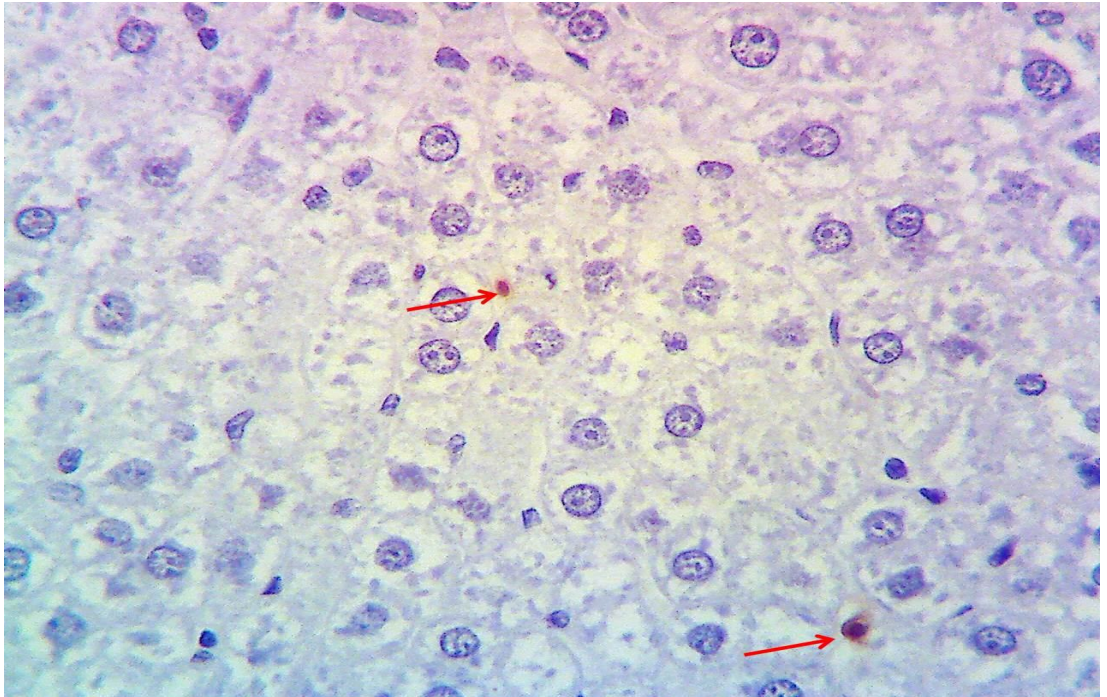
^b CCl₄ grubuna göre karşılaştırıldığında, ($p<0.05$).



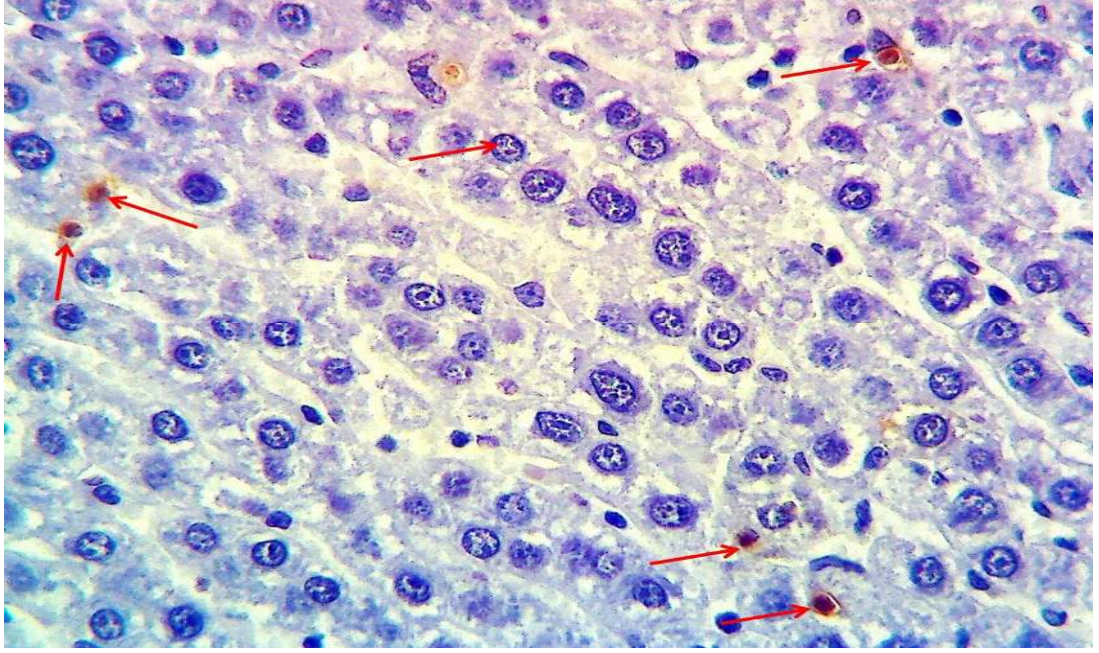
Şekil 13. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusunda TUNEL pozitif hücreler. (→)



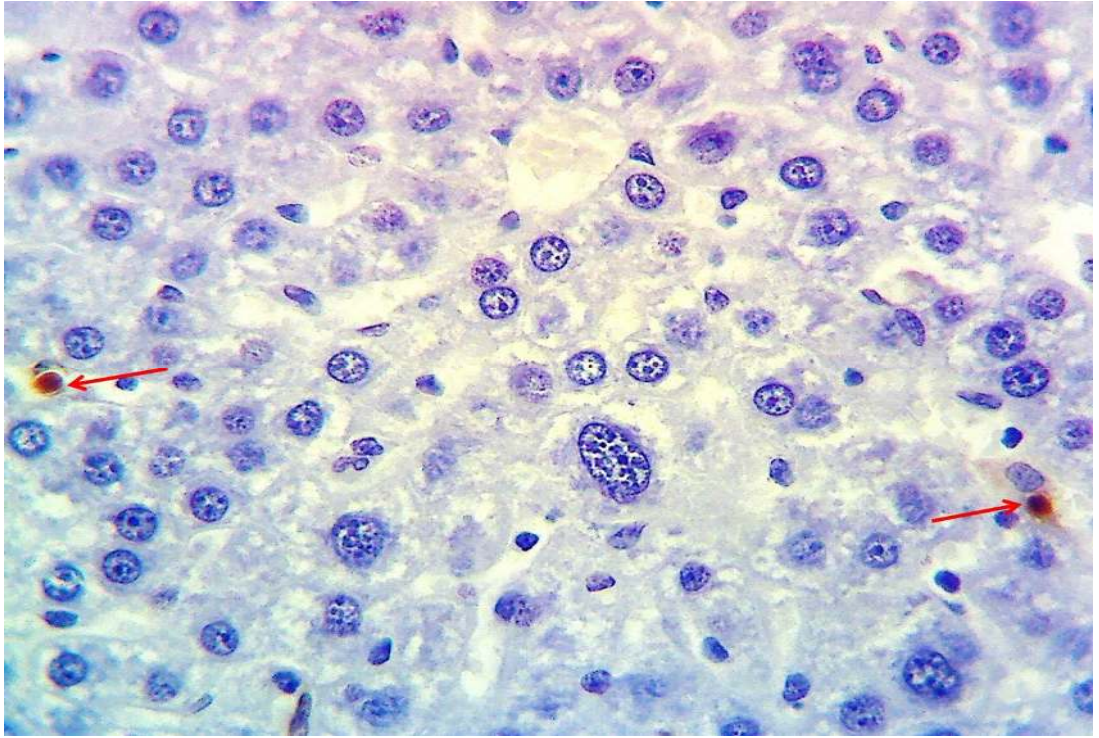
Şekil 14. Benfotiamin verilen gruba ait karaciğer dokusunda TUNEL pozitif hücreler. (→)



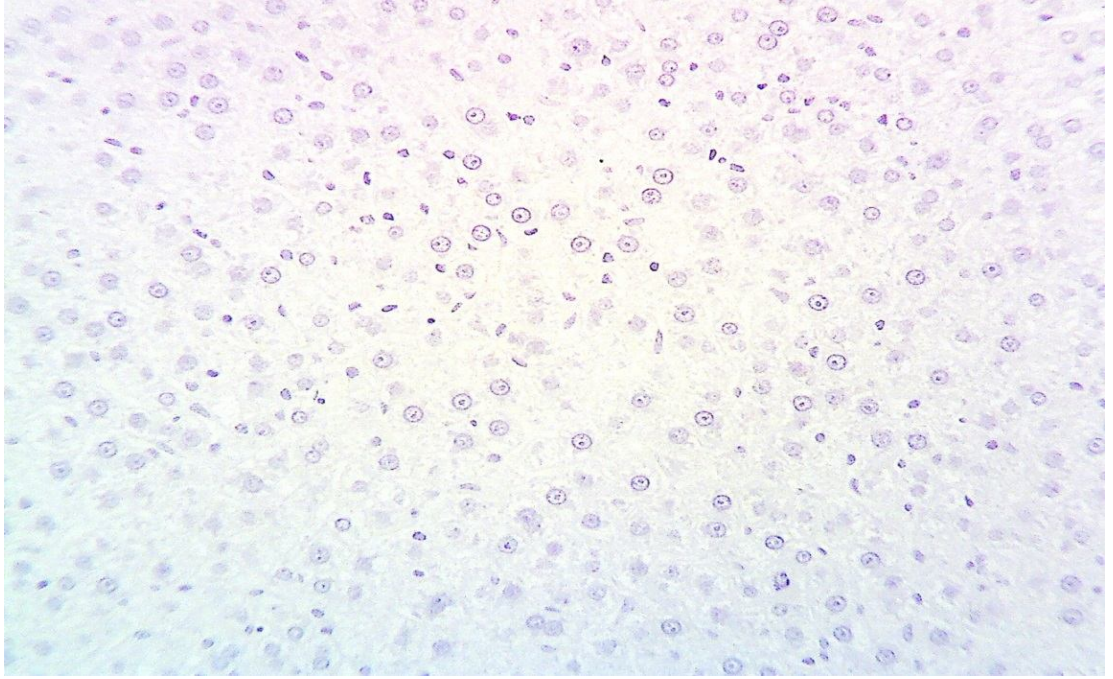
Şekil 15. Zeytinyağı verilen gruba ait karaciğer dokusunda TUNEL pozitif hücreler. (→)



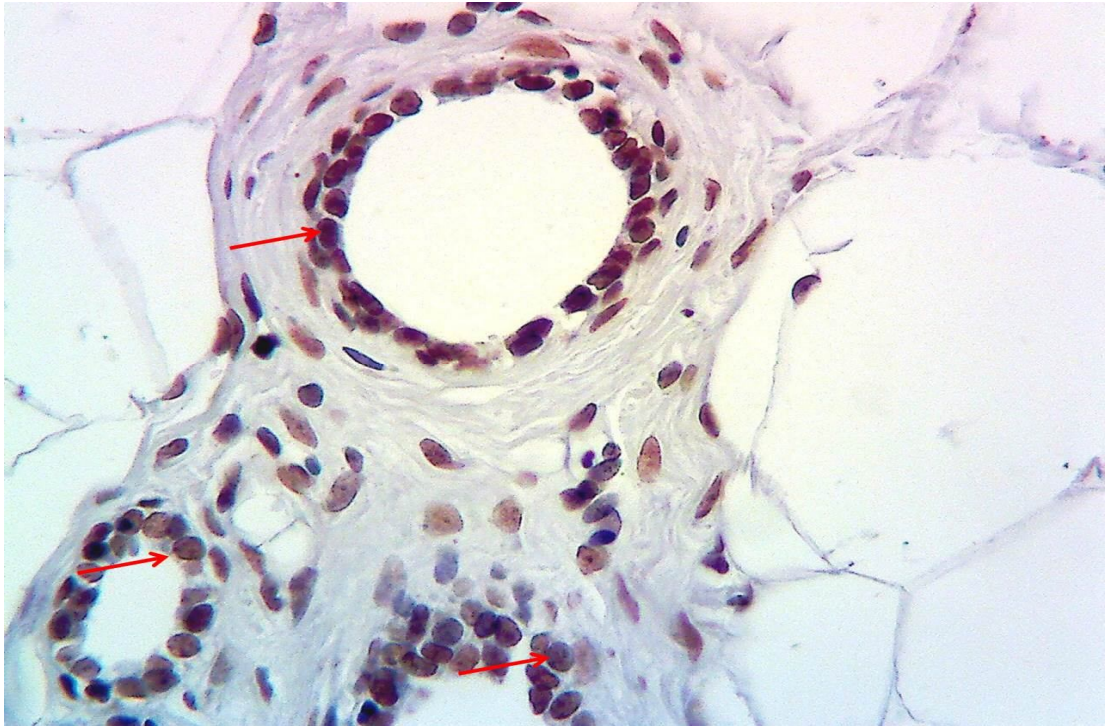
Şekil 16. CCl₄ verilen gruba ait karaciğer dokusunda TUNEL pozitif hücreler. (→)



Şekil 17. CCl₄ + benfotiamin grubuna ait karaciğer dokusunda TUNEL pozitif hücreler. (→)



Şekil 18. TUNEL negatif kontrol.



Şekil 19. TUNEL pozitif kontrol. Meme dokusu (→)

3.3. MDA Bulguları

Spektrofotometrik olarak ölçülen doku MDA düzeyleri kontrol, benfotiamin ve zeytinyağı gruplarında benzerdi. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında CCl_4 grubunda MDA düzeyleri anlamlı olarak artmış bulundu ($p<0.05$). CCl_4 grubu ile

karşılaştırıldığında CCl_4 Benfotiamin verilen grupta karaciğer dokularında MDA düzeyi anlamlı olarak azalmış bulundu ($p<0.05$) (Tablo 11).

Tablo 11. Doku MDA değerleri

GRUP	MDA (nmol/g protein)
KONTROL	111.83 ± 1.72
BENFOTİAMİN	121.50 ± 2.07
ZEYTİNYAĞI	110.16 ± 9.28
CCl_4	165.83 ± 8.86^a
CCl_4 + BENFOTİAMİN	104.33 ± 2.338^b

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

^b CCl_4 grubuna göre karşılaştırıldığında, ($p<0.05$).

4. TARTIŞMA

Karaciğer, oral veya damar yoluyla alınan hemen hemen tüm ilaçların, toksik maddelerin ve mikrobik ajanların, oluşturdukları zararlı etkilerine maruz kalmakta olup bu etkileri ya detoksifiye eder ya da ajanların oluşturduğu hasara rejenerasyon yoluyla cevap vererek kendini korur (188).

Karaciğerin, fizyolojik ve biyokimyasal rolü nedeni ile toksik maddelerin inhibisyon basamaklarında önemli role sahip olduğu bilinmektedir. Fakat bu kimyasal olaylar sırasında karaciğerde çeşitli hasarlar oluşabilmektedir. Bu hasarların oluşumunda, oksidatif stresin ve bunu takiben ortaya çıkan serbest radikallerin etkili olduğu kanıtlanmıştır (189).

Reaktif oksijen radikallerinin Alzheimer, Multiple Skleroz, Diyabet, Karaciğer Sirozu ve Hepatosellüler Karsinoma'nın patogeneğinde önemli bir etken olduğu ifade edilmiş olup (190); ayrıca son yapılan çalışmalarda reaktif oksijen metabolitlerinin hepatotoksisitede etkili bir rol oynadığı ileri sürülmüştür (191).

Yapılan birçok çalışmada, karaciğer hastalıklarında artan oksidatif stres ile karaciğer hasarı ve fibrozu arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (43, 72, 84-89).

Dış orbitallerinde bir veya birden fazla eşleşmemiş elektrona sahip olan serbest radikaller, kısa ömürlü, kararsız ve çok etkili moleküller olup oksidatif stres ile yakından ilişkilidir (112).

Dokularda meydana gelen metabolik reaksiyonlar süperoksit anyonu, hidroksil radikali, hidrojen peroksit ve oldukça yüksek reaktiviteye sahip serbest oksijen radikallerinin oluşmasına sebebiyet vermektedir (192, 193).

Hücre içi elektron dengesinin bozulması, oksidatif stres, mitokondrial defektler ve antioksidan sistemin yetersiz kalması apoptozis oluşumunu tetikleyebilmektedir (194).

Oksidatif stres antioksidan mekanizma üzerindeki olumsuz etkilerine bağlı olarak lipid peroksidasyonunu artırmakta ve karaciğerde fibrozise neden olabilmektedir (195).

Hepatotoksin özellikte olan Karbontetraklorür (CCl_4), serbest radikallerin üretilmesine neden olmakta ve buna bağlı olarak doku hasarına sebebiyet vermektedir (196).

Karbontetraklorür'ün oluşturduğu karaciğer dejenerasyonu, insandaki siroz gelişim sürecine benzerlik gösterdiği için, kemirgenlerde deneysel çalışmalarda en çok kullanılan kimyasal ajanlardan biri olmuştur. Karbontetraklorür'e bağlı karaciğer toksisitesinin oluşmasında oksidatif stresin önemli rol oynadığı bilinmektedir (108).

Karbontetraklorür'ün neden olduğu karaciğer hasarının gelişim basamakları şu şekilde özetlenebilir; redüktif dehalojenasyon, radikallerin kovalent bağlanması, protein sentezinin inhibisyonu, yağ birikimi, kalsiyum sekestrasyonunda kayıp, apoptozis ve son olarak fibrozis şeklindedir (197).

Yapılan deneysel çalışmalarda farklı uygulama yöntemlerine ve farklı dozlara bağlı olarak verilen Karbontetraklorür'ün karaciğer ve böbrek dokularında lipid peroksidasyon ürünlerinin sentezini arttığı; ayrıca GSH (redükte glutatyon) seviyesini de anlamlı olarak düşürdüğü rapor edilmiştir (198).

Reaktif oksijen türlerini ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta bazı savunma mekanizmaları geliştirilmiştir. Bunlar antioksidan savunma sistemleri olarak bilinmektedirler. 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 getirirler. 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 (199).

Benfotiamin yararlı etkilerini bir dizi mekanizma ile gösterir. Diyabet vakalarında, benfotiaminin glukoz metabolizmasında önemli bir enzim olan transketolaz aktivitesini artırdığı ve bunun sonucu olarak hiperglisemik hasara yol açan üç majör moleküler yolağı bloke ettiği ifade edilmiştir. Aynı zamanda Benfotiaminin protein kinaz C aktivitesini normale döndürmesi ve diyabetiklerin retinalarında nükleer faktör kappa B aktivitesini engellediği görülmüş olup buna ek olarak, benfotiamin aldoz redüktaz aktivitesi, sorbitol konsantrasyonları ve intrasellüler glukozu azaltarak polyol yolağındaki düzensizlikler üzerinde etkili olduğu ifade edilmiştir (124).

Diyabetik sıçanlarda tiamin ve benfotiamin desteklerinde sinir iletimi ve sinir gliko-oksidasyonunun değerlendirildiği bir çalışmada ise sonuçlar benfotiaminin net bir şekilde üstün bir AGE inhibitörü olduğunu göstermiştir. Diyabet

indüksiyonundan üç ay sonra sinir iletimi %10,5 oranında düşmüş ve glikasyon ürünü CML 3,5 kat ve deoxyglucosone AGE oluşumu 5,1 kat artmıştır. Benfotiamin desteğinin 6. ayından sonra sinir iletim hızı neredeyse normale dönmüştür. Tiamin desteği aynı zamanda sinir uyarı iletimini de iyileştirdiği fakat benfotiamin kadar etkili olmadığı görülmüştür. Daha önemlisi, benfotiamin diyabetin indüklediği CML ürünlerini tümüyle önlemiş, fakat tiamin AGE seviyelerini anlamlı olarak azaltmamıştır (139). Bazı çalışmalar Benfotiamin'in reaktif oksijen ürünleri üzerinde baskılayıcı özellikte olduğunu göstermiştir (21, 22).

Karbon tetraklorüre maruz kalan sıçanların karaciğerleri morfolojik olarak incelendiğinde; yağlanma, hidrofik distrofi, hepatosit sitoplazmasında yıkıcı değişimler ve hepatositlerin ağır nekrozu gibi çok önemli değişimlerin olduğu ifade edilmiştir (200).

Çalışmamızda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında CCl_4 grubunda MDA seviyesi, preapoptotik bir protein olan bax immünreaktivitesi ve apoptotik hücrelerin belirgin olarak arttığı tespit edilmiş olup tedavi olarak verilen benfotiaminin bu parametreleri anlamlı olarak azalttığı gözlenmiştir.

Oksidatif hasarda kalsiyum dengeleri ve mitokondrial membran potansiyeli değişkenlik göstermektedir. Bu değişiklik DNA'da hasara yol açarak hücreyi programlı ölüm olarak tarif edilen apoptozise götürmektedir (124).

Hücrenin hasarlandığı ve apoptozise gittiği sırada bazı değişiklikler olduğu bilinmektedir. Bu değişiklikler sonucunda sitokrom c, sitozole salınır. Sitokrom c'nin sitozole salınımı antiapoptotik üyeler (Bcl-2, Bcl-XL) tarafından durdurulabilir. Ayrıca, Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyeleri (Bax, Bak, Bad) ise sitokrom c salınımını artırmaya yönelik fonksiyon görürler. Hücrenin ölmesi ve yaşaması bu dengeye bağlıdır (201-203).

Tiamin vitamininin yağda çözünen bir formu olan benfotiamin (20), redükte olmuş glutatyon vasıtasıyla hücreyi oksidan ajanlara ve protein oksidasyonuna karşı korumasından ötürü, antioksidan özellik göstermektedir (23).

Karaciğerin, CCl_4 'ün indüklediği hasara karşı korunmasında ve tedavisinde antioksidanların kullanılması yararlı olabilir.

Vales ve ekibinin yaptığı bir çalışmada, CCl₄ 'den sonra antioksidan bir madde olan NAS (N-Asetil sistein) verildiğinde karaciğer dokusunda nekrozun oluşmadığını ifade etmişlerdir (204).

Wang ve ark. (72), melatonin uygulaması ile CCl₄ uygulanmış sıçanlarda, karaciğerde fibrozisin gerilediği ve antioksidan enzimler olan SOD ile GSH-Px düzeylerinde artış olduğunu bildirmiştir (72).

Başka bir çalışmada ise sıçanlarda CCl₄ ile oluşturulan akut karaciğer hasarında, askorbik asid (C vitamini) ve alfa-tokoferolün (E vitamini) karaciğer üzerinde koruyucu etkilerinin olduğu ifade edilmiştir (205).

Aynı zamanda CCl₄ ile oluşturulan karaciğer hasarına karşı onarıcı etkilerini değerlendirmek için birçok izoflavon türevi ile çalışmalar yapılmıştır. Üstündağ ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada; soya izoflavonlarının deneysel olarak oluşturulmuş CCl₄ hasarına bağlı olarak gelişen karaciğer harabiyetini önlemede etkili olduğu, artmış olan lipid peroksidasyon ürünlerini azalttığı ve soya izoflavonlarının antioksidan özelliğe sahip paraoksonaz enzimini stimüle edici etkisi olduğu gösterilmiştir (206).

Sonuç olarak;

Bu çalışma ile CCl₄' ün belirgin olarak apoptozisi, bax immünreaktivitesini ve MDA seviyesini arttırdığı, tedavide verilen benfotiaminin bu parametreleri azalttığı, gelecekte yapılacak daha ileri ve ayrıntılı çalışmalarla başta siroz olmak üzere karaciğer hasarının olduğu durumlarda benfotiamin ile ilişkili tedavi yaklaşımları denenebileceği kanaatine varılmıştır.

5. KAYNAKLAR

1. Burroughs AK, Westaby D. Liver, biliary tract and pancreatic disease. Kumar P, Clark M (Eds). Clinical Medicine (6th ed), Elsevier Saunders, 2005: 347-417.
2. Dhanabal SP, Syamala G, Satish Kumar MN, Suresh B. Hepatoprotective activity of the Indian medicinal plant *Polygala arvensis* on D-galactosamine-induced hepatic injury in rats. *Fitoterapia* 2006; 77: 472-474.
3. Naaz F, Javed S, Abdin MZ. Hepatoprotective effect of ethanolic extract of *phyllanthus amarus* schum et thonn on aflatoxin B1-induced liver damage in mice. *J Ethnopharma* 2007; 113, 503-509.
4. Seven A, Candan G. Antioksidan savunma sistemleri. *Cerrahpaşa J Med* 1996; 27: 41- 50.
5. Bacon BR, Tavill AS, Brittenham GM, Park CH, Recknagel RO. Hepatic lipid peroxidation in vivo in rats with chronic iron overload. *J Clin Invest* 1983; 71: 429-439.
6. Brattin WJ, Glende EA, Recknagel RO. Pathological mechanisms in carbon tetrachloride hepatotoxicity. *J Free Radio Biol Med* 1985; 1: 27-38.
7. Comporti M. Lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Lab Invest* 1985; 53: 599-623.
8. Kaplowitz N, Fernandez-Checa J, Ookhtens M. Glutathione, alcohol and hepatotoxicity. Halsted CH, Rucker RB, (Ed). *Nutrition and the Origins of Disease*. 1st Ed, San Diego: Academic Press, 1989: 267-282.
9. Halliwell B. The antioxidant paradox. *Lancet* 2000; 355: 1179-1180.
10. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and Disease. *Biochem J* 1984; 219: 1-14.
11. Hooper C. Free radicals: research on biochemical bad boys comes of age. *J Natl Inst Health Res* 1989; 1: 101-106.
12. Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 1984; 222: 1-15.

13. Musaoğlu A. Karaciğer hastalıklarında laboratuvar testleri. İliçin G, Ünal S, Biberoglu K, Akalin S, ve Süleymanlar G (eds). Temel İç Hastalıkları. 1. Baskı, Ankara: Güneş Kitabevi, 1997: 1096-1109.
14. Recknagel RO, Glende EA, Dolak JA, Waller RL. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharma& Therapeut* 1989; 43: 139-54.
15. Weber LW, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: Carbon tetrachloride as a toxicological model. *Critical Reviews in Toxicology* 2003; 33: 105-136.
16. Yao T, Delgi Esposti S, Huang L, Arnon R, Spangenberg A, Zern MA. Inhibition of carbon tetrachloride-induced liver injury by liposomes containing vitamin E. *Am J Physiol* 1994; 267: 476-484.
17. Zimmerman HJ. Hepatotoxicity: the adverse effects of drugs and other chemicals in the liver. 2nd Ed, Philadelphia, Lippincott: Williams & Wilkins, 1999.
18. Poli G, Cottalasso D, Pronzato MA, Chiarpotto E, Marinari UM. Lipid peroxidation and covalent binding in the early functional impairment of golgi apparatus by carbon tetrachloride. *Cell Biochem Funct* 1990; 8: 1–10.
19. Poli G, Albano E, Dianzani MU. The role of lipid peroxidation in liver damage. *Chem Phys Lipids* 1987; 45: 117–142.
20. Woelk H, Lehl S, Bitsch R, Kopcke W. Benfotiamine in treatment of alcoholic polineuropathy; an 8-week randomized controlled study (BAPI Study). *Alcohol* 1998; 33: 318-631.
21. Gadau S, Emanuelli C, Linthout SV, Grainai G, Todaro M, Meloni M, et al. Benfotiamine accelerate the healing of ischaemic diabetic limbs in mice through protein kinase B/Akt-mediated potentiation of angiogenesis and inhibition of apoptosis. *Diabetologia* 2006; 49: 405-420.
22. Marchetti V, Menghinini R, Rizza S, Vivanti A, Feccia T, Laura D, et al. Benfotiamine counteracts glucose toxicity effects on endothelial progenitor cell differentiation via Akt/ FOXOsignaling. *Diabetes* 2006; 55: 2231-2237.

23. Bakker SJ, Heine RJ, Gans RO. Thiamine may indirectly act as an antioxidant. *Diabetologia* 1997; 40: 741-742.
24. Pomero F, Molinar Min A, La Selva M, Allione A, Molinetti GM, Porta M. Benfotiamine is similar to thiamine in correcting endothelial cell defects induced by high glucose. *Acta Diabetol* 2001; 38: 135-138.
25. John L. Cameron: Liver, Anatomy. *Current Surgery* 2001: 309.
26. Süzen LB. İnsan Anatomisine Giriş. İstanbul: AkademiYayın, 2006: 314-319.
27. Unur E, Ulger H, Ekinçi N. Anatomi, 1. Baskı, 2002: 152-156.
28. D'Angelica M, Fong Y. The liver. Townsend CM, Beauchamp RD, Evers BM, Mattox KL (Ed). *Sabiston Textbook of Surgery*. 17. Ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2004; 1513-1569.
29. Moore KL. *Clinically Oriented Anatomy. The abdomen*. 3rd Edition, Baltimore: Williams & Wilkins, 1992: 127-242.
30. Emre A. Karaciğerin Cerrahi Anatomisi: Genel Cerrahi/İ.Ü.T.F. Temel Ve Klinik Bilimler Ders Kitapları, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2002: 1083-1086.
31. Yıldırım M. *Topografik Anatomi*. 2. Baskı, İstanbul Nobel Tıp Kitabevleri, 2004: 251-253.
32. Skandalakis JE, Skandalakis PN, Skandalakis LJ. Seven R, Yaltı T, Erbil Y, Değerli Ü. (Çeviri ed.) s. 531-572. *Cerrahi anatomi ve teknik. Karaciğer*. 2. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 2000.
33. <http://hepatoloji.org/karaciger-segmental-anatomisi/> Source: Sleisenger & Fordtran's *Gastrointestinal and Liver Disease*, 8th ed. 2012.
34. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. *Basic histology*. 10th ed. Lange, Connecticut 2002: 307-320.
35. William K, Ovalle, Patrick C. Nahirney. *Netter's Essential Histology*. Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P (Çev. Ed). Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri, 2009: 312- 323.

36. Roose MH, Romrell LJ, Kage GI, Histology. A text and atlas. Third edition, 1995: 496-507.
37. Carnerio J, Kelley RO. Sindirim kanalına bağlı bezler. Aytekin Y, Solakoğlu S, Ahışhalı B (eds). Temel Histoloji, 1. Baskı, İstanbul: Barış Kitabevi, 1998: 307-319.
38. Abraham L, Kierszen B. MD, NAD, Sindirim Bezleri, Arbak S. (Çev. Ed. Demir R), Histoloji ve Hücre Biyolojisi 1. Baskı, Ankara: Palme Yayıncılık, 2006: 447-474.
39. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. J Clin Invest 2005; 115: 209-31.
40. Eroscheno VP. Di Fiore Histoloji Atlası Fonksiyonel İlişkileri. (Çev. Demir R). Ankara: Palme Yayıncılık, 2000: 219-225.
41. Burtis C, Ashwood ER. Textbook of Clinical Chemistry. 3rd Ed. London: W.B. Saunders Company, 1999: 1125-1177.
42. Eşrefoğlu M, Özel Histoloji, Malatya: Medipres Mat Yay, 2009: 106-120.
43. Ökten A. Türkiye’de karaciger sirozunun etyolojisi. Hepotolojide Güncel Gelişmeler Sempozyum Kitabı, 1998: 67.
44. Karaöz E. Sindirim sistemi histolojisi, Karaöz E. (ed) Özel Histoloji. Isparta: SDÜ Basımevi, 2002.
45. Guyton AC, Hall JE (eds). Tıbbi Fizyoloji. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2006: 802-804.
46. Balistreri WF, Rej R. Liver function. Burtis CA, Ashwood ER (Eds). Tietz Textbook of Clinical Chemistry (2nd ed), Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1994: 1449-1512.
47. Sauders WB. Cecil Essential of Medicine. Tuzcu M (Çev. Ed.) s.320-322, İstanbul: Talat Matbaası, 1995.
48. Broulac-Sage P, Balabaud C. Toxic and drug induced disorders of the liver. Odze R, Goldblum J, Crawford J (eds). Surgical Pathology of the GI Tract, Liver, Biliary Tract and Pancreas. Philadelphia: Saunders, 2004: 833-861.

49. Scheuer P. Liver biopsy interpretation. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1988: 99–113.
50. Lee R. Diagnostic liver pathology. First ed. St Louis: Mosby, 1994: 342–378.
51. Narci T, Geoffrey F. Liver Disease Caused by Drugs. Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease, 8th ed, Philadelphia: Saunders, 2006: 1807–1843.
52. Brunt E, Clouston A. Advanced liver pathology: current contreversies/advances. Pathology International 2004; 54: 287-302.
53. Shad JA, Chinn CG, Brann OS. Acute hepatitis after ingestion of herbs. South Med J 1999; 92: 1095-1097.
54. Eren M, Temizel İ, Koçak N. İlaça bağlı hepatotoksisite. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi 2004; 47: 222–227.
55. Goodman Z, Ihsak K. Medical diseases of the liver. Silverberg's Principles and practice of Surgical Pathology and Cytopathology. 4th ed. Elsevier: Churchill Livingstone, 2006; 1475–1500.
56. Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessayre D, Lemasters JJ. Mechanisms of hepatotoxicity. Toxicological Sciences 2002; 65: 166- 176.
57. Sturgill MG, Lambert GH. Xenobiotic-induced hepatotoxicity: mechanisms of liver injury and methods of monitoring hepatic function. Clinical Chemistry 1997; 43: 8: 1512–1526.
58. Watkins PB, Bloom J, Hunt C. Biomarkers of acute idiosyncratic hepatocellular injury (AIHI) within clinical trials. Institute of Med. National Acad Sci Washington DC, 2008.
59. Yazıcı H, Hamuryudan V, Sonsuz A. İç Hastalıkları. 1. Baskı, İstanbul: İstanbul Med Yay, 2007: 856-880.
60. Lucena MI, Cortes MG, Cueto R, Duran L, Andrade RJ. Assessment of drug induced liver injury in clinical practice. Fundam Clin Pharmacol 2008; 22: 141-158.

61. William E. Oxidative stress, toxic hepatitis, and antioxidants with particular emphasis on zinc. *Exp Mol Pathol* 2003; 75: 265–276.
62. Arıcı S. Toksik Hepatit. *Pamukkale Tıp Derg* 2008; 1: 113-119.
63. Foulis PR, Sandrof BH, Gottfried M. Drug induced morphologic changes in the liver. *Ann Clin Lab Sci* 1988; 18: 215-228.
64. Stricker BHC, Blok APR, Desmet VJ. Pathology of drug-induced hepatic injury. Stricker BHC (ed). *Drug-Induced Hepatic Injury*, 2 ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1992.
65. Shimizu H. Carbon tetrachloride-induced acute liver injury in Mini and Wistar rats, *Exp Toxic Pathol* 2001; 53: 11-17.
66. Wong M. The cytoprotective effect of a-tocopherol and daidzein against d-galactosamine-induced oxidative damage in the rat liver. *Metabol Clin Exp* 2007; 56: 865-875.
67. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological Profile for Carbon Tetrachloride. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service 2005.
68. Thrall KD, Vucelick ME, Gies RA, Zangar RC, Weitz KK, Poet TS, et al. Comparative metabolism of carbon tetrachloride in rats, mice, and hamsters using gas uptake and PBPK modeling. *J Toxicol Environ Health A* 2000; 60: 531-548.
69. Fleming LE. Carbon tetrachloride toxicity. National Academics Press, *Environmental Medicine* 1995; 8: 249-266.
70. Kumar V, Abbas A, Fausto N. *Pathologic Basis of Disease*. 7. Ed. China: Elsevier Saunders, 2005.
71. Farrell GC. Liver disease caused by drugs, Anesthetics and Toxins. Sleisenger & Fordtran's *Gastrointestinal and Liver Disease*. Feldman M, Sleisenger. MH (Eds). Pennsylvania: WB Saunders Company, 1998.

72. Wang H, Wei W, Wang NP. Melatonin ameliorates carbontetrachloride-induced hepatic fibrogenesis in rats via inhibition of oxidative stres. *Life Sci* 2005; 77: 1902-1915.
73. Özoran Y. Hücre Zedelenmesi ve Adaptasyonu, Patoloji (Robbins and Kumar Basic Pathology), Uluoğlu O (Ed). Ankara: Güneş Kitabevi, 1987: 9-10.
74. Nadkarni GD, Souza NB. Hepatic antioxidant enzymes and lipid peroxidation in carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis in rats. *Biochem Med and Met Biol* 1988; 40: 42-45.
75. Dashti HM, Al Sayer H, Behbehani A, Madda J, Christenson JT. Liver chirrosis induced by carbon tetrachloride and the effect of superoxide dismutase and xantine oxidase inhibitor treatment. *JR Coll Surg* 1992; 37: 23-28.
76. Poli G. Liver damage due to free radicals (Free Radicals in Medicine). Cheeseman KH, Slater TF (Ed). London: British Medical Bulletin, 1993.
77. Hernandez-Munoz R, Diaz Munoz M, Lopez V, Lopez-Barrera F, Yanez L, Virdio S, et al. Balance between oxidative damage and proliferative potential in an experimental rat model of CCl4-induced cirrhosis, Protective role of adonesine administration. *Hepatology* 1997; 26: 1100-1110.
78. Güven A, Erginsoy S, Kaya N. Kazlarda karbon tetraklorür zehirlenmesinin biyokimyasal ve patolojik parametrelere etkisi. *Kafkas Ü Vet Fak Derg* 2003; 9: 131-136.
79. McCay PB, Lai EK, Payer JL, Dubose CM, Janzen EG. Oxygen and carbon centered radical formation during carbon tetrachloride metabolism. *J Biol Chem* 1984; 259: 2135-2143.
80. Pohl LR, Mico BA. Electrophilic halogens as potentially toxic metabolites of halogenated compounds. *Trends Pharmacol Sci* 1984; 5: 61-64.
81. Stombeck DR, Guilford WG. *Small Animal Gastroenterology*. 2nd ed. California: Stongate Publishing Co, 1990.

82. Oh WY, Pyo S, Lee KR, Lee BK, Shin DH, Cho SI, Lee SM. Effect of *Holotrichia diomphalia* larvae on liver fibrosis and hepatotoxicity in rats. *J Ethnopharma* 2003; 87: 175-180.
83. Hong RT, Xu JM, Mei Q. Melatonin ameliorates experimental hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 1452-1458.
84. Parola M, Robino G. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *J Hepatol* 2001; 35: 297-306.
85. Poli G. Pathogenesis of liver fibrosis, role of oxidative stress. *Molecular Aspects of Medicine* 2000; 21: 49-98.
86. Lee KS, Buck M, Houghlum K. Activation of hepatic stellate cells by TGF alpha and collagen type I is mediated by oxidative stress through Cyb expression. *J Clin Invest* 1995; 96: 2461-2468.
87. Parola M, Pinzani M, Casini A. Stimulation of lipid peroxidation or 4-hydroxynonenal treatment increase procollagen alpha 1 (I) gene expression in human liver fat-storing cells. *Biochem Biophysical Res Comm* 1993; 194: 1044-1050.
88. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. *Temel Patoloji*. Çevikbas U (Ed). 2. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 1994: 545-550.
89. Gochee PA, Johnsson JR, Clouston AD. Steatosis in Chronic Hepatitis C: association with increased Messenger RNA Expression of Collagen I, tumor necrosis factor-alpha and cytochrome P450 2E1. *J Gastro Hepatol* 2003; 18: 386-392.
90. Kujawska M, Ignatowicz E, Ewertowska M, Oszmianski J, Jodynis-Liebert J. Protective effect of chokeberry on chemical-induced oxidative stress in rat. *Human Exp Toxicol* 2010; 30: 199-208.
91. Lavanya G, Sivajyothi R, Manjunath M, Parthasarathy PR. Fate of biomolecules during carbon tetrachloride induced oxidative stress and protective nature of *Ammoniac baccifera* Linn. A natural antioxidant. *Int J Green Pharma* 2009; 3: 300-305.

92. Boll M, Weber L, Becker E, Stampfl A. Mechanism of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. Hepatocellular damage by reactive carbon tetrachloride metabolites. Z Naturforsch 2001; 560: 649-659.
93. Çakatay U, Kayalı R. Serbest radikal biyokimyasının tarihsel süreçteki gelişimi. Cerrahpaşa Tıp Dergisi 2006; 37: 162–167.
94. Bast A, Haenen G, Goelmen JA. Oxidants and antioxidants. State Art Am J Med 1991; 91: 2-13.
95. Yavuzer S. Serbest radikallerle hücre yaralanması. Tıpta Temel Bilimler Kolu Sonbahar Okulu: Oksidan Stres ve Hücre Hasarı Kurs Notları 1993: 12-14.
96. Erbaş D. Radikal kavramı ve oksijen radikalleri, Tıpta Temel Bilimler Kolu Sonbahar Okulu: Oksidan stres ve Hücre Hasarı Kurs Notları, 1993: 1-5.
97. Özdemir G. Reaktif oksijen partikülleri (ROP) Oksidan moleküller serbest radikaller. Roche Bilimsel Eserler Serisi, 1993.
98. Mihmanlı A, Güneylüoğlu D, Özşeker F, Arslan S, Özgel M, Akaya E. Astımlı hastalarda serbest oksijen radikalleri ve antioksidan aktiviteleri. Torax Derg 2003; 4: 262-268.
99. Hatungil R. Serbest radikallerin açtığı doku hasarı. Mersin Üni Tıp Fak Derg 2002; 3: 460-69.
100. Rice-Evans CA, Diplock AT. Current status of antioxidant therapy. Free Radic Biol Med 1993; 15: 77-96.
101. Halliwell B, Chirico S. Lipid Peroxidation: its mechanism, measurement and significance. Am J Clin Nut 1993, 57: 715-725.
102. McCormick M, Denning GM, Reszka GM, Bilski P, Buettner GR, Rasmussen GT, et al. Biological effects of menadione photochemistry: effects of menadione on biological systems may not involve classical oxidant production. Biochem J 2000; 350: 797-804.

103. Serafini M, Del Rio D. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool? *Redox Report* 2004; 9: 145-152.
104. Seifried HE, Andersson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem* 2007; 18: 567-579.
105. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. 1. Baskı, Konya: Mimoza Yayınları, 1995: 13-19.
106. Suntivich J. A perovskite oxide optimized for oxygen evolution catalysis from molecular orbital principles. *Science* 2007; 334: 1383-1385.
107. Basaga HS. Biochemical aspects of free radicals. *Biochem Cell Biol* 1990; 68: 989-98.
108. Mc Gee SA, Wiggins SA, Pierce JD. What advanced practise nurses to know about free radicals. *Int J Adv Nurs Prac* 2003; 6: 1-10.
109. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Third Edition. Oxford Science Publications, 2001: 22-24.
110. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease, An overview. *Methods Enzymol* 1990; 186: 1-85.
111. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition* 2002; 18: 872-879.
112. Evans P, Halliwell B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Br J Nutr* 2001; 2: 67-74.
113. Steinman HM. Superoxide dismutases: Protein chemistry and structure-function relationships. *Superoxide Dismutase* 1982; 1: 11-68.
114. Kim D, Chen JK, Yen TF. Naval derusting wastewater containing high concentration of iron, treated in UV photo-Fenton-like oxidation. *J Environ Sci (China)* 2010; 22: 991-997.

115. Catala A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem Phys Lipids* 2009; 157: 1-11.
116. Breen AP, Murphy JA. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med* 1995; 18: 1033-1077.
117. Simic MG. DNA markers of oxidative processes in vivo: relevance to carcinogenesis and anticarcinogenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 1918-1923.
118. Ashley-Koch AE, Elliott L, Kail ME, De Castro LM, Jonassaint J. Identification of genetic polymorphisms associated with risk for pulmonary hypertension in sickle cell disease. *Blood* 2008; 111: 5721-5726.
119. Bhatt P, Swarup D, Patra RC, Pattanaik AK, Ranjan R. Enhanced erythrocytic lipid peroxides level in rabbits after repeated parental administration of iron. *Indian J Exp Biol* 2005; 43: 854-858.
120. Wright A, Bubb WA, Hawkins CL, Davies MJ. Singlet oxygen-mediated protein oxidation: evidence for the formation of reactive side chain peroxides on tyrosine residues. *Photochem Photobiol* 2002; 76: 35-46.
121. Mugnaini V, Lucarini M. Hydrogen bonding affects the persistency of alkyl peroxy radicals. *Org Lett* 2007; 9: 2725-2728.
122. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 1997; 3-4: 92-95.
123. Rayner BS, Hua S, Sabaretnam T, Witting PK. Nitric oxide stimulates myoglobin gene and protein expression in vascular smooth muscle. *Biochem J* 2009; 25: 169-177.
124. Burçak G, Andrican G. Oksidatif DNA hasarı ve yaşlanma. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* 2004; 12: 159-169.
125. Cotran R. Hücre zedelenmesi adaptasyon, *Basic Pathology* Cotran R, Kumar V, Robbins S (eds). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 1994: 3-11.

126. Halliwell B. The Role of oxygen radicals in human disease. With Particular Reference To The Vascular System. *Haemostasis* 1993; 23: 118-126.
127. Ersoy A, Dilek K. Hemodiyaliz hastalarında eritrosit membran lipid peroksidasyonu antioksidatif homeostazis değişiklikleri. *Türk Nefroloji ve Transplantasyon Dergisi* 1999; 1: 1-4.
128. Rayaman P. Sağlıklı ve Hasta Polimorf Nüveli Lökositlerinde Miyeloperoksidaz ve Hücre İçi Öldürme Aktivitesinin İlişkisi ve Bazı İlaçların Miyeloperoksidaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Araştırılması. Doktora Tezi, İstanbul: MÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2010.
129. Memişoğulları R. Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi* 2005; 3: 30-39.
130. Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem Biophy Res Comm* 2005; 338: 668–676.
131. Özşahin EA, Yazıcı C, Köse K, Utaş C, Tokgöz B. Hemodiyaliz hastalarında plazma Malondialdehid ve tiyol seviyeleri. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2004; 13: 8-14.
132. Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem Biophy Res Comm* 2005; 338: 668–676.
133. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47: 412-426.
134. Esterbauer H, Wag G, Puhl H. Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. *Br Med Bull* 1993; 49: 566-576.
135. Çakatay U, Kayalı R. Protein oksidasyonunun klinik önemi, *Cerrahpaşa J Med* 2004; 35: 140-149.
136. Clarkson PM, Thompson HS. Antioxidants: What role do they play in physical activity and health? *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 637-646.

137. Bayraktar M, Kılıç S, Özdemir İ, Aydemir S, Ulu R. The investigation of serum malondialdehyde levels and erythrocyte antioxidant enzymes in hypertension patients. *J Healt Sci* 2005; 14: 76-81.
138. Bellamy COC, Malcomson RDG, Harrison DJ, Wyllie AH. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Seminar in Cancer Bio* 1995; 6: 3-16.
139. Ellis RE, Yuan J, Horvitz HR. Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* 1991; 7: 663-698.
140. Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* 2007; 32: 37-43.
141. Nicotera P, Bernassola F, Melino G. Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene* 2004; 23: 2757-2765.
142. Vakkila J, Lotze MT. Inflammation and necrosis promote tumour growth: *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 641-648.
143. Cotran RS, Robbins SL, Kumar V. Robbins Basic Pathology. 7th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2002: 4-31.
144. Edinger AL, Thompson CB. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16: 663-669.
145. Cohen JJ. Apoptosis. To be or not to be. *Postgraduate Syllabus (AAAA-I)* 1998; 1: 1-19.
146. Kerr JF, Wyllie A H, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257.
147. Hökelek M. Patogenez ve apoptozis (hücresel hasar mekanizmaları, programlanmış hücre ölümü). Özcel MA, Tanyüksel M, Eren H (eds). *Moleküler Parazitoloji*. Bornova, İzmir: Meta Basım, 2009: 31-47.
148. Thompson EB. Apoptosis and steroid hormones. *Mol Endocrinol* 1994; 8: 665-673.
149. Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 323-333.

150. Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications: *Cell Death Differ* 2007; 14: 1237-1243.
151. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257.
152. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis: *Int Rev Cytol* 1980; 68: 251-306.
153. Gültekin N, Karaoğlu K, Küçükateş E. Hücrede apoptoz ve sağkalım mekanizmalarının keşfedilmesi ve yeni potansiyel tedavi stratejileri. *Türk Kardiyol Dern Arş - Arch Turk Soc Cardiol* 2008; 36: 120-130.
154. Öztürk F. Apoptoz. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2002; 9: 143- 148.
155. Tomatır AG. Apoptoz; programlı hücre ölümü. *T Klin J Med Sci* 2003; 23: 499-508.
156. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-1462.
157. Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW. Structural biology of the bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1644: 83-94.
158. Hunot S, Flavell RA. Death of a monopoly? *Science* 2001; 292: 865-866.
159. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004; 116: 205-219.
160. Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ* 2006; 16: 1093-1107.
161. Karakoyun-Çelik Ö, Aras A, Tuğan D, Hekimgil M, Yalman D, Esassolak M ve ark. Sıçan germ hücrelerinde radyasyona bağlı apoptoz ve amifostin ile ilişkisi. *T Klin Tıp Bilimleri* 2004; 24: 142-146.
162. Dubska L, Matalova E, Misek I. Detection of apoptosis in parafin embedded tissues: the influence of tissue type and fixation. *Acta Vet BRNO* 2002; 71: 529-553.

163. Kelly KJ, Sandoval RM, Dunn KW, Molitoris BA, Dagher PC. A novel method to determine specificity and sensitivity of the TUNEL reaction in the quantitation of apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 284: 1309-1318.
164. Ulukaya E. Apoptozis Ders Notları. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 2010.
165. Boldin, MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1-and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 1996; 85: 803-815.
166. Kelly KJ, Sandoval RM, Dunn KW. A novel method to determine specificity and sensitivity of the TUNEL reaction in the quantitation of apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 284: 1309-1318.
167. Zimmermann M. Burgerstein's handbook of nutrition: micronutrients in the prevention and therapy of disease. Thime 2001.
168. Jellin JM, Gregory P, Batz F, Hitchens K. Pharmacist's Letter/Prescriber's Letter Natural Medicines, 2008.
169. Benton D, Griffiths R, Haller J. Thiamine supplementation mood and cognitive functioning. *Psychopharmacology (Berl)* 1997; 129: 66-71.
170. Witte KK, Clark AL, Cleland JG. Chronic heart failure and micronutrients. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 1765-1774.
171. Sadekov RA, Danilov AB, Vein AM. Diabetic polyneuropathy treatment by milgamma-100 preparation. *Zh Nevrol Psikhiatr Im SS Korsakova* 1998; 98: 30-32.
172. Benfotiamine. Monograph. *Altern Med Rev* 2006; 11: 238-242.
173. Loew D. Pharmacokinetics of thiamine derivatives especially of benfotiamine. *Int J Clin Pharmacol Ther* 1996; 34: 47-50.
174. Anonymous. Benfotiamine. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog>. Erişim Tarihi: 20 05. 2014.
175. Volvert ML, Seyen S, Piette M, Evrard B, Gangolf M, Plumier JC, Bettendorff L. Benfotiamine, a synthetic S-acyl thiamine derivative, has different mechanisms of

action and a different pharmacological profile than lipid-soluble thiamine disulfide derivatives. *BMC Pharmacol* 2008; 8: 10.

176. Monnier VM. Intervention against the Maillard reaction in vivo. *Arch Biochem Biophys* 2003; 419: 1-15.
177. Hammes HP, Bretzel RG, Federlin K, Horiuchi S, Niwa T, Strake H. Benfotiyamin inhibits the formation of advanced glycation end products in diabetic rats. *Diabetologia* 1999; 41: 301.
178. Stracke H, Hammes HP, Werkmann D, Mavrakis K, Bitsch I, Netzel M, et al. Efficacy of benfotiyamine versus thiamine on function and glycation products of peripheral nerves in diabetic rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2001; 109: 330-336.
179. Lin J, Alt A, Liersch J, Reinhard GB, Brownlee M, Hammes HP. Benfotiyamin inhibits intracellular formation of advanced glycation endproducts in vivo. Third Medical Department, Justus-Liebig-University Giessen, Germany. New York: Albert Einstein College, 2004.
180. Hammes HP, Du X, Edelstein D, Taguchi T, Matsumura T, Ju Q, et al. Benfotiyamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nat Med* 2003; 9: 294-299.
181. Adamis AP. Diabetic retinopathy: is diabetic retinopathy an inflammatory disease? *Br J Ophthalmol* 2002; 86: 363-365.
182. Brownlee M, Lecture L. 1993. Glycation and diabetic complications. *Diabetes* 1994; 43: 836-841.
183. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications *Nature* 2001; 414: 813-820.
184. Beltramo E, Berrone E, Buttiglieri S, Porta M. Thiamine and benfotiamine prevent increased apoptosis in endothelial cells and pericytes cultured in high glucose. *Diabetes Metab Res Rev* 2004; 20: 330-336.
185. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress and antioxidants: Review. *J Biochem Mol Toxicol* 2003; 17: 4-38.

186. Berrone E, Beltramo E, Solimine C, Ape AU, Porta M. Regulation of intracellular glucose and polyol pathway by thiamine and benfotiamine in vascular cells cultured in high glucose. *J Biol Chem* 2006; 281: 9307–9313.
187. Balakumar P, Rohilla A, Krishan P, Solairaj P, Thangathirupathi A. (The multifaceted therapeutic potential of benfotiamine)The multifaceted therapeutic potential of benfotiamine. *Pharmacol Res* 2010; 61: 482-488.
188. Orrego H, Blake JE, Blendis LM, Medline A. Prognosis of alcoholic cirrhosis in the presence and absence of alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 1987; 92: 208-214.
189. Ning QJ, Qin SW, Xu CS. Expression patterns and action analysis of genes associated with drug-induced liver diseases during rat liver regeneration. *World J Gastroenterol* 2006; 21: 6966-6972.
190. Cabre M, Comps J, Paternain JL, Ferre N, Joven J. Time course of changes in hepatic lipid peroxidation and glutathione metabolism in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000; 27: 694-699.
191. Evans P, Halliwell B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Br J Nutr* 2001; 85: 67-74.
192. Castillo T, Koop DR, Kamimura S, Triadafilopoulos G, Tsukamoto H. Role of cytochrome P-450 2E in ethanol-carbon tetrachloride-and iron-dependent microsomal lipid peroxidation. *Hepatology* 1992; 16: 992–996.
193. Hartley DP, Kolaja KL, Reinhold J, Peterson DR. 4-Hydroxynonenal and malondialdehyde hepatic protein adducts in rats treated with carbon tetrachloride: immunochemical detection and lobular localization. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; 161: 23–33.
194. Oren M, Rotter V. Introduction: p53 the first twenty years. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55: 9-11.
195. Bandyopadhyay U, Das D, Banerjee R. Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. *Curr Sci* 1999; 77: 658-665.
196. Pietta P G. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 2000; 63: 1035-1042.

197. Hong RT, Xu JM, Mei Q. Melatonin ameliorates experimental hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 1452-1458.
198. Guven A, Gulmez M. The Effect of Kefir on the Activities of GSH-Px, GST, CAT, GSH and LPO Levels in Carbon Tetrachloride-Induced Mice Tissues. *J Vet Med B* 2003; 50: 412-416.
199. Halliwell B Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochem Pharma* 1995; 49: 1341-1348.
200. Chin PL, Momand J, Pfeifer GP. In vivo evidence for binding of p53 to consensus binding sites in the p21 and GADD45 genes in response to ionizing radiation. *Oncogene* 1997; 15: 87-100.
201. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 88: 355-365.
202. Lee JI, Lee KS, Paik YH, Nyun Park Y, Han KH, Chon CY, et al. Apoptosis of hepatic stellate cells in carbon tetrachloride induced acute liver injury of the rat: analysis of isolated hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2003; 39: 960-966.
203. Hoijman E, Rocha Viegas L, Keller Sarmiento MI, Rosenstein RE, Pecci A. Involvement of bax protein in the prevention of glucocorticoid-induced thymocytes apoptosis by melatonin. *Endocrinology* 2004; 145: 418-425.
204. Valles EG, de Castro CR, Castro JA. N-acetylcysteine is an early but also a late preventive agent against carbon tetrachloride induced liver necrosis *TOXICOL Lett* 1994; 71: 87-95.
205. Bayram İ. Askorbik asit ve alfa-tokoferol'ün karbon tetraklorürle oluşturulmuş akut karaciğer toksisitesi modelinde karaciğeri koruyucu etkisi. *Van Tıp Dergisi* 2004; 11: 32-38.
206. Üstündağ B, Bahçecioğlu İH, Şahin K, Gülcü F, Düzgün S, Özercan İH, et al, Soy izoflavonların karbon tetraklorüre (CCl₄) bağlı karaciğer hasarı ve plazma paraoksonaz ile arilesteraz aktivite düzeylerine olan etkileri. *FÜ Sağlık Bil Dergisi* 2005; 19: 263-271.

6. ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Elazığ'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Elazığ'da tamamladım. 2003 yılında girdiğim Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesinden 2009 yılında mezun oldum. Pratisyen hekim olarak Diyarbakır ili Dicle İlçe Hastanesi acil servisinde görev yaptıktan sonra Tıpta Uzmanlık Sınavını kazanarak Şubat 2011 tarihinde Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimime başladım. Halen eğitime devam etmekteyim. Yabancı dilim İngilizcedir.