



T. C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**PİROLİZİDİN ALKALOİDİNİN NEDEN OLDUĞU
HEPATOTOKSİSİTEDE NÜKLEER FAKTÖR KAPPA
B İNHİBİTÖRÜ PİROLİDİN DİTİYOKARBAMAT'IN
KORUYUCU ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Nuran PARLAK
UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Özge Uzun

BOLU
2009

T. C.
ABANT İZZET BAYSALÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**PIROLİZİDİN ALKALOİDİNİN NEDEN OLDUĞU
HEPATOTOKSİSİTEDE NÜKLEER FAKTÖR KAPPA-B
İNHİBİTÖRÜ PIROLİDİN DİTİYOKARBAMAT'IN
KORUYUCU ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Nuran PARLAK
UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Özge Uzun

BOLU
2009

TEŞEKKÜR

Asistanlığım sürecinde bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, beni her konuda destekleyen; tezimin hazırlanması aşamasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen sevgili hocam ve tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Özge UZUN' a teşekkürlerimi sunarım.

Asistanlığım süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, bana her konuda destek olan Sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Coşkun SILAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Deneylerin yapılması aşamasında bana her türlü desteği veren ve histopatolojik değerlendirmelerde yardımcı olan Düzce Üniversitesi Düzce Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı başkanı Sayın Prof. Dr. Meryem ÇAM'a ve asistanlarına, biyokimyasal değerlendirmede yardımcı olan Biyokimya Anabilim Dalı başkanı Doç. Dr. Özlem YAVUZ'a ve asistanlarına teşekkür ederim.

Sevgi ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim, bugünlere gelmemi sağlayan sevgili anneme, babama ve kardeşlerime en içten teşekkürlerimi sunarım. Bana her zaman, her konuda destek olan, ilgi ve sevgisi ile hep yanımda olan sevgili eşim Ali Haydar PARLAK'a, çocuklarım Uğurcan ve Burak PARLAK'a eğitimim süresince bana verdikleri destek için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	iii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1.NFκB.....	2
2.1.1.Tarihçe.....	2
2.1.2. NFκB'nin Yapısı.....	2
2.1.3. NFκB'nin İşlevi ve Aktivasyonu.....	3
2.1.4. NFκB Aktivasyon Yolakları.....	3
2.1.5. Fizyolojik ve Patolojik Olaylardaki Önemi.....	4
2.2.Karaciğer Hastalıkları ve NFκB.....	7
2.2.1. Kupfer Hücreleri ve Karaciğer Hasarı	7
2.2.2. Karaciğer Patolojilerinde Olası Hasar Mekanizmaları	8
2.2.3. Yeni İlaçların Geliştirilmesinde Hedef Olarak NFκB	11
2.3. Reaktif Oksijen Türleri ve Antioksidan Sistemler	12
2.3.1. Reaktif Oksijen Türleri	12
2.3.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynakları.....	13
2.3.3. Reaktif Oksijen Türleri ile Oluşan Reaksiyon Tipleri	14
2.3.4. Oksidatif Stres.....	15
2.3.5.Antioksidan Savunma Mekanizmaları	16
2.3.6. Oksidatif Stresin Değerlendirilmesi.....	17
2.3.7. Reaktif Oksijen Türlerinin Ölçümü.....	18
2.3.8. Antioksidan Aktivitenin Ölçülmesi	18
2.4. Oksidatif Stres ve NFκB Yolağı	19
2.5. NFκB ve Antioksidanlar	21
2.6. PDTC	22
2.7. Monokrotalin	24
3. ARAÇ GEREÇLER VE YÖNTEM.....	26
3.1. Deney Hayvanları.....	26
3.2. Kullanılan Malzeme ve Kimyasal Maddeler.....	26

3.2.1 Kullanılan Malzemeler.....	26
3.2.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	27
3.3. Deney Grupları.....	28
3.4. Örneklerin Alınması.....	28
3.5. Yöntem.....	29
3.5.1.Biyokimyasal Çalışmalar	29
3.5.2.Histopatolojik Çalışmalar	31
3.6. Bulguların Değerlendirilmesi	32
4. BULGULAR	33
4.1. MDA ve TAK	33
4.2.Histopatoloji Sonuçları	34
5. TARTIŞMA	42
6. SONUÇ	47
7.Türkçe ÖZET	48
8.İngilizce ÖZET.....	49
9. KAYNAKLAR	50
10.Resimlemeler Listesi	67
10.1.Şekiller	67
10.2.Tablolar	68
10.3.Resimler	69
11.Özgeçmiş	70
12.Ekler	71
12.1.Etik Kurul Onayı	71

ŞİMGELER ve KISALTMALAR

AOS	Antioksidan Sistemler
AP-1	Aktivasyon protein-1
BAFF	B Hücre Aktivasyon Faktörü
BHA	Butil Hidroksi Anisol
CD 27	Cluster Differation (farklılaşma kümesi) 27
CD 30	Cluster Differation (farklılaşma kümesi) 30
CD 40L	Cluster Differation (farklılaşma kümesi) 40 ligand
CAL	Kalibratör
CTRL1	Kontrol 1
CTRL2	Kontrol 2
ÇDYA	Çoklu Doymamış Yağ Asitleri
DDTC	Dietilditiokarbamat
DFO	Desferroksamin
DHMC	Dihidromonokrotalin
DMPO	5,5-dimetil- 1-prolin N-oksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EBV	Ebstein Barr Virusu
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
FLAP	5-Lipooksijenaz Aktive Eden Protein
GM-CSF	Granülosit Makrofaj-Koloni Stimülan Faktör
GPx	Glutasyon Peroksidaz
GSH	Glutasyon
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
HE	Hemotoksilen Eozin
HOCl	Hipokloröz Radikali
HTLV1	Human T Lenfoma Virusu 1
HPLC	Yüksek Basıncılı Likit Kromatografi
IκB	İnhibitör Kappa B
IKK	IκB kinaz Kompleks
IL-1	İnterlökin-1
IL-6	İnterlökin-6
IL-10	İnterlökin-10

iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
i.p	İntraperitoneal
KAT	Katalaz
LT-β	Lenfotoksin-β
LOOH	Lipid Hidroperoksitler
LOX	Lipooksijenaz
LPS	Lipopolisakkarit
MCT	Monokrotalin
MCTP	Monokrotalin PiroI
MDA	Malondialdehit
NAC	N-asetilsistein
NEMO	NFκB Esansiyel Modülatörü
NFκB	Nükleer Faktör Kappa B
NIK	NFκB'nin Tetiklediği Kinaz
NLS	Nükleer Lokalizasyon Sinyal
NO	Nitrik Oksit
OD	Optik Dansite
PDTC	Pirolidin Ditiyokarbamat
PMA	Forbol Myristat Asetat
RANK	NFκB'nin Reseptör Aktivatörü
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
RHD	Rel Homolog Domain
SOD	Süperoksit Dismutaz
STAT3	Transkripsiyonda Sinyal İletici ve Aktivatörü 3
STOP	Stop Solüsyonu
TAK	Total Antioksidan Kapasite
TBA	Tiyobarbitürik Asit
TBARS	Tiyobarbitürik Asit İle Reaksiyon Veren Madde
TEMPO	2,2,6,6-tetra Metil Piperidin -1-oxyl
TGF-β	Transforming Growth Faktör β
TMP	3,3' 5,5' Tetra Metil Benzidin
TNF	Tümör Nekrozis Faktör
TNFR -1	Tümör Nekrozis Faktör Reseptör-1
MM	Multipl Miyelom

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Son yıllarda Nükleer Faktör Kappa B (NFκB) ve ilişkili sinyal yolları, karaciğer fizyopatolojisi açısından üzerinde önemle durulan konulardan biri haline gelmiştir.¹ Bugünkü bilgilerimize göre NFκB; enflamatuvar yanıtın oluşmasında, hücre büyümesinin kontrolünde, apoptozda rol alan sitokin, hücre adezyon molekülleri, kemoatraktan proteinler ve büyüme faktörleri ile ilgili genlerin transkripsiyonunun kontrolünde önemli olan düzenleyici bir faktördür.²

NFκB'nin, karaciğerde apoptozis ve enflamasyon gibi iki önemli biyolojik süreçte antiapoptotik ve proenflamatuvar olarak rol oynadığı kabul edilmektedir. Ayrıca yukarıda belirtilen moleküllerin yanı sıra reaktif oksijen türleri (ROT) gibi hasar oluşturu moleküllerin de üretimine neden olmaktadır. Bu bilgiye paralel olarak, antioksidan özellikleriyle bilinen E vitamini, N-asetilsistein (NAC) ve Pirolidin Ditiyokarbamat (PDTC) gibi moleküllerin NFκB aktivasyonunu önledikleri gösterilmiştir.³ Hücrelere kolaylıkla penetre olabilen PDTC, antioksidan bir molekül olması dışında NFκB'nin spesifik bir inhibitörü olarak da kabul edilir. Günümüzde hücre biyolojisi araştırmalarında oldukça sık kullanılan PDTC'nin antiapoptotik özellikleri nedeniyle kanser de dahil olmak üzere bazı hastalıklara karşı etkin bir ilaç olabileceği düşünülmektedir.^{4,5}

Bu araştırmada yukarıda özeti sunulan bilgiler ışığında sıçanlarda Monokrotalinle (MCT) oluşturulmuş hepatotoksisite modelinde PDTC'nin etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Pirolizidin alkaloidi bir fitotoksin olan MCT'ye bağlı karaciğer toksisitesinin mekanizmasında oksidatif stresin, nötrofiller ve kupfer hücrelerinden salıverilen Tümör Nekroz Faktör-α (TNF-α), İnterlökin (IL)-1β gibi enflamatuvar mediyatörlerin rolü olduğu bilinmektedir.⁶ Bu nedenle çalışmamızda öncelikle PDTC'nin etkinliği doku düzeyinde, lipid peroksidasyonu ve total antioksidan kapasite açısından değerlendirilecektir. Sonraki aşamada ise PDTC tedavisinin karaciğer dokusunda MCT'ye bağlı patolojik değişiklikler üzerindeki etkisi enflamasyon, hemoraji/konjesyon, yağlanma, kollajen artışı, piknotik çekirdek/apoptotik hücre ve karyomegali açısından belirlenecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nükleer Faktör Kappa B (NFκB)

2.1.1.Tarihçe

NFκB, ilk kez olgun B hücresi çekirdeğinde, immünglobulin kappa hafif zincir geninde κB alanı olarak bilinen spesifik DNA sekansına (5'-GGGACTTTC-3') bağlanan bir protein olarak tanımlanmıştır.⁷ Başlangıçta bu transkripsiyon faktörünün sadece B hücrelerinin olgunlaşması ve gelişimi için önemli olduğu düşünüldüğünden NFκB olarak adlandırılmıştır. Devam eden çalışmalar NFκB'nin aslında tek bir protein olmadığını, transkripsiyon faktörü olarak rol oynayan bir protein kompleksi olduğunu anlaşılmıştır. İlk olarak nükleer ekstraktlardaki varlığıyla tanımlanan NFκB'nin moleküler özellikleri EMSA adı verilen bir değerlendirme yöntemiyle açığa çıkarılmıştır.⁷⁻⁹ Araştırmalar, NFκB'nin sadece B hücrelerine spesifik bir protein olmayıp gerçekte bir pleiotropik ve latent sitoplazmik transkripsiyon faktör prototipi olduğunu göstermiştir.¹⁰

2.1.2. NFκB'nin Yapısı

Sirke sineği, *Drosophila melanogaster*'den insana kadar tüm omurgalı canlılarda varlığı gösterilen NFκB proteinleri, retroviral onkoprotein v-Rel ile yapısal homoloji gösterdiğinden Rel ailesi proteinleri olarak da bilinmektedirler. NFκB/Rel protein ailesinin, transkripsiyon faktörlerinin farklı bileşimlerinden oluşan heterodimerik bir protein kompleksi olduğu anlaşılmıştır. Bu protein ailesi üyeleri evrimleşme sürecinde oldukça iyi korunmuş ve türden türe aktarılmış olan Rel homolog domaine (RHD) sahiptirler.¹¹ RHD'nin, NFκB proteinlerinin N-terminal bölgelerine yerleşmiş yaklaşık 300 aminoasit içeren bir yapıda olduğu anlaşılmıştır. RHD, inhibitör kappa B (IκB) ile etkileşim, DNA'ya bağlanma ve dimerizasyondan sorumlu olduğundan “DNA bağlanma dimerizasyon domaini” olarak da adlandırılmaktadır. Bu bölge sitoplazmada IκB proteinleri olarak bilinen inhibitör alt ünitelerle (IκBα, IκBβ ve IκBε) etkileşim için çok önemli işlevsel bir NLS alanı içermektedir.¹¹⁻¹³

NFκB tüm canlı hücrelerin sitoplazmasında inaktiftir ve aktive edildiğinde hızla nükleusa gidip, bir kaskad aktifleşmesine neden olur. NFκB yapısal olarak akraba beş memeli proteininden oluşmaktadır. Bunlar: NFκB1 (p50 ve prekürsörü p105), NFκB2 (p52 ve prekürsörü p100), p65 (RelA), c-Rel ve RelB'dir. NFκB'yi G₀ dönemindeki hücrelerin sitoplazmasında latent halde tutan unsur ise IκB protein ailesi üyelerinden herhangi birisi ile yapmış olduğu komplekstir. Sözü edilen inhibitör proteinler; IκBα, IκBβ, IκBγ, IκB_{NS}, IκBε, bcl-3 ve prekürsör proteinler olan p105 ile p100'dür.¹⁴ NFκB/IκB kompleksi, NFκB'nin aktivasyonunda hız kısıtlayıcı basamak olarak bilinmektedir.^{12,13}

2.1.3. NFκB'nin İşlevi ve Aktivasyonu

NFκB protein kompleksleri, immün ve enflamatuar yanıt da dahil olmak üzere, hücre yaşamının devamı, proliferasyonu, angiogenez ve apoptozis ile ilişkili 400'den fazla farklı gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Normal hücrelerde NFκB'nin aktivasyonu sıkı kontrol altındadır. Bununla birlikte, patojenler, oksidan maddeler, enflamasyon mediyatörleri ve büyüme faktörleri NFκB aktivasyonuna neden olmaktadır. NFκB aktivasyonunun oksidatif stresle ilişkisinden dolayı NFκB, redoks duyarlı transkripsiyon faktörü olarak da tanımlanmaktadır.¹⁵ NFκB aktivasyonuna neden olan sinyal uyaranları Şekil 2.1. de gösterilmiştir.¹⁶

2.1.4. NFκB Aktivasyon Yolakları

NFκB'nin ana aktivasyon yolakları; kanonikal (klasik) ve nonkanonikal (alternatif) yolaklar olarak tanımlanmışlardır (Şekil 2.2).¹⁷ Bir de atipik yolak olarak adlandırılan, ancak henüz tam olarak anlaşılmamış, daha az kullanılan üçüncü bir aktivasyon yolağından söz edilmektedir.¹⁸

Kanonikal yolağın güçlü aktivatörleri, patojen kaynaklı lipopolisakkarit, TNFα, IL-1 ve IL-6 gibi proenflamatuar sitokinler, kamptotesin, daunomisin gibi DNA hasarı yapan maddeler, Toll-benzeri reseptör agonistleri ya da HTLV1, EBV'u gibi virüsler olabilir. Bu yolağın NFκB aktivasyonunda en sık kullanılan ve en hızlı aktivasyon yolağı olduğu anlaşılmıştır.¹⁸⁻²⁰ Sitoplazmik NFκB'nin hızlı aktivasyonu ve nükleer translokasyonu için 900 kDa ağırlığındaki IKK'nın aktive olması gerekmektedir. Bu yapı, IKKα, IKKβ ve IKKγ (NEMO)'dan oluşmaktadır.²¹ Sonuçta, aktive olan IKKβ, IκBα'yı içerdiği iki serin rezidüsü (S32 ve S36) üzerinden fosforile etmektedir.

Daha sonra bu aşamayı E2 ve E3 ligaz aracılıklı poliubikütinasyon ve 26S proteozom aracılıklı degradasyon işlemleri izlemektedir. Bu olaylar sonrasında NFκB, inhibitöründen ayrılarak çekirdeğe geçmekte ve kemokinlerin, sitokinlerin, adhezyon moleküllerinin, enflamasyonla ilişkili enzimlerin, apoptozis inhibitörlerini şifreleyen genlerin ekspresyonunu düzenlemektedir.^{20,21}

NFκB'nin non-kanonik aktivasyon yolağının, lenfoid organ gelişimi adaptif immün yanıt için önemli olduğu, NEMO ve IKKβ'dan bağımsız IKKα'ya bağımlı olduğu anlaşılmıştır.²² Non-kanonik yolağı aktive ettiği belirlenen az sayıda uyaran bulunmaktadır. Bunlar; LT-β gibi TNF sitokin ailesi üyeleri, TNF ailesine ait özellikle B hücre yaşamı ve matürasyonu için önemli BAFF, CD40L, RANK, CD27, CD30 gibi uyarandır.²³ Bu yolakta LT-β ve BAFF gibi uyarılar NIK aktivasyonuna neden olurlar. NIK ise IKKα homodimerinin de aktivasyonunu sağlamaktadır. Bu yolaktaki IKK kompleksi sadece IKKα'dan oluşmaktadır. Sonuçta IKK kompleksinin aktivasyonu, inaktif NFκB p100/RelB dimerinin fosforilasyonuna neden olmakta, p52/RelB dimer şeklini almakta ve aktif NFκB dimeri nukleusa geçerek gen transkripsiyonunda değişiklikler yapabilmektedir. Nonkanonik yolağın, kanonik yoldan daha yavaş olduğu anlaşılmıştır.²⁴

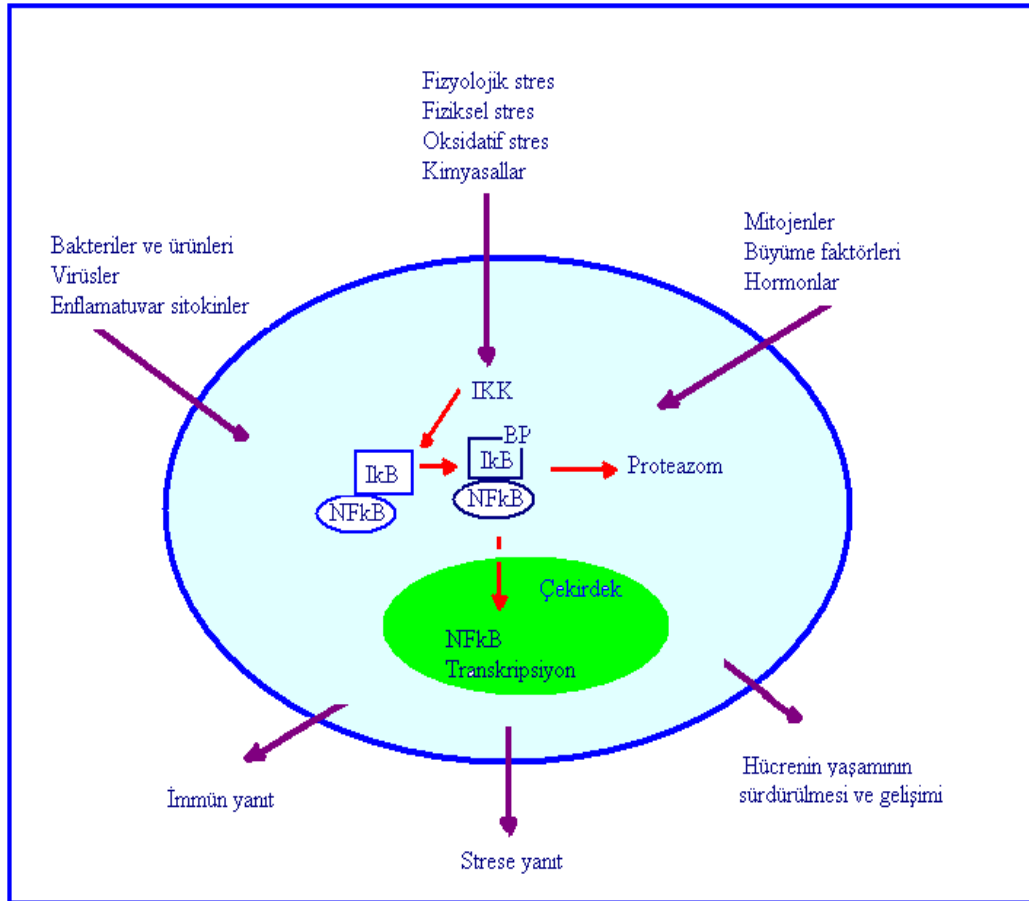
Atipik NFκB aktivativasyon yolağı, IKK'dan bağımsız olması nedeniyle atipik olarak adlandırılmaktadır. Atipik NFκB aktivativasyon yolağının, ultraviyole ışınları ve doksorubisin tarafından aktive edilebildiği gösterilmiştir. Bu aktivasyon DNA hasarı ile sonuçlanabilmektedir.¹⁸

2.1.5. Fizyolojik ve Patolojik Olaylardaki Önemi

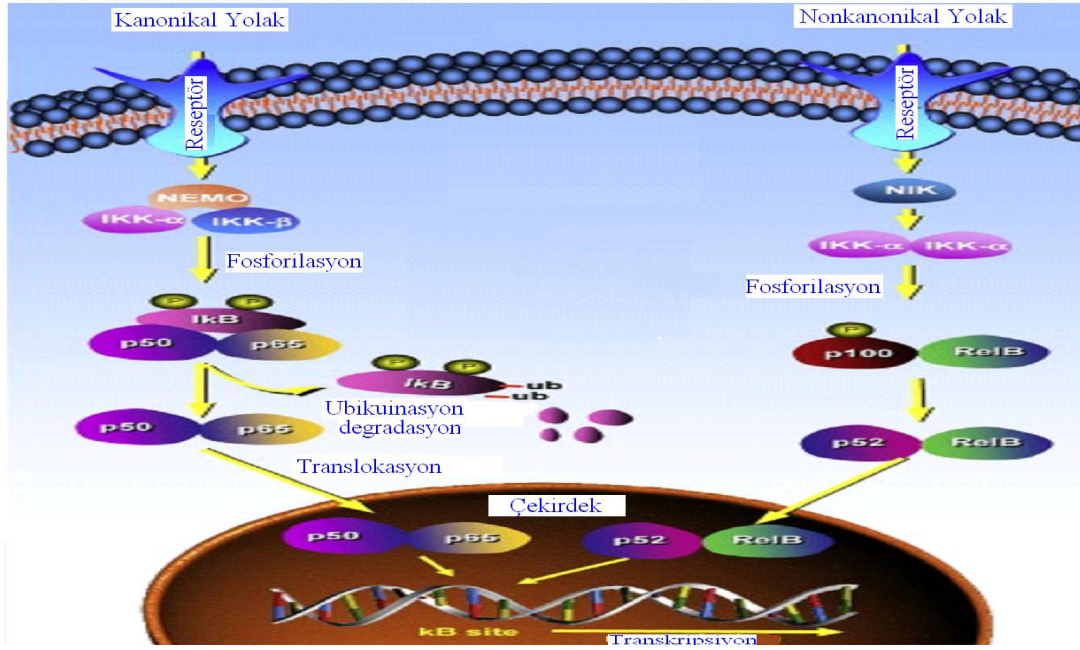
NFκB'yi aktive edebilen uyarıların sayısının şaşırtıcı derecede fazla olması ve aktive ettiği fonksiyonel κB alanında bulunan yaklaşık 100 gen, NFκB'nin normal canlı fizyolojisinde ve hastalıkların oluşumunda önemli bir role sahip olduğunu düşündürmektedir.^{25,26}

Nitekim, çok sayıda araştırmanın sonuçları NFκB aktivitesindeki artışın, insanlarda pek çok kanser türünün gelişiminde ve devamında önemli bir rol oynadığını göstermektedir.²⁷⁻²⁹ Bunun dışında son yıllarda insülin direnci, kaşeksi, Alzhemier hastalığı, transplant toleransı/greft reddi, iskemi/reperfüzyon hasarı, inkontinensia pigmenti ve çeşitli

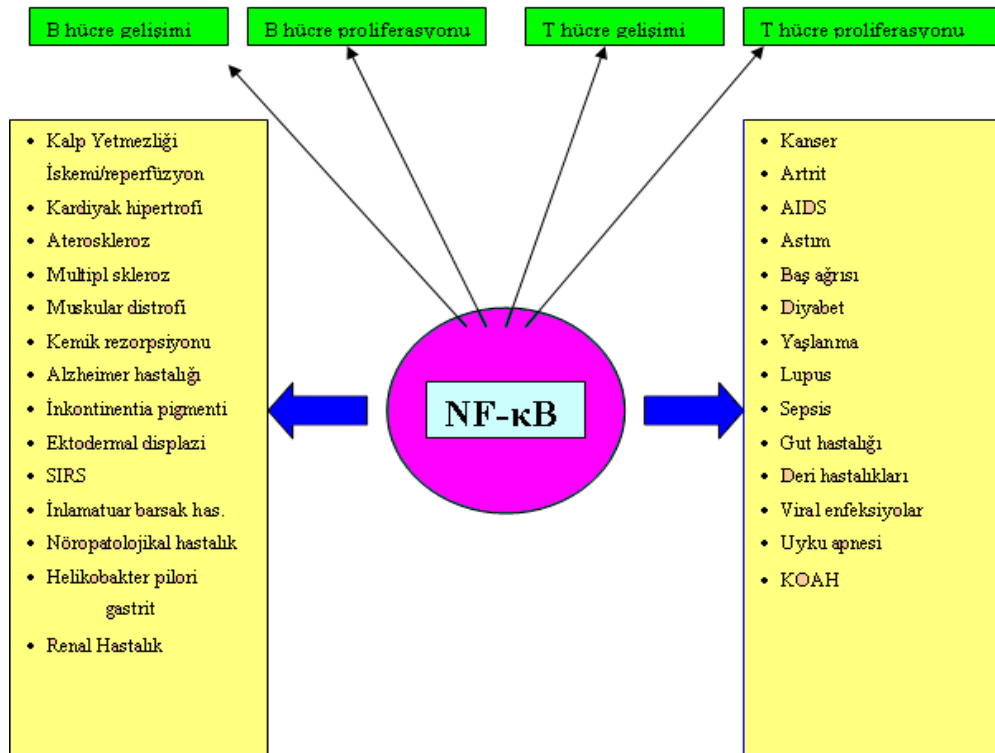
enflamatuvar hastalıkların, NFκB deregölasyonuyla ilişkisi kurulmuştur.^{30,31} NFκB'nin ilgili olduğu fizyolojik (yeşil renkle) ve patolojik olaylar (sarı renkle) Şekil 2.3'de gösterilmiştir.³²



Şekil-2.1. NFκB aracılıklı sinyalin uyarıları¹⁶



Şekil-2.2. NF-κB aktivasyonunun klasik ve alternatif yolları¹⁷



Şekil-2.3. NFκB'nin ilgili olduğu fizyolojik ve patolojik olaylar³²

2.2. Karaciğer Hastalıkları ve NFκB

Kronik karaciğer hastalıkları ve sirozun oluşturduğu hastalık grubu, batı ülkelerinde görülen başlıca ölüm nedenleri arasında dokuzuncu sırada yer almaktadır. Halen dünya genelinde görülen en önemli sağlık sorunlarından biri olan karaciğer hastalıklarının nedenlerine bakıldığında bunun kıtalara göre farklılıklar gösterdiği görülmektedir. Afrika ve Asya'da temel neden viral ve parazitik enfeksiyonlar iken, Avrupa ve Amerika'da (son yıllarda giderek artmakta olan viral hepatit vakalarına rağmen) aşırı alkol tüketiminin karaciğer hastalıklarının oluşumundaki temel neden olduğu belirtilmektedir.^{33,34} Yine son yıllarda artan obezite nedeniyle non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı da tüm dünyada oldukça sık görülen bir karaciğer hastalığı haline gelmiştir.³⁵

2.2.1. Kupfer Hücreleri ve Karaciğer Hasarı

Yapılan araştırmalara göre karaciğerde NFκB aktivitesinden sorumlu olan başlıca yapının, kupfer hücreleri olduğu anlaşılmıştır. Kupfer hücreleri, vücuttaki sabit makrofajların en büyük grubunu temsil etmekte olup, karaciğerdeki nonparenkimal hücrelerin de yaklaşık %20'sini oluşturmaktadır.³⁶ Kupfer hücrelerinin kaynağı, kemik iliğindeki progenitörlerden açığa çıkan dolaşımdaki monositlerdir. Sinüzoidal vasküler alan içinde bulunan bu hücrelerin periportal alanda baskın oldukları da bilinmektedir. Kupfer hücrelerinin esas görevleri; kandan geçen endotoksin, mikroorganizma ve atıkların fagositozla temizlenmesi işlemidir.³⁷ Alkol, karbon tetraklorür, endotoksin ve kolestaza bağlı olarak oluşturulan karaciğer hasar modellerinde kupfer hücrelerinden yanıt olarak hepatomitojenler adı verilen TNF-α ve IL-6 dahil proenflamatuar sitokinlerin salıverildiği ve bunların NFκB aktivasyonuna yol açmada major rol oynadığı gösterilmiştir.^{38,39} Kupfer hücrelerinden açığa çıkan diğer mediyatörler de IL-1-α/β, IL-12, IL-18 ve GM-CSF olarak sıralanabilir.⁴⁰ Kupfer hücrelerinden salıverilen TNF-α ve IL-6'nın karaciğerde nekroz, enflamasyon, fibrozis ve hepatosellüler karsinomu teşvik etme açısından güçlü bağlantısı olduğu düşünülmektedir.^{38,39}

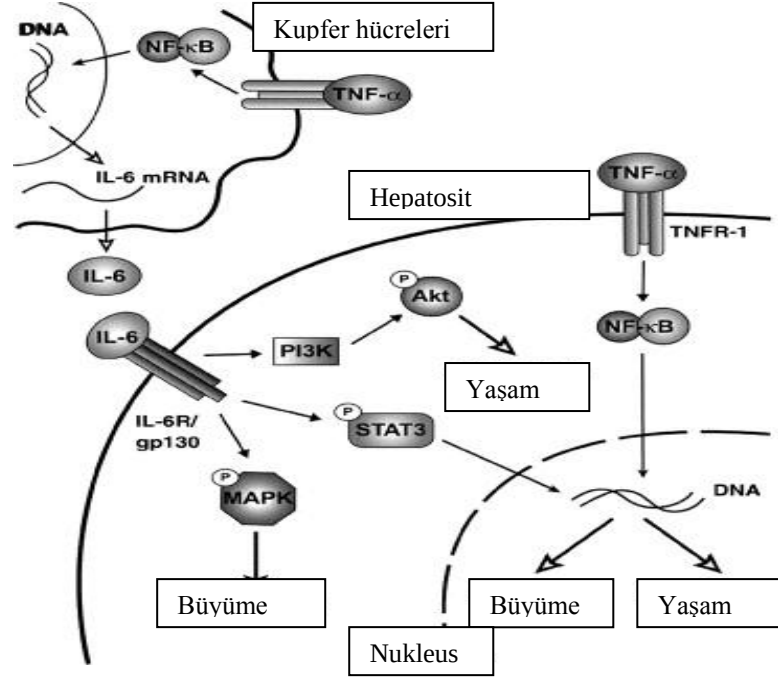
Yukarıda sözü edilen özelliklerinden dolayı, NFκB'nin karaciğer işlevlerinde ya da hastalıklarındaki rollerini anlamaya yönelik araştırmaların önemli bir kısmında kupfer hücreleri kullanılmaktadır.

2.2.2. Karaciğer Patolojilerinde Olası Hasar Mekanizmaları

Karaciğer patolojilerini taklit eden deneysel modellerdeki çalışmalar; NFκB aktivasyonuna bağlı yanıtların cinsiyet, yaş ve diyetteki yağ içeriğine bağlı olarak değiştiğini göstermektedir.⁴¹ Buna göre NFκB aktivasyonuna bağlı yanıt dişilerde, gençlerde ve fazla yağlı diyetle beslenenlerde artmaktadır. İnsan karaciğer hastalıklarında hepatik NFκB'nin önemine ilişkin çalışmalar henüz yeterli değildir. Bununla birlikte alkolik karaciğer hastalığında enflamasyon ve fibrozisin hepatik NFκB aktivasyonu ile ilişkisi net olarak ortaya konmuştur.³⁵

Sağlıklı karaciğerde sitokinlerin yapısal üretiminin olmadığı ya da çok düşük olduğu bilinmektedir.⁴² Ancak akut ve kronik karaciğer hastalıklarına bağlı olarak hepatosit ölümünde en önemli modülatörlerin sitokinler olduğu da yapılan çalışmalar sonucunda gösterilmiştir.⁴³ Bu konuda üzerinde en çok çalışılan sitokin, TNF'dir.⁴⁴ Kupfer hücrelerinden açığa çıkan TNF'nin, sadece proapoptotik sinyalleri indüklemekle kalmadığı aynı zamanda NFκB yolağının da aktivasyonuna neden olduğu düşünülmektedir.⁴²⁻⁴⁴ Genel kabul TNF etkisinin hepatositler üzerinde proliferatif ya da apoptotik olup olmayacağını belirleyen unsurun, ortamın GSH ve ROT içeriğine bağlı olduğudur.^{45,46}

Araştırmalar karaciğerde rejenerasyon sürecinde TNF-α ve IL-6'nın başlıca kritik faktörler olduğunu ve bunların hepatositleri mitojenlere duyarlı duruma getirdiğini göstermektedir.⁴⁰ TNF-α ve IL-6'nın kupfer hücreleri tarafından salıverilmesinin lokal enflamatuvar yanıt oluşturmak üzere nötrofil lökositler tarafından tetiklendiği gösterilmiştir.^{47,48} Buna göre kupfer hücreleri tarafından salıverilen TNF-α hepatosit üzerindeki TNF reseptör I'e (TNF-R1) bağlanarak kendisi ile ilgili süreçleri başlatmakta sonra da NFκB yolağının aktivasyonuna neden olmaktadır. Sonuçta da IL-6 ekspresyonu artmakta ve STAT3 aktivasyonu gerçekleşmektedir. Hepatositleri mitojenik uyarana duyarlı hale getiren ve hücre siklusunun G₀ fazından G₁ ve S fazına geçiren bu reaksiyonu sonlandıran ve dengeleyen unsurun ise TGF-β olduğu anlaşılmıştır.⁴⁹



Şekil-2.4. Karaciğer rejenerasyonu esnasında sitokin sinyalizasyonu ⁴⁰

Kendini yenileme kapasitesi açısından benzersiz bir organ olan karaciğerde parsiyel hepatektominin hemen sonrasında ve hücre proliferasyonun öncesinde indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) transkripsiyonunun da NFκB aktivasyonu aracılığıyla TNF-α ve IL-6 tarafından indüklendiği gösterilmiştir.^{49,50}

Antiinflamatuvar bir sitokin olan IL-10 ve NFκB ilişkisinin karaciğerde enflamatuvar yanıtta rolü de araştırılmıştır. Kupfer hücreleri ve diğer makrofajların IL-10 üretimiyle aşırı üretilen enflamatuvar sitokinleri kontrol edebilecekleri düşünülmektedir.^{51,52} Bu kontrolde NFκB'nin önemi, IL-10 transkripsiyonuna katılmasından kaynaklanmaktadır.⁵²

Hepatositlerde NFκB'nin baskın formunun p50-p65 heterodimer formu olduğu anlaşılmıştır.⁵⁴ Bir başka önemli nokta NFκB'nin hepatositler için yaşamsal öneme sahip olduğudur. Nitekim, NFκB p65'in tamamen yok edildiği farelerde yapılan genetik çalışmalar, TNF-α tarafından indüklenecek yoğun hepatosit apoptozisine bağlı olarak embriyonik ölümün gerçekleştiğini göstermiştir.⁴³ Diğer taraftan yapılan moleküler düzeydeki araştırmalar NFκB'nin p50 alt biriminin karaciğer hasarında enflamatuvar hücre sayısını arttırarak ve TNF-α'nın ekspresyonunu sınırlayarak karaciğer hasarında koruyucu rol oynadığını göstermektedir.³⁴

Konuyla ilgili artan çalışmalar giderek NFκB'yi, karaciğer fizyopatolojisinin odak noktası haline getirmektedir. Bazı araştırıcılara göre NFκB, apoptozis ve enflamasyon gibi iki önemli biyolojik süreçte antiapoptotik ve proenflamatuar olarak kabul edilir.^{34,40} Bununla birlikte; toksik bir uyarının karaciğer makrofajlarında oluşturduğu NFκB aktivasyonunun, sitokin ve ROT gibi hasar oluşturucu ürünlerin üretimiyle sonuçlandığı da bulgular arasındadır. Bu konu üzerine yapılmış birbiriyle çelişen değişik araştırmaların verileri topluca değerlendirildiğinde karaciğer hastalıklarının oluşmasındaki en önemli nedenin apoptozis regülasyonundaki bozulma olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır.⁵⁵

Son yıllarda üzerinde önemle durulan bir başka konu da NFκB fonksiyonları ve kanser arasındaki bağlantıdır. Bazı araştırmacılar, NFκB aktivasyonunun hücre ölümünü uygunsuz baskılayışı ile tümör gelişimi arasında bağlantı kurmakta ve bu durumun tümör hücrelerinin kemoterapiye dirençli hale gelmesine neden olabileceğini düşünmektedirler.^{42,56,57} Diğer taraftan NFκB aktivasyonunda eksiklik olan farelerin karaciğer kanserine daha yatkın olduklarını gösteren araştırmalar da literatürde bulunmaktadır.^{58,59} Kronik enflamasyon ve kanser oluşumu arasındaki bağlantı gösterilmiş olmasına rağmen bu olayların fizyopatolojisinde NFκB'nin rolü ve öneminin aydınlatılması için daha fazla araştırmaya gereksinim vardır.⁶⁰

Karaciğerde apoptotik süreçlerle ilgili olaylarda NFκB'nin rolü düşünöldüğünde bazı karaciğer patolojilerinde bu yolağın potansiyel tedavi hedefi olabileceği de akla gelmektedir.⁵⁵ Bu konuda gerçekçi bir yorumu Maeda ve arkadaşları řu şekilde yapmaktadır: "Karaciğerde Kupfer hücreleri ve hepatositler gibi farklı hücre tiplerinde NFκB'nin farklı fonksiyonları olabilir. Bu nedenle NFκB sinyal yolağını hedefleyen ilaçların sistemik alınması halinde bir hücre tipine yararlı sonuçlar elde edilirken diğer hücre tiplerinde öngörölemeyen zararlar oluşabilir".⁵⁸

2.2.3. Yeni İlaçların Geliştirilmesinde Hedef Olarak NFκB

NFκB, enflamatuvar süreçler ve kanser arasındaki ilişkinin giderek daha çok anlaşılmasına başlanmış olması bu yolağın inhibisyonu esasına dayanan yöntemlerin yeni tedavi seçenekleri olarak düşünölmeye başlanmasına neden olmaktadır.⁶¹ Bu nedenle günümüzde NFκB aktivitesini bloke eden yeni ilaçların geliştirilmesi birçok laboratuvar ve ilaç şirketinin ana hedefi haline gelmiştir. Diğer taraftan, yoğun araştırmalar sırasında yıllardır kullandığımız bir çok eski ilacın bilinen özellikleri dışında NFκB sinyal kaskadını inhibe edebilme gücüne sahip olduğu da anlaşılmıştır (Tablo- 2.1).^{61- 63}

Tablo-2.1. NFκB inhibisyonu yapan ilaçlar, moleküler hedefleri ve çalışılan modeller.^{62,63}

İlaçlar	NFκB İle İlişkili Moleküler Hedefler	Çalışılan Model	
		in-vitro	in-vivo
Aspirin	IKKβ inhibisyonu P65 lokalizasyonu Siklooksijenaz-2 inhibisyonu	Sinovyal fibroblast, akciğer epiteliyal hücre, dendritik hücre, monosit, makrofaj, T hücreleri, endotel hücreleri, vasküler düz kas hücreleri	Kontakt hipersensitivite, zimosanla indüklenen pençe enflamasyonu
Sülfasalazin	IKKβ inhibisyonu Sistein uptake		
5-Aminosalisilik asit	p65 fosforilasyonu		
Glukokortikoidler	IκBα transkripsiyonu p65 ile GR etkileşimi IKK inhibisyonu	Makrofajlar, endotelial hücreler, pulmoner epitelyal hücreler, T-hücreleri	Karagenin indüklediği hava kesesi, periton sepsisi, miyokardial kontraktile depresyonu
Selektif östrojen reseptör modölatörü	p65 ve ER etkileşimi	Tamoksifen, hücre kültürlerinde TNF-α ile indüklenen NFκB aktivasyon azalması	Dirençli yada tekrarlayan Multipl miyelom'da (Tamoksifen)
Talidomid/ lenalidomid	IKKβ inhibisyonu	Jurkat T hücrelerinde IL-1β ve TNFα'ın indüklediği NFκB aktivasyonunun blokajı	Multipl miyelom'da -antiproliferatif -antianjiyojenik -proapoptotik
Makrolidler	IκBα stabilizasyonu IKKβ inhibisyonu	Klaritromisin Jurkat T hücrelerinde TNF-α ile indüklenen NFκB transkripsiyonel aktivitesini azaltma	Roksitromisin HCC sıçan modelinde NFκB'nin yapısal aktivasyonunu ve tümör oluşumunu azaltma
Bortezomib	Proteozom inhibisyonu	Miyelom, Hodgkin gibi hematolojik malignensi hücreleri	Solid organlarda (meme, mide, kolon vb.) proliferasyon inhibisyonu

İlaçlar	NFκB İle İlişkili Moleküler Hedefler	Çalışılan Model	
		in-vitro	in-vivo
Doğal bileşikler: flavanoidler, polifenoller, seskiterpen laktonlar, kurkumin, sesterterpen)	IκB'nin fosforilasyonu	T-hücreleri, makrofajlar, fibrosarkoma ve epiteliyal hücreler	Septik şok, deri enflamasyon
Antioksidanlar: PDTC, N-asetilsistein, Vitamin E, Vitamin C	Reseptör sinyalizasyonu	Makrofajlar, monositler, T-hücreleri	Septik şok, nötrofilik alveolit, çoklu organ hasarı, deneysel alerjik ensefalomyelit

Tablo-2.1. (Devam) NFκB inhibisyonu yapan ilaçlar, moleküler hedefleri ve çalışılan modeller^{62,63}

2.3. Reaktif Oksijen Türleri ve Antioksidan Sistemler

2.3.1. Reaktif Oksijen Türleri

Oksijen, organizmada oluşan serbest radikallerin çoğunun kaynağıdır. ROT ya da yaygın kullanılan adlarıyla serbest oksijen radikalleri dış yörüngesinde bir ya da birden fazla eşleşmemiş elektrona sahip molekül ya da molekül parçacıkları için kullanılan bir tanımlamadır. Sözü edilen yapılar hem radikal hem de radikal olmayan yapıları içermektedir (Tablo 2.2).⁶⁴⁻⁶⁷ Yapılarındaki çiftleşmemiş elektron ya da elektronlar serbest radikali oldukça kararsız bir yapıya dönüştürmekte ve kimyasal olarak reaktif hale getirmektedir. Bu nedenle ROT'lar diğer moleküllerle çok kolay biçimde elektron alışverişine girebilmektedirler.⁶⁷

Tablo-2. 2. Bazı Reaktif Oksijen Türleri⁶⁵

RADİKALLER	RADİKAL OLMAYANLAR
Süperoksit radikal ($O_2 \cdot^-$)	Hidrojenperoksit (H_2O_2)
Hidroksil radikal ($OH \cdot$)	Hipokloröz asit ($HOCl$)
Alkoksil radikal ($LO \cdot$)	Hipobromöz asit ($HOBr$)
Peroksil radikal ($LOO \cdot$)	Ozon (O_3)
Semikinon radikal ($HQ \cdot$)	Singlet oksijen ($1 O_2 \cdot$)
Hemoproteine bağlı serbest radikaller	Nitroksil anyonu (NO)
Organik radikaller ($R \cdot$)	Nitröz asit (HNO_2)
Organik peroksit radikali ($RCOO \cdot$)	Dinitrojen tetraoksit (N_2O_4)
Nitrikoksit ($NO \cdot$)	Dinitrojen trioksit (N_2O_3)
	Peroksinitrit ($ONOO^-$)

2.3.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynakları

Reaktif oksijen radikallerinin kaynağı bir çok anabolik ve katabolik işlemler sırasında gerçekleşen reaksiyonlardır Tablo 2.3’de ROT kaynakları özetlenmiştir.^{68,69} Oluşan ROT’lar arasında en güçlü olanları süperoksit, hidroksil ve nitrik oksit radikalleridir.⁶⁵ Bu radikaller, kısa yarı ömürlü olup son derece reaktif moleküllerdir. Daha zarar verici bileşiklere dönüşmeleri, sadece mikro- ya da nano-saniyeler içinde gerçekleşmektedir.^{65-67,69}

Tablo-2.3. Reaktif Oksijen türlerinin kaynakları⁶⁸

Normal biyolojik kaynaklı	Dış Kaynaklı	Yaşlanma süreci
Mitokondrial elektron transport zinciri Mikrozomal elektron transport zinciri Kloroplast elektron transport zinciri Oksidan enzimler: Ksantin oksidaz indolamin dioksijenaz triptofan dioksijenaz galaktoz oksidaz lipooksijenaz monoamin oksidaz Fagositik hücreler: Nötrofiller, monosit ve makrofajlar, eozinofiller, endotelial hücreler Otooksidasyon (demir, epinefrin) reaksiyonları	Redoks döngüsü maddeler (Parakuat, dikuat, alloksan, doksorubisin) İlaç oksidasyonu (Parasetamol, CCl ₄) Sigara içimi İyonize radyasyon Güneş ışığı İskemi Hemoraji Travma Sıcak şoku	Protein karboksilasyonunun artışı ve katalize edici tüm enzimlerin azalması

2.3.3. Reaktif Oksijen Türleri ile Oluşan Reaksiyon Tipleri

Araştırmalar düşük düzeyde oluşan süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil ve moleküler oksijenin, hücre proliferasyonu, apoptozis, immün yanıt ve hücre farklılaşması dahil birçok hücresel süreçte rol oynadığını göstermektedir.⁷⁰ Bununla birlikte ROT'ların aşırı düzeylerde oluşması ve onlara bağlı reaksiyonlar anahtar biyolojik moleküllerin tümünü, özellikle DNA'yı, protein lipid ve karbonhidrat yapıları, olumsuz yönde etkileyebilir.⁶⁷

Bu açıdan bakıldığında ROT'ların katıldığı kimyasal reaksiyonlar aşağıda belirtildiği şekilde özetlenebilir:

1. Radikal ile radikal olmayan molekül reaksiyonu: Serbest radikalın, radikal olmayan bir molekülle reaksiyona girmesiyle oluşur. Böyle bir reaksiyonda, radikal özelliğine sahip olmayan molekül elektronunu kaybederek başka bir serbest radikale dönüşür.^{67,71}

2. Radikal ile radikal reaksiyonu: İki serbest radikal reaksiyona girdiğinde çiftlenmemiş elektronlarını birleştirerek "dipol'ler"(çift) oluştururlar. Bu olay ROT eliminasyonu için bir mekanizma olarak düşünülebilir. Ancak yapılan çalışmalar, bu tip reaksiyonların sonucunda oluşan ürünün her iki radikalın kombinasyonundan daha zarar verici olduğunu da göstermiştir.^{67,71}

3. Lipid Peroksidasyonu: ROT'lara bağlı olarak gelişen en önemli reaksiyon, membran lipidlerinin oksidatif hasarı olan lipid peroksidasyonudur. Radikal reaksiyonlarına en sık giren membran yağ asitleri linolenik asit ya da eikozapentaenoik asit gibi ÇDYA'dir. Bu olay membran yağ asitlerinin erime noktasının yükselmesine ve membranının akışkanlığının azalmasına neden olmaktadır. Sonuç olarak hücre membranı, seçici geçirgenliğini kaybetmekte ve hücrelerde ozmotik hasar oluşmaktadır. Bu reaksiyon zinciri ÇDYA'deki karbon atomundan bir hidrojen atomu koparan hidroksil radikali gibi güçlü bir oksidanla başlamaktadır. Böylece oluşan karbon merkezli radikal, komşu yağ asitinden hidrojen atomu koparan oksijen merkezli peroksil radikaline dönüşmektedir. Reaksiyon substrat olarak yağ asitleri tükeninceye kadar devam etmektedir.⁶⁷⁻⁷²

2.3.4. Oksidatif Stres

Artan ROT üretimine karşılık, mevcut antioksidan mekanizmaların etkinliğinin yetersiz kalması hücrede oksidatif dengenin bozulmasına ve sitotoksik radikal etkinliğinin artmasına neden olur. Bu durum oksidatif stres olarak adlandırılmaktadır. Oksidatif stres; özellikle hiperoksi, iskemi/reperfüzyon hasarı, tütün dumanı, ozon, asbest vb. ksenobiyotiklere maruziyet, aktive olmuş nötrofiller ile diğer fagositlerin dokuda toplanması gibi durumlarda karşılaşılan bir durumdur.^{66,67,72}

Baskılanamayan ROT artışı, başta DNA olmak üzere yaşamsal biyolojik yapılar üzerinde olumsuz etkilere sahiptir. Bu açıdan mitokondriyal DNA düşük onarım kapasitesine sahip olması nedeniyle oksidatif stresten en çok zarar gören yapılardan biri olarak kabul edilmektedir.^{65,73,74} Diğer taraftan oksidatif stres nükleik asitlerde mutasyona neden olarak kansere de zemin oluşturabilir.⁷⁵

Protein yapısındaki moleküllerin oksidasyonu ise onların sekonder ve tersiyer yapısının değişmesine ve sonuçta işlevlerini kaybetmelerine neden olmaktadır.^{76,77} Hasarın büyüklüğü, radikalin üretildiği yere göre, bulundukları konuma, içeriğine ve yapısına bağlı olarak değişebilmektedir.⁷⁶ Yapılan araştırmalar özellikle triptofan, tirozin, histidin ve sisteinin, artan ROT üretimine diğer aminoasitlerden daha duyarlı olduklarını göstermiştir.⁷⁷

Oksidatif stresin, lipit yapılarına verdiği hasar hücrenin membran yapısı ve işlevlerini bozması açısından çok önemlidir. Bu açıdan bakıldığında ÇDYA'nın, diğerlerine oranla peroksidasyona karşı daha az dirençli olduğu anlaşılmıştır. Bu nedenle, membranlarda ÇDYA'larındaki değişiklikler, oksidatif hasarın hızını ve oranını etkilemektedir.⁷⁸ Lipid peroksidasyonu, protein ve DNA hasarına da yol açabilecek bir zincir reaksiyonu tetiklediği için de önem taşımaktadır. Çünkü bu olayların sonucunda hücrede iyon transportu ve transmembranal potansiyel bozulmakta ve hücresel metabolik olaylar inhibe olmaktadır.
69,72, 77-79

2.3.5. Antioksidan Savunma Mekanizmaları

Hücrede ROT'ların hedefi olan protein, karbohidrat, lipit yapıdaki moleküllerin ve DNA gibi oksidasyona açık hücre bileşenlerinin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidanlar denilmektedir.^{66,67} Hücrelerde ve ekstraselüller sıvıda, söz konusu sitotoksik ROT'ları zararsız duruma getirmeye çalışan antioksidan savunma mekanizmaları mevcuttur. Bunlar ve bazı sentetik antioksidanlar tablo 2.4.'de özetlenmiştir.⁸⁰

Tablo-2.4. Antioksidan Savunma Mekanizmaları⁸⁰

Antioksidan enzimler	Süpürücü antioksidanlar	Engelleyici Antioksidanlar	Sentetik antioksidanlar
Süperoksit dismutaz (SOD)	Askorbik asit	Transferin	N-asetilsistein
Katalaz (KAT)	α - tokoferol	Albumin	Allopurinol
Glutasyon peroksidaz (GPx).	Tiyoller	Seruloplazmin	Probukol
Glutasyon redüktaz	Beta karoten	Ferritin	Penisilamin
Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz	Ürik asit		Pirolidin ditiyokarbamat
NADH peroksidaz ve oksidaz	Flavonoidler		Desferroksamin
Sitokrom C oksidaz	Koenzim Q		

Memeli hücrelerinde antioksidan mekanizmalar açısından önemli hücre içi enzimler; SOD, KAT ve GPx'dır. Bu enzimlerin fonksiyonlarını sürdürebilmeleri için bakır, çinko ve mangan (SOD için) ve selenyum (GPx için) gibi eser elementler yaşamsal öneme sahiptir.^{66,80,81} Organizmada ROT'lara karşı ilk savunma SOD ile yapılmaktadır. SOD, süperoksitin hidrojen perokside dönüşümünü katalize etmektedir. Hidrojen peroksit ise GPx ve KAT enzimleri tarafından suya dönüştürülmektedir. Bu reaksiyonda fizyolojik koşullarda GPx'in önemi vardır. Ancak hidrojen peroksidin arttığı durumlarda KAT etkinliği önem taşımaktadır.^{66,67}

ROT'un nötralizasyonunda önemli bir başka nokta endojen olarak üretilen ya da beslenme ile alınan antioksidanların fonksiyonudur. Burada sözü edilen endojen bileşikler, hücre içi tiyoredoksin sistemlerini, ubikinonları ve glutatyonu içermektedir. Bunlar içinde de glutatyon, biyolojik sistemlerdeki en aktif antioksidan olarak kabul edilmektedir. Diğer endojen antioksidanlar ise C vitamini ve ürik asittir. Bununla birlikte ürik asidin, başka radikallerin oluşumuna da neden olabileceğini unutmamak gerekir.⁷⁶ Beslenme yoluyla elde edilenlere ise E vitamini ve karatenoidler gibi bitkisel kaynaklı bileşikler örnek vermek mümkündür.⁸²

ROT hasarına karşı savunmanın diğer bir basamağı, yapısal olandır. Bu açıdan bakıldığında bireyler, türler ve dokular arasında farklar olabileceğini de hesaba katmak gerekir. Ayrıca ROT hasarına karşı yapısal savunma gücünün yaş ile ilgisi de ortaya konmuştur. Buna göre savunma gücü yaşlanmaya bağlı olarak azalmaktadır.⁷⁸

Son olarak, oksidatif strese bağlı zarara karşı hasarlı moleküllerin onarılması ya da ortadan kaldırılmasının gereğinden söz edilebilir. Bu açıdan da DNA onarımının çok önemli olduğu açıktır.⁸³

2.3.6. Oksidatif Stresin Değerlendirilmesi

Oksidatif stresin değerlendirilebilmesi için biyolojik materyalleri analiz etmeye uygun çeşitli yöntemler geliştirilmiştir.⁶⁶

2.3.7. ROT Ölçümü

ROT'ların kısa yarı ömüre sahip olmaları ve biyolojik örneklerde düşük konsantrasyonda bulunmaları nedeniyle daha çok oluşturdıkları hasarın ikincil ürünlerinin ölçülmesi hedef alınmaktadır. Bu yöntemler arasında da en çok kullanılan lipit peroksidasyonunun son ürünlerinin ölçülmesi yöntemidir. Bu nedenle LOOH, konjuge dienler, MDA ve dışındaki aldehitlerin ölçümü, uçucu hidrokarbonların ve lipit peroksidasyonu fluoresan ürünlerinin ölçümü yapılabilir.^{66,84} En doğru yaklaşım oksidasyona bağlı oluşan birden fazla ürünün miktarını ölçmektir.

Günümüzde deneysel araştırmalarda, lipit peroksidasyonunu değerlendirmek için en sık kullanılan yöntem MDA ölçümüdür. TBA reaksiyonuna dayanmaktadır. Bir başka yöntem ise daha güvenilir bir ölçüm sağlayacak olan HPLC'dir.⁶⁶

2.3.8. Antioksidan Aktivitenin Ölçülmesi

Antioksidan aktivitenin ölçülmesi için biyolojik materyalde indirgenmiş glutatyon, SOD, Glutatyon redüktaz, Glutatyon peroksidaz (Gpx), KAT aktiviteleri, β - karoten, askorbik asit, α -tokoferol vb. ölçümler çeşitli yöntemlerle yapılabilmektedir.⁸⁵ Antioksidan kapasite değerlendirilirken antioksidan madeler arasında sinerjistik ve antagonistik etkileşimler bulunabileceği de düşünülmelidir. Bu nedenle, toplam antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesi, antioksidanların ayrı ayrı konsantrasyonlarının ölçümüne dair verileri yorumlamaktan daha kolay ve anlamlı olacaktır.^{86,87}

Biyolojik sıvı ya da dokularda TAK değerlendirebilen yöntemlere iki açıdan bakılabilir:⁸⁶⁻⁸⁸

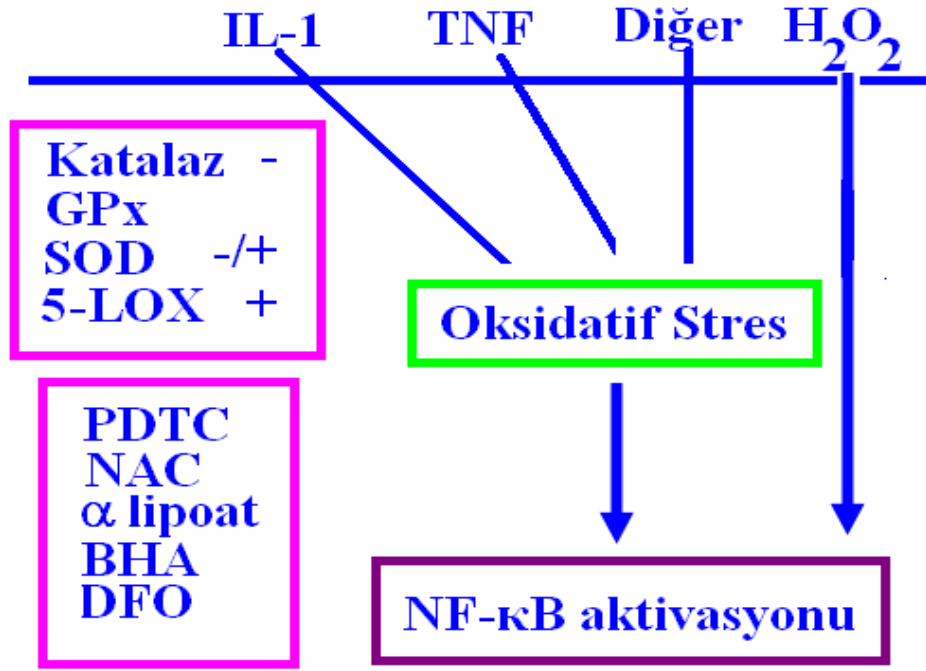
1. Antioksidan ve substratın, termal olarak oluşmuş peroksil radikalleri için birbiriyle yarıştığı reaksiyona göre düzenlenmiş yöntemler
2. Bir antioksidanın, bir oksidantı indirgeme kapasitesini kolorimetrik olarak ölçen yöntemler.

2.4. Oksidatif Stres ve NFκB

NFκB, oksijen duyarlı transkripsiyon faktördür ve oksidatif strese doğrudan yanıt verdiği gösterilen transkripsiyon faktörleri arasında en önemlisidir.⁸⁹ NF-κB'yi aktive eden moleküllerin bir çoğunun süperoksit, hidrojen peroksit, lipooksijenaz ürünlerinin oluşumunu da tetiklediği artık bilinmektedir. Ayrıca NFκB aktivasyonu için gerekli olan IκB/NFκB kompleksinden IκB'nin ayrılması aşaması için de oksidatif stresin gerekli olduğu gösterilmiştir.⁹⁰⁻⁹³

NFκB ile ROT'lar arasındaki ilişki hakkında fikir veren araştırmaların bir kısmında NAC ve PDTTC gibi antioksidanlar kullanılmıştır. Bu araştırmalarda antioksidanların NFκB aktivasyonunu önlediği sonucu ortaya çıkmıştır.^{3,94}

Başta DNA olmak üzere tüm makromoleküllerde hasar oluşturma eğiliminde olan oksidanlar için, NFκB de bir hedef olarak düşünülebilir.^{95,96} Yine bu açıdan bakıldığında, ROT ve NFκB arasındaki etkileşim, NFκB'nin aktivasyonuna neden olan intrasellüler sinyal süreçlerinin bir bileşeni olarak değerlendirilebilir. Araştırmalara göre oksidan özellikte maddeler NFκB'nin DNA'a bağlanma yeteneğini engelleyebilmektedir.⁹⁵ Bu durum sonucu indüklenen hücresel olayların ise yaşlanma, kanser oluşumu, immün yetmezlik ve kalp-damar hastalıkları ve bazı dejeneratif süreçlerin oluşmasına katkıda bulunduğu ve enflamatuar olaylarla ilgisinin olduğu anlaşılmıştır.^{93,97} Yapılan çalışmalar ROT'ların, NFκB regülasyonunu hem pozitif hem de negatif olarak modüle edebilme yeteneğine sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır (Şekil 2.5).⁹⁸



Şekil-2. 5. NFκB aktivasyonu ve oksidatif stres ilişkisi:⁹⁸

1. Hidrojen peroksit bazı hücrelerde NFκB'yi doğrudan aktive edebilir.
2. Bazı stimulanlara yanıt olarak hücre içi oksidatif stres artışı ölçülebilir.
3. PDTC, NAC, alfa-lipoik asit, DFA ve BHA gibi antioksidanlar NFκB aktivasyon yollarını inhibe edebilir.
4. KAT, GPx, SOD ve 5-LOX (Lipooksijenaz) gibi enzimler, hücrenin redoks durumunu modüle edebilir, NFκB aktivasyonunu pozitif ya da negatif yönde etkileyebilir.

NFκB aktivasyon yolağı üzerinde ROT ile etkileşimin ortak noktası henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak bir varsayım olarak, ROT'ların redoks duyarlı kinazlar aracılığı ile NFκB aktivasyonunu sağladığı düşünülmektedir.^{89,90,95} Sözü edilen redoks duyarlı kinazların da NIK ya da IKK olduğu tahmin edilmektedir. Çünkü bu moleküller IκB içindeki önemli serin kalıntılarının fosforilasyonuna neden olarak, sitoplazmik p65/p50 heterodimerinin ayrılmasını sağlamaktadırlar.^{18,95} Bununla birlikte ROT ve IκKα, IκKβ ya da NIK'in kinaz aktivitesi arasındaki etkileşimin biyokimyasal olarak açıklaması henüz tam olarak yapılamamıştır. Diğer taraftan ROT'ların NFκB'den bağımsız olarak da hücrede redoksa duyarlı bazı transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu artırabileceği ileri sürülmektedir.^{95,99}

Yapılan araştırmalar ROT düzeyindeki değişikliklere bağlı olarak farklı redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerinin aktive olduğunu ve buna bağlı olarak farklı biyolojik

yanıtların tetiklediğini göstermektedir. Buna göre, düşük oksidatif stresin, Nrf-2 olarak adlandırılan ve antioksidan enzimler için transaktivasyon gen kodlaması yaptığı bilinen bir transkripsiyon faktörünü tetiklediği, orta miktardaki ROT'un ise NFκB ve AP-1 aktivasyonu aracılığıyla enflamatuar yanıtı tetiklediği gösterilmiştir. Şiddetli oksidatif stres ise mitokondrial permeabilite geçiş poru işlevinde sorunlara neden olmaktadır. Bu da elektron transferinin aksamasına ve apoptozise ve/veya hücrenin nekroza gitmesine neden olmaktadır.¹⁰⁰

2.5. NFκB ve Antioksidanlar

NFκB ve antioksidan maddelerle ilgili çalışmalarda oksidatif stresin rolü araştırılırken bu amaç için en fazla kullanılan iki bileşik NAC ve PDTC olmuştur. E, C ve A vitaminleri, α-lipoik asit gibi diğer antioksidanlar da yine bu araştırmalarda kullanılmışlardır. Bunların bazı hücre tiplerinde NFκB aktivasyonunu inhibe edebildikleri gösterilmiştir.^{101,102} Bu maddelerden NAC, hücre içi glutatyon seviyelerini arttırabilen ve H₂O₂, hidroksil radikali ve hipokloröz asit gibi oksidanları süpüren bir antioksidan olarak bilinmekteydi.¹⁰³ Sonraları bu özelliklerine ek olarak NFκB'nin genel inhibitörü olduğu vurgusu da yapıldı. Ancak araştırmalar, NAC için NFκB duyarlı ve duyarsız yolların olabileceğini de ortaya koydu. Bu nedenle artık antioksidanların NFκB aktivasyonu üzerindeki etkilerinin, uyarı ve hücreye spesifik olduğu görüşü ağırlık kazanmıştır.⁹⁸

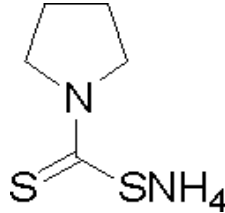
Konuyla ilgili olarak moleküler araştırmalarda T hücre kültürleri çok kullanılmıştır. Bu çalışmalarda, IL-1, TNF ve PMA kullanılarak, NFκB yolları aktive edilmiş ve bu açıdan antioksidanların farklı etkileri olabileceği sonucu daha net bir şekilde ortaya konmuştur (Tablo 2.5).⁹⁸

Tablo-2.5. NFkB aktivatörleri ve Antioksidanlar⁹⁸

Bileşik	Etki Mekanizması	IL- 1	TNF	PMA
NAC	Radikal süpürücüsü ve glutatyon prekürsörü	-	-	-
Allopurinol	Ksantin oksidazdan ROT inhibisyonu	-	-	-
DMPO	Hidroksil radikali spin trap	-	-	-
PDTC	Radikal süpürücüsü ve metal şelatörü	-	+	+
DDTC	Radikal süpürücüsü ve metal şelatörü	-	+	+
DFO	Demir iyonu şelatörü	-	+	+
TEMPO	Demir iyonu şelatörü, Radikal süpürücü	-	+	+
BHA	Lipid peroksidasyonu	-	+	S
o-Fenantrolin	Bakır şelatörü	+	+	+
ZM230487	5-LOX inhibitörü	+	+	S
MK886	FLAP inhibitörü	-	-	S
C vitamini	Genel antioksidan	+	+	+

NFkB aktivasyonu, EMSA ile ölçüldü. (-); inhibisyon yok, (+); inhibisyon var, S;saptanamadı

2.6. Pirolidin Ditiyokarbamat (PDTC)

**Şekil-2. 6.** Amonyum pirolidin ditiyokarbamatın yapısı¹⁰⁴

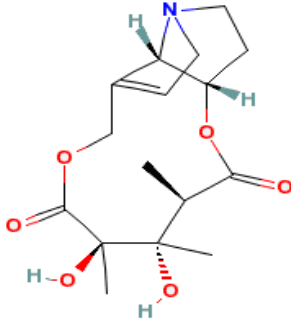
Kimyasal olarak (R₁) (R₂) N-C(S)-SR₃ fonksiyonel grupları ile bilinen ditiyokarbamatlar bazı sanayi kollarında ve tarımda pestisit olarak oldukça yaygın kullanılan maddelerdir. Bu kimyasal yapıya sahip olan maddelerden, dietilditiyokarbamat ve disülfiram halen tıpta kronik alkolizmin ve akut metal zehirlenmelerinin tedavisinde kullanılmaktadır.¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ Ayrıca AIDS tedavisinde de etkinlikleri denenmektedir.¹⁰⁷ Son zamanlarda bu grup bileşiklerden sentetik bir molekül olan ve hücre biyolojisi araştırmalarında oldukça sık kullanılan PDTC'nin antiapoptotik özelliğe sahip olmasından dolayı kansere karşı etkin bir ilaç olacağı varsayılmaktadır.^{4,108}

PDTC, kimyasal formülü $C_5H_9NS_2$, moleküler ağırlığı 147.26166 g/mol olan stabil bir tiyol bileşiğidir (Şekil-2.6).¹⁰⁴ Güçlü bir antioksidan olduğu uzun yıllardan beri bilinmektedir.^{109,110} Bu özelliği, metal şelatörü olmasından kaynaklanmaktadır.^{110,111} Bununla birlikte, PDTC'nin deneysel koşullara göre değişmekle birlikte prooksidan etkinliğe sahip olduğundan da söz edilmektedir.^{108,112-114}

Hücrelere kolaylıkla penetre olmasından dolayı hücre kültürü çalışmalarında oldukça yaygın kullanılan PDTC aynı zamanda NFκB için spesifik bir inhibitör olarak kabul edilmektedir.¹¹⁵ Çünkü PDTC'nin, insan lenfositik hücrelerinde ve fare fibroblastlarında IL-1, TNF, PMA, H_2O_2 , LPS tarafından indüklenen NFκB aktivasyonunu inhibe ettiği deneysel çalışmalarla gösterilmiştir.¹¹⁶ Yapılan araştırmalarda PDTC'nin NFκB inhibisyonuna neden olması genellikle onun antioksidan özellikleriyle açıklanmaya çalışılmaktadır. Oysa bu etkide PDTC'nin prooksidan özelliklerinin de payı olabileceğini hatırlamak gerekir. Bu etki ditiyokarbamatların ROT'lar ve nitrojen ile reaksiyonları sonucu oluşan tiüram disülfidlere bağlanmaktadır.¹¹⁷⁻¹¹⁹ Tiüram disülfitlerinse GSH ve protein tiyollerin oksidasyonuna neden olduğu bilinmektedir.^{112,120} Bu bilgilere dayanarak PDTC'nin bazı transkripsiyon faktörlerinin kritik tiyol gruplarını okside ederek NFκB inhibisyonu oluşturabileceği sonucuna da varılabilir.¹²¹

PDTC'nin, NFκB'nin inhibisyonuna neden olmasını açıklayan başka bir mekanizma ise onun NFκB yolağında bir proteozom inhibitörü olarak davrandığının gösterilmiş olmasıdır.¹²² Günümüzde proteozom inhibitörleri apoptoza karşı koruyucu etkileriyle kanser tedavisi için ümit verici hedef haline gelmişlerdir. Diğer taraftan karaciğer hastalıkları da dahil olmak üzere immün ya da enflamatuar pek çok hastalığın patogenezinde rolü olduğu bilinen NFκB aktivasyonu ile iNOS transkripsiyonu ilişkisini gösteren araştırmalar PDTC'nin başka bir özelliğine de dikkat çekmektedir.¹²³ Bu, PDTC'nin patolojik süreçlerde aşırı artan NO üretimini iNOS ekspresyonunu engelleyerek azaltmasıdır.^{124,125}

2.7. Monokrotalin (MCT)



Şekil-2. 7. Monokrotalinin kimyasal yapısı¹²⁶

Monokrotalin, *Crotalaria spectabilis* bitkisinin tohumlarından elde edilen, molekül ağırlığı 325.35692 g/mol, kimyasal formülü $C_{16}H_{23}NO_6$ olan pirolizidin alkaloidi bir fitotoksindir.^{126,127} Çalı türü bir bitki olarak tüm dünyada yaygın olarak bulunmaktadır. Bitkinin Hindistan, Afganistan ve Rusya’da karaciğer hastalığı epidemilerine neden olduğu bildirilmiştir. İnsanlar bitkinin içeriğinde bulunan monokrotaline, bu bitkiyle kontamine olmuş tahıllardan hazırlanan kahvaltılık tahıllar, yemeklik yağlar, bitkisel çaylar ve ilaçları tüketirken kazara maruz kalırlar. Hayvanlar ise otlanma sırasında alırlar.¹²⁸

Monokrotaline bağlı gelişen zehirlenmelerde; anoreksi, kilo kaybı ve sarılık da dahil olmak üzere karaciğer yetmezliği ile ilgili klinik bulgular ortaya çıkmaktadır. Bu bulgularla eş zamanlı olarak karaciğerde; fibrozis, megalositozis, sentrilobüler nekroz, dilate ve konjesyone sinüzoidler görülmüş, yaygın hemoraji, santral venöz ve sinüzoidal hücre hasarı parankim hücre onkozisi ve apoptozisle karakterize histopatolojik değişiklikler oluştuğu gösterilmiştir.¹²⁹⁻¹³³

MCT toksisitesinin nedeni molekülün karaciğerde sitokrom P- 450 3A enzim sistemi tarafından reaktif pirol yapıdaki ara ürünlere dönüşmesidir. Oluşan bu ara ürünler MCTP ya da DHMC olarak adlandırılır. MCTP’nin, nötral pH’ya sahip sulu ortamda yarılanma ömrünün 3 saniye olduğu bilinmektedir. Bu madde güçlü alkilleyici özelliكتedir ve kolayca DNA ve proteinlere bağlanır.^{132,133} Monokrotalin ile yapılan araştırmaların sonucunda bu maddenin; sitotoksik, genotoksik, hepatotosik, kardiyopnömotoksik olduğu gösterilmiştir.¹³⁴⁻

MCT ile oluşan toksisitenin hücrenel ve moleküler mekanizması halen tam olarak bilinmemekle birlikte tarihsel olarak bakıldığında, reaktif metaboliti olan pirolün DNA-DNA ve DNA-protein çapraz bağlanmalarını indüklediğı ve bu çapraz bağların hepatotoksik etkiyle bağlantısı olduğı düşünölmektedir.¹³⁷ Takip eden çalışmalarda bu hasarın oksidatif stresle ilişkisi ortaya atılmıştır. Buna göre DHMC, GSH ile konjuge edilerek detoksifiye edilmekte ve daha az toksik olan sekonder metabolitine (GSDHM) dönüştörmektedir.¹³⁸ Bu bulguyu destekleyen bir çalışmada sülfür içeren amino asitler olan sistein ve taurinin MCT'nin toksik etkilerini baskıladığı gösterilmiştir.^{138,139}

MCTP'nin toksik etkilerinin mekanizması üzerine yapılan araştırmalarda bir başka dikkat çekici nokta da mitokondrial disfonksiyon oluşturmasıdır.¹⁴⁰ Nitekim MCT'nin konsantrasyon bağımlı biçimde glutamat/malat destekli durum 3 (solunum zincirindeki kompleks I) solunumun inhibisyonuna, mitokondride ATP eksikliğine, submitokondrial parçacıklarda kompleks I ve NADH oksidaz aktivitesinin inhibisyonuna neden olduğı anlaşılmıştır.¹³⁴

Diğer taraftan MCT'nin karaciğerde enflamasyona neden olduğı, nötrofiller ve kupfer hücrelerinden salıverilen TNF- α , IL-1 β gibi enflamatuar mediyatörlerin hepatik parenkimal hücre hasarına katıldığı gösterilmiştir.⁶ Aynı araştırmacılar MCTP'nin karaciğerde endotel hasarına bağı koagölasyon sistemi aktivasyonuna ve fibrin depolanmasına neden olduğunu da göstermişlerdir. Fibrin depolanmasına bağı olarak aksayan kan dolaşımı ve sonucunda sıçan karaciğerinin sentrilobüler bölgesinde hipoksi oluşması da parankimal hasarın mekanizmasını açıklayan bir bulgudur.¹⁴¹ Ayrıca MCT'nin toksik etkisini aydınlatmak amacıyla yapılan çalışmalarda apoptozise neden olduğı da gösterilmiştir.¹³⁵

3. ARAÇ GEREÇLER VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Yaptığımız çalışmada kullanılan deney hayvanları Düzce Üniversitesi, Düzce Tıp Fakültesi deney hayvanları laboratuvarından temin edilmiştir. Bunlar 200-250 gram ağırlığında olan erkek, wistar albino cinsi ve herhangi bir patolojisi olmayan sağlıklı sıçanlardır. Hayvanlar standart pellet sıçan yemi (Bolu Kınacı Yem ve Un sanayiden alınan ticari sıçan yemi), çeşme suyu ile beslenmiş, yiyecek ve su kısıtlaması yapılmamıştır. 12 saat gece, 12 saat gündüz sirkadiyen ritimde, ortam sıcaklığı 20-26°C olacak şekilde çelik tel kafeslerinde muhafaza edilmişlerdir. Hayvanlara uygulanan bütün prosedür Düzce Üniversitesi Düzce Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırmaları Etik kurulu tarafından 22.09.2008 Tarih No: 100/11 sayılı kararı ile onaylanmıştır. Bu çalışma Düzce Üniversitesi Düzce Tıp Fakültesinde yapılmıştır.

3.2. Kullanılan Malzemeler ve Kimyasal Maddeler

3.2.1. Kullanılan Malzemeler:

Işık Mikroskobu (Olympus BX50, Japonya)
Mikrotom (LEICA RM 2245, Almanya)
Spektrofotometre (StatFax 1904, Awareness Technology, ABD)
Derin dondurucu (Uğur, Türkiye)
Vorteks karıştırıcı (MS1 MINISHAKER, ThermoFisher Scientific, ABD)
Hassas terazi (Presica XB220A, İsviçre)
Otomatik pipetler (Eppendorf, Almanya)
pH metre (Mettler, Seven Easy pH Meter, Çin)
Manyetik karıştırıcı (Heidolph DIAX 900 homogenizer, Fisher Scientific, Malezya)
Homojenizatör (Ultra-Turrax T25, IKA; Werke 24,000 r.p.m.j. Almanya)
ELIZA cihazı (Bio-Tek ELx808, Ultra Microplate Reader, İngiltere)
37°C'yi sağlayabilmek için inkübasyon çemberi (Nüve EN-055, İndem, Türkiye)
Santrifüj (Nüve NF 1215, Türkiye)

3.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Monokrotaline (MCT) (Sigma-Aldrich; İsviçre), 0.1 N HCL'de çözüldü ve pH~7'ye gelecek şekilde, 0.1 N NaOH ile nötralize edildi.¹⁴²

Pirolidine ditiokarbamat (PDTC) (Sigma-Aldrich; İsviçre), %0.9'luk (a/h) NaCl'de çözüldü.

Sodyum Azit (Merck, Almanya)

n-Butanol (Merck, Almanya)

1,1,3,3-tetraetoksipropan (Sigma-Aldrich; İsviçre)

Formol (Merck, Almanya)

Tiyobarbitürik asit (TBA) (Merck, Almanya)

Hemotoksilen Eozin

Gomori Trikróm boyası

Toplam Antioksidan Kapasite (TAK) tayini için kullanılan ELİSA kiti (ImAnox ELİSA kiti, Almanya)

Kit içeriği:

1- 2 parça Mikroplate

2- 3 adet kalibratör (0,5, 10, 20, 40, 100 U/ml) (liyofilize)

3- 3'er adet Kontrol (Kontrol 1 ve Kontrol 2) (liyofilize)

4- 1 adet 0.25 ml Peroksit çözeltisi

5- 1 adet 1.5 ml Reaksiyon tamponu A

6- 1 adet 1.5 ml Reaksiyon tamponu B

7- 1 adet 35 µl Enzim çözeltisi

8- 1 adet 11 ml STOP solüsyonu

9- 1 adet 5 ml Rekonstitüsyon solüsyonu

3.3. Deney Grupları

Çalışmalarda kullanılan deney hayvanları 4 gruba ayrılmıştır. Bu gruplar ve yapılan ilaç uygulamaları aşağıdaki tabloda yer almaktadır.

Tablo-3.1 Deney gruplarına göre ilaç uygulaması

Deney Grubu	N	Uygulama
I (Kontrol)	6	Serum fizyolojik (i.p) ¹⁴³ Deneyler süresince her gün
II (MCT)	6	60 mg/kg MCT (i.p) Deneylerin birinci günü, tek uygulama ^{144,150}
III (MCT+PDTC)	6	60 mg/kg MCT (i.p) Deneylerin birinci günü, tek uygulama + 100 mg/kg PDTC (i.p) (3 ve 28. günler arasında her gün, günde bir kez, tedavi amaçlı) ¹⁴⁵
IV (PDTC)	6	100 mg/kg PDTC(3 ve 28. günler arasında her gün, günde bir kez i.p) ¹⁴⁵

3.4. Örneklerin Alınması

Deney sonunda ketamin 50mg/kg dozunda i.p olarak sıçanlara uygulandı. Anestezik madde uygulanması işleminin ardından sıçanlar dekapite edildiler ve karaciğerleri alınarak örneklerin bir kısmı serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra, histopatolojik inceleme için %10'luk formalin tampon çözeltisinde sabitlendi. Karaciğerlerden alınan diğer doku örnekleri de biyokimyasal değerlendirmeler için -80 °C'deki derin dondurucuda saklandı.

3.5. Yöntem

3.5.1. Biyokimyasal Çalışmalar

Karaciğer Dokusunda MDA ve TAK Tayini

Sıçanların donmuş karaciğer örnekleri tartılarak (yaklaşık 500 mg), 1:9 (a/h) oranında %1.15 soğuk KCl solüsyonu içinde homojenize edildi. İşlem sonunda elde edilen homojenatlar 4000 rpm’de, 10 dakika santrifüj edildi. Daha sonra elde edilen süpernatantlar MDA ve TAK düzeylerini ölçmek için kullanıldı.

MDA Tayini

Malondialdehitin tayini karaciğer dokusundaki lipid peroksidasyonu göstermektedir. Bu amaçla lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA oluşumu ölçümü esasına dayanan tiobarbitürat reaksiyonu kullanıldı.^{66,146} Bu spektrofotometrik olarak MDA’nın asidik ortamda tiyobarbitürik asit ile oluşturduğu pembe rengin optik dansitesinin 535 nm’de ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

MDA ölçümü yapabilmek için hazırlanan karaciğer homojenatlarının 0,5 ml’si 10 ml’lik kapaklı cam deney tüplerine konularak üzerlerine 3 ml %1’lik (h/h) fosforik asit ve 1 ml %0,6’lık TBA solüsyonu eklendi. Karıştırma işleminden sonra 45 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Soğutmadan sonra örneklerin üzerine 4 ml n-Butanol eklendi ve yeniden karıştırıldı. 3000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildikten sonra, organik tabaka ayrıldı. Süpernatantın absorbansı, 535 nm dalga boyunda, spektrofotometrede, suya karşı (kör) okutuldu. 1,1,3,3 -tetraetoksipropan, standart olarak kullanıldı. Standartlar, 5-20 nmol/ml arası konsantrasyonlarda hazırlandı ve çizilen kalibrasyon grafiğinden, numunedeki MDA miktarı nmol/ml olarak hesaplandı ve sonuçlar ise nmol/g doku olarak verildi.

Toplam Antioksidan Kapasite

TAK'ı belirlemek için ImAnOx ticari kiti kullanıldı. ImAnOx ticari kiti, in-vitro çalışmalarda kullanılabilen ve TAK'ın kantitatif tayini için tasarlanmış bir fotometrik test sistemidir. Bu sistemde antioksidan kapasitenin tayin edilmesi, numunedeki antioksidanların, belirli miktardaki ekzojen hidrojen peroksit ile reaksiyon vermesi esasına dayanır. Numunedeki antioksidanlar, sağlanan hidrojen peroksinin belirli bir miktarını elimine etmektedir. Kalan hidrojen peroksit, kromojen'nin renkli bir ürüne dönüşümünü içeren enzimatik bir reaksiyonla, fotometrik olarak tayin edilebilmektedir.

Bu yöntemde belirli bir zaman aralığında, uygulanan ve ölçülen peroksit konsantrasyonları arasındaki fark, örnekteki antioksidanların reaktivitesi (antioksidan kapasite) ile orantılıdır. Kantitatif ölçüm, kalibratörle sağlanmaktadır.

Reaktiflerin Hazırlanması

Tüm reaktifler 2-8°C'de, kalibratör ve kontroller ise -20 °C'de saklanmıştır. Reaktiflerin hazırlanması ve daha sonra numunelerdeki ölçümü, ImAnOx kiti kullanım kılavuzunda belirtilen şekilde aşağıdaki gibi yapılmıştır:

1. 10'ar µl numune, CAL ya da CTRL 1, CTRL 2; uygun kuyucuklara pipetlenmiştir.
2. 100 µl Reaktif 1 eklenmiştir.
3. 37°C'de, 10 dakika boyunca inkübasyon yapılmıştır.
4. 100'er µl Reaktif 2a ve Reaktif 2b sırayla eklenmiştir.
5. Oda sıcaklığında, 5 dakika boyunca enkübe edilmiştir.
6. 50 µl Stop solüsyonu (STOP) eklenmiştir.

Stop solüsyonu eklenmesinin hemen ardından, 450 nm de ELIZA cihazında ölçüm gerçekleştirilmiştir.

Sonuçların Değerlendirilmesi

Enzimli ve enzimsiz ölçülen numunelerin optik dansite değerleri arasındaki fark (ΔOD), antioksidan kapasite ile ters orantılıdır. ΔOD değerini bulmak için, numunelerin enzimli ölçülmüş OD değerlerinden, enzimsiz ölçülmüş OD değerleri çıkartılmıştır. Daha sonra antioksidan kapasite, aşağıdaki formülle hesaplanmıştır:

$$\text{Antioksidan kapasite } (\mu\text{mol/l}) = 392 - (392 - \text{Kalibratör Konsantrasyonu}) * \frac{\Delta OD_{\text{numune}}}{\Delta OD_{\text{kalibratör}}}$$

3.5.2 Histopatolojik Çalışmalar

Daha önce tarif edildiği gibi karaciğer doku örnekleri %10'luk formalin çözeltisi ile tesbit edilerek dehidratasyon ve şeffaflaştırma işlemleri sonrası parafine gömülmüştür. Bu parafin bloklardan 3 μm kalınlığında seri kesitler hazırlanmıştır. Daha sonra, kesitler ışık mikroskopunda incelenebilmesi için HE, kollajen liflerin görülmesi için de Gomori Trikróm boyası ile boyanmıştır.¹⁴⁷⁻¹⁴⁹ Hazırlanan örnekler, Olympus BX50 ışık mikroskopunda incelenerek resimleri çekilmiştir.

Karaciğerlerde oluşan patolojik değişikliklerin derecesini ifade edebilmek için, yapılan semikantitatif değerlendirmede, hasar skorlaması yapılmıştır.^{144,145,150,151} Her bir karaciğer için, portal alanda hemoraji/konjesyon, enflamasyon, kollajen artışı, karyomegali, piknotik çekirdek/apoptotik hücre belirlenmiştir. Bu hasarları, skorlayabilmek için kullandığımız yöntemde belirgin hasarın göstergesi olarak (+) ile yoğun (ağır) derecede hasarın göstergesi olarak (+++++) kullanılmıştır. Hasar görülmemiş ise: 0, minimal hasar: $\pm$, fokal hasar: +, hafif derecede hasar: ++ ve orta derecede hasar için: +++ değerleri verilmiştir. Ayrıca ($\pm$) sembolü, bazı bölgelerin hasarlı (artı işareti), bazı bölgelerin hasarsız (eksi işareti) olduğunu belirtmek için kullanılmıştır. Daha sonra '0' sembolü, normal doku görünümü olarak değerlendirilmiş ve işaretlere sayısal değerler verilmiştir: bir + sembolü 10 puan, bir $\pm$ sembolü 5 puan ve bir '0' sembolü 0 puan olarak kabul edilmiştir. Bulgular kısmında değerlendirmeler sayısal olarak ifade edilmiştir.

3.6. Bulguların Değerlendirilmesi

Deneylerde elde edilen bulgular ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. Gruplar arasındaki anlamlı fark olup olmadığının belirlenmesi için önce ANOVA yapılmıştır. Anlamlılık belirlenmişse post test olarak Student Neuman Keuls testi kullanılmıştır. $P < 0.05$ değeri anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Araştırmamızın bulgularını sunduğumuz bu bölümde kontrol grubuna göre anlamlı hiçbir değişiklik belirlenemediğinden PDTC grubuna ait sonuçlar verilmemiştir.

4.1. MDA ve TAK

MCT enjeksiyonu uygulamasına bağlı olarak karaciğer hasarı oluşturulmuş sıçanlarda kontrol grubuna göre doku MDA düzeyinin belirgin şekilde yüksek olduğu tesbit edilmiştir. Tablo 4.1’de görüldüğü gibi, kontrol grubundaki sıçanların ortalama MDA düzeyi $0,012 \pm 0,0008$ nmol/mg protein iken, MCT grubundakilerin ortalama MDA düzeyi $0,017 \pm 0,0004$ nmol/mg protein olarak belirlenmiştir. Monokrotalin uygulamasına bağlı olarak artan MDA düzeyleri MCT+PDTC grubunda anlamlı olarak azalmıştır ($0,011 \pm 0,0004$ nmol/mgprotein) (Tablo-4.4). Kontrol grubundaki sıçanlar ve sadece PDTC enjekte edilen sıçanlar arasında ise, MDA düzeyi açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Tablo-4.1. Doku MDA değerleri

Deney Grubu	n	MDA (nmol/mg protein)
Kontrol	6	$0,012 \pm 0,0008$
MCT	6	$0,017 \pm 0,0004^*$
MCT+PDTC	6	$0,011 \pm 0,0004^\dagger$

* $p < 0.05$, Kontrol ve MCT grupları arasındaki anlamlılık $^\dagger p < 0.05$, MCT ve PDTC grupları arasındaki anlamlılık

Deneylerimizde kontrol grubu ve MCT uygulaması yapılan gruplarda TAK düzeyleri açısından önemli bir değişiklik belirlenmemiştir ($0,58 \pm 0,03$ μ mol/mg protein’den $0,50 \pm 0,03$ μ mol/mg protein’e indi). Ancak PDTC ile tedavi edilen sıçanlarda, TAK düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ($0,70 \pm 0,01$ μ mol/mg protein) (Tablo-4.3). Kontrol grubundaki sıçanlar ve sadece PDTC enjekte edilenler arasında, TAK düzeyi bakımından anlamlılık belirlenmemiştir.

Tablo-4.2. Doku TAK değerleri

Deney Grubu	n	TAK ($\mu\text{mol/mg protein}$)
Kontrol	6	$0,58 \pm 0,03$
MCT	6	$0,50 \pm 0,02$
MCT+PDTC	6	$0,70 \pm 0,01^\dagger$

* $p<0.05$, Kontrol ve MCT grupları arasındaki anlamlılık; $^\dagger p<0.05$, MCT ve MCT+PDTC grupları arasındaki anlamlılık

4.2.Histopatoloji sonuçları

Araştırmamızda karaciğerdeki morfolojik değişiklikler; konjesyon/hemoraji, enflamasyon, kollajen artışı, yağlanma (vakuolizasyon), karyomegali, apoptotik hücre/piknotik çekirdek varlığı açısından değerlendirilmiştir. Bu değişikliklerin semikantitatif değerlendirilmesi Tablo-4.3, Tablo-4.4 ve Resim-1, 9 (Kontrol) Resim-2, 3, 4, 6, 10'de verilmiştir. Işık mikroskopik incelemede; MCT verilen grupta; konjesyon/hemoraji, enflamasyon, kollajen artışı, yağlanma (vakuolizasyon), karyomegali, piknotik çekirdek/apoptotik hücre dahil tüm değerlendirme kriterlerimiz açısından bakıldı ve kontrole göre anlamlı bir kötüleşme olduğu saptandı (Resim-2, 3, 4, 6, 10). Diğer taraftan MCT+PDTC grubunda konjesyon/hemoraji, enflamasyon, karyomegali, piknotik çekirdek/apoptotik hücre ve sayısında anlamlı bir azalma belirlenmiştir (Tablo-4.3 ve 4.4 Resim-5, 7, 11). Kontrol grubundaki sıçanlar ve sadece PDTC enjekte edilen sıçanlar arasında, karaciğerin histopatolojik açıdan incelenmesi sonucunda elde edilen bulgular bakımından anlamlı bir fark tesbit edilmemiştir (Tablo-4.3, Tablo 4.4 ve Resim-1, 8, 9, 12).

Tablo 4.3. Karaciğerde morfolojik değişikliklerin semikantitatif değerlendirilmesi

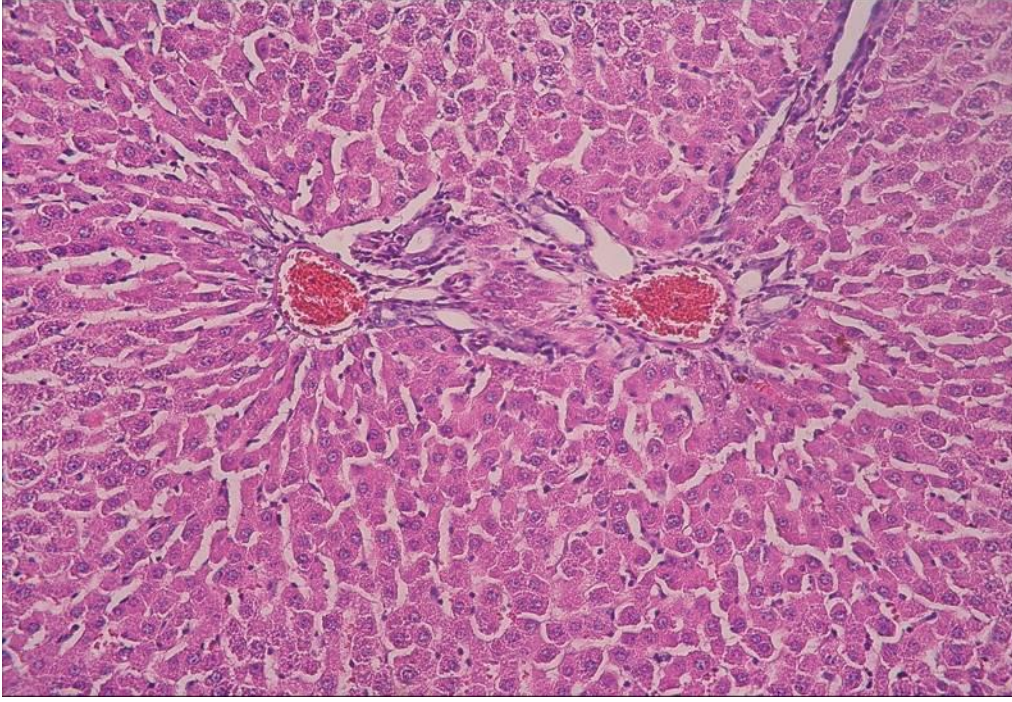
Deney Grubu	n	Hemoraji / Konjesyon	Enflamasyon	Yağlanma (vakuolizasyon)	Kollajen artışı
Kontrol	6	0,83 ± 0,83	3,33 ± 1,05	2,5 ± 1,12	0 ± 0
MCT	6	14 ± 2,24*	25 ± 5*	26,6 ± 4,22*	23,3 ± 2,12*
MCT+PDTC	6	8,33 ± 1,05*†	8,33 ± 1,05†	15 ± 2,24†	11,6 ± 1,7 *†

*p<0.05, Kontrol ve MCT grupları arasındaki anlamlılık; †p<0.05, MCT ve MCT+PDTC grupları arasındaki anlamlılık

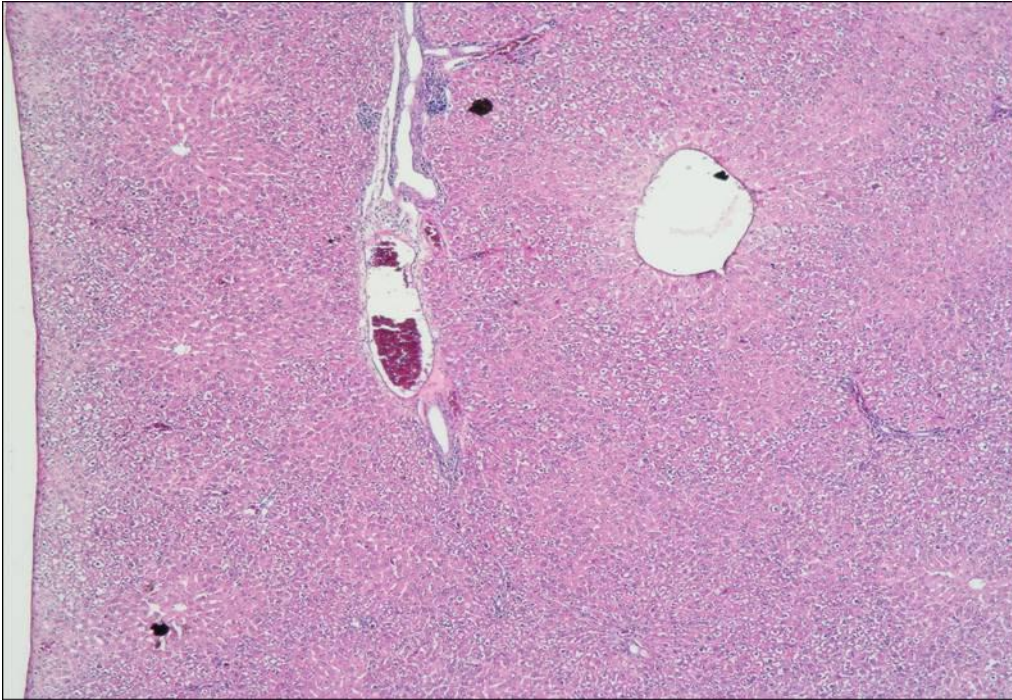
Tablo-4.4. Karaciğer hücrelerindeki çekirdek değişikliklerinin semikantitatif değerlendirilmesi

Deney Grubu	n	Dev Çekirdek (Karyomegali)	Piknotik çekirdek / apoptotik hücre
Kontrol	6	0 ± 0	0 ± 0
MCT	6	25 ± 3,42*	25 ± 3,42*
MCT+PDTC	6	8,33 ± 1,7*†	10 ± 0*†

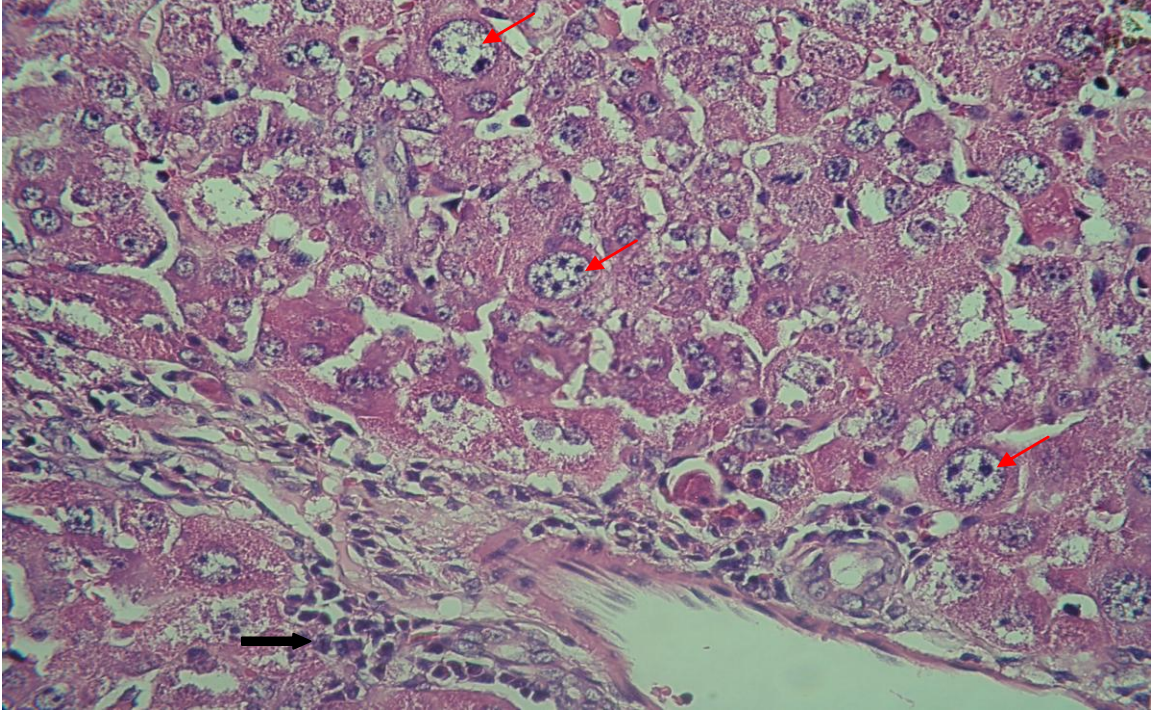
*p<0.05, Kontrol ve MCT grupları arasındaki anlamlılık; †p<0.05, MCT ve MCT+PDTC grupları arasındaki anlamlılık



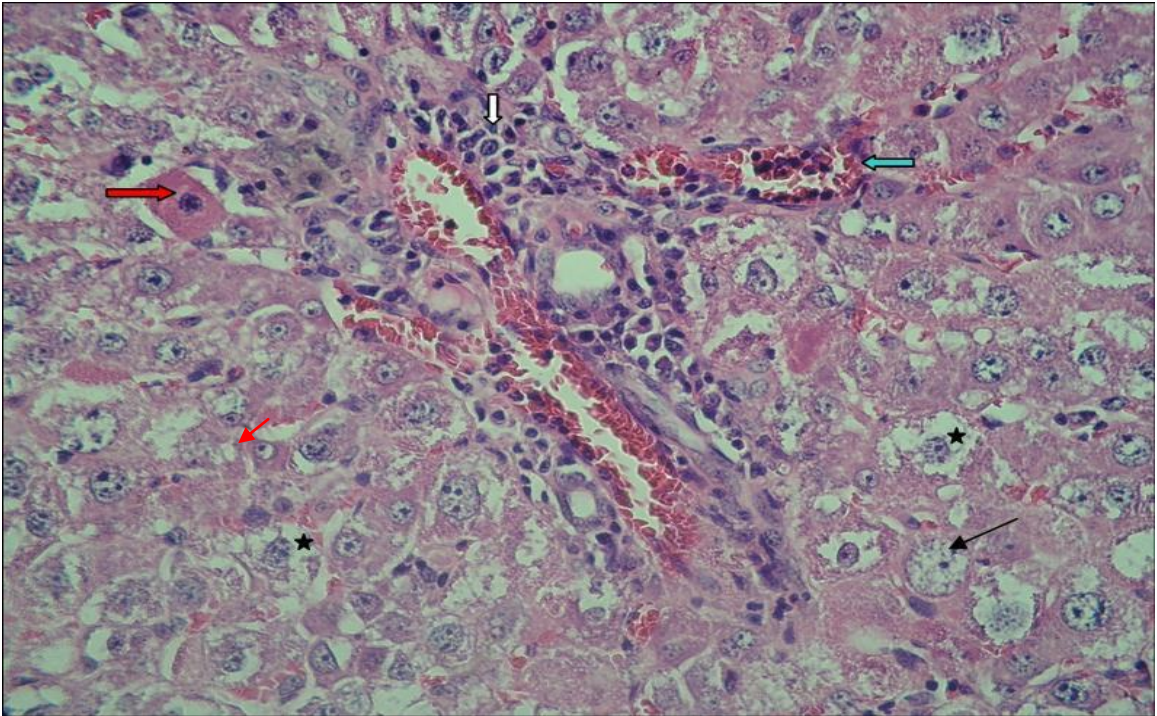
Resim-1. Kontrol grubu; normal karaciğer dokusu HE x200



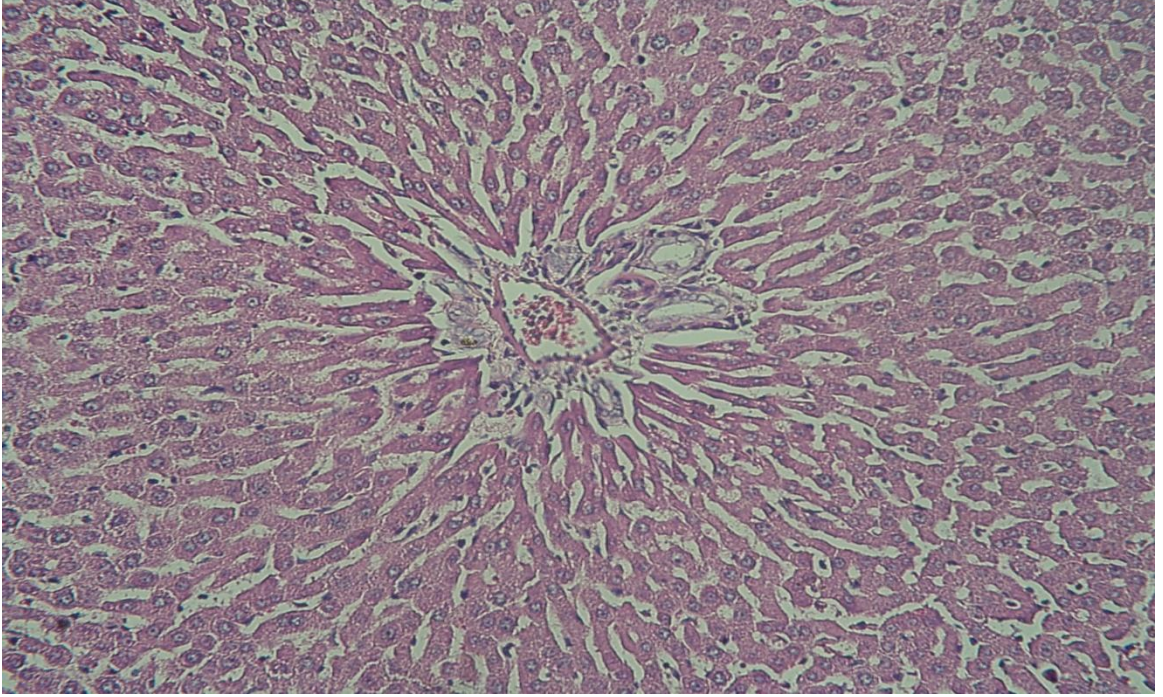
Resim-2. MCT grubu; hasarın portal alan çevresinde olduğu görülüyor. HE x40



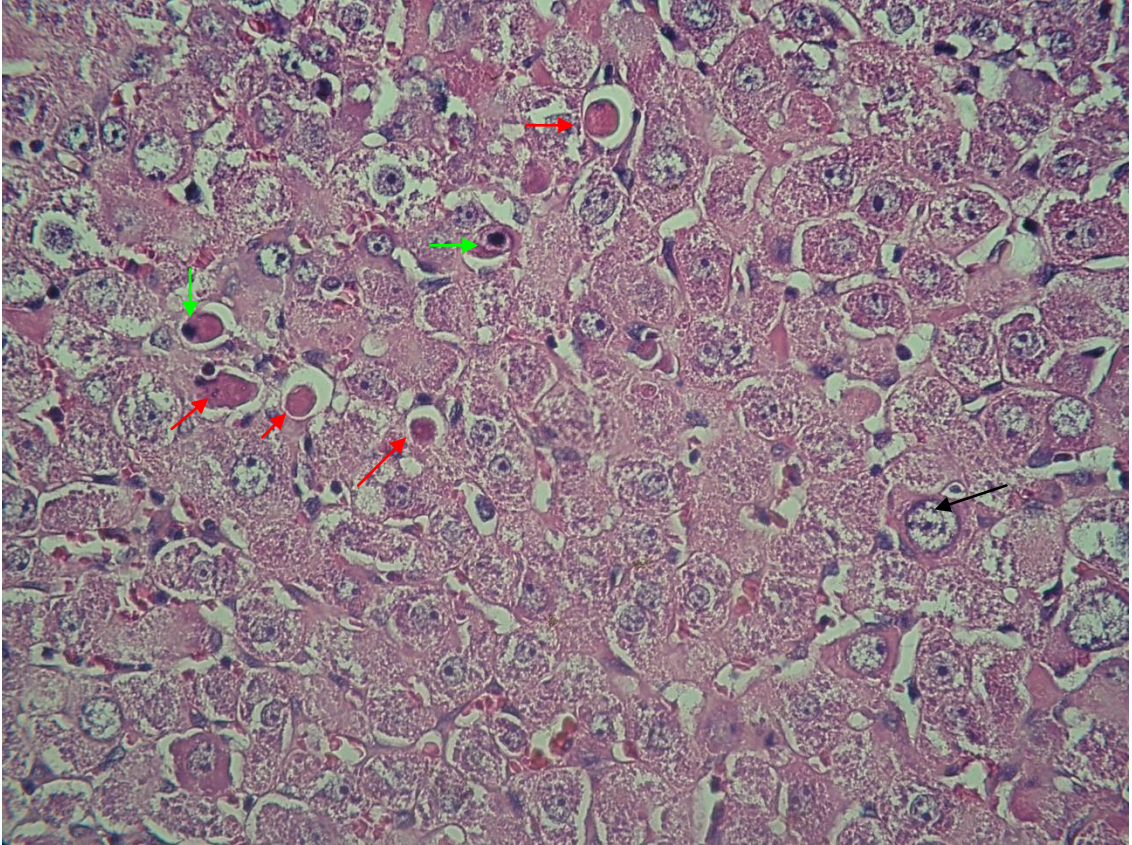
Resim-3. MCT grubu; Portal alanda enflamatuvar hücreler(➡) hepatositlerde karyomegali (➡) görülüyor. HE x400



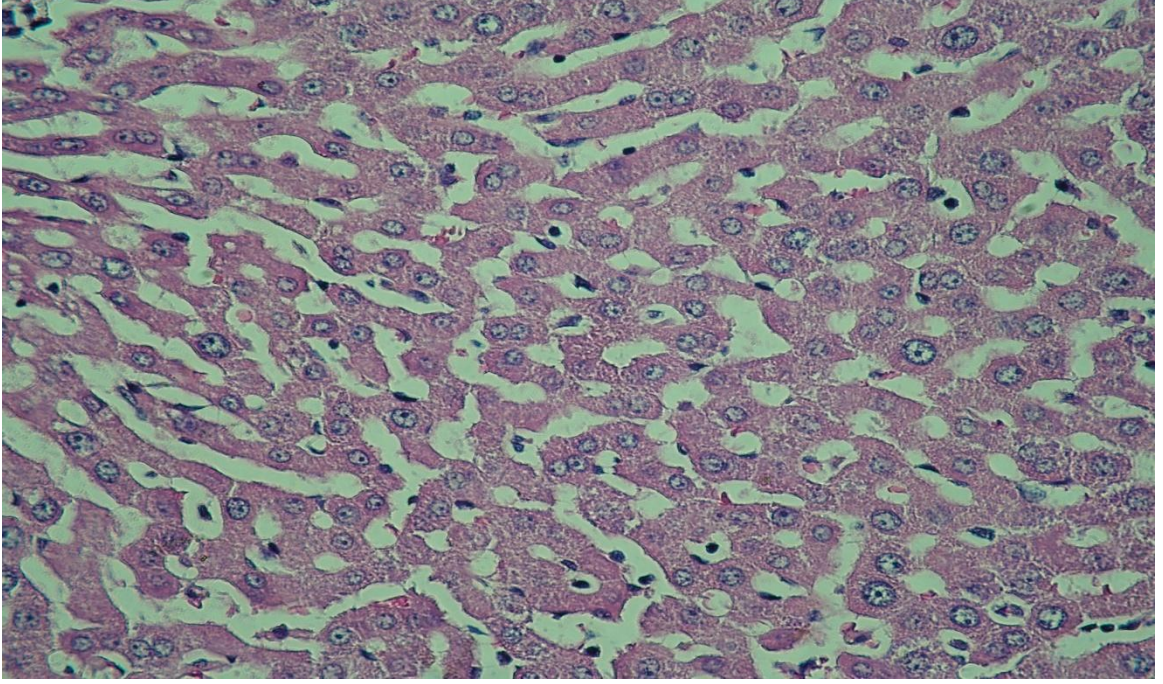
Resim-4. MCT grubu; Portal alanda enflamatuvar hücreler (↱), konjesyon ve hemoraji (↔), apoptotik hücre (piknotik çekirdek) (➡), hepatositlerde karyomegali (➡), yağlanma (vakuolizasyon) (★) görülüyor.



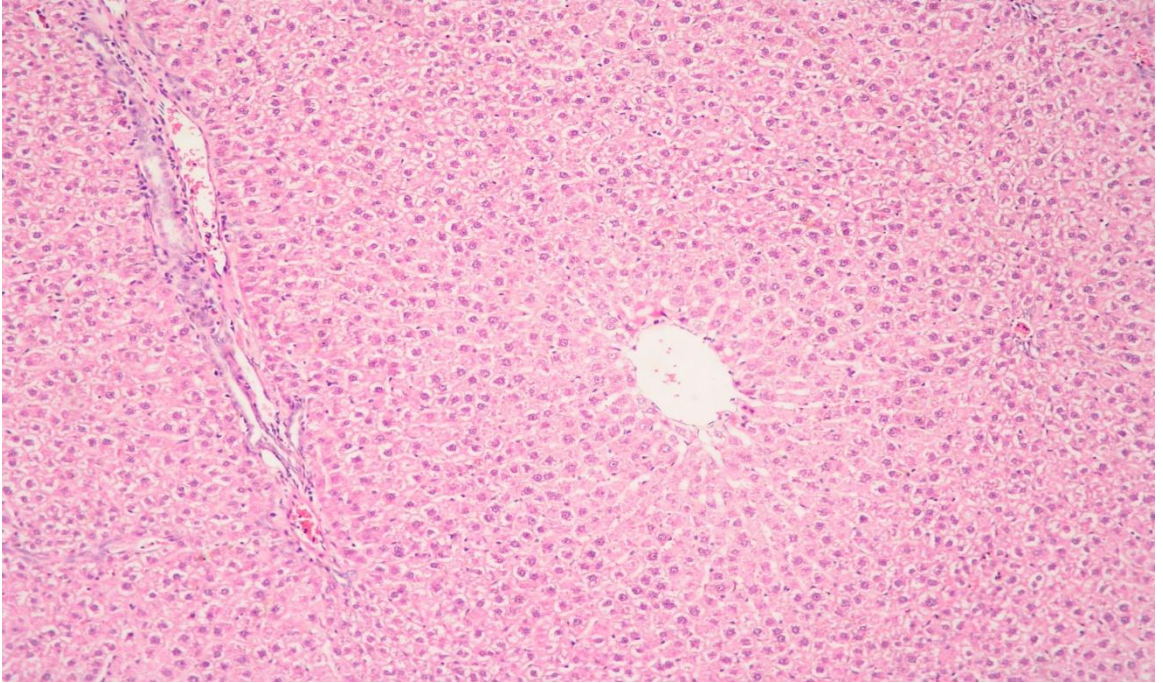
Resim-5. MCT-PDTC grubu; portal alan normal görünüyor. HE x200



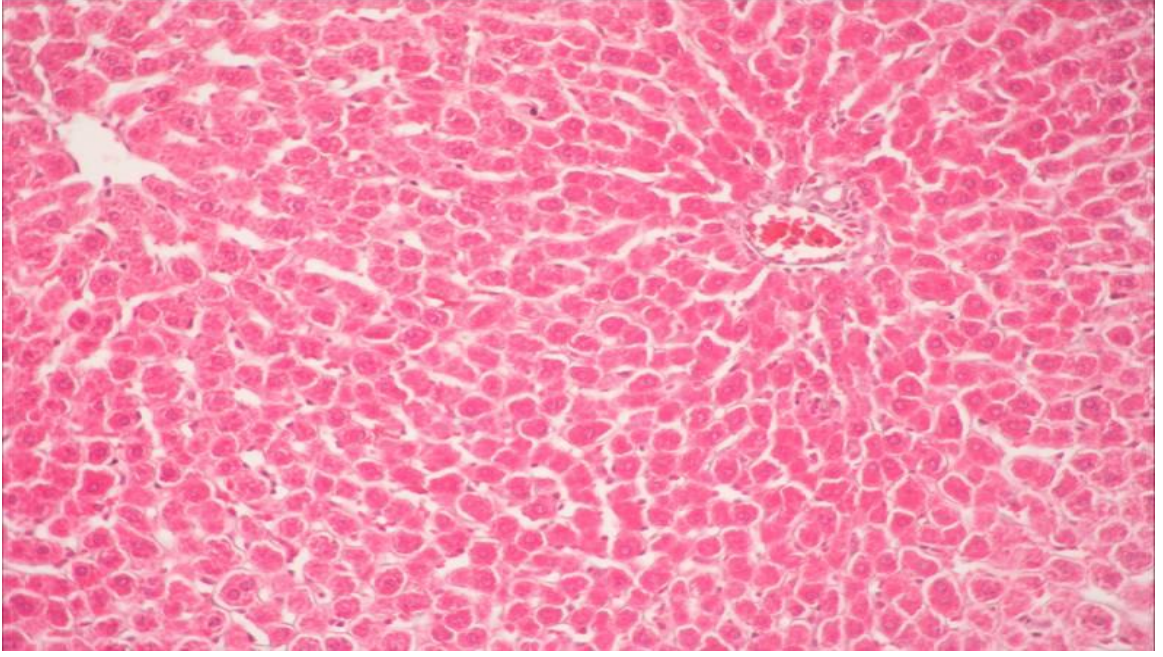
Resim-6. MCT grubu; Apoptotik hücreler(→) [(çekirdekte piknoz(→)], hepatositlerde karyomegali (↗) görülüyor. HE x400



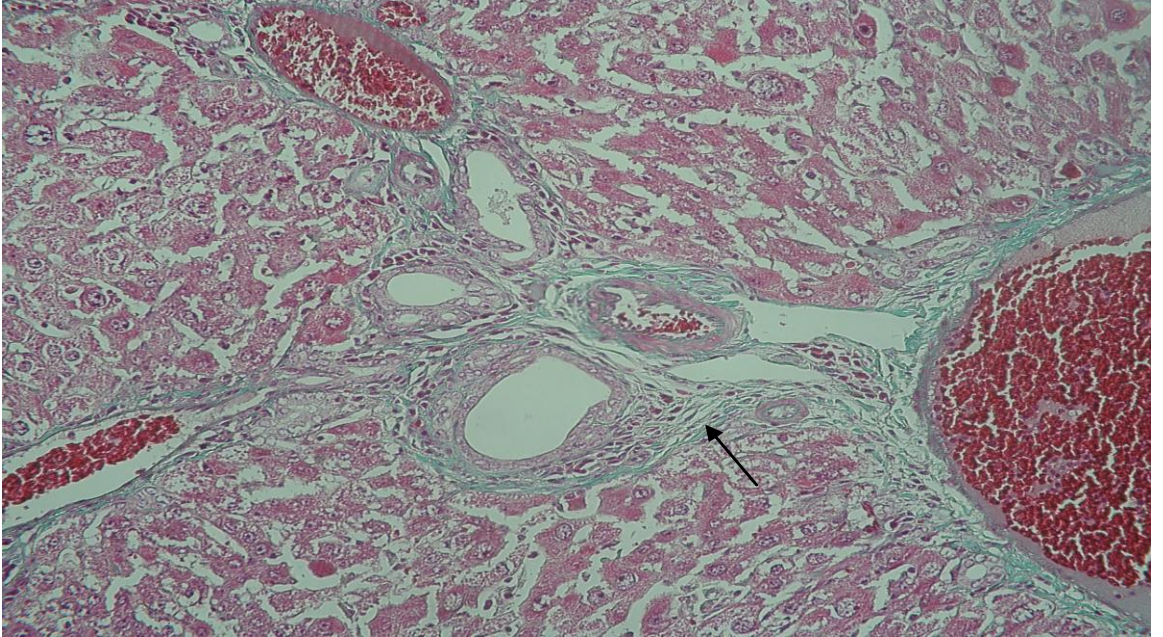
Resim-7. MCT-PDTC grubu; hepatositler normal görünüyor. HE x400



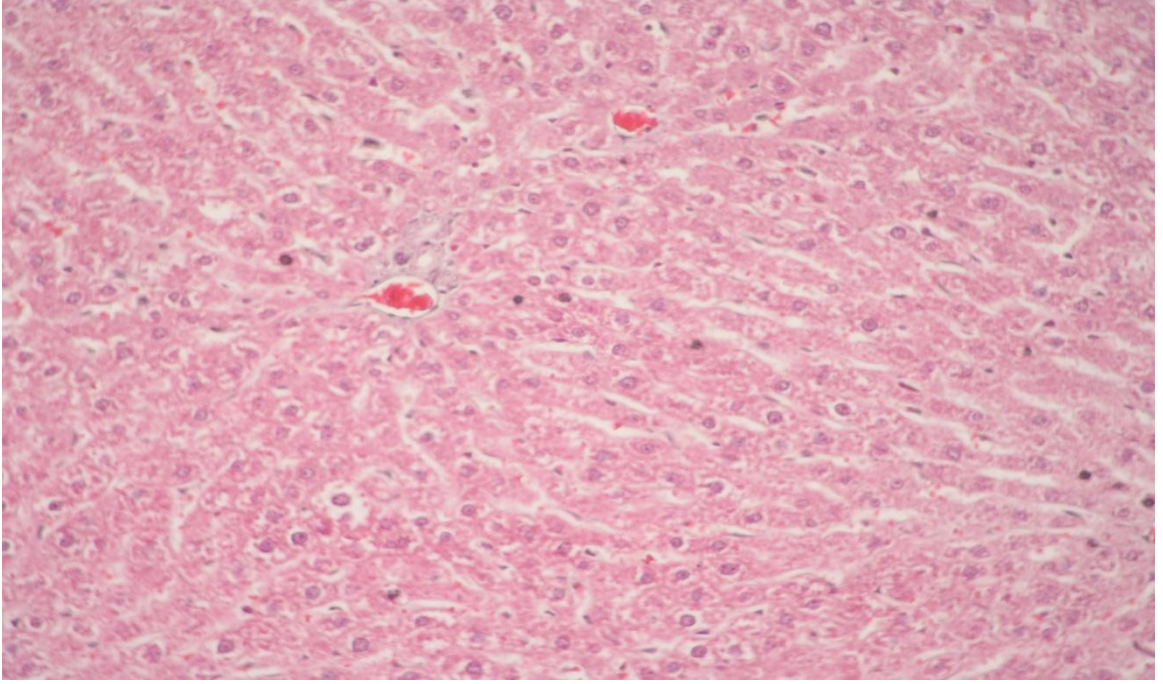
Resim-8. PDTC grubu; karaciğer dokusu normal görünüyor. Portal alan, vena centralis
HE x200



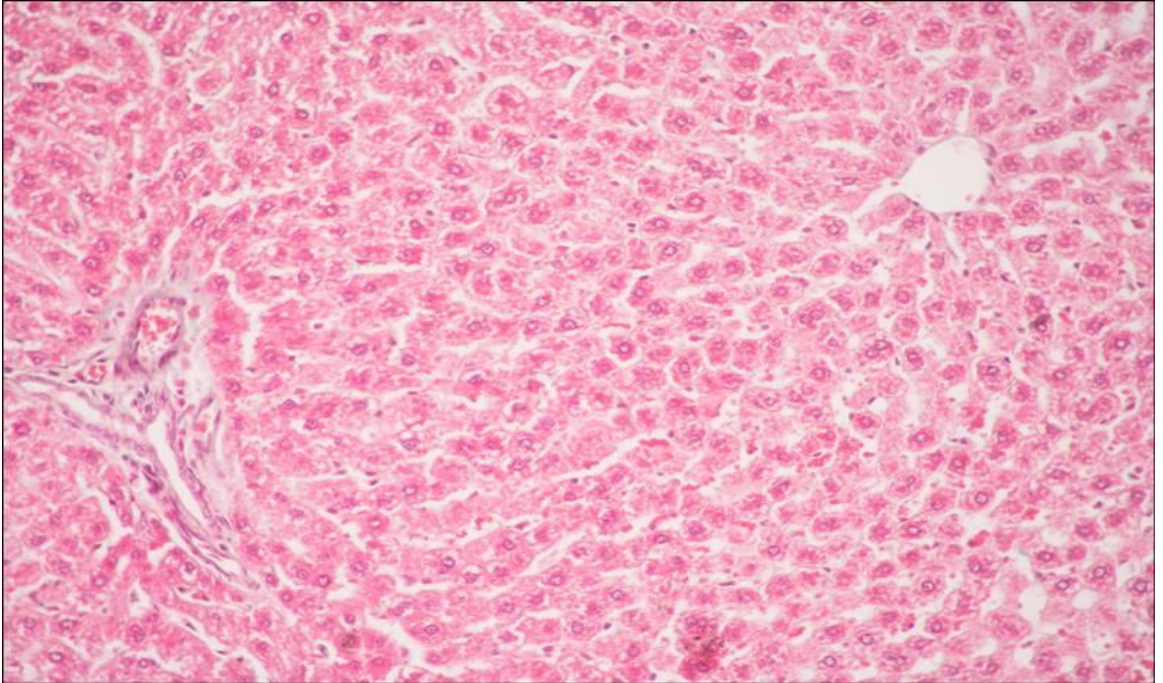
Resim-9. Kontrol grubu; normal karaciğer dokusu. Gomori üçlü boya x200



Resim-10. MCT grubu; Portal alanda kollajen lif artışı (↘) görülüyor.
Gomori üçlü boya x400



Resim-11. MCT-PDTC grubu; karaciğer dokusu normal görünüyor.
Gomori üçlü boya x200



Resim-12. PDTC grubu; karaciğer dokusu normal görünüyor. Gomori üçlü boya x200

5. TARTIŞMA

Araştırmamızda, MCT'nin indüklediği hepatotoksisite modelinde hem bir antioksidan hem de NFκB inhibitörü olan PDTC'nin etkinliğinin araştırılması planlanmıştır. Bunun için, karaciğer dokusunda oksidatif stres, enflamasyon, hemoraji /konjesyon, kollajen artışı, yağlanma, karyomegali, piknotik çekirdek/apopitotik hücre sayısının artışı açısından değerlendirmeler yapılmıştır. Sonuçlarımız PDTC uygulamasına bağlı olarak 1. Lipit peroksidasyonunun inhibe edildiğini, 2. Karaciğerde enflamasyon, hemoraji /konjesyon, yağlanmanın (vakuolizasyon) azaldığını ve kollajen artışının engellendiğini 3. Piknotik çekirdek ve apopitotik hücre sayısında azalma oluştuğunu 4. Karyomegali skorunun da düştüğünü ortaya çıkartmıştır.

Bu araştırmada sıçanlarda hepatotoksisite oluşturmak için MCT, tek doz olacak şekilde, 60mg/kg dozda i.p olarak verilmiş ve 28 gün beklenmiştir.^{144,151} Literatürde benzer deney protokollerinde 150-160 mg/kg, 300 mg/kg hatta farelerde 500 mg/kg dozlarda MCT'nin hepatotoksisite oluşturmak amacıyla kullanıldığı görülmektedir. Bu dozlar bizim seçtiğimiz doza göre çok yüksektir. Konuyla ilgili araştırmalar incelendiğinde dozun seçiminde, çalışılacak parametreler, izlenecek olayların akut ya da kronik süreçte değerlendirilecek oluşu gibi faktörlerin dikkate alınmış olabileceği düşünülebilir. Örneğin MCT'nin 300 mg/kg kullanıldığı araştırmalarda erken dönem toksisite belirtileri 8 saat içinde görülmektedir.¹⁵²

Diğer taraftan MCT'nin doz bağımlı bir şekilde 30 mg/kg'dan başlayarak hepatotoksik/hepatokarsinojenik olduğunun gösterilmiş olduğunu da vurgulamak gerekir.^{137,153} Bu nedenle daha önce benzer araştırmalarda da kullanılan seçtiğimiz doz deney amacımıza uygundur. Ayrıca yine bu dozda kullanılan MCT, karaciğer hasarı ve portal hipertansiyonun deneysel modelini oluşturmak amacıyla da önerilmiştir.¹⁵⁴

Yukarda sözü edilen MCT toksisitesinin erken döneminde, sinuzoidal endotel hücrelerde, santral venüler endotel hücrelerde hasar oluşmakta ve hepatik parankimal hücreler harabiyete uğramaktadır.^{130,153,155} Daha sonra ise santral ve sublobular venlerde

fibrotik oklüzyonlar ile sinuzoidal fibrozis oluşmaktadır. Bu nedenle MCT, hepatik veno-oklusif hastalığın deneysel modeli olarak da kullanılmaktadır.¹⁵⁵

ROT'ların çok sayıda karaciğer hastalığının patogeneze katıldığı bilinmektedir.¹⁵⁶ Bu nedenle de değişik deneysel hepatik hasar modellerinde antioksidanların etkinliği uzun zamandır araştırmaların konusu olmaktadır.¹⁵⁷⁻¹⁵⁹ Bu araştırmanın konusu olan MCT bağımlı hepatoksisitenin mekanizması için de oksidatif stres üzerinde durulmaktadır.¹³⁸ Nitekim potent bir antioksidan olduğu bilinen beta karotenin karaciğer parankimasında MCT bağımlı enflamasyona karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir.¹⁴⁴ Bununla birlikte MCT bağımlı hepatotoksisite ve oksidatif stres ilişkisine yönelik literatürde fazla çalışma bulunmamaktadır. PDTC'nin bu modeldeki etkinliği ise ilk kez araştırılmaktadır.

Çalışmalarımızda MCT bağımlı hepatotoksisitede etkinliğini değerlendirmeyi amaçladığımız PDTC antioksidan özellikleri ile bilinmektedir.^{109,110} Araştırmamızın bulgularını bu açıdan değerlendirdiğimizde, karaciğer dokusunda, MCT enjeksiyonunun lipid peroksidasyonunu artırdığı, buna paralel olarak MDA düzeylerinin 0.012 ± 0.0008 nmol/mg protein'den 0.017 ± 0.0004 nmol/mg protein'e (n=6) çıktığı görülmektedir. Daha sonra bu artışın PDTC ile tedavi ettiğimiz sıçanlarda 0.011 ± 0.0004 nmol/mg protein düzeyine gerilediği saptanmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar, PDTC'nin kullanıldığı, karaciğer toksisitesininin başka modellerinde elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermektedir.^{160,161}

Deneyslerimizde TAK'ın belirlenebilmesi için de bir değerlendirme yapılmıştır. Çalışmamızın bu bölümünde kontrol ve MCT uygulaması yapılan gruplar arasında anlamlı bir fark izlenmezken (0.58 ± 0.03 μ mol/mg protein ve 0.50 ± 0.02 μ mol/mg protein) PDTC ile tedavi edilen sıçanlarda, TAK'de anlamlı bir artış saptanmıştır (0.70 ± 0.01 μ mol/mg protein). PDTC ile elde ettiğimiz bu sonuç aslında şaşırtıcı değildir. Çünkü kolestazis bağımlı hepatik hasar modelinde de PDTC'nin antioksidan enzim aktivitesini artırdığı belirlenmiştir.^{161,162}

MCT bağımlı toksisitede yukarıda sözü edilen durumların dışında enflamasyon da gelişmektedir. MCT bağımlı hepatoselüler hasarın enflamasyon nedeniyle oluşmasından ziyade, hasar nedeniyle enflamatuar hücre akümülyasyonunun gerçekleştiği düşünülmektedir.^{128,162} Daha önceki bölümlerde de belirtildiği gibi enflamasyon tablosuna ek olarak, MCT karaciğerde yoğun hemoraji, yağ infiltrasyonu, kollajen artışı ve hücre nekrozuna neden olmaktadır.

Araştırmamızda histopatolojik çalışmalar sonrasında sayılan parametreler açısından PDTC'nin bu tabloyu olumlu anlamda değiştirdiği net bir şekilde ortaya çıkmıştır (Tablo-4.3, 4.4, Resim-5, 7, 11) Bu sonucu yorumlarken PDTC'nin iki özelliği üzerinde durmak gerekir. Bunlardan birincisi PDTC'nin bizim araştırmamızda da gösterildiği gibi antioksidan özelliklerinin olmasıdır. Çünkü diğer fonksiyonlarının yanı sıra, ROT'lar reseptörden transkripsiyon faktörlerine uzanan hücresel yollarda sinyal iletimi açısından önemli aracılık görevleri üstlenirler. Bu görevlerden biri de ROT'ların proenflamatuvar sitokinlerin etkinliğini modüle edebilme işlevidir.^{163,164} Antioksidanlarla yapılan deneysel çalışmalardan benzer bulgular elde edilmiştir. Örneğin NAC'ın lipopolisakkarit ile oluşturulan endotoksik şok modelinde TNF, IL-6 ve IL-10 düzeylerini düşürdüğü gösterilmiştir.^{165,166} Bu durumda PDTC'nin MCT bağımlı karaciğer hasarında enflamasyona karşı koruyucu olması şaşırtıcı bir sonuç değildir.

ROT'ların ya da neden oldukları lipid peroksidasyonunun fibroblastlarda ve hepatik stellat hücrelerde siroza giden süreçte, kollajen gen ekspresyonunu ve proliferasyonunu stimüle ettiği ama bunun d- α - tokoferol ile inhibe edilebileceği gösterilmiştir.¹⁶⁷⁻¹⁶⁹ Buna benzer bir sonuç, MCT toksisitesinde β -karoten ile de elde edilmiştir. Biz de daha önceki araştırmalarda gösterildiği gibi PDTC'nin MCT'ye bağlı kollajen artışını inhibe ettiğini saptadık.

Çalışmamızda PDTC'nin etkinliğini karaciğerde yağlanma açısından da değerlendirdik. Aslında karaciğerde yağlanmanın da antioksidanlar tarafından önlenebileceğini gösteren araştırmalar vardır.^{170,171} Bizim bulgumuzda bu çalışmaları desteklemektedir.

Yukarıda histopatolojik sonuçları yorumlarken PDTC'nin antioksidan özelliği üzerinde durulmuştur. Değerlendirilen parametreler açısından üzerinde durulması gereken ikinci önemli PDTC özelliği ise, onun bir NF κ B inhibitörü olduğudur.³ Bilindiği gibi çok sayıda araştırma NF κ B aktivitesinde artışla, kanser de dahil olmak üzere değişik patolojiler arasında doğrudan ilişki kurmaktadır.³² Bu patolojik durumlar arasında karaciğere ilişkin sorunlar da bulunmaktadır.^{34,55,58} Bu hastalıklara ilişkin değişik deneysel modellerde NF κ B inhibitörlerinin patolojiyi düzeltmede etkin olduğu gösterilmiştir.^{34,172} Bu nedenle

sonuçlarımızı, PDTC'nin NFκB inhibitörü özelliğine sahip olması ile de açıklayabiliriz.^{160,161,173}

MCT ile yapılan çalışmalarda onkozis ve apoptozisin bir arada olduğu görülmüştür.¹³¹ Bazı araştırmacılara göre apoptozis, ATP bağımlı bir süreç olarak kabul edilmektedir.^{174,175} Bu araştırmacıların bulgularına göre fizyolojik koşullarda oluşan apoptozis, ATP eksikliğinde onkozis ve nekroza gitmektedir.¹⁷⁵ Diğer taraftan karaciğerde uzun süreli hipoksinin hücresel ATP düzeylerini azalttığı gösterilmiştir.¹⁷⁶ Bu gözlem MCT'nin apoptozisle hepatosit ölümünü başlatmasını açıklamaktadır. İlerleyen süreçte ise MCT toksisitesine bağlı olarak, koagülatif hepatik parankimal hücre onkozisi gerçekleştiği anlaşılmıştır.¹³⁰ Bu açıklamalara uygun olarak, retrorsin adlı başka bir pirolizidin alkaloidinin de karaciğerde onkozis ve apoptozise neden olduğu gösterilmiştir.^{131,177}

Yaptığımız çalışmada şiddetli hücre hasarına özgü çekirdek değişikliklerinin olduğu görüldü. Bunlar; piknotik ve dev çekirdekli (karyomegalik) hücrelerdi. Piknoz, çekirdek büzüşmesi ve bazofili artışı olarak tanımlanmakta olup nekroz ve apoptozisle ilgili süreçlerde izlenmektedir.¹⁷⁸

Çalışmamızda MCT ile ortaya çıkan çok sayıdaki piknotik çekirdek ve apoptotik hücrenin, PDTC ile önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Antioksidan ve radikal süpürücüsü olan PDTC'nin lenfosit ve tümör hücre kültürlerinde aynı etkiyi gösterdiği daha önceki çalışmalarda da gösterilmiştir.¹¹⁰ Buna ek olarak başka antioksidanlarla yapılan birçok çalışmada da piknotik hücre sayısının önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir.¹⁷⁹⁻¹⁸¹ Ortaya çıkan bu durum hasarlanan hücreyi ölüme götüren süreçte PDTC'nin koruyuculuğu hakkında ortak bir görüşün oluşmasını sağlamıştır.

MCT, sığır ve insan pulmoner arter endotel hücre kültürlerinde hücre siklusunun G₂ fazında kalıcı inhibisyonuna neden olmakta sonuçta da sitomegali ve karyomegali gelişmektedir.¹⁸² Karyomegali, genetik materyalin birikimiyle hücre çekirdeğinin genişlemesi durumu olarak tanımlanmaktadır.¹⁸³ Literatürde okratoksin ve sisplatinin gibi çeşitli maddelerin karyomegali oluşumuna neden olduğu ve bunun antioksidanlarla düzeltilebildiği ile ilgili yayınlar bulunmaktadır.^{184,185} Bu çalışmada da bir hepatotoksikan olan MCT'nin oluşturduğu karyomegalinin PDTC ile engellendiği gösterilmiştir.

Araştırmamızın bulguları, karaciğer patolojilerinde oksidatif stres, enflamasyon ve apoptotik süreçlerle ilişkili olaylarda NFκB ile ilişkili yolların potansiyel tedavi hedefi olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte karaciğerde farklı hücre tiplerinde NFκB'nin farklı fonksiyonlarının olabileceğini düşündüren araştırmalar da dikkate alınmalıdır. Bulgularımız PDTC'nin MCT bağımlı karaciğer hasarında koruyucu rolünü göstermesi açısından önemli olsa da bu molekülün bir ilaç olarak değerlendirilebilmesi için daha ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir.

6. SONUÇ

Araştırmamızda, MCT ile oluşturulmuş hepatotoksisite modelinde NF-κB inhibitörü PDTC'nin etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla öncelikle, doku düzeyinde, MDA ve TAK ölçümleri yapılmıştır. İkinci aşamada ise PDTC tedavisinin karaciğer dokusunda MCT'ye bağlı patolojiyi nasıl değiştirdiği araştırılmıştır. Sonuçlarımız MCT aracılıklı hepatotoksisitede PDTC'nin;

Lipit peroksidasyonunu inhibe ettiğini,

Karaciğerde hemoraji ve konjesyonu azalttığını,

Enflamasyonu azalttığını,

Yağlanmayı azattığını,

Kollajen artışını engellediğini

Piknotik çekirdek/apoptotik hücre ve karyomegalik hücre sayısını azalttığını göstermektedir.

Sonuç olarak, araştırmamızın bulguları, karaciğer patolojilerinde oksidatif stres, enflamasyon ve apoptotik süreçlerle ilişkili olaylarda PDTC'nin ve NFκB ile ilişkili yolların potansiyel tedavi hedefi olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte karaciğerde farklı hücre tiplerinde NFκB'nin farklı fonksiyonlarının olabileceği de unutulmamalıdır. Bulgularımız PDTC'nin MCT bağımlı karaciğer hasarında koruyucu rolünü göstermesi açısından önemli olsa da bu molekülün bir ilaç olarak değerlendirilebilmesi için daha ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir.

7. TÜRKÇE ÖZET

PIROLİZİDİN ALKALOİDİNİN NEDEN OLDUĞU HEPATOTOKSİSİTEDE NÜKLEER FAKTÖR KAPPA B İNHİBİTÖRÜ PİROLİDİN DİTİYOKARBAMAT'IN KORUYUCU ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

AMAÇ: Bu çalışma monokrotalinin (MCT) neden olduğu karaciğer hasarında bir antioksidan ve NFκB aktivasyon inhibitörü olan pirolidin dithiokarbamatın (PDTC) etkinliğini test etmek amacıyla yapılmıştır.

MATERYAL VE METOD: Bu araştırmada sıçanlar 4 gruba ayrılmıştır: 1. Kontrol grubu 2. MCT enjeksiyonu yapılan sıçanlar (60 mg/kg MCT i.p) 3. 60 mg/kg i.p MCT enjeksiyonunu takiben 3.günden 28.güne kadar 100 mg/kg/gün i.p PDTC enjeksiyonu yapılan grup (MCT+PDTC). 4. PDTC grubu (3 ve 28. günler arasında 100 mg/kg/gün i.p). 28 gün sonra bütün deney hayvanları dekapite edilerek karaciğerleri histolojik ve biyokimyasal çalışmalar için çıkartılmıştır. Çıkarılan dokularda MDA düzeyleri ve ImAnOx ticari kitleri kullanılarak total antioksidan kapasite TAK belirlenmiştir. Işık mikroskopik inceleme için dokular %10 formolde tespit edilerek, rutin takip sonrası parafine gömülmüş, HE ve Gomori üçlü boyama yöntemiyle boyanarak incelenmiştir.

BULGULAR: Monokrotalin uygulamasına bağlı olarak MDA düzeylerinin arttığı (0.012 ± 0.0008 nmol/mg protein ve 0.017 ± 0.0004 nmol/mg protein n=6), TAK düzeylerinin ise anlamlı olarak değişmediği belirlenmiştir (0.58 ± 0.03 μmol/mg protein ve 0.50 ± 0.02 μmol/mg protein n=6). MCT enjeksiyonu yapılan grubun tersine, MCT+PDTC uygulaması yapılan grupta MDA değerleri anlamlı olarak azalmış (0.011 ± 0.0004 nmol/mg protein n=6) TAK değerleri ise MCT verilen gruba göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (0.50 ± 0.03 μmol/mg protein ve 0.70 ± 0.1 μmol/mg protein n=6). Histopatolojik incelemeler, PDTC'nin MCT verilen sıçanlarda oluşan hemoraji-konjesyon, enflamasyon, kollajen artışı, yağlanma, karyomegali ve piknozisi önlediğini göstermiştir. (PDTC grubu ve kontrol grubu arasında ise anlamlı farklar gözlenmemiştir),

TARTIŞMA VE SONUÇLAR: Sonuç olarak, ROT'ların MCT bağımlı karaciğer hasarına katıldıkları gösterilmiştir. NFκB inhibitörü PDTC serbest radikal süpürücü özellikleri nedeniyle MCT verilmiş sıçanlarda karaciğer parankimasını korunmakta ve enflamasyonu azaltmaktadır. Bu nedenlerle PDTC'nin MCT bağımlı karaciğer hasarının gelişmesini azalttığı sonucuna vardık.

Anahtar kelimeler: Karaciğer, MCT, NFκB, PDTC

8. İNGİLİZCE ÖZET

EVALUATION OF PROTECTIVE EFFECTIVENESS OF PYRROLIDINE DITHIOCARBAMATE, INHIBITOR OF NF κ B ON PYRROLIZIDINE ALCALOID INDUCED HEPATOTOXICITY

OBJECT: The aim of the present study was to examine the efficacy of the pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC), an antioxidant and inhibitor of the NF- κ B activation, in monocrotaline (MCT) induced liver injury.

MATERIAL AND METHOD: In this study, rats randomized into four groups: 1. Control group, 2. MCT-injected rats (60 mg/kg MCT i.p) 3. MCT-injected rats treated with PDTC 100 mg/kg once daily i.p on days 3 to 28 (MCT+PDTC group) 4. PDTC injected group (100 mg/kg/day i.p on days 3 to 28). All rats were sacrificed after 28 days. Their livers are taken out for histologic and biochemical studies. It is detected MDA levels and TAS by commercially available ImAnOx kit on the removed tissue. For light microscopic analysis, the tissues are held in formol %10 and after routine processing embedded in paraffin and examined by staining HE and Gomori triple staining method.

FINDINGS: We observed that MDA levels were elevated (from 0.012 ± 0.0008 nmol/mg protein to 0.017 ± 0.0004 nmol/mg protein $n=6$) and TAS was not changed significantly (from 0.58 ± 0.03 μ mol/mg protein to 0.50 ± 0.02 μ mol/mg protein, $n=6$) by MCT. In contrast to the MCT-injected group, MDA levels were significantly decreased in the MCT+PDTC treated group (0.011 ± 0.0004 nmol/mg protein, $n=6$). TAS was significantly higher in MCT+PDTC treated rats when compared to MCT injected rats (from 0.50 ± 0.03 μ mol/mg protein to 0.70 ± 0.10 μ mol/mg protein $n=6$). Histopathological examination demonstrated that PDTC decreased significantly hemorrhage-congestion, inflammation, collagen deposition, steatosis, karyomegaly and pyknosis in MCT treated rats. (We do not observe any significant differences between PDTC and control group)

DISCUSSION AND CONCLUSIONS: In conclusion, it has been shown that ROS participate in MCT-induced liver injury. The free radical-scavenging properties of PDTC an NF- κ B inhibitor, are the basis of decreased inflammation and protected liver parenchyma in MCT treated liver. Therefore, we conclude that PDTC reduces the development of MCT induced liver damage.

Keywords: Liver, MCT, NF κ B, PDTC

9. KAYNAKLAR

1. Vainer GW, Pikarsky E, Ben-Neriah Y. Contradictory functions of NF- κ B in liver physiology and cancer. *Cancer Lett* 2008; 267:182-188.
2. Chen F, Castranova V, Shi X, Demers LM. New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem* 1999 ;45:7-17.
3. Li YQ, Zhang ZX, Xu YJ, Ni W, Chen SX, Yang Z, Ma D. N-Acetyl-L-cysteine and pyrrolidine dithiocarbamate inhibited nuclear factor-kappaB activation in alveolar macrophages by different mechanisms. *Acta Pharmacol Sin* 2006;27:339-46.
4. Orrenius S, Nobel CS, van den Dobbela DJ, Burkitt MJ, Slater AF. Dithiocarbamates and the redox regulation of cell death. *Biochem Soc Trans* 1996;24:1032-38.
5. Malaguarnera L, Pilastro MR, DiMarco R, Scifo C, Renis M, Mazzarino MC, Messina A. Cell death in human acute myelogenous leukemic cells induced by pyrrolidinedithiocarbamate. *Apoptosis* 2003;8:539-45.
6. Hanumegowda UM, Copple BL, Shibuya M, Malle E, Ganey PE, Roth RA. Basement membrane and matrix metalloproteinases in monocrotaline-induced liver injury. *Toxicol Sci* 2003;76:237-46.
7. Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986 ;46:705-16.
8. Sen R. NF κ B and the immunoglobulin kappa gene enhancer. *J Exp Med* 2004;200:1099-102.
9. Doyle SL, O'Neill LA. Toll-like receptors:from the discovery of NF kappa B to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochem pharmacol* 2006;72:1102-13.

10. Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF κ B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J* 1995;9:899-909.
11. Gilmore T., <http://people.bu.edu/gilmore/nf-kb>.
12. Amin RH, Schlissel MS. NF-kappa B comes home. *Immunity* 2005;22:401-2.
13. Buzzelli MD, Nagarajan M, Radtka JF, Shumate ML, Navaratnarajah M, Lang CH, et al. Nuclear factor κ B (NF κ B) mediates the inhibitory effects of tumor necrosis factor- α (TNF) on growth hormone (GH)-inducible gene expression in liver. *Endocrinology* 2008;149:6378-88
14. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 2004 15;18:2195-224.
15. Ahn KS, Sethi G, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappa B: from clone to clinic. *Curr Mol Med* 2007;7:619-37.
16. Li X, Stark GR. NFkappa B-dependent signaling pathways. *Exp Hematol* 2002;30:285-96
17. Srivastava SK, Ramana KV. Focus on molecules: nuclear factor-kappa B. *Exp Eye Res* 2009; 88:2-3.
18. Tergaonkar V. NFkappaB pathway: a good signaling paradigm and therapeutic target. *Int J Biochem Cell Biol* 2006;38:1647-53.
19. Hofmann A, Baltimore D. Circuitry of nuclear factor κ B signaling. *Immunol rev* 2006;210:171-86.
20. Gilmore TD. Introduction to NF κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 2006;25:6680-84.
21. Perkins ND. and Gilmore TD. Good cop, bad cop: the different faces of NF- κ B. *Death and Differentiation* 2006;13:759-72.
22. Sun SC, Ley SC. New insights into NF-kappaB regulation and function. *Trends Immunol* 2008;29:469-78.
23. Senftleben U. Anti-inflammatory interventions of NF- κ B signaling: Potential applications and risks. *Biochem pharmacol* 2008;75:1567-79.

24. Dejardin E. The alternative NF- κ B pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development. *Biochem pharmacol* 2006;72: 1161-79.
25. Chariot A. 20 years of NF-kappaB. *Biochem Pharmacol* 2006; 72:1051-3.
26. Dixit V, Mak TW. NF-kappaB signaling. many roads lead to madrid. *Cell* 2002;111:615-9.
27. Courtois G, Gilmore TD. Mutations in the NF κ B signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene* 2006;25:6831-43.
28. Cortes SM., Rodriguez FV., Sanchez PI., Perona R. The role of the NFkappaB signaling pathway in cancer. *Clin Transl Oncol* 2008;10:143-7.
29. Garg A, Aggarwal BB. Nuclear factor- κ B as a target for cancer drug development. *Leukemia* 2002;16:1053-68.
30. Smahi A, Courtois G, Rabia SH, Döffinger R, Bodemer C, Munnich A, et al. The NF-kappaB signalling pathway in human diseases: from incontinentia pigmenti to ectodermal dysplasias and immune-deficiency syndromes. *Hum Mol Genet* 2002;11:2371-5.
31. Courtois G. The NF-kappaB signaling pathway in human genetic diseases. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:1682-91.
32. Kumar A, Takada Y, Boriek AM, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. *J Mol Med* 2004;82:434-48.
33. Kim WR, Brown RS, Terrault NA, El-Serag H. Burden of liver disease in the United States: summary of a workshop. *Hepatology* 2002;36:227-42.
34. Muriel P and Rivera-Espinoza Y. Beneficial drugs for liver diseases. *J Appl Toxicol* 2008;28:93-103.
35. Elsharkawy AM, Mann DA. Nuclear factor- κ B and the hepatic inflammation-fibrosis-cancer axis. *Hepatology* 2007;46:590-97.
36. Mackay IR. Hepatoimmunology: a perspective. *Immunol Cell Biol* 2002; 80: 36-44.
37. Racanelli V, Rehermann B. The liver as an immunological organ. *Hepatology* 2006;43:54-62.

38. Muriel P, Alba N, Pérez-Álvarez VM, Shibayama M, Tsutsumi VK. Kupffer cells inhibition prevents hepatic lipid peroxidation and damage induced by carbon tetrachloride. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2001;130:219-26.
39. Muriel P, Escobar Y. Kupffer cells are responsible for liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride. *J Appl Toxicol* 2003; 23:103-8.
40. Markiewski MM, DeAngelis RA, Lambris JD. Liver inflammation and regeneration: two distinct biological phenomena or paralel pathophysiologic processes? *Molecular Immunology* 2006;43:45-6.
41. Ribeiro PS, Cortez-Pinto H, Sola S, Castro RE, Ramalho Rm, Baptista A, et al. Heapatocyte apoptosis, expression of death receptors, and activation of NF-kappaB in the liver of nonalcoholic and alcoholic steatohepatitis patients. *Am J Gastroenterol* 2004;99:1708-17.
42. Wullaert A, van Loo G, Heyninck K, Beyaert R. Hepatic tumor necrosis factor signaling and nuclear factor-kappaB: effects on liver homeostasis and beyond. *Endocr Rev* 2007;28:365-86.
43. Luedde T, Trautwein C. Intracelluler survival pathways in the liver. *Liver Int* 2006;1163-74.
44. Heyninck Beyaert R. Mechanisms of crosstalk between TNF-induced NF-kB and JNK activation in hepatocytes. *Biochemical Pharmacology* 2006;72:1090-101.
45. Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol* 2000;32:19-31.
46. Dey A, Cederbaum AI. Alcohol and oxidative liver injury. *Hepatology* 2006;43: 63-74.
47. Jaeschke H, Hasegawa T. Role of neutrophils in acute inflammatory liver injury. *Liver Int* 2006;26:912-19.
48. Selzner N, Selzner M, Odermatt B, Tian Y, Van Rooijen N, Clavien PA. ICAM-1 triggers liver regeneration through leukocyte recruitment and Kupffer cell-dependent release of TNF-alpha/IL-6 in mice. *Gastroenterology* 2003;124:692-700.

49. Fausto N, Riehle KJ. Mechanisms of liver regeneration and their clinical implications. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2005;12:181-9
50. Shin HH, Lee HW, Choi HS. Induction of nitric oxide synthase (NOS) by soluble glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor (sGITR) is modulated by IFN-gamma in murine macrophage *Exp Mol Med* 2003;35:175-80.
51. Yoshidome H, Kato A, Edwards MJ, Lentsch AB. Interleukin-10 suppresses hepatic/ischemia reperfusion injury in mice: implications of a central role for NFκB. *Hepatology* 1999;30:203-8.
52. Fujiwara N, Kobayashi K. Macrophages in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005;4:281-86.
53. Cao S, Zhang X, Edwards JP, Mosser DM. NFκB1 (p50) homodimers differentially regulate pro-and anti-inflammatory cytokines in macrophages. *J Biol Chem* 2006;281:26041-50.
54. Schwabe RF, Brenner DA. Mechanisms of Liver Injury. TNF-alpha-induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:583-9.
55. Heyninck K, Wullaert A, Beyaert R. Nuclear factor-kappa B plays a central role in tumour necrosis factor-mediated liver disease. *Biochem Pharmacol* 2003 ;66:1409-15.
56. Stankovic T, Marston E. Molecular mechanisms involved in chemoresistance in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Srp Arh Celok Lek* 2008;136:187-92.
57. Rayet B, G  linas C. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene* 1999;18:6938- 47.
58. Maeda S, Kamata H, Luo JL, Leffert H, Karin M. IKK beta couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis. *Cell* 2005;121:977-90.
59. Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, et al. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 2004;431:461-6.

60. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001;357:539- 45.
61. Sethi G, Sung B, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB activation: from bench to bedside. *Exp Biol Med* 2008;233:21- 31.
62. Olivier S, Robe P, Bours V. Can NF-kappaB be a target for novel and efficient anti-cancer agents? *Biochem Pharmacol* 2006 ;72:1054-68.
63. D'Acquisto F, May MJ, Ghosh S. Inhibition of nuclear factor kappa B (NF-B): an emerging theme in anti-inflammatory therapies. *Mol Interv* 2002;2:22-35.
64. Castro L, Freeman BA. Reactive oxygen species in human health and disease. *Nutrition* 2001;17:161-65.
65. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 2006;141:312-22.
66. www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01s.pdf
67. Dökmeci İ. Oksijen ve serbest radikaller. *Farmakoloji temel kavramlar. Nobel tıp kitapçevleri.* 2000;714-5.
68. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, et al. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 1987 ;107:526-45
69. Macit A. Nükleer faktör kappa b inhibitörü pirolidin ditiyokarbamat'ın pulmoner hipertansiyon tedavisinde etkinliğinin değerlendirilmesi. Yüksek Lisans tezi. Düzce Üniversitesi, Sağlık Bilimleri enstitüsü 2009;19-22.
70. Trouba KJ, Hamadeh HK, Amin RP, Germolec DR. Oxidative stress and its role in skin disease. *Antioxid Redox Signal* 2002;4:665-73.
71. Liochev SI, Fridovich I. The role of O₂ in the production of HO• in vitro and in vivo. *Free Radical Biol Med* 1994;16:29-33.
72. Kayaalp O. Oksijen ve diğer tedavi gazları. *Tıbbi Farmakoloji. Onbirinci baskı. Feryal Matbacılık, Hacettepe.* 2005:613-20.
73. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 2005; 120:483-95.

74. Falnes PØ, Klungland A, Alseth I. Repair of methyl lesions in DNA and RNA by oxidative demethylation. *Neuroscience* 2007;145:1222-327
75. Halliwell B. Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation. *Biochem Soc Trans* 1996;24:1023-7.
76. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002;82:47-95, .
77. Akpoyraz M, Durak İ. Serbest radikaller rolü ve biyolojik etkileri. antioksidanların etkisi. *Ankara Tıp Dergisi* 1995;48: 253- 262.
78. Hulbert AJ, Pamplona R, Buffenstein R, Buttemer WA. Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiol Rev* 2007;87: 1175-213.
79. Valencak TG, Ruf T. N-3 polyunsaturated fatty acids impair lifespan but have no role for metabolism. *Aging Cell* 2007;6:15-25.
80. Altan N, Dinçel AS, Koca C. Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Türk Biyokimya Dergisi* 2006;31:51-6.
81. Halliwell B. Antioxidant characterization. methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology* 1995;49:1341-48.
82. Catani C, Peters A, Schaefer HM. Life-history tradeoffs are influenced by the diversity, availability and interactions of dietary antioxidants. *Anim Behav* 2008;76:1107-19.
83. Kastan MB, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 2004;432:316-23.
84. Chi VD, Kuypers F, Lubin B. Lipid peroksidation in human red cells. *Semin hematol* 1989;26:257-76.
85. Selman C, McLaren JS, Collins AR, Duthie GG, Speakman JR. Antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation, and DNA oxidative damage: the effects of short-term voluntary wheel running. *Arch. Biochem. Biophys* 2002;401:255-61.

86. Cohen A, Klasing K, Ricklefs R. Measuring circulating antioxidants in wild birds. *Comp Biochem Physiol* 2007;147:110-21.
87. Somogyi A, Rosta K, Pusztai P, Tulassay Z, Nagy G. Antioxidant measurements. *Physiol Meas* 2007;28 :41-55.
88. Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci* 2000;899:136-47.
89. Haddad JJ. Redox regulation of pro-inflammatory cytokines and IkappaB-alpha/NF-kappaB nuclear translocation and activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;296:847-56.
90. Kabe Y, Ando K, Hirao S, Yoshida M, Handa H. Redox regulation of NF-kappaB activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus. *Antioxid Redox Signal* 2005;7:395-403.
91. Flohé L, Brigelius-Flohe R, Saliou C, Traber MG, Packer L. Redox regulation of NF-kappa B activation. *Free Radic Biol Med* 1997;22:1115-26.
92. Hatungil R. Serbest radikallerin yol açtığı doku hasarı. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2002;3:460-9.
93. Haddad JJ. Oxygen sensing and oxidant/redox-related pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;316:969 -77.
94. Krakauer T, Buckley M. The potency of anti-oxidants in attenuating superantigen-induced proinflammatory cytokines correlates with inactivation of NF-kappaB. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2008;30:163 -79.
95. Pantano C, Reynaert NL, van der Vliet A, Janssen-Heininger YM. Redox-sensitive kinases of the nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Antioxid Redox Signal* 2006;8:1791-806.
96. Wang T, Zhang X, Li JJ. The role of NF-kappaB in the regulation of cell stress responses. *Int Immunopharmacol* 2002;2:1509-20.

97. Henderson BC, Tyagi SC. Oxidative mechanism and homeostasis of proteinase/antiproteinase in congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2006;41:989-99.
98. Bowie A, O'Neill LA. Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. *Biochem Pharmacol* 2000;59:13-23.
99. Fan H, Sun B, et al. Oxygen radicals trigger activation of NF-B and AP -1 and upregulation of ICAM -1 in reperfused canine heart. *Am J Physiol* 2002;282: 1778-86.
100. Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. NF-κB activation by oxygen species: fifteen years later. *Biochemical Pharmacology* 2006;72:1493-1505.
101. Suzuki YJ, Aggarwal BB, Packer L. Alpha-lipoic acid is a potent inhibitor of NF-kappa B activation in human T cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;189:1709-15.
102. Suzuki YJ, Packer L. Inhibition of NF-kappa B DNA binding activity by alpha-tocopheryl succinate *Biochem Mol Biol Int* 1993;31:693-700.
103. Çağlıkülekci M, Pata C, Apa DD, Dirlik M, Tamer L, Yaylak F, et al. The effect of N-acetylcysteine (NAC) on liver and renal tissue inducible nitric oxide synthase (iNOS) and tissue lipid peroxidation in obstructive jaundice stimulated by lipopolysaccharide (LPS). *Pharmacol Res* 2004;49:227-38.
104. <http://Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
105. Brewer C. Recent development in disulfiram treatment. *Alcohol* 1993;28:383-95.
106. Shinobu LA, Jones SG, Jones MM. Mobilization of cadmium deposits by dithiocarbamates. *Arch Toxicol* 1983;54:235-42.
107. Lang JM, Touraine JL, Trepo C, Choutet P, Kirstetter M, Falkenrodt A, et al. Randomized double-blind placebo-controlled trial of dithiocarb sodium (imuthiol) in human immunodeficiency virus infection. *Lancet* 1988;8613:702-06.

108. Malaguarnera L, Quan S, Pilastro MR, Abraham NG, Kappas A. Diminished heme oxygenase potentiates cell death: pyrrolidinedithiocarbamate mediates oxidative stress. *Exp Biol Med* 2003;228:459-65.
109. Verhaegen S. , McGowan A.J., Brophy A.R., Fernandes R.S. and Cotter T.G., Inhibition of apoptosis by antioxidants in the human HL-60 leukemia cell line. *Biochem Pharmacol* 1995;50:1021-29.
110. Bessho R, Matsubara K, Kubota M, Kuwakado K, Hirota H, Wakazono Y, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate, a potent inhibitor of NF- κ B activation, prevents apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells and thymocytes. *Biochem Pharmacol* 1994;48:1883-89.
111. Topping RJ, Jones MM. Optimal dithiocarbamate structure for immunomodulator action. *Med Hypotheses* 1988;27:55-7.
112. Nobel CI, Kimland M, Lind B, Orrenius S, Slater AF. Dithiocarbamates induce apoptosis in thymocytes by raising the intracellular level of redox-active copper. *J Biol Chem* 1995;270:26202-208.
113. Kim SH, Han S, Oh SY, Chung HY, Kim HD, Kang HS. Activation of heat shock factor 1 by pyrrolidine dithiocarbamate is mediated by its activities as pro-oxidant and thiol modulator. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;281:367-72.
114. Di Nicuolo F, Serini S, Boninsegna A, Palozza P, Calviello G. Redox regulation of cell proliferation by pyrrolidine dithiocarbamate in murine thymoma cells transplanted in vivo. *Free Radic Biol Med* 2001;31:1424-31.
115. Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 1991;10:2247-58.
116. Schreck R, Meier B, Mannel DN, Droge W, Baeuerle PA. Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor κ B activation in intact cells. *J Exp Med* 1992;175:1181-94.
117. Mankhetkorn S, Abedinzadeh Z, Houee-Levin C. Antioxidant action of sodium diethyldithiocarbamate: reaction with hydrogen peroxide and superoxide radical. *Free Radic Biol Med* 1994;17:517-27.

- 118.Liu J, Shigenaga MK, Yan LJ, Mori A, Ames BN. Antioxidant activity of diethyldithiocarbamate. *Free Radic Res* 1996;24:461-72
- 119.Zanocco AL, Pavez R, Videla LA, Lissi EA. Antioxidant capacity of diethyldithiocarbamate in a metal independent lipid peroxidative process. *Free Radic Biol Med* 1989;7:151-6.
- 120.Hosni M, Meskini N, Prigent AF, Anker G, Joulain C, el Habib R, et al. Diethyldithiocarbamate (ditiocarb sodium) effect on arachidonic acid metabolism in human mononuclear cells. Glutathione peroxidase-like activity. *Biochem Pharmacol* 1992;43:1319-29.
- 121.Brennan P and O'Neill LA, Effects of oxidants and antioxidants on nuclear factor kappa B activation in three different cell lines: Evidence against a universal hypothesis involving oxygen radicals. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1260:167-75.
- 122.Cvek B, Dvorak Z. Targeting of nuclear factor-kappaB and proteasome by dithiocarbamate complexes with metals. *Curr Pharm Des* 2007;13:3155-67.
- 123.Baldwin AS Jr. The NF-kB and IκB proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996;14:649-83.
- 124.Li J, Billiar TR. Nitric oxide. IV. determinants of nitric oxide protection and toxicity in liver. *Am J Physiol* 1999;276:G1069-73.
- 125.Ma XL, Li YH, Gao JX, Li J, Guo L, Wu CZ. Expression of inducible nitric oxide synthase in the liver is under the control of nuclear factor kappa B in concanavalin A-induced hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23:e231-5.
- 126.<http://Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- 127.Yee SB, Kinser S, Hill DA, Barton CC, Hotchkiss JA, et al. Synergistic hepatotoxicity from coexposure to bacterial endotoxin and the pyrrolizidine alkaloid monocrotaline. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000;166:173-85.
- 128.Copple BL, Ganey PE, Roth RA. Liver inflammation during monocrotaline hepatotoxicity. *Toxicology* 2003;190:155-69.
- 129.Nobre VMT, Dantas AFM, Riet-Correa F, Barbosa Filho JM, Tabosa IM, Vasconcelos JS. Acute intoxication by *Crotalaria retusa* in sheep. *Toxicon* 2005;45:347-52.

130. Copple BL, Baner A, Ganey PE, Roth RA. Endothelial cell injury and fibrin deposition in rat liver after monocrotaline exposure. *Toxicol Sci* 2002;65:309-18.
131. Copple BL, Rondelli CM, Maddox JF, Hoglen NC, Ganey PE, Roth RA. Modes of cell death in rat liver after monocrotaline exposure. *Toxicol Sci* 2004;77:172-82.
132. Mattocks AR, Legg RF, Jukes R. Trapping of short-lived electrophilic metabolites of pyrrolizidine alkaloids escaping from perfused rat liver. *Toxicol Lett* 1990;54:93-99.
133. Lamé MW, Jones AD, Wilson DW, Segall HJ. Monocrotaline pyrrole targets proteins with and without cysteine residues in the cytosol and membranes of human pulmonary artery endothelial cells. *Proteomics* 2005;5:4398-413.
134. Mingatto FE, Dorta DJ, Santos AB, Carvalho I, Silva VB, Silva CHTP. Dehydromonocrotaline inhibits mitochondrial complex I. A potential mechanism accounting for hepatotoxicity of monocrotaline. *Toxicon* 2007;50:724-30.
135. Santos AB, Dorta DJ, Pestana CR, Maioli MA, Curti C, Mingatto FE. Dehydromonocrotaline induces cyclosporine A-insensitive mitochondrial permeability transition/cytochrome c release. *Toxicon* 2009;54:16-22.
136. Mingatto FE, Maioli MA, Bracht A, Ishii-Iwamoto EL. Effects of monocrotaline on energy metabolism in the rat liver. *Toxicology Letters* 2008;182:115-20.
137. Petry TW, Bowden GT, Huxtable RJ, Sipes IG. Characterization of hepatic DNA damage induced in rats by the pyrrolizidine alkaloid monocrotaline. *Cancer Res* 1984;44:1505-09.
138. Yan CC, Huxtable RJ. The effect of the pyrrolizidine alkaloids, monocrotaline and trichodesmine, on tissue pyrrole binding and glutathione metabolism in the rat. *Toxicon* 1995;33:627-34.
139. Aziz SM, Toborek M, Herring B, Olson JW, Chuang S, Lipke DW. Oxidative stress mediates monocrotaline-induced alterations in tenascin expression in pulmonary artery endothelial cells. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29:775-87.
140. Amacher DE. Drug-associated mitochondrial toxicity and its detection. *Curr Med Chem* 2005;12:1829-39.

141. Copple BL, Roth RA, Ganey PE. Anticoagulation and inhibition of nitric oxide synthase influence hepatic hypoxia after monocrotaline exposure. *Toxicology* 2006;225:128-37.
142. Swamidas GP, Basaraba RJ, Baybutt RC. Dietary retinol inhibits inflammatory responses of rats treated with monocrotaline. *J Nutr* 1999;129:1285-90.
143. Mitani Y, Maruyama K, Sakurai M. Prolonged administration of L-arginine ameliorates chronic pulmonary hypertension and pulmonary vascular remodeling in rats. *Circulation* 1997;96:689- 97.
144. Baybutt RC, Molteni A. Dietary β -carotene protects lung and liver parenchyma of rats treated with monocrotaline. *Toxicology* 1999;137:69-80.
145. Sawada H, Mitani Y, Maruyama J, Jiang BH, Ikeyama Y, Dida FA, et al. Nuclear factor-kappaB inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate ameliorates pulmonary hypertension in rats. *Chest* 2007;132:1265-74.
146. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for peroxidases in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-58.
147. Allen CT. Hematoxylin and eosin. In: Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH, editors. *Laboratory methods in histochemistry*. Washington, DC, Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology. 1992;53.
148. Roncalli M, Borzio M, Di Tommaso L. Hepatocellular dysplastic nodules. *Ann Ital Chir* 2008;79:81-9.
149. Bergman S, Graeme-Cook F, Pitman MB. The usefulness of the reticulin stain in the differential diagnosis of liver nodules on fine-needle aspiration biopsy cell block preparations. *Mod Pathol* 1997;10:1258- 64.
150. Molteni A, Ward WF, Ts'ao CH, Solliday NM, Dunn M. Prevention of monocrotaline-induced pulmonary fibrosis in the rat by administration of captopril and penicillamine. *Proc Soc Exp Biol Med* 1985;180:112-20.
151. Baybutt RC, Rosales C, Brady H, Molteni A. Dietary fish oil protects against lung and liver inflammation and fibrosis in monocrotaline treated rats. *Toxicology* 2002;175:1-13.

- 152.Copple BL, Woolley B, Banes A, Ganey PE, Roth RA. Anticoagulants prevent monocrotaline-induced hepatic parenchymal cell injury but not endothelial cell injury in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002;180:186-96.
- 153.Dalvi RR. Dose-related inhibition of the drug-metabolizing enzymes of rat liver by the pyrrolizidine alkaloid, monocrotaline. *J Pharm Pharmacol* 1987; 39:386-8.
- 154.Perazzo J, Eizayaga F, Romay S, Bengochea L, Pavese A, Lemberg A. An experimental model of liver damage and portal hypertension induced by a single dose of monocrotaline. *Hepatogastroenterology* 1999;46:432-5.
- 155.DeLeve LD, McCuskey RS, Wang X, Hu L, McCuskey MK, Epstein RB, et al. Characterization of a reproducible rat model of hepatic veno-occlusive disease. *Hepatology* 1999;29:1779- 91.
- 156.Czaja MJ. Cell signaling in oxidative stress-induced liver injury. *Semin Liver Dis* 2007;27:378-89.
- 157.Liu SL, Degli Esposti S, Yao T, Diehl AM, Zern MA. Vitamin E therapy of acute CCl₄-induced hepatic injury in mice is associated with inhibition of nuclear factor kappa B binding. *Hepatology* 1995;22:1474-81.
- 158.Brown KE, Poulos JE, Li L, Soweid AM, Ramm GA, O'Neill R, et al. Effect of vitamin E supplementation on hepatic fibrogenesis in chronic dietary iron overload. *Am J Physiol* 1997;272:G116-23.
- 159.Boigk G, Stroedter L, Herbst H, Waldschmidt J, Riecken EO, Schuppan D. Silymarin retards collagen accumulation in early and advanced biliary fibrosis secondary to complete bile duct obliteration in rats. *Hepatology* 1997;26:643-9.
- 160.Demirbilek S, Akin M, Gürünlüoğlu K, Aydın NE, Emre MH, Taş E, et al. The NF-kappaB inhibitors attenuate hepatic injury in bile duct ligated rats. *Pediatr Surg Int* 2006;22:655-63.
- 161.Bruck R, Schey R, Aeed H, Hochman A, Genina O, Pines M.A protective effect of pyrrolidine dithiocarbamate in a rat model of liver cirrhosis. *Liver Int* 2004;24:169-76.
- 162.Wang YP, Yan J, Fu PP, Chou MW. Human liver microsomal reduction of pyrrolizidine alkaloid N-oxides to form the corresponding carcinogenic parent alkaloid. *Toxicol Lett* 2005;155:411-20.

- 163.Sambo P, Fadlon EJ, Sironi M, Matteucci C, Introna M, Mantovani A, et al. Reactive oxygen intermediates cause rapid release of the interleukin-1 decoy receptor from human myelomonocytic cells. *Blood* 1996;87:1682.
- 164.Feng L, Xia Y, Garcia GE, Hwang D, Wilson CB. Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide. *J Clin Invest* 1995;95:1669-75.
- 165.Peristeris P, Clark BD, Gatti S, Faggioni R, Mantovani A, Mengozzi M, et al. N-acetylcysteine and glutathione as inhibitors of tumor necrosis factor production. *Cell Immunol* 1992;140:390-9.
- 166.Hsu BG, Lee RP, Yang FL, Harn HJ, Chen HI. Post-treatment with N-acetylcysteine ameliorates endotoxin shock-induced organ damage in conscious rats. *Life Sci* 2006;79:2010-6.
- 167.Bedossa P, Houghlum K, Trautwein C, Holstege A, Chojkier M. Stimulation of collagen alpha 1(I) gene expression is associated with lipid peroxidation in hepatocellular injury: a link to tissue fibrosis? *Hepatology* 1994;19:1262-71.
- 168.Nieto N, Friedman SL, Greenwel P, Cederbaum AI. CYP2E1-mediated oxidative stress induces collagen type I expression in rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 1999;30:987-96.
- 169.Houghlum K, Brenner DA, Chojkier M. d-alpha-tocopherol inhibits collagen alpha 1(I) gene expression in cultured human fibroblasts. Modulation of constitutive collagen gene expression by lipid peroxidation. *J Clin Invest* 1991;87:2230-5.
- 170.Yang YS, Ahn TH, Lee JC, Moon CJ, Kim SH, Jun W, et al. Protective effects of pycnogenol on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in Sprague-Dawley rats. *Food Chem Toxicol* 2008;46:380-7.
- 171.Bujanda L, Hijona E, Larzabal M, Beraza M, Aldazabal P, García-Urkia N, et al. Resveratrol inhibits nonalcoholic fatty liver disease in rats. *BMC Gastroenterol* 2008;8:40.
- 172.Muriel P. NF-kappaB in liver diseases: a target for drug therapy. *J Appl Toxicol* 2009;29:91-100.

173. Lu JW, Wang H, Yan-Li J, Zhang C, Ning H, Li XY, et al. Differential effects of pyrrolidine dithiocarbamate on TNF- α -mediated liver injury in two different models of fulminant hepatitis. *J Hepatol* 2008;48:442-52.
174. Eguchi K, Kawakami J, Tsuboi M, Hida A, Tominaga M, Nakajima T, et al. Expression of apoptosis-related molecules at lesions of autoimmune diseases. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 1997;20:502-5.
175. Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S, Nicotera P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 1997;185:1481-86.
176. Paxian M, Bauer I, Rensing H, Jaeschke H, Mautes AE, Kolb SA, et al. Recovery of hepatocellular ATP and "pericentral apoptosis" after hemorrhage and resuscitation. *FASEB J* 2003;17:993-1002.
177. Gordon GJ, Coleman WB, Grisham JW. Bax-mediated apoptosis in the livers of rats after partial hepatectomy in the retrorsine model of hepatocellular injury. *Hepatology* 2000;32:312-20.
178. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Robbins Basic Pathology (Temel Patoloji). Çeviri Editörü: Çevikbaş U. 7. Baskı. 2003;25.
179. Yuan WP, Liu B, Liu CH, Wang XJ, Zhang MS, et al. Antioxidant activity of chito-oligosaccharides on pancreatic islet cells in streptozotocin-induced diabetes in rats. *World J Gastroenterol* 2009;15:1339-45.
180. Verma RJ, Nair A, Mathuria N. Vitamin E ameliorates aflatoxin-induced alterations in the epididymis of mice. *Acta Pol Pharm* 2008;65:331-7.
181. Narayana K. An aminoglycoside antibiotic gentamycin induces oxidative stress, reduces antioxidant reserve and impairs spermatogenesis in rats. *J Toxicol Sci* 2008;33:85-96.
182. Wilson DW, Lamé MW, Dunston SK, Segall HJ. DNA damage cell checkpoint activities are altered in monocrotaline pyrrole-induced cell cycle arrest in human pulmonary artery endothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000;166:69-80.
183. Maaroufi K, Zakhama A, Baudrimont I, Achour A, Abid S, Ellouz F, et al. Karyomegaly of tubular cells as early stage marker of the nephrotoxicity induced by ochratoxin A in rats. *Hum Exp Toxicol* 1999;18:410-5.

184. Aydın G, Özçelik N, Çiçek E. and Soyöz M. Histopathologic changes in liver and renal tissues induced by Ochratoxin A and melatonin in rats. *Hum Exp Toxicol* 2003;22:383-91.
185. Ateşşahin A, Ceribaşı AO, Yuce A, Bulmus O, Cikirim G. Role of ellagic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2007;100:121-6.

10. RESİMLEMELER LİSTESİ

10.1. ŞEKİLLER

Şekil 2.1. NFκB aracılıklı sinyal uyarıları.....	5
Şekil 2.2. NF-κB aktivasyonunun klasik ve alternatif yolları.....	6
Şekil 2.3. NFκB ve ilgili fizyolojik ve patolojik olaylar.....	6
Şekil 2.4. Karaciğer rejenerasyonu esnasında sitokin sinyalizasyonu.....	9
Şekil 2.5. NF-κB aktivasyonu ve oksidatif stres ilişkisi.....	20
Şekil 2.6. Pirolidin ditiyokarbamatın yapısı.....	22
Şekil 2.7. Monokrotalinin kimyasal yapısı.....	24

10.2. TABLOLAR

Tablo 2.1. NFκB inhibisyonu yapan ilaçlar, moleküler hedefleri ve çalışılan modeller...	11,12
Tablo 2.2. Reaktif Oksijen Türleri.....	13
Tablo 2.3. Reaktif Oksijen türlerinin kaynakları.....	14
Tablo 2.4. Antioksidan Savunma Mekanizmaları.....	16
Tablo 2.5 NFκB aktivatörleri ve Antioksidanlar.....	22
Tablo 3.1. Deney gruplarına göre ilaç uygulaması.....	28
Tablo 4.1. Doku MDA değerleri.....	33
Tablo 4.2. TAK değerleri.....	34
Tablo4.3. Karaciğer hücrelerindeki morfolojik değişikliklerin semikantitatif değerlendirilmesi.....	35
Tablo4.4. Karaciğer hücrelerindeki çekirdek değişikliklerinin semikantitatif değerlendirilmesi.....	35

10.3.RESİMLER

- Resim-1.** Kontrol grubu; normal karaciğer dokusu HEx200..... 36
- Resim-2.** MCT grubu; hasarın portal alan çevresinde olduğu görülüyor. HEx40..... 36
- Resim-3.** MCT grubu; portal alanda enflamatuvar hücreler (➡), hepatositlerde Karyomegali (➡) görülüyor. HE x400..... 37
- Resim-4.** MCT grubu; Portal alanda enflamatuvar hücreler (⌋), konjesyon ve hemoraji (⇔), apopitotik hücre (➡), hepatositlerde karyomegali(➡), yağlanma (vakuolizasyon),(★) görülüyor.....37
- Resim-5.** MCT-PDTC grubu; portal alan normal görülüyor. HE x200.....38
- Resim-6.** MCT grubu; Apopitotik hücreler (➡)[çekirdekte piknoz (➡)], hepatositlerde karyomegali (➡) görülüyor. HE x400.....38
- Resim-7.**MCT-PDTC grubu; hepatositler normal görülüyor. HE x400.....39
- Resim-8.** PDTC grubu; karaciğer dokusu normal görülüyor. Portal alan, vena centralis HEx200..... 39
- Resim-9.** Kontrol grubu; normal karaciğer dokusu. Gomori üçlü boya x200.....40
- Resim-10.** MCT grubu; Portal alanda kollagen lif artışı (➡) görülüyor. Gomori üçlü boya x400..... 40
- Resim-11.** MCT-PDTC grubu; karaciğer dokusu normal görülüyor. Gomori üçlü boya x200..... 41
- Resim-12.** PDTC grubu; karaciğer dokusu normal görülüyor.Gomori üçlü boya x200..... 41

11. ÖZGEÇMİŞ

2009-2010 Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji ABD

2005-2009 Düzce Üniversitesi Düzce Tıp Fakültesi Farmakoloji ABD

2003-2005 AİBÜ Bolu Mediko Sosyal Merkez Doktorluğu

2000-2003 AİBÜ Düzce Tıp Fakültesi Mediko Sosyal Merkez Doktorluğu

1995-2000 AİBÜ Bolu Mediko Sosyal Merkez Doktorluğu

1993-1995 Bolu 4. No'lu Sağlık Ocağı Tabibi

1991-1993 Sivas Numune Hastanesi Acil Hekimliği

1985-1991 Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi

1982-1985 İzmir Kız Lisesi

1979-1982 İzmir Gürçeşme Ortaokulu

1974-1979 İzmir Çamlık İlkokulu

12. EKLER

12.1. ETİK KURUL ONAYI



T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ETİK KURUL
DENEY HAYVANLARI ALT KURULU

Tarih: 22.09.2008
No:100/11

Sayın Dr. Özge UZUN

Aşağıda belirtilen araştırmamız Etik Kurulumuz tarafından ilgili yönetmelik ve yönergeler uyarınca evrensel etik kurallar çerçevesinde değerlendirilmiş ve oybirliği ile "uygun" bulunarak Etik Komite onayı verilmiştir.

Bilgilerinize saygılarımla rica ederim.

Başkan

Doç. Dr. M. Tefvik YAVUZ

Protokol No: 011

Araştırmanın Adı: Monokrotalinle indüklenen pnömotoksisite ve Hepatotoksisitede NF-Kappa B inhibitorü pirolidin ditiokarbamatın etkinliğinin değerlendirilmesi.

Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi
Konuralp 81620 DÜZCE
☎:380 542 11 28 Faks:380 542 11 29