

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



RATLARDA ASETAMİNOFENLE İNDÜKLENEN
HEPATOTOKSİSİTE MODELİNDE PROPOLİSİN
OKSİDATİF STRES
ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Büşra ÇAVUŞOĞLU

2021

ONAY SAYFASI



TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimime bilgi ve tecrübeleri ile büyük katkıda bulunan ve yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini esirgemeyen, Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı, danışman hocam Prof. Dr. Seval YILMAZ'a teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans eğitimimde emeği geçen Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Necmi ÖZDEMİR'e, Prof. Dr. Mine ERİŞİR'e ve Doç. Dr. Emre KAYA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışması için maddi destek aldığımız Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP) Koordinasyon Birimine (Proje No: VF. 20.09) teşekkür ederim.

Tüm yaşamım boyunca hep desteklerini gördüğüm, beni yetiştiren anne ve babama, dostlarıma ve bu tezin hazırlanması sırasında desteğini ve yardımını esirgemeyen, sevgili eşim Cihangir ÇAVUŞOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Büşra ÇAVUŞOĞLU

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI.....	II
TEŞEKKÜR	III
TABLolar LİSTESİ.....	VII
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	IX
SİMGELER VE KISALTMALAR	XI
1. ÖZET.....	XV
2. ABSTRACT	XVI
3. GİRİŞ	1
3.1. Asetaminofen.....	1
3.1.1. Asetaminofen Tarihçesi	1
3.1.2. Asetaminofenin Yapısı ve Özellikleri.....	3
3.1.3. Asetaminofenin Etki Mekanizması.....	5
3.1.4. Asetaminofenin Metabolizması	7
3.1.5. Asetaminofenin Terapötik Kullanımı	8
3.1.6. Asetaminofenin Yan Etkileri	9
3.1.7. Asetaminofenin Toksisitesi.....	10
3.1.8. Asetaminofen Kaynaklı Hepatotoksisite	10
3.2. Serbest Radikaller.....	11
3.2.1. Serbest Radikal Çeşitleri.....	13
3.2.1.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$).....	13
3.2.1.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2).....	15
3.2.1.3. Hidroksil Radikali ($OH^{\cdot}$)	17
3.2.1.4. Singlet Oksijen (1O_2).....	17
3.2.1.5. Reaktif Nitrojen Türleri	18
3.2.1.5.1. Nitrik oksit ($NO^{\cdot}$)	18

3.2.2. Serbest Radikal Kaynakları	19
3.2.2.1. Eksojen Radikal Kaynakları.....	19
3.2.2.2. Endojen Radikal Kaynakları	19
3.2.3. Serbest Radikallerin Etkileri	20
3.2.3.1. Karbohidratlara Etkileri	20
3.2.3.2. DNA Üzerine Etkileri	21
3.2.3.3. Proteinler Üzerine Etkileri	21
3.2.3.4. Serbest Radikallerin Hücre Lipitlerine Etkileri.....	22
3.2.3.5. Malondialdehit (MDA)	23
3.3. Antioksidan Savunma Sistemleri	24
3.3.1. Endojen (Doğal) Antioksidanlar	26
3.3.1.1. Primer Antioksidanlar	26
3.3.1.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD).....	26
3.3.1.1.2. Katalaz (KAT).....	27
3.3.1.2. Sekonder Antioksidanlar	28
3.3.1.2.1. Glutasyon (GSH)	28
3.3.1.2.2. Glutasyon S-Transferaz (GST)	30
3.3.1.2.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)	31
3.3.2. Eksojen (Sekonder) Antioksidanlar	33
3.3.2.1. Vitamin Yapıda Olan Eksojen Antioksidanlar.....	33
3.4. Oksidatif Stres	33
3.4.1. Asetaminofenin Oksidatif Stres ile İlişkisi	33
3.5. Propolis.....	37
3.5.1. Propolisin Fiziksel, Kimyasal Yapısı ve Özellikleri.....	38
3.5.2. Propolisin Antioksidan Özellikleri	43
4. GEREÇ VE YÖNTEM.....	45

4.1. Deney Hayvanlarının Bakım ve Beslenmeleri	45
4.2. Kullanılan Gereçler	46
4.2.1. Cihazlar	46
4.2.2. Kimyasal Maddeler	46
4.3. Yöntemlerin Uygulanması	46
4.3.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması	46
4.3.2. Asetaminofen ve Propolis Uygulaması	47
4.4. Örneklerin Toplanması ve Biyokimyasal Analizler	47
4.4.1. Kan Örneklerinin Hazırlanması	47
4.4.1.1. MDA Tayini için Hazırlanması	47
4.4.1.2. GSH Tayini için Hazırlanması	47
4.4.1.3. KAT Tayini için Hazırlanması	47
4.4.1.4. GSH-Px Tayini için Hazırlanması	48
4.4.2. Doku Örneklerinin Alınması, Hazırlanması ve Homojenizasyonu	48
4.4.2.1. MDA, GSH, KAT, GST ve Protein Tayini için Doku Örneklerinin Hazırlanması	48
4.4.2.2. GSH-Px Tayini için Doku Örneklerinin Hazırlanması	48
4.5. Kanda ve Dokuda MDA, GSH, KAT, GSH-Px, GST, Protein ve Hemoglobin Analizleri için Kullanılan Yöntemler	49
4.5.1. Plazmada ve Dokuda MDA Düzeyinin Tayini	49
4.5.2. Kanda ve Dokuda GSH Düzeyinin Tayini	50
4.5.3. Kan ve Dokuda KAT Aktivitesinin Tayini	51
4.5.4. Dokuda GST Aktivitesinin Tayini	52
4.5.5. Kanda ve Dokuda GSH-Px Aktivitesinin Tayini	54
4.5.6. Hemoglobin Tayini	56
4.5.7. Dokuda Protein Tayini	56

4.6. İstatistiksel Değerlendirme.....	58
5. BULGULAR.....	59
5.1. Kan MDA ve Antioksidan Düzeyleri.....	59
5.1.1. Kan MDA Düzeyi.....	60
5.1.2. Kan GSH Düzeyi.....	61
5.1.3. Kan KAT Aktivitesi.....	62
5.1.4. Kan GST Aktivitesi.....	63
5.1.5. Kan GSH-Px Aktivitesi.....	63
5.2. Karaciğer Oksidan ve Antioksidan Düzeyleri.....	64
5.2.1. Karaciğer MDA Düzeyi.....	65
5.2.2. Karaciğer GSH Düzeyi.....	66
5.2.3. Karaciğer KAT Aktivitesi.....	67
5.2.4. Karaciğer GST Aktivitesi.....	68
5.2.5. Karaciğer GSH-Px Aktivitesi.....	69
6. TARTIŞMA.....	71
7. SONUÇ.....	91
8. KAYNAKLAR.....	92

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1: Asetaminofenin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	4
Tablo 2: Asetaminofenin Yan Etkileri	9
Tablo 3: Reaktif Oksijen Türleri	13
Tablo 4: Propolisin Kimyasal Yapısı	39
Tablo 5: Propolis İçeriğinde Bulunan Flavonoid Türleri	40
Tablo 6: Propolis Yapısındaki Bileşiklerin Biyolojik Aktiviteleri	42
Tablo 7: Rat Yeminin Bileşimi ve Kalori Değeri	45
Tablo 8: Plazma ve Doku MDA Düzey Ölçümü	49
Tablo 9: Kan ve Doku GSH Düzey Ölçümü	51
Tablo 10: Kan ve Doku KAT Aktivite Ölçümü	52
Tablo 11: Doku GST Aktivite Ölçümü	53
Tablo 12: Kan ve Doku GSH-Px Aktivite Ölçümü	55
Tablo 13: Hb Düzey Ölçümü	56
Tablo 14: Protein Düzey Ölçümü	57
Tablo 15: Asetaminofen Uygulanan Ratlarda Propolisin Plazma MDA, Eritrosit GSH Düzeyleri ile KAT, GSH- Px Aktiviteleri	60
Tablo 16: Deneysel Gruplara Ait Doku Karaciğer MDA, GSH, KAT ,GST, GSH- Px Aktiviteleri	65

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Asetaminofen Sentezi	3
Şekil 2: Asetaminofenin Kimyasal ve 3 Boyutlu Yapısı	4
Şekil 3: COX-1 ve COX-2 Enzimlerinin Etkileri.....	6
Şekil 4: Asetaminofenin Metabolizması	8
Şekil 5: Asetaminofen Alımı Sonrası Toksisite Meydana Gelme Süresi.....	11
Şekil 6: L Arginin Sitruline Dönüşümü Sırasında NO.'in Oluşumu.....	19
Şekil 7: MDA Oluşumu	23
Şekil 8: MDA'nın Yapısı.....	23
Şekil 9: TBA'nın MDA ile reaksiyonu.....	24
Şekil 10: Antioksidanların Sınıflandırılması	25
Şekil 11: Antioksidanların Serbest Radikallere Karşı Etkileri	26
Şekil 12: Serbest Radikallerin Oluşumu ve Enzimatik Detoksifikasyonu	28
Şekil 13: Glutatyonun Kimyasal Yapısı	28
Şekil 14: Redükte/Okside Glutatyon Döngüsü.....	30
Şekil 15: NAPSQI Radikalinin Oluşması.....	34
Şekil 16: Yeşil- Kahverengi Ham Propolis Örnekleri	39
Şekil 17: Propolisin Aktiviteleri	41
Şekil 18: Kontrol (a) ve Asetaminofen (b) Grubunun Karaciğer Doku Görünümü	59
Şekil 19: Asetaminofen ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarında Plazma MDA Düzeyleri	61
Şekil 20: Asetaminofen ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarında Kan GSH Düzeyleri	62
Şekil 21: Asetaminofen ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarında Kan KAT Aktiviteleri	63
Şekil 22: Asetaminofen ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarında Kan GSH-Px Aktiviteleri	64
Şekil 23: Asetaminofen ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarında Karaciğer MDA Düzeyleri.....	66
Şekil 24: Asetaminofen ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarında Karaciğer GSH Düzeyleri.....	67

Şekil 25: Asetaminofen ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarında Karaciğer KAT Aktiviteleri	68
Şekil 26: Asetaminofen ve Propolis Uygulanan Ratlarda Karaciğer GST Aktiviteleri	69
Şekil 27: Asetaminofen ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarında Karaciğer GSH-Px Aktiviteleri.....	70



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

µl	: Mikrolitre
dl	: Desilitre
ml	: Mililitre
L	: Litre
mg	: Miligram
g	: Gram
kg	: Kilogram
ppm	: Milyonda Kısım
µmol	: Mikromol
mM	: Milimol
M	: Mol
N	: Normal
nm	: Nanometre
U	: Ünite
nmol	: Nanomol
µg	: Mikrogram

Kisaltmalar

¹O₂	: Singlet Oksijen
ALT	: Alanin Aminotransferaz
AST	: Aspartat Aminotransferaz
ATP	: Adenozin Trifosfat
BSA	: Sığır Serum Albumin
CAPE	: Kafeik Asit Fenil Ester
CDNB	: 1-Klor-2,4-Dinitrobenzen

COX	: Siklooksijenaz
Cu	: Bakır
CYP 450	: Sitokrom p450
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DTNB	: 5,5' Dithiobis- (2-Nitrobenzoik Asit)
ETS	: Elektron Taşıma Sistemi
Fe	: Demir
Fe⁺³	: Ferri Demir
Fe⁺²	: Ferro Demir
GST	: Glutatyon-S-Transferaz
GSSG	: Okside Glutatyon
GSH-Px	: Glutatyon Peroksidaz
GSH	: Redükte Glutatyon
GR	: Glutatyon Redüktaz
Hb	: Hemoglobin
HOCl	: Hipoklorik Asit
HO₂[·]	: Perhidroksi Radikali
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
IL-1β	: İnterlökin-1 Beta
i.v	: İntravenöz
i.p	: İntraperitoneal
KAT	: Kalataz

LPO	: Lipid Peroksidasyonu
MDA	: Malondialdehit
NAC	: N-Asetilsistein
NaCl	: Serum Fizyolojik
NSAİ	: Non Steroid Antiinflamatuvar
NSAİİ	: Non-Steroidaİ Antiinflamatuvar İlaç
NAPQİ	: N-Asetil Para Benzokinoimin
NAPSQİ	: N-Asetil-P-Benzosemikinonimin Radikali
NADP	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NO	: Nitrik oksit
NO·	: Nitrik Oksit Radikali
NO₂·	: Nitrojen Dioksit
NO₂	: Nitrit
NO₃	: Nitrat
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
O₂	: Moleküler Oksijen
OH·	: Hidroksil Radikali
O₂⁻	: Süperoksit Radikali
ONOO·	: Peroksinitrit Radikali
OD	: Optik Dansite
PUFA	: Doymamış Yağ Asitleri
PG	: Prostaglandin

RNA	: Ribonükleik Asit
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
RNT	: Reaktif Nitrojen Türleri
ROOH	: Hidroperoksit
SOD	: Süperoksit Dismutaz
-SH	: Sülfidril (Tiyol) Grubu
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör Alfa
t- BOOH	: t-Bütil Hidroperoksit
TBA	: Tiyobarbitürik Asit
TBARs	: Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler
TCA	: Triklorasetik Asit
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör Alfa

1. ÖZET

Asetaminofen, ağrı kesici ve ateş düşürücü etkisinden dolayı aneljezik ve antipiretik bir ilaç olarak kullanılmaktadır. Yüksek doz asetaminofen alımı hepatotoksisteye neden olabilmektedir. Bu çalışma, bal arısı ürünlerinden biri olan propolisin asetaminofen kaynaklı karaciğer fonksiyon bozukluğu ve oksidatif strese karşı iyileştirici etkisini değerlendirmek için yapılmıştır. Çalışmada 41 adet erkek Wistar-Albino 2,5 aylık ratlar 5 gruba ayrılmıştır. 1. grup; kontrol grubu, 2. grup; propolis, 3. grup; asetaminofen, 4. grup; propolis+asetaminofen, 5. grup; asetaminofen+propolis uygulanan gruplar şeklinde oluşturulmuştur. Propolis grubuna 7 gün boyunca 200 mg/kg/gün propolis etanolde çözülürölerek gavaj yoluyla uygulanmıştır. Asetaminofen grubuna 2 gr/kg gavaj yoluyla asetaminofen tek doz olarak uygulanmıştır. Propolis+asetaminofen uygulamasına asetaminofen uygulamasından 7 gün önce başlanmış ve 7 gün uygulamaya devam edilmiştir. Asetaminofen+propolis uygulamasına asetaminofen uygulamasından hemen sonra başlanmış ve 7 gün boyunca devam edilmiştir. Uygulamalar sonunda kan ve karaciğer doku örneklerinde malondialdehit (MDA), redükte glutatyon (GSH) düzeyleri, katalaz (KAT), glutatyon-S-trasferaz (GST), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri ölçölmüştür. Asetaminofen uygulanan grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kan ve karaciğer MDA düzeylerinde önemli artış, GSH düzeylerinde, KAT, GST ($p<0,001$) ve GSH-Px ($p<0,05$, $p<0,001$) aktivitelerinde ise önemli bir azalış gözlenmiştir. Asetaminofen+propolis ve propolis+asetaminofen uygulanan gruplar asetaminofen uygulanan grup ile karşılaştırıldığında MDA düzeyinde önemli azalış, GSH düzeyinde KAT, GST ve GSH-Px aktivitelerinde ise istatistiksel olarak artış saptanmış ve kontrol grubuna yaklaşmıştır. ($p<0,001$). Propolis+asetaminofen uygulanan gruptaki iyileşmenin daha belirgin olduğu saptanmıştır. Kanda GST aktivitesi okunamayacak düzeyde olduğu için ölçölememiştir. Sonuç olarak; asetaminofen kaynaklı karaciğer ve oksidatif hasara karşı propolisin koruyucu ve tedavi edici etkileri olduğu elde edilen biyokimyasal verilere dayandırılarak söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Asetaminofen, Serbest Radikaller, Oksidatif Stres, Propolis

2. ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF PROPOLIS ON OXIDATIVE STRESS IN ACETAMINOPHEN- INDUCED HEPATOTOXIC MODEL IN RATS

Acetaminophen is used as an analgesic and antipyretic drug due to its pain-relieving and fever-reducing effect. High doses of acetaminophen may cause hepatotoxicity. This study was conducted to evaluate the curative effect of propolis, one of the bee products, against acetaminophen-induced liver dysfunction and oxidative stress. Forty-one 2.5-month-old male Wistar-Albino rats were used in this study, and they were divided into 5 groups: group 1; control group, group 2; propolis, group 3; acetaminophen, group 4; propolis+acetaminophen, group 5; acetaminophen+propolis applied groups were formed. In the propolis group, 200 mg/kg/day propolis was dissolved in ethanol and administered by gavage for 7 days. The acetaminophen group was administered 2 g/kg by gavage as a single dose of acetaminophen. Propolis+acetaminophen administration was started 7 days before acetaminophen administration and continued for 7 days. Acetaminophen+propolis administration was started immediately after the administration of acetaminophen and continued for 7 days. At the end of the applications, malondialdehyde (MDA), reduced glutathione (GSH) levels, catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GSH-Px) activities were measured in blood and liver tissue samples. When the acetaminophen administered group was compared with the control group, a significant increase in blood and liver MDA levels, a significant decrease in GSH levels, CAT, GST ($p < 0.001$) and GSH-Px ($p < 0.05$, $p < 0.001$) activities were observed. When the groups given acetaminophen+propolis and propolis+acetaminophen were compared with the group given acetaminophen, a significant decrease in MDA level and a statistical increase in CAT, GST and GSH-Px activities in GSH level were found and it approached the control group. ($p < 0.001$). It was determined that the improvement was more pronounced in the group treated with propolis+acetaminophen, but GST activity in the blood could not be measured because it was at an unreadable level.

As a result, based on the obtained biochemical data; It can be said that propolis has protective and therapeutic effects against acetaminophen-induced liver dysfunction and oxidative damage.

Key Words: Acetaminophen, Free Radicals, Oxidative Stress, Propolis



3. GİRİŞ

3.1. Asetaminofen

3.1.1. Asetaminofen Tarihçesi

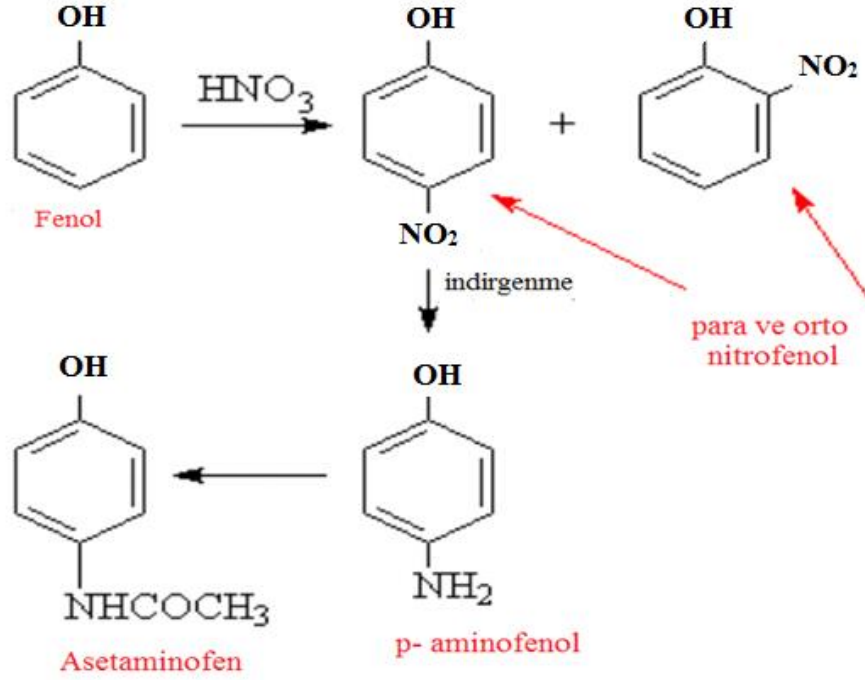
Antik ve orta çağda ateş düşürücü olarak kullanılan maddeler; beyaz söğüt ağacı (kabuğunda bulunan salisilin olarak adlandırılan madde) ve kınakına ağacı kabuğunda bulunan bileşiklerdir. 1880'lerde kınakına ağacı tükenmeye başlayınca ateş düşürücü olarak alternatifler aranmaya başlanmıştır (1).

1980'lerde Stranburg Üniversitesinde bulunan Arnold Chan ve Paul Heppa adlı iki doktor bir hastalarında bulunan bağırsak kurtlarını tedavi etmek amacıyla hastalarına antihelmintik olarak naftalin yerine yanlışlıkla asetanilid uygulamışlardır. Bu yanlış uygulamanın sonucu bağırsak kurtları üzerinde küçük bir etki görülmüş olsa da asıl etki hastanın yüksek ateşinin önemli derecede düşüşü ile görülmüştür. Daha sonra asetanilid 'antifebrin' adı altında tıbbi olarak uygulanmaya başlanmıştır. Bu ilacın üretimi çok ucuz olmasına rağmen kısa süre sonra methemoglobinemi ve yüksek toksisiteye neden olduğu anlaşılmış ve kullanımına son verilmiştir (2).

Asetanilidin daha az toksik türevleri hakkında çok sayıda araştırma yapılmıştır. İlk defa 1878 yılında Harmon Northrop Morse tarafından fenasetin ve p-nitrofenolün asetik asit ile indirgenmesi sonucunda asetaminofen sentezlenmiştir ve ateş düşürücü iyi birer ajan oldukları düşünülmüştür. Bu iki asetanilid türevi klinik olarak ilk defa Joseph Von Mering tarafından kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara dayanarak, asetaminofenin asetanilide benzer yüksek toksisiteye neden olduğu düşünüldüğü için uzun yıllar kullanılmamıştır. Fenasetin ise 1887'de tıbbi olarak kullanılmaya başlanmıştır. Fakat uzun süreli kullanımdan sonra fenasetinin de analjezik nefropati gelişimine neden olduğu ortaya konmuştur. 1893'te fenasetin almış kişilerin idrarlarında asetaminofen varlığı gözlemlenmiş ve acı bir tada sahip beyaz, kristal bir bileşik halinde konsantre edilmiştir (1, 3, 4).

1899'da ise asetaminofenin, asetanilidinin bir metaboliti olduğu keşfedilmiş fakat bu keşif o zamanlar büyük ölçüde göz ardı edilmiştir. 1948 yılında Brodie ve Axelrod asetaminofenin, fenasetin ve asetanilidin esas ara ürünü olduğunu onaylamışlardır. Asetanilid vücutta asetaminofen ve aniline metabolize olmaktadır. Analjezik etkiyi asetaminofen gösterir iken toksik etki ise anilinden kaynaklanmaktadır. Asetaminofen toksik etkiye sahip olmadığı için kullanımı savunulmuştur (5).

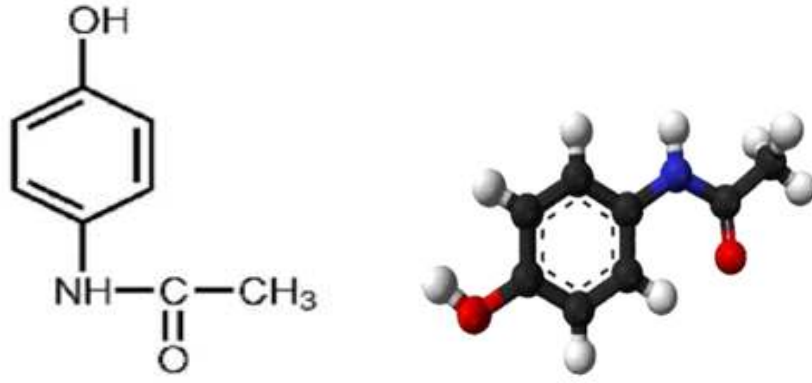
Böylece, asetaminofen 1950'lerin ortalarında “yeniden keşfedilmiş” ve piyasaya sunulmuştur. Asetaminofen "1955 yılında" analjezik ve antipiretik olarak ilk kez ABD'de "Tyenol" ticari adıyla, daha sonra "1956 yılında" İngiltere'de ise "Panadol" ticari ismi ile piyasaya sürülmüştür. "1958 yılında" çocuklarda kullanılması için hazırlanan formu "Panadol elixir" kullanıma sunulmuştur. Sonraki yıllarda hem yan etkisi az olduğu hem de iyi bilinen bir analjezik olduğu için popülaritesi gittikçe artan bir ilaç haline gelerek tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (4). Asetaminofenin ticari üretimi için fenol sıklıkla kullanılmaktadır. Fenolün nitrolanması sonucu para ve orto nitrofenol oluşur. Oluşan bu para ve orto nitrofenol karışımı distilasyon ile izomelerine ayrılır. Daha sonra para-nitrofenol izomeri indirgenerek p-aminofenol meydana gelir ve bu bileşiğin asetik anhidritle asetillenmesiyle asetaminofen oluşmaktadır (Şekil 1) (6).



Şekil 1: Asetaminofen Sentezi (6)

3.1.2. Asetaminofenin Yapısı ve Özellikleri

Asetaminofen ‘anilin türevleri’ ya da ‘anilin analjezikleri’ olarak adlandırılan grubun bir üyesidir. Bu grupta günümüzde hala popüler olan asetanilid ve fenasetin de bulunur. Fenasetin ve asetaminofenin her ikisi de asetanilid türevidir (7). Asetaminofen (parasetamol, N-asetil p-aminofenol, APAP) gibi isimlerle bilinen kömür katranı aneljeziği olarak adlandırılan non-steroidal antiinflamatuvar ilaç (NSAİİ) grubunda bulunan ilaçlardan fenasetinin aktif bir metaboliti ve para-aminofenol derivesidir (Şekil 2). Güçlü bir aneljezik ve antipiretik olmasına rağmen antiinflamatuvar özelliği oldukça zayıftır (8).



Şekil 2: Asetaminofenin Kimyasal ve 3 Boyutlu Yapısı (9, 10)

Asetaminofenin kimyasal (sistematik) adı N-(4-hidroksifenilasetamid) ve moleküler formülü C₈H₉NO₂'dir. Kimyasal yapısından dolayı asetaminofen adını almıştır (Tablo 1) (8).

Tablo 1: Asetaminofenin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri (10)

İlaç Sınıfı	Analjezik ve Antipiretik
Kimyasal ismi	N-(4-hidroksifenilasetamid)
Kimyasal formülü	C ₈ H ₉ NO ₂
Molekül ağırlığı (g/mol)	151,17
Sudaki çözünürlüğü	12,78 mg/ml (20 °C)
Erime noktası (°C)	169-172
pH	5,5-6,5
Fiziksel görünüm	Beyaz kristalize toz
Biyolojik dönüşümü	%90-95'i biyolojik olarak ayrışır
Metabolitleri	Glukoronoid (%55) ve Sülfat (%35)

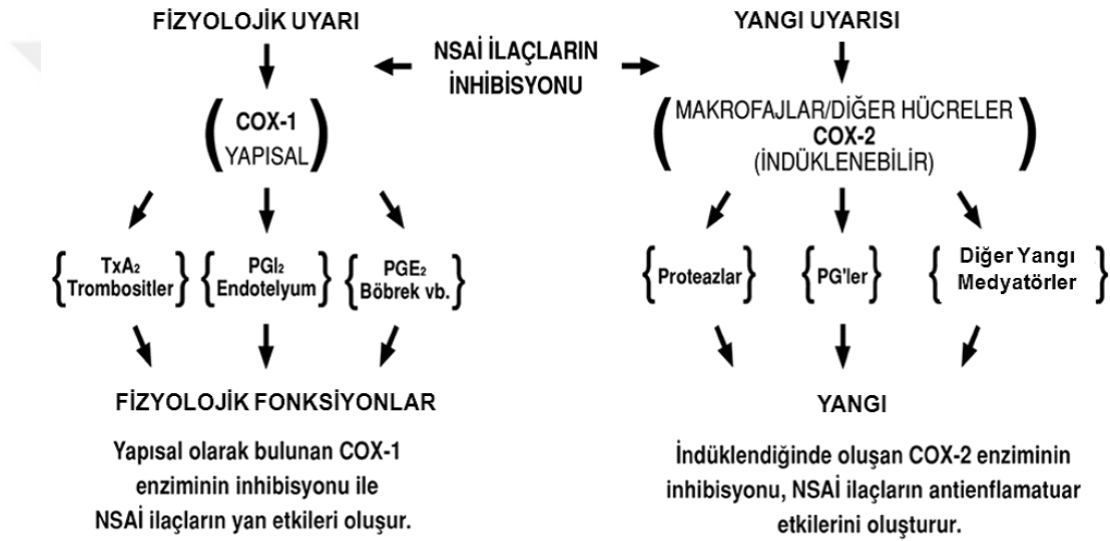
Asetaminofen inflamasyonun olmadığı hafif ve orta şiddetli baş ağrısı, diş ağrısı, miyalji, dismenore, nevrалji, kemik, eklem ağrıları ve postoperatif ağrıların hafifletilmesi için kullanılır (11). Asetaminofen oral yoldan vücuda alındığında midede az, ince bağırsakta ise hızlı bir şekilde absorbe edilir. Besinler ile alınımı emilim düzeyi üzerinde azalmaya neden olur. Asetaminofen emilmeye başladıktan sonra ortalama 20-30 dk içerisinde kanda pik konsantrasyona ulaşır. Plazma proteinlerine az miktarda bağlanır. Vücut sıvı ve dokularına eşit oranda dağılır. Yarı ömrü 2,5 saat olan asetaminofen karaciğerde yüksek oranda (%80-90) metabolize olur. Glukronik asit, sülfürik asit ve sistein ile konjuge oluşturarak idrar aracılığı ile atılır. Asetaminofenin antitrombotik etkisi zayıftır, kanama süresini değiştirmez (8, 12).

Asetaminofen akut doz aşımında, hepatik ve/veya renal hasarı sonucu ölümlerle sonuçlanabilir. Asetaminofen, reçetesiz alınabildiği ve ucuz olduğu için ulaşımı kolaydır ve daha fazla kullanılır. Bu nedenle asetaminofen ve içeriğinde asetaminofen bulunan ilaçlarla intihar veya kaza sonucu ölümlere sıklıkla rastlanmaktadır. İntihar olgusunun araştırıldığı bir çalışmada sıklıkla asetaminofen tercih edilmesinin nedeni olarak; olguların yarısı (%50) bu ilaca kolayca ulaşıldığı için, olguların %29'u riskli ve olguların %4'ünün ise ucuz olduğu için kullanıldığının ortaya koymuştur (11).

3.1.3. Asetaminofenin Etki Mekanizması

Asetaminofen 100 yıldan uzun bir süre önce keşfedilmiş ve uzun yıllar boyunca tıbbi uygulamalarda yaygın olarak kullanılmış, fakat etki mekanizması tam olarak açıklanamamıştır (13). NSAİİ'lara benzer analjezik ve antipiretik özelliklere sahiptir, ancak bunların aksine herhangi bir antiinflamatuvar etkisi yoktur. Asetaminofen bir antiinflamatuvar bileşenin eksikliğinden dolayı NSAİİ ailesinin bir üyesi olarak kabul edilmemiştir, fakat her zaman bu ilaçlarla birlikte tartışılmıştır. Bu yüzden, asetaminofenin etki mekanizması hakkındaki tartışma, NSAİİ'lerin etkisinin analizinden başlamalıdır (14). Asetaminofenin etki mekanizması, başlıca merkezi sinir sistemi üzerinde santral siklooksijenaz (COX) inhibisyonu ve serotoninerjik sistemle indirekt yolla etki ettiği düşünülmektedir.

COX biyosentetik prostaglandin (PG) yolunun çalışmasını düzenleyen ve sınırlayan ilk enzimdir. Birçok dokuda bulunan COX-1, fizyolojik hücre iletişiminde rol alır. COX-1 enzimi inhibe edilirse buna bağlı olarak, NSAİİ'lerin istenmeyen etkileri (yan etkiler) ortaya çıkabilmektedir. COX-2, yangısal cevapta görevli prostanooidlerin oluşumuna neden olur ve yangının meydana geldiği bölgede başlatılır. COX-2 enziminin inhibe edilmesine bağlı olarak NSAİİ'lerin analjezik ve antiinflamatuvar etkinliği ortaya çıkar (Şekil 3) (15). Üçüncü izoenzim COX-3'ün yaygınlığı ve rolü, bugüne kadar devam eden tartışmaların konusudur. COX-3 varlığı sadece beyin ve spinal kordda ortaya çıkartılmıştır (16, 17).



Şekil 3: COX-1 ve COX-2 Enzimlerinin Etkileri (15)

Asetaminofenin antiinflamatuvar etki potansiyeli hep tartışılmalıdır. Asetaminofen santral sinir sisteminde PG sentezini baskılar. Diğer NSAİİ'lara göre asetaminofen periferde daha zayıf PG sentez inhibisyonu yaptığı bildirilmektedir. Asıl etkinin santral PG sentezi inhibisyonu üzerinden meydana geldiği ve bu santral etkinin antiinflamatuvar ve analjezi etki oluşturmak için yeterli olduğu ileri sürülmektedir (15).

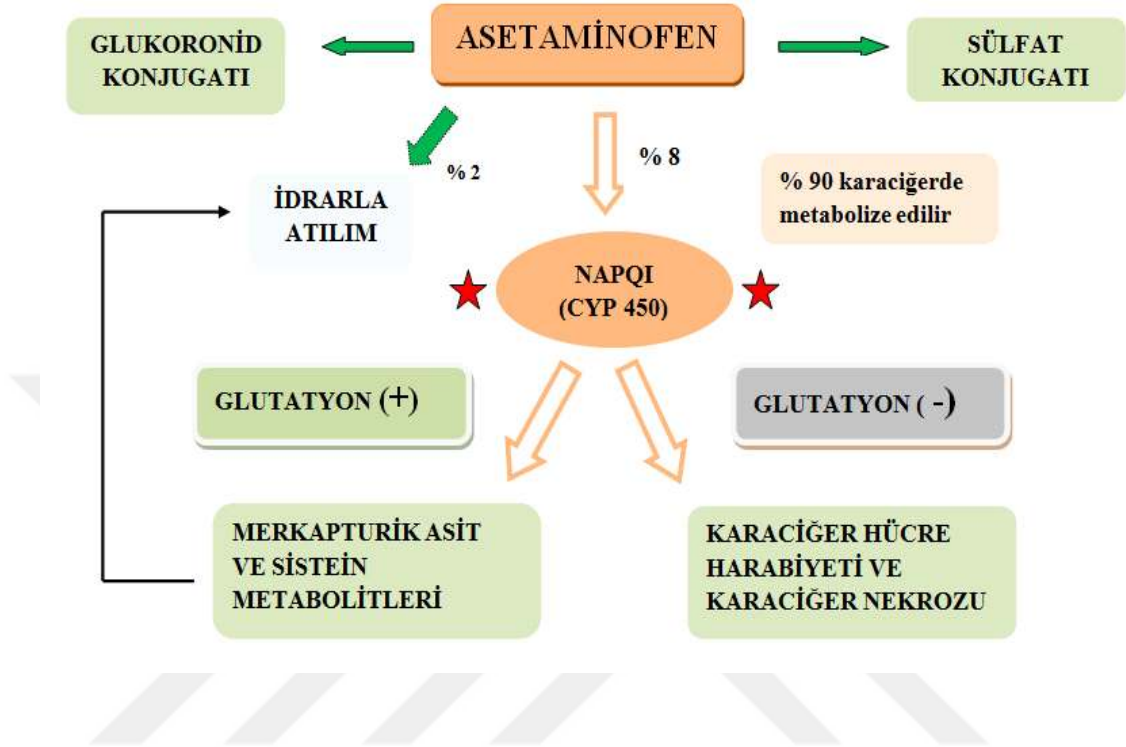
3.1.4. Asetaminofenin Metabolizması

Asetaminofen, oral alımlarda gastrointestinal sistemde hızlı bir şekilde ve tamamen absorbe edilir. 30-60 dakikada plazma pik konsantrasyonuna ulaşır ve terapötik dozdan 2-4 saat sonra plazmadaki yarılanma ömrünü tamamlamaktadır. Oral yolla kullanıldığında biyoyararlılığı %80 olarak rapor edilmiştir. Rektal yolla kullanıldığında ise, yüksek oranda fakat oldukça yavaş bir biçimde emilir ve biyoyararlılığının %30-40 olduğu bildirilmektedir. Plazma proteinlerine tutunma süresi kısadır (18).

Asetaminofenin biyotransformasyonu yüksek oranda karaciğerde, majör ve minör olmak üzere iki şekilde gerçekleşmektedir ve bir kısmı da böbrekte glukuronidasyon, sülfasyon ve mikrozomal oksidasyon (sitokrom p450 (CYP450)'ye bağlı) reaksiyonları şeklinde gerçekleşmektedir. Asetaminofen majör yolu kullanarak %90'ı karaciğerde sülfotransferaz enzimi yardımıyla sülfat konjugatına ve üridin difosfoglukronil transferaz enzimini kullanarak asetaminofenin konjugatı olan glukoronide dönüştürülür. Oluşan bu konjugatların bir bölümü karaciğerden safraya bir bölümü kan dolaşımına geçer. Glukuronidasyon ve sülfasyon basamaklarıyla oluşan metabolitler ile konjuge olmayan bileşiklerin %2'lik kısmı değişmeden idrarla atılır ve organizma için toksik değildir. Geriye kalan %8'lik kısmı ise minör yol ile hepatik CYP450 enzimlerini kullanarak N-asetil p-benzokinoimin (NAPQI) adlı bileşiğe dönüştürülür. Bu bileşik oldukça reaktif ve toksiktir (3). NAPQI metabolitinin bir bölümü protein arilasyonu oluştururken diğer bölümü ise glutatyon (GSH) konjugatı meydana getirerek safraya gönderilmektedir. Asetaminofen doz aşımında minör basamakta meydana gelen NAPQI (CYP450'ye bağlı oksidasyon basamağında oluşur), serbest radikal üretimi artırır ve toksisiteye neden olur. Şekil 4'te görüldüğü gibi toksik olmayan merkaptürik asit ve sistein metabolitlerine dönüştürülerek idrarla atılmaktadır (19).

Aşırı doz asetaminofen alımlarında GSH fazla miktarda tüketilir ve toksik metabolit olan NAPQI miktarında meydana gelen artış hepatik GSH kapasitesini aşarsa biriken NAPQI detoksifiye edilemeyeceğinden NAPQI metabolitinin proteinler, lipidler ve deoksiribonükleik asit (DNA) gibi makromoleküllere

kovalent bağlanarak hasara neden olur (20, 21). NAPQI artışı toksikasyona neden olur ve bu da karaciğerde nekroz ve ileri evrelerde de karaciğer yetmezliği ile böbreklerde de hasar meydana getirir (22).



Şekil 4: Asetaminofenin Metabolizması (22)

3.1.5. Asetaminofenin Terapötik Kullanımı

Terapötik dozda kullanılan asetaminofen genellikle iyi tolere edilir. Asetaminofen, analjezik veya antipiretik amaçla kullanıldığında aspirine tercih edilir. Asetaminofenin yetişkinlerde oral olarak kullanılan uygun dozu 500-1000 mg'dır (rektal olarak kullanılırsa 650 mg). Günlük toplam doz 4 gr'dan fazla olmamalıdır. Asetaminofen çocuklarda 10-15 mg/kg dozunda her 4-6 saatte bir kullanılabilir. Yaşa ve kilo farklılıklarına bağlı olarak günlük (24 saatte) maksimum 5 doz verilmelidir (23). Ağrı giderici amaçla, 5-10 günden fazla kullanılması tavsiye edilmez.

Asetaminofen akut doz aşımında, karaciğer ve/veya böbrek üzerinde meydana gelen hasar sonucu ölüme neden olabilmektedir. Oral yolla kullanılırsa tavşan ve ratlarda; 2000 mg/kg dozunda, farelerde; 400-900 mg/kg dozunda, kedilerde; 50 mg/kg ve köpeklerde; 500 mg/kg dozlarında ölümlerle sonuçlanabileceği bildirilmektedir. Kediler asetaminofene çok duyarlıdır (24).

3.1.6. Asetaminofenin Yan Etkileri

Asetaminofen, terapötik dozlarda kullanıldığında genellikle iyi tolere edilir. Asetaminofen genellikle hafif yan etkilere neden olmaktadır. Yan etkileri arasında ciltte meydana gelen reaksiyonlar (kızarıklık, döküntü) ve ilaç ateşi görülebilmektedir. En sık görülen yan etkiler ise bulantı, kusma, kabızlık gibi gastrointestinal sistem ile ilgili şikayetlerdir. Asetaminofen yüksek dozda kullanıldığında, ölümlerle sonuçlanabilen karaciğer nekrozu en ciddi yan etkisidir (25). Ayrıca, intravenöz (i.v.) yol ile uygulamalarda enjeksiyon yerinde ağrı görülebilir. Yan etkileri sıklığına ve görülen sistemlere göre Tablo 2'de kısaca gösterilmiştir.

Tablo 2: Asetaminofenin Yan Etkileri (25)

	Yaygın (%1-10)	Nadir (<%1)
Hepatik	AST yükselmesi	AST ve ALT yükselmesi
Gastrointestinal	Karın ağrısı, ishal, kabızlık, dispepsi	-
Alerjik	-	Anafilaksi, hipersensitivite reaksiyonları
Hematolojik	Anemi	Trombositopeni, lökopeni, nütropeni
Dermatolojik	Kızarıklık, kaşıntı	Steven-Johnson sendromu, toksik epidermal nekroz
Diğer	Yüksek ateş, halsizlik, enjeksiyon yerinde ağrı, kızarıklık	-

AST: Aspartat aminotransferaz, ALT: Alanin aminotransferaz

3.1.7. Asetaminofen Toksisitesi

Asetaminofen akut olarak yüksek dozda kullanıldığında görülen en önemli yan etkisi doza bağımlı olarak ortaya çıkan ölümcül karaciğer nekrozudur. Öte yandan renal tübüler nekroz ve hipoglisemik koma da şekillenebilir. Terapötik kullanımlarda karaciğer enzimlerinde görülen hafif artış geri dönüşümlü olup ilaç kesilince ortadan kalkar. Asetaminofen kaynaklı yüksek doz maruziyeti hepatoselüler hasara hatta ölüme neden olabilir. Oluşan bu mekanizma, onun toksik reaktif metabolitine (NAPQI) dönüşümünü içerir (23). NAPQI hücresel proteinler ile kovalent bağlar oluşturabilir, bunun sonucunda ise bu proteinlerin yapı ve fonksiyonlarını değiştirebilir. Bu hücresel bozukluklar, kalsiyum ATPaz aktivitesinde azalmaya yol açar ve sitozolik kalsiyum düzeylerinde artışa neden olur, hücresel kalsiyum homeostazisi bozulması, hücrenin geçirgenliğini değiştirebilir ve membran bütünlüğünün kaybına yol açabilir (26).

3.1.8. Asetaminofen Kaynaklı Hepatotoksisite

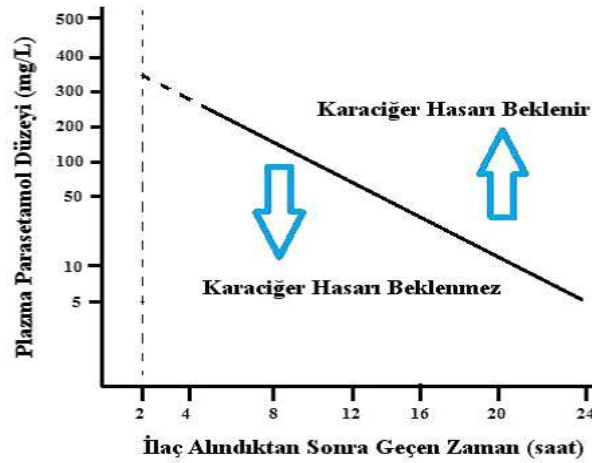
Asetaminofen doza bağlı hepatotoksik bir ajan olarak bilinmektedir. Terapötik doz alımında güvenli olan asetaminofen yüksek dozda kullanıldığında öldürücü akut karaciğer nekrozuna neden olur (21). Akut karaciğer yetmezliği vakalarının %58 ilaçlara bağlı olarak meydana gelmektedir. Bu ilaçlar arasında %46 ile asetaminofen yüksek bir orana sahiptir. Asetaminofen ucuz olduğu ve reçetesiz satıldığı için intihar kaynaklı ölümler içinde önemli bulunmaktadır. Fakat daha önemlisi asetaminofen başka ilaç preparatları içerisinde de bulunur ve bu ilaçlara uzun dönem maruz kalındığında geç fark edildiği için hepatotoksisite riski daha tehlikeli olmaktadır (27).

Karaciğerde meydana gelen nekrozun şiddetini etkileyen faktörler;

1. GSH depoları
2. CYP450 sistemi
3. Glukuronizasyon sistemin aktivitesidir.

Tek seferde 10-15 g/kg asetaminofen alımını takiben hepatotoksisite şekillenebilir. Fakat 20-25 g/kg ve üzerindeki kullanılan dozlar ölümcül olabilmektedir. Dozun büyük bir kısmı ilaç alımını takiben absorbe edilir, kalan kısmının absorpsiyonunun yavaş ve uzamış şekilde devam etmesi toksisitede diğer bir etken olarak görülmüştür (20, 28).

Plazma asetaminofen düzeyine ve ilacın alımından sonra geçen süreye bakılarak meydana gelen toksisite incelenmiştir. Buna göre ilaç alımından sonraki 4. saatteki asetaminofen düzeyi 200 µg/ml üzerinde olan hastaların hepatotoksisite riski %60 iken, böbrek yetmezliği riski %1 ve mortalite riski %5 olarak hesaplanmıştır. İlaç alımından sonra 4. saatten sonra asetaminofen düzeyi 150 µg/ml altında olan hastalarda ise hepatotoksisite riski %1 olup tüm hastaların komplikasyonsuz iyileşmesi beklenir (Şekil 5) (29, 30).



Şekil 5: Asetaminofen Alımı Sonrası Toksisite Meydana Gelme Süresi (30)

3.2. Serbest Radikaller

Oksijen canlılığın devamı için çok önemli bir elementtir. Organizmada enerji üretmek için kullanılan oksijen, reaktif oksijen türleri (ROT) ve reaktif nitrojen türleri (RNT) oluşumuna neden olmaktadır. Moleküler oksijen (O₂, dioksijen)'in vücutta kullanımı esnasında mitokondri sürekli serbest radikal üretmektedir. Enerji üretimi sonucunda meydana gelen serbest radikaller nükleik asit, protein ve lipitlerin yapısını değiştirebilir (31).

Serbest radikaller, dış yörüngede eşleşmemiş bir elektrona sahip oksidan moleküller olarak tanımlanır. Genellikle kararsız yapıda bulunurlar ve çok reaktiftirler. Kararlı hale gelmek için diğer maddelerle kolayca reaksiyona girebilirler. Yapılarında bulunan elektronları çiftler halinde bulunduran atomlar ise kararlı bir yapıya sahip olduğundan diğer maddelerle reaksiyona girme eğilimleri serbest radikallere oranla daha düşüktür ve bu molekül ya da atomlar nonradikal olarak isimlendirilir. (32, 33).

Serbest oksijen radikalleri veya daha genel olarak ROT ve ayrıca RNT, normal hücrel metabolizmanın ürünleridir. ROT ve RNT canlı sistemler için zararlı veya faydalı olabilirler. ROT'nin faydalı etkileri düşük veya orta konsantrasyonlarda ortaya çıkar. Potansiyel biyolojik hasara neden olan serbest radikallerin zararlı etkisi, oksidatif stres ve nitroaktif stres olarak adlandırılır (34).

Bu biyolojik sistemlerde bir tarafta aşırı ROT/RNT üretimi ve diğer tarafta enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların eksikliği olduğunda meydana gelir. Başka bir deyişle, oksidatif stres, oksijen kullanan metabolik reaksiyonlardan kaynaklanır ve canlı organizmalarda prooksidan/antioksidan reaksiyonların denge durumundaki bir bozukluğu temsil eder. Aşırı ROT, normal işlevlerini inhibe ederek hücrel lipidlere, proteinlere veya DNA'ya zarar verebilir. Bu nedenle, oksidatif stres, yaşlanma sürecinin yanı sıra bir dizi insan hastalığında da rol oynamaktadır. Serbest radikallerin faydalı ve zararlı etkileri arasındaki hassas denge, canlı organizmaların çok önemli bir yönüdür ve “redoks düzenlemesi” adı verilen mekanizmalarla sağlanır. “Redoks düzenlemesi” süreci, canlı organizmaları çeşitli oksidatif streslerden korur ve redoks durumunu in vivo kontrol ederek “redoks homeostazını” sürdürür (35).

Serbest radikaller kaynağını ya oksijenden (Tablo 3) ya da nitrojenden alır. Oksijen kaynaklı olanlar ROT ve nitrojen kaynaklı olanlar RNT olarak adlandırılır. RNT arasında: Nitrik oksit ($\text{NO}\cdot$) ve Nitrojen dioksit ($\text{NO}_2\cdot$) bulunur (32,33).

Tablo 3: Reaktif Oksijen Türleri (36)

Radikaller		Non Radikaller	
Süperoksit	$O_2^{\cdot -}$	Hidrojen Peroksit	H_2O_2
Hidroksil	$OH^{\cdot}$	Hipokloröz Asit	$HOCl$
Peroksil	$ROO^{\cdot}$	Hipobromöz Asit	HOB
Alkoksil	$RO^{\cdot}$	Singlet Oksijen	1O_2
Hidroperoksil	$H_2O^{\cdot}$	Ozon	O_3
Lipit Peroksil	$LOO^{\cdot}$		

3.2.1. Serbest Radikal Çeşitleri

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

Oksijenden türetilen radikaller, canlı sistemlerde üretilen en önemli radikal sınıfını temsil eder. O_2 benzersiz bir elektronik konfigürasyonuna sahiptir ve kendisi bir radikaldır. Dioksijene bir elektron eklenmesi sonucu süperoksit radikali ($O_2^{\cdot -}$) meydana gelir (37). Metabolik süreçler yoluyla veya fiziksel ışınlama ile oksijen aktivasyonunun ardından ortaya çıkan $O_2^{\cdot -}$ "birincil" ROT olarak kabul edilir. Ardından doğrudan veya yaygın olarak enzim veya metal yoluyla "ikincil" ROT oluşturmak için diğer moleküllerle etkileşime girebilir. (38).

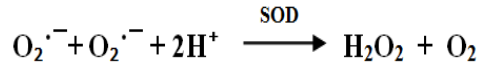
Süperoksit üretimi çoğunlukla bir hücrenin mitokondrisinde meydana gelir. Mitokondriyal elektron taşıma zinciri, memeli hücresindeki ATP'nin ana kaynağıdır ve bu nedenle yaşam için gereklidir. Enerji iletimi sırasında, az sayıda elektron erkenden oksijene sızar ve çeşitli hastalıkların patofizyolojisinde rol oynayan serbest oksijen radikali olan $O_2^{\cdot -}$ oluşturur (39, 40).

Oksijen, en önemli serbest radikal kaynağı olarak bilinir. Oksijen toplamda 8 adet elektrona sahip olup dış orbitalinde ise eşleşmemiş 2 adet elektrona sahip olduğu için diradikal olarak adlandırılır. Toplamda 4 elektron alabilen oksijen bu elektronları alarak suya indirgenir.

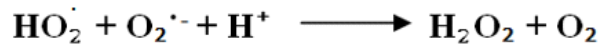
Oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi ile $O_2^{\cdot-}$ meydana gelir. Oluşan bu $O_2^{\cdot-}$ yapısında eşleşmemiş bir elektron bulundurduğu için radikal grubunda yer alır. Yine $O_2^{\cdot-}$ bir elektron alarak hidrojen peroksit (H_2O_2)'e indirgenir (41).



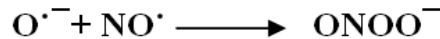
Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi yardımıyla $O_2^{\cdot-}$ radikali hızlıca H_2O_2 dönüşmektedir. $O_2^{\cdot-}$ radikali nadiren oksidatif hasara neden olur. Asıl hasar $O_2^{\cdot-}$ radikallerinin H_2O_2 kaynağı ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasından kaynaklanır. İki $O_2^{\cdot-}$ radikali bir araya gelmesi sonucu H_2O_2 oluşur.



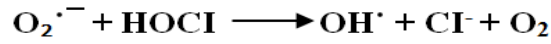
$O_2^{\cdot-}$ ve perhidroksi radikali ($HO_2^{\cdot}$) ile reaksiyona girmesi sonucunda biri okside olur diğeri ise indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonunun sonucunda ise H_2O_2 ve O_2 meydana gelir (42)



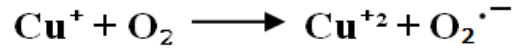
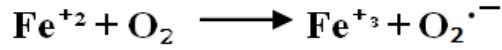
$O_2^{\cdot-}$, $NO^{\cdot}$ ile reaksiyona girmesi sonucunda eşleşmemiş halde bulunan birer adet elektronlarını kovalent olarak bağlarlar ve bunun sonucunda peroksinitrit ($ONOO^-$) meydana gelmektedir (43).



Oksijen metabolitleri ile reaksiyona girme potansiyeline sahip olan hipoklorik asit ($HOCl$) bu özelliği nedeniyle ilgi uyandırmıştır. $O_2^{\cdot-}$ radikalinin $HOCl$ ile reaksiyonu sonucunda çok güçlü oksidan olan Hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$)'ni oluşturur (44).



Öte yandan geçiş metallerinin otooksidasyona uğraması sonucunda da $\text{O}_2^{\cdot-}$ oluşabilmektedir (45).

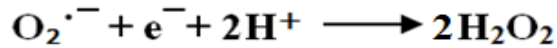
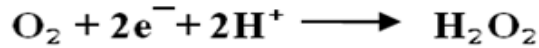


Bu reaksiyonlar **redoks reaksiyonları** olarak adlandırılır. Serbest radikal reaksiyonlarının hızlanmasında büyük öneme sahip olan redoks reaksiyonları geri dönüşümlüdür (46).

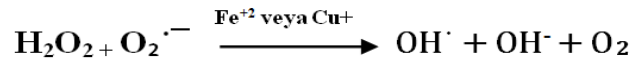
3.2.1.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit (H_2O_2) serbest radikal değildir. Fakat biyolojik membranlara nüfuz edebilme yeteneğine sahiptir ve ROT'nin üretimine katkı sağlar. Bu yüzden non ROT arasında önemli yere sahiptir. Önemli bir diğer fonksiyonu ise hücre içi sinyal molekülü olarak işlev göstermesidir (47).

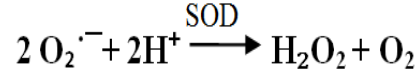
Asidik ortamda bulunan O_2 ortamdan iki elektron alarak ya da $\text{O}_2^{\cdot-}$ 'i ortamdan bir elektron alarak, H_2O_2 'i meydana getirir.



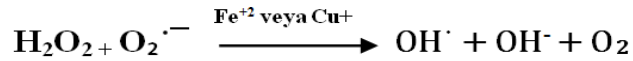
H_2O_2 , $\text{OH}^{\cdot}$ kaynağı olduğundan ROT arasında önemli bir yere sahiptir. Çünkü en zararlı ROT'ni $\text{OH}^{\cdot}$ 'dir (48).



H₂O₂'nin organizmada asıl üretimi O₂^{•-}'nin dismutasyonu ile olur. Bu reaksiyon kendiliğinden oluşabildiği gibi SOD enzimi katalizörlüğünde de oluşabilir. (44, 49). İki O₂^{•-} iki hidrojen ile SOD katalizörlüğünde reaksiyona girerek ve O₂^{•-} iki proton alarak H₂O₂ ve O₂ meydana getirir (45).



H₂O₂ ortaklanmamış bir elektron içermediğinden tek başına çok zayıf oksidan özelliğe sahiptir. H₂O₂ gerektiğinde glutatyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz (KAT) gibi antioksidanlar ve belirli peroksidazlar tarafından yok edilebilir. H₂O₂ ortamda Fe ve Cu gibi geçiş metalleri varlığında O₂^{•-} ile reaksiyona girerek en reaktif ve en zarar verici serbest oksijen radikali olan OH[•] radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir. Bu reaksiyon **Haber-Weiss** reaksiyonu olarak adlandırılır ve katalizörlü ya da katalizörsüz olarak gerçekleşir. Katalizör yokluğunda reaksiyon çok yavaş ilerler (50).

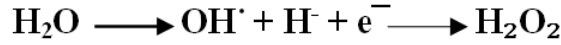


Bu reaksiyon esnasında ilk önce O₂^{•-} ferri demiri (Fe⁺³) ferro demire (Fe⁺²) indirir ve O₂ meydana gelir. Daha sonra bu Fe⁺² kullanılarak **Fenton reaksiyonu** ile H₂O₂'ten OH[•] radikali ve OH⁻ meydana gelir ve reaksiyonun gerçekleşme mekanizması aşağıdaki şekilde gibidir (45).

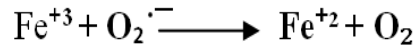


3.2.1.3. Hidroksil Radikali (OH[•])

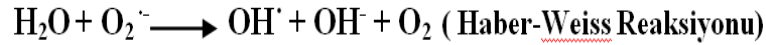
Hidroksil radikali (OH[•]), çok kısa in vivo yarı ömürlü olmasına rağmen yüksek reaktiviteye sahiptir, bu da onu çok tehlikeli bir radikal yapar (36). Bu yüzden OH[•], in vivo olarak üretildiğinde, oluşum bölgesine yakın reaksiyona girer. Suyun iyonize radyasyona maruz kalması sonucu ortaya çıkar (49).



Fenton ve Haber-Weiss tepkimelerinin sonucu olarak meydana gelir. Serbest oksijen radikalleri daha toksik bir radikal olan OH[•] radikaline dönüşür, asıl toksik etkilerini bu şekilde gösterirler. Çok güçlü bir reaktif olan OH[•] canlı hücrelerde bulunan amino asit, lipid ve nükleotitler gibi moleküllerle reaksiyona girer ve bu moleküllerin yapısını bozarak hasara neden olur (44, 49).



(Fenton Reaksiyonu)



3.2.1.4. Singlet Oksijen (¹O₂)

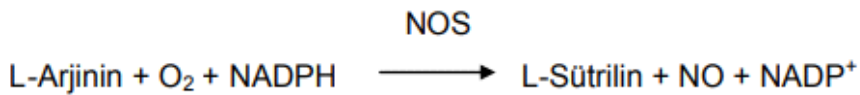
Singlet Oksijen (¹O₂) eşleşmemiş elektrona sahip olmadığından dolayı bir serbest radikal değildir. Oksijenin ortaklanmamış elektronlarından birinin enerjisi alması sonucunda bulunduğu orbitalden başka bir orbitale ya da kendi spininin tersi yönünde yer değiştirmesiyle ¹O₂ oluşur (44, 51).

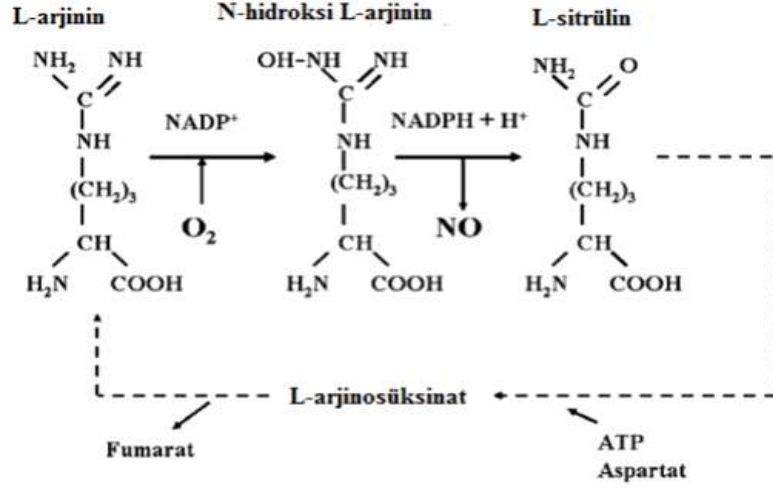
3.2.1.5. Reaktif Nitrojen Türleri

3.2.1.5.1. Nitrik oksit (NO[•])

Nitrik oksit (NO[•]), oksijen gibi organizmanın yaşaması için gerekli olup toksik bir madde haline de dönüşebilir. Fizyolojik görevleri; hücresel adezyon ve vasküler tonusun düzenlenmesinde, immün cevap ve nöronal aşırım gibi olaylarda görev alır. Düşük konsantrasyonlardaki fizyolojik rolü vazodilatasyona neden olan ve nörotransmitter bir hormon olarak işlev görür. Fakat yüksek konsantrasyonlarda olursa hücre moleküllerine bağlanıp bu molekülleri etkisiz duruma getirir. NO[•], renksiz bir gaz olup kaynağını nitrojen alan bir non radikal türüdür. Ortaklanmamış elektron nitrojen atomunun elektronuna ait olsa da bu elektron hem nitrojen atomu hem de oksijen atomu üzerinde lokalizedir. Bu özelliğinden dolayı NO[•] tam bir radikal özelliği bulundurmaz. NO[•]'in yaşam süresi uzundur ve NO[•]'i yok edecek bir enzim bulunmamaktadır. Oksijen kaynaklı radikaller çok fazla yolla üretilir fakat NO[•] sınırlı kaynaktan meydana gelir. Nitro bileşiklerinin metabolize olduğu esnada meydana gelen NO[•] dışında nitrik oksit sentaz (NOS) enzimleri, endojen NO[•] oluşturan tek mekanizmadır (52).

NO[•], L-Arjinin tarafından NOS aracılığıyla nikotinamidadenin dinükleotit fosfat (NADPH) varlığında in vivo olarak sentezlenir (Şekil 6) (52, 53).





Şekil 6: L Arginin Sitruline Dönüşümü Sırasında NO.'in Oluşumu (53)

3.2.2. Serbest Radikal Kaynakları

Organizmanın metabolik faaliyetlerin devamlılığı için gerekli reaksiyonların sonucunda meydana gelen serbest radikaller çevresel faktörler, radyasyon, stres gibi faktörlere bağlı olarak da meydana gelmektedir. Serbest radikaller endojen ve ekzojen kaynaklı olabilir (54).

3.2.2.1. Eksojen Radikal Kaynakları

Radyasyon, UV-ışınları, gamma ışınları, mikrodalga ışınları, güneş ışığı, sigara dumanı ilaç oksidasyonları, volkanik faaliyetler, kükürt dioksit, egzoz gazları, orman yangınları, temizlik ürünleri, parfümler, boya, böcek ilaçları, tiner, tutkal gibi kimyasallar, kloroform gibi su kirletici maddeler, çevresel ajanlar ve strestir (54).

3.2.2.2. Endojen Radikal Kaynakları

1. Mitokondride aerobik solunum gerçekleştiği esnada oksijenler elektron transport sistemi tarafından katalize edilir ve katalize edilen oksijen yan ürün olarak serbest radikalleri meydana getirir.

2. Yangı durumunda serbest kalan sitokinler, makrofaj ve nötrofiller serbest radikal üretmeye başlar.

3. Araşidonik asit metabolizması, plateletler ve düz kas hücreleri ve tarafından serbest radikaller üretilebilir.

4. Ksantin oksidaz ile NADPH oksidaz gibi enzimlerle otooksidasyon reaksiyonları gerçekleştiği sırada endoplazmik retikulumda CYP450 sisteminde meydana gelen elektron kaçaklarından oluşabilir.

5. Yorgunluktan veya zihinsel stresten kaynaklanan stres toksik yan ürün olarak serbest radikal üretebilir.

6. Ayrıca kateşolamin ve kortizol gibi hormonlar vücutta stres reaksiyonlarına neden olabilir ya da bu hormonların kendileri de serbest radikallere dönüşebilirler.

7. İmmun sistem hücrelerinin patojenlere yanıtı olarak ROT ve oksidatif radikaller meydana gelebilir (45).

3.2.3. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller etkilerini özellikle canlı hücreler için yaşamsal öneme sahip olan DNA, lipitler ve proteinlere saldırarak gösterirler (55-57).

3.2.3.1. Karbohidratlara Etkileri

Serbest radikaller, monosakkaritlerin oto oksidasyona uğraması sonucunda, peroksitler, H_2O_2 ve okzalaldehitler meydana gelir. Oluşan bu ürünler diyabetin patogenezinde ve sigara kullanımı ile bağlantılı kronik hastalıklarda önemli bir role sahiptirler. Radikallerin karbohidratlar üzerindeki etkisine gözün vitröz hümründe bol miktarda bulunan hiyalüronik asitin oksidatif hasara uğraması sonucu katarakt meydana gelmesi bir örnektir. Okzalaldehitler; DNA, RNA ve proteinlere bağlanırlar ve aralarında çapraz bağlar oluşturabilme özelliğine sahiptir. Bu yüzden antimitotik etkisi bulunur. Böylelikle yaşlanma ve kanser olaylarında da önemli rol oynarlar (58,59).

3.2.3.2. DNA Üzerine Etkileri

UV ve iyonize radyasyon gibi eksojen faktörler ya da endojen süreçler sonucunda DNA molekülünde meydana gelebilecek farklılıklar "DNA hasarı" olarak adlandırılır. ROT' den kaynaklanan hücrel modifikasyonların en ciddisinin DNA hasarı olduğu düşünülmektedir. Serbest radikallerin DNA'da meydana getirdiği hasar "Oksidatif DNA Hasarı" olarak bilinir. Bazı durumlarda özellikle güçlü reaktif bir bileşik olan OH[·] etkisi ile DNA'da meydana gelen "oksidatif hasar" onarılamaz ve sonucunda karsinogenez, mutagenез, ya da yaşlanma olayları ortaya çıkar (58, 59-61). OH[·], DNA yakınlarında meydana gelirse bu radikal deoksiriboz ve bazlar ile kolay bir şekilde reaksiyona girer ve sonucunda mutasyonlar oluşabilir. Bu etkilerini nükleik asitlerdeki doymuş karbon atomlarından hidrojen çıkarma veya çift bağlara katma reaksiyonları ile DNA hasarı oluşturarak gösterirler. Lipid peroksidasyonu (LPO)'nun son ürünü olarak oluşan malondialdehit (MDA)'ın DNA üzerinde mutasyona sebep olduğu, kanser ve bazı genetik hastalıklara da yol açtığı düşünülmektedir. (62, 63).

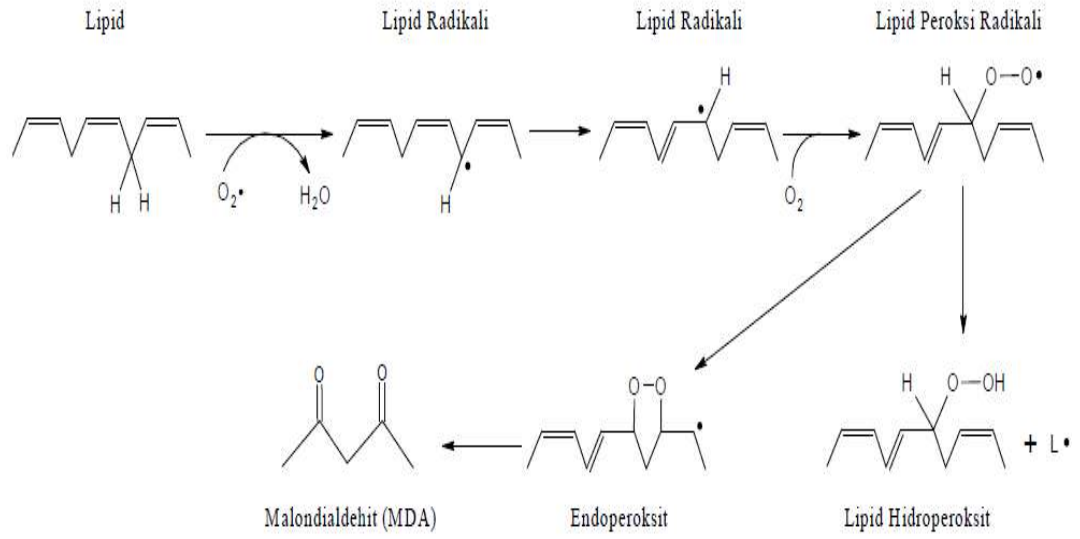
3.2.3.3. Proteinler Üzerine Etkileri

Proteinler, lipitlere oranla serbest radikallerden daha az etkilenir. Serbest radikallerin proteinleri etkileme dereceleri, proteinlerin içerdiği amino asit kompozisyonuna bağlı olarak farklılık gösterir. Proteinlerin tüm amino asit kalıntılarının, özellikle proteinlerin sistein ve metionin kalıntılarının yan zincirleri, ROT/RNT'nin etkisiyle oksidasyona duyarlıdır (64). Yapısında doymamış bağ ve sülfür bulunan amino asitlerden (triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi) oluşan proteinler serbest radikaller tarafından daha kolay etkilenirler. Proteinler radikallerle reaksiyona girerse bu reaksiyon sonucunda karbon merkezli radikaller ve sülfür radikalleri meydana gelir. Proteinlerde oluşan oksidatif hasar, proteinlerin radikallerle reaksiyonundan meydana gelen karbon merkezli radikallerden 'karbonillerin' ölçülmesi ile saptanır. Serbest radikallerin oluşturduğu hasar sonucunda proteinler parçalanır, proteinlerde çapraz bağlanma görülür ve agregasyon oluşur. Enzimlerin yapısında protein bulunur. Bu proteinlerin de hasar meydana gelirse hücrelerin normal fonksiyonlarında bozukluklar meydana gelir ve enzim aktivitesinde aksaklıklar görülür (65, 66).

3.2.3.4. Serbest Radikallerin Hücre Lipitlerine Etkileri

Doymamış yağ asidi ile başlatıcı bir radikal reaksiyona girmesi sonucunda bir hidrojen atomu transfer edilerek yağ asidi radikali oluşturulur. Lipitler serbest radikallere karşı oldukça hassas moleküllerdir. Serbest radikaller özellikle çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA)'nın yapısında bulunan ikili bağları hedef alırlar. LPO sonucu meydana gelen ürünler radikal hasarın incelenmesinde önemli role sahiptir. Yağ asitlerinin peroksidasyonu zincir reaksiyonu şeklinde meydana gelir. Serbest radikaller hücre membranlarında bulunan kolesterol ve yağ asitlerine etki ederek LPO'nu başlatırlar. Yağ asidi radikaline oksijen eklenmesi sonucunda peroksi radikali oluşur. Oluşan bu peroksi radikali, diğer bir yağ asidi molekülünden ayrılan hidrojen ile birleşerek hidroperoksit (ROOH)'ler ve yeni lipid radikalleri oluşur. Böylelikle LPO'u zincir reaksiyonu halinde devam eder ve sonuç olarak MDA, etan, pentan gibi ürünler meydana gelir (67). Çok zararlı bir zincir reaksiyonu olan LPO geri dönüşümsüz membran hasarına neden olur. Daha sonra devam eden bu zincir reaksiyonları protein oksidasyonuna sebep olur. Membranlarda oluşan yıkıcı etki genellikle reaksiyon esnasında açığa çıkan $\text{OH}\cdot$ radikalinin membran yağ asidi yan zincirlerine saldırmasıyla meydana gelir (68).

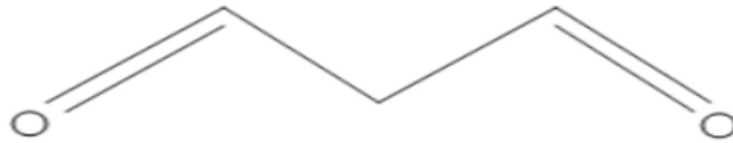
LPO reaksiyonu ya süpürücü antioksidan reaksiyonları tarafından sonlandırılır ya da oto katalitik yayılma reaksiyonları ile sürdürülür (Şekil 7) (69).



Şekil 7: MDA Oluşumu (70)

3.2.3.5. Malondialdehit (MDA)

Araşidonik asit ve dokosahekzaenoik asit gibi en az 3 tane çift bağ içeren PUFA'nın peroksidasyonu sonucu oluşan bir üründür (Şekil 8) (70, 71)

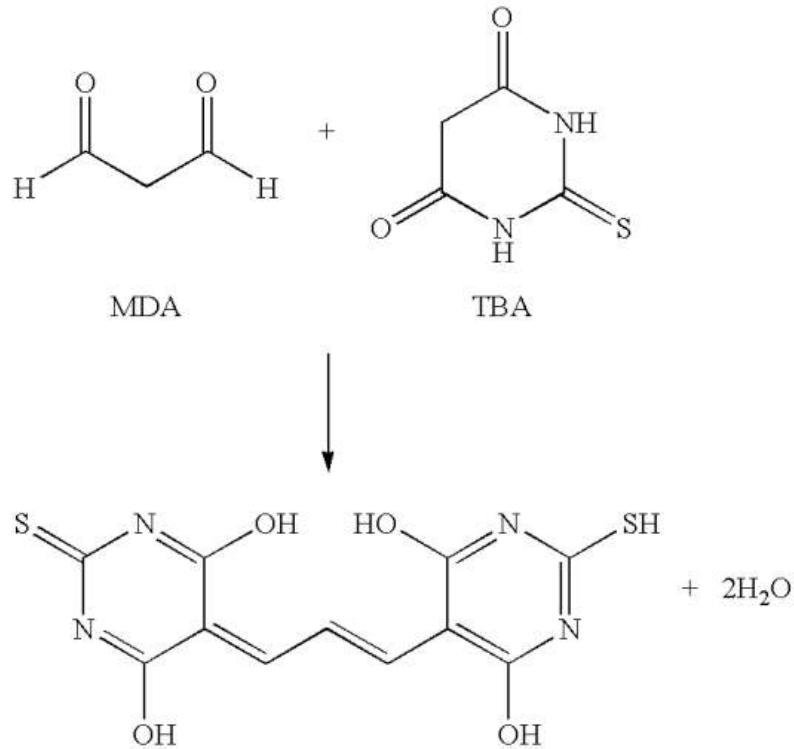


Şekil 8: MDA'nın Yapısı (72)

Oluşan MDA, birçok hasara sebep olabilmektedir. Başta membran bütünlüğünü bozarak membrandan iyon alışverişinin bozulmasına sebep olur. Ayrıca oluşan MDA'nın aldehit grubu DNA'nın azot içeren bazlarıyla reaksiyona girebilir ve sonucunda mutajenik, genotoksik ve karsinogenik etkiler yaratabilir (72, 73). Serbest radikal miktarı artarsa, MDA düzeyinde de artış görülür.

Bu yüzden MDA organizmada meydana gelen oksidatif stresin bir belirtici olarak kullanılmaktadır (74).

Tiobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyon veren ve LPO bir ürünü olan MDA, bilirubin gibi maddeler de TBA ile reaksiyon verdiği için LPO düzeyi tiobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARs) olarak ifade edilir (75). Kısa zincirli fonksiyonel bir aldehit olan MDA, iki aldehit grubu ile birer amino grubuna bağlanarak schiff bazını oluşturmaktadır. Ayrıca MDA iki molekül TBA ile reaksiyona girerek spektrofotometrede 512 nm’de okunabilen pembe renkli bir bileşik oluşturur (Şekil 9) (76, 77).



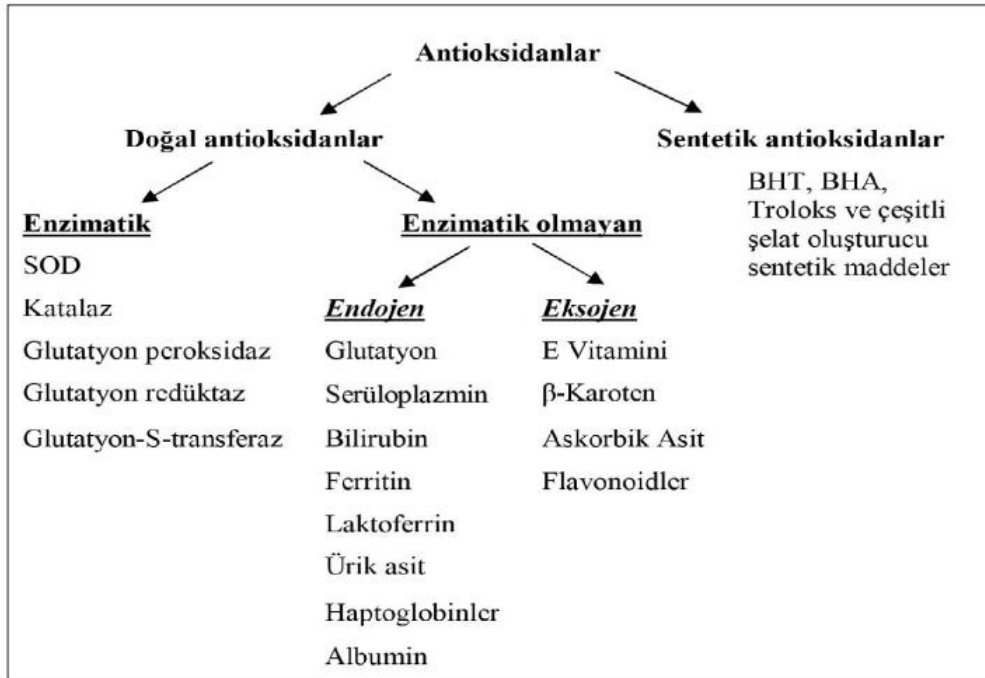
Şekil 9: TBA’nın MDA ile reaksiyonu (77)

3.3. Antioksidan Savunma Sistemleri

ROT oluşumunu engellemek veya oluşturduğu hasarı önlemek, bunların detoksifikasyonu sağlamak amacıyla vücutta bulunan savunma sistemine “antioksidan savunma sistemleri” veya “antioksidanlar” adı verilir.

Serbest radikallerin insan vücudunda neden olduğu oksidatif strese karşı antioksidan savunma sistemleri koruyucu olarak rol alır. Antioksidanlar serbest radikalleri detoksifiye eder ve hücre hasarına karşı koruma sağlar. Antioksidanlar ya doğal olarak vücutta üretilirler veya dışarıdan hazır olarak alınırlar. Her iki durumda da antioksidanlar serbest radikal süpürücü olarak etki göstererek organizmanın savunma sistemini güçlendirir ve hastalık riskini azaltırlar (78).

Antioksidanların kaynakları; endojen ve eksojen olmak üzere ikiye ayrılır. Bu iki grup antioksidanlar vücutta meydana gelecek serbest radikalleri etkisiz hale getirerek vücudu serbest radikallere karşı korurlar (Şekil 10) (79).



Şekil 10: Antioksidanların Sınıflandırılması (80)

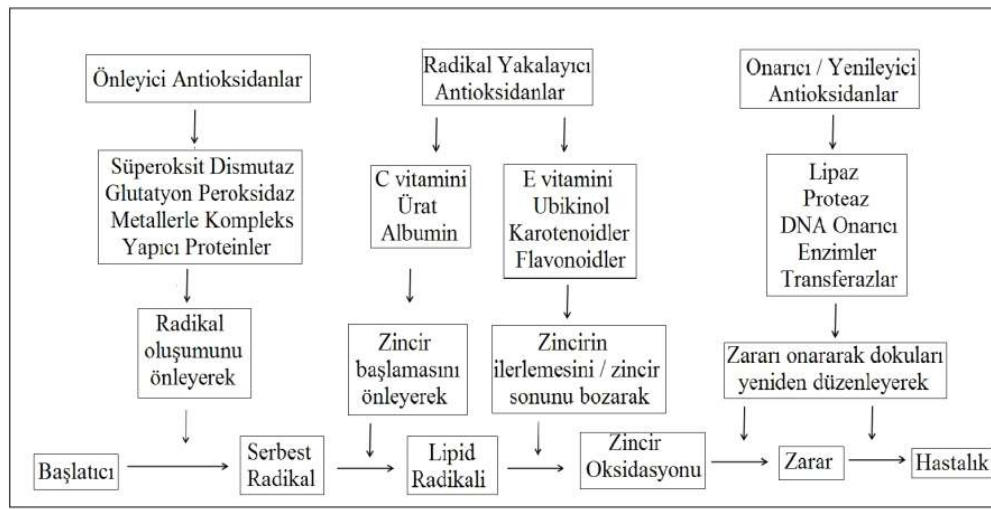
Antioksidanlar Etkilerini Dört Farklı Şekilde Gösterirler

1) Toplayıcı Etkileri: Oksidan maddeleri tutma ya da daha az zararlı bir moleküle dönüştürme olayıdır. Küçük moleküller, antioksidan enzimler ve trakeo bronşiyal mukus böyle etki göstermektedir.

2) Bastırıcı Etkileri: Oksidan maddelerle tepkimeye girip onlara bir hidrojen vererek serbest oksijen radikallerinin etkilerini azaltır ya da inaktif hale dönüştürür. Vitaminler ve flavanoidler de böyle etki gösterirler.

3) Zincir Kırıcı Etkileri: Ortamda var olan oksidanların fonksiyonlarını engellemek için bağlayıp zincirlerini kırma şeklinde etki gösterirler. Hemoglobin (Hb) ve E vitamini bu şekilde etkilerini gösterirler.

4) Onarıcı Etkileri: Oksidan kaynaklı hasarın onarılmasıdır (Şekil 11) (80, 81).



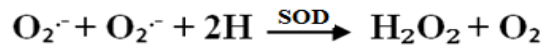
Şekil 11: Antioksidanların Serbest Radikallere Karşı Etkileri (82)

3.3.1. Endojen (Doğal) Antioksidanlar

3.3.1.1. Primer Antioksidanlar

3.3.1.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

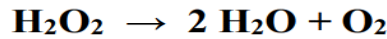
Süperoksit Dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1) hemen hemen tüm aerobik organizmalarda bulunan, $O_2^{\cdot-}$ 'in, H_2O_2 ve O_2 'e dismutasyonunu katalize eden bir veya daha fazla metal (bakır (Cu), çinko, mangan) içerdiğinden metaloenzim olarak adlandırılan bir antioksidan enzimdir (83).



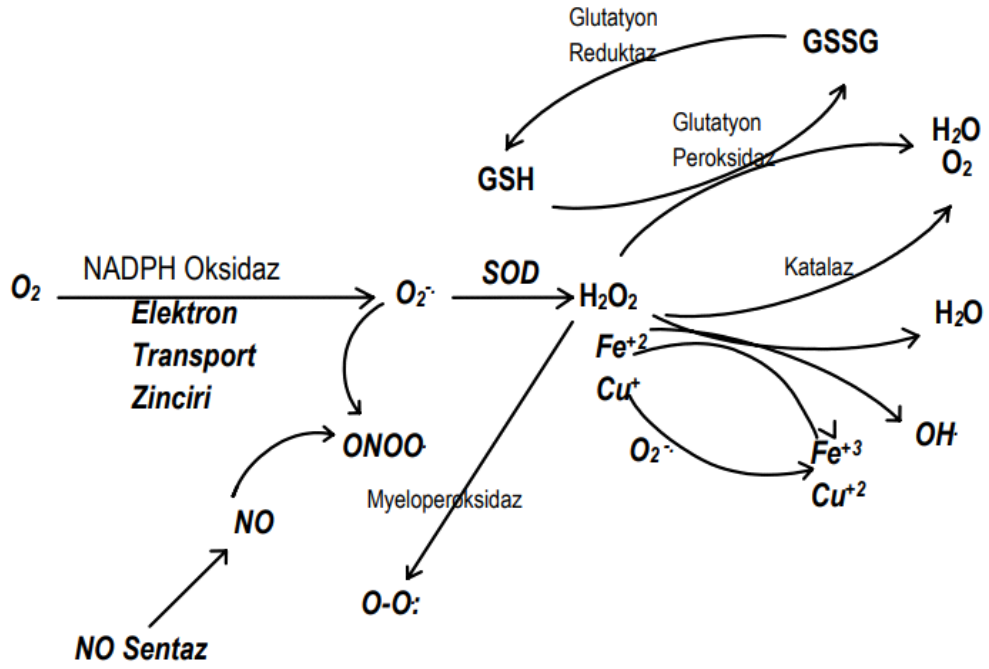
Hemen hemen tüm hücre tiplerinde ve dokularda, bakteri ve insan gibi çeşitli organizmalarda bol miktarda üretildikleri bilinmektedir. Fizyolojik fonksiyonu hücreleri LPO'na karşı korur. Yaş artışıyla birlikte SOD aktivitesinde de artış meydana gelir (83). O_2^- nin H_2O_2 'e dönüştükten sonra meydana gelen H_2O_2 miktarı az ise GSH-Px yardımıyla H_2O ve O_2 ye dönüştürülür. Fakat fazla miktarda H_2O_2 oluşmuşsa KAT tarafından aynı şekilde yok edilir. H_2O_2 yok edilmediği durumlarda $OH\cdot$ radikaline dönüşür. SOD'ın katalizlediği tepkime sonucunda toksik oksijen türlerinden olan H_2O_2 meydana geldiğinden ve KAT tarafından yok edildiğinden SOD'ın KAT ile birlikte kullanılması önerilmektedir (83, 84).

3.3.1.1.2. Katalaz (KAT)

Başlıca peroksizomlarda bulunan katalaz (KAT, EC 1.11.1.6) neredeyse bütün dokularda farklı miktarlarda bulunur. İçerisinde 4 tane hem grubu bulunduran bir hemoproteindir. Hemen hemen bütün dokularda bulunmasına rağmen en yüksek aktiviteyi peroksizomların fazla oranda bulunduğu karaciğerde, böbrekte ve eritrositlerde gösterir. Canlı oraganizmada en yaygın bulunan enzimlerden biridir. KAT H_2O_2 'i su (H_2O) ve O_2 'e dönüşümünü katalize eder.



Organizmada H_2O_2 düzeyi artarsa bununla birlikte KAT aktivitesi de artar. Fakat H_2O_2 konsantrasyonu düşerse GSH-Px gibi H_2O_2 'i substrat olarak kullanan başka antioksidan aktivite gösteren enzimler etkileşim göstererek H_2O_2 'i ortamdan uzaklaştırırlar (Şekil 12) (85).

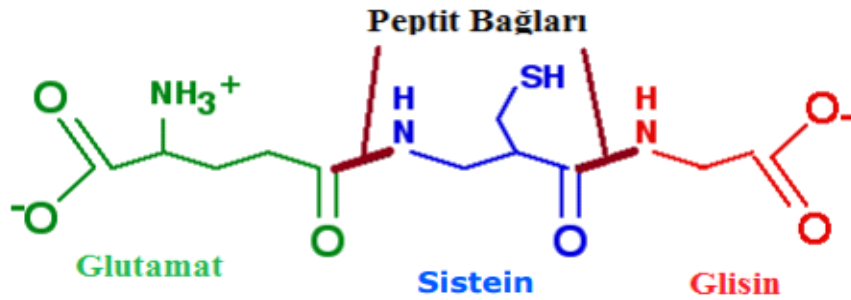


Şekil 12: Serbest Radikallerin Oluşumu ve Enzimatik Detoksifikasyonu (85)

3.3.1.2. Sekonder Antioksidanlar

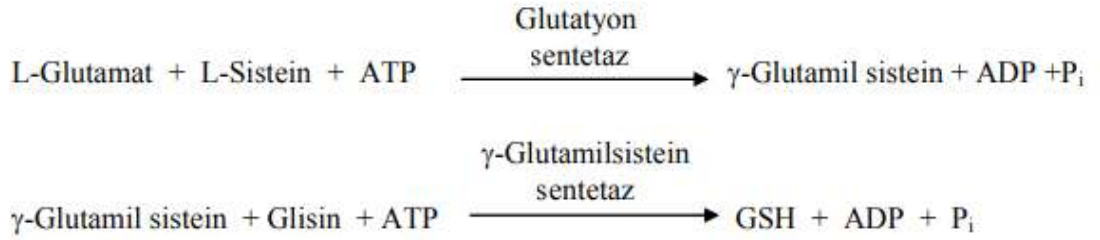
3.3.1.2.1. Glutasyon (GSH)

GSH (γ -glutamil sisteinil glisin), bitkiler de dahil olmak üzere birçok organizmada üç amino asitten (sistein, glisin, glutamik asit) ve protein olmayan başlıca tiyolden oluşan basit bir kükürt bileşiğidir (Şekil 13) (86).



Şekil 13: Glutasyonun Kimyasal Yapısı (86)

GSH iki basamakta L-glutamat, L-sistein ve glisinden sentezlenir.



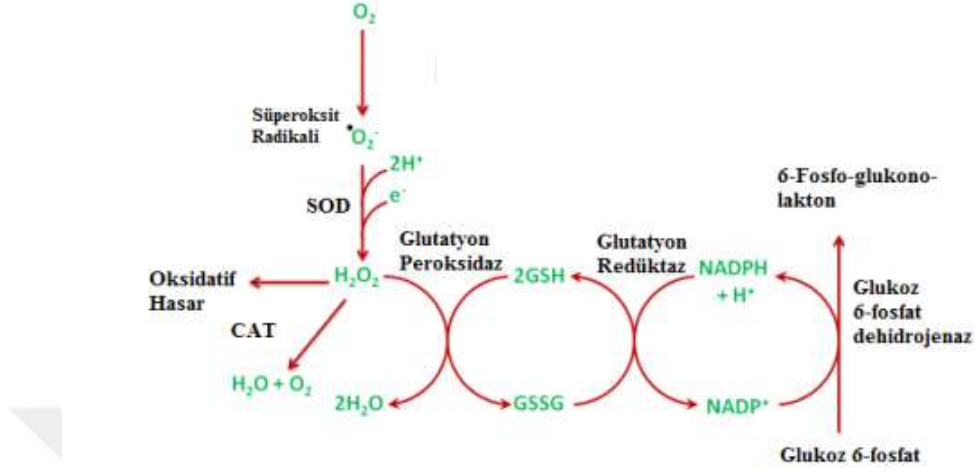
GSH antioksidan ve enzim kofaktörüdür. Elektron donörü olarak görev yapan sülfhidril (-SH) grubu sistein amino asidi kalıntısından gelmektedir. GSH hücrede genel olarak redükte formunda bulunmaktadır. Sağlıklı bir hücrede total GSH düzeyinin sadece %10luk bir kısmını okside formu olan okside glutatyon (GSSG) oluşturmaktadır. GSH, H₂O₂'i ya da organik oksitleri alyuvarlardan detoksifiye eder.

GSH, hücrenin yapısında bulunan proteinleri, indirgemiş halde tutan disülfid-sülfidril değişimi tepkimelerinde etkilidir. Enzimatik olmayan önemli antioksidanlardan biri olan GSH, -SH tamponu görevini görür, bunu da Hb ve diğer eritrosit proteinlerinde bulunan sistein rezidülerini indirgenmiş halde tutarak gerçekleştirir. GSH, yine GSH-Px katalizörlüğünde, H₂O₂ ve organik peroksitler ile reaksiyona girerek antioksidan olarak etki gösterir ve H₂O₂'i alyuvarlardan detoksifiye eder.

H₂O₂ birikimi Hb'in methemoglobine oksidasyon hızını artırarak alyuvarların yaşama süresini azalttığından bu tepkime önemlidir. Ayrıca alyuvarlarda Hb methemoglobine otookside olarak O₂⁻ oluşur ve diğer dokularda ise bu CYP450 redüktaz ve ksantin oksidaz gibi enzimlerle oluşur.

Vücutta normal metabolizma sonucu oluşan O₂⁻ ve H₂O₂, SOD ve GSH-Px enzimleri kullanılarak bu maddelerin zararlı etkileri ortadan kaldırılır. Bu reaksiyonda GSH; GSH-Px etkisi ile GSSG'a ve daha sonra da GSSG glutatyon redüktaz (GR) katalizörlüğünde devamlı olarak GSH'a indirgenir ve bu

indirgenme olayı GSH miktarının düzenlenmesini sağlar. GSH yokluğunda ise H_2O_2 birikir (Şekil 14) (86, 87).



Şekil 14: Redükte/Okside Glutasyon Döngüsü (87).

GSH eksikliği karaciğer hasarının oluşumunda ve karaciğer hasarına bağlı ölümlerde önemli bir unsur olarak öne çıkar. Karaciğer hücrelerinin detoksifikasyon mekanizmalarını yerine getirebilmeleri için hücre içi GSH seviyeleri oldukça önemlidir. Yapılan çalışmalar diyetlerinde sülfür içeren amino asitleri düzenli bir şekilde alan bireylerin GSH düzeylerinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir.

Karaciğer hücreleri içerisindeki GSH düzeylerinin azalması çeşitli patolojik tablolara sebep olabilmektedir. İlaçlar, toksik maddeler ve karsinojenler GSH ile konjuge edilmezse DNA, RNA ve hücre içi proteinlere kovalan olarak bağlanarak önemli derecede hasara sebep olur (87).

3.3.1.2.2. Glutasyon S-Transferaz (GST)

Glutasyon S-Transferaz (GST, EC 2.5.1.18) endojen ve eksojen ksenobiyotiklerin metabolizması sırasında meydana gelen reaktif ürünleri detoksifiye eden önemli bir antioksidan enzimdir. Çoğu ksenobiyotik lipofilik olduğu için kolayca absorbe edilir.

Ksenobiyotikler üç farklı şekilde detoksifiye edilir. Faz I ve faz II lipofilik olan değişimleri barındırır. Faz III' te ise suda daha kolay çözünen, polar olamayan ve hücreler tarafından daha kolay uzaklaştırılabilen ksenobiyotikler oluşur. Elektrofilik ve hidrofobik bileşiklerin endojen ve eksojen kaynaklarının GSH ile konjugasyonunu sağlayarak genellikle daha kolay uzaklaştırılan ve daha az toksik metabolitlere dönüşümü katalize eden GST'lar, faz II detoksifikasyon enzim ailesinin bir üyesidir. Hücrenin sitozol veya mikrozomal bölümlerinde bulunmaktadır. Selenyuma bağlı olmaksızın LPO'na karşı antioksidan etkisini GSH- Px gibi aktivite göstererek yapar (88).

GST elektrofilik karbon, azot veya kükürt atomu içeren nonpolar bileşiklere, GSH'un nükleofilik ataklarını katalizlerler. Substratları halojen nitrobenzenler, arenoksitler, kinonlar ve α , β -doymamış karbonilleri içerir. GST, GSH'un tiyol grubunun ikinci bir substratın elektrofilik bölgesine konjugasyon reaksiyonlarını katalize ederek detoksifiye olmalarını sağlar. Oluşan GSH konjugatı daha az toksiktir ve çözünür formda vücuttan atılırlar (88, 89).

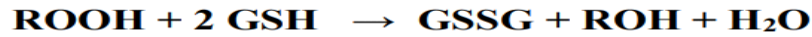
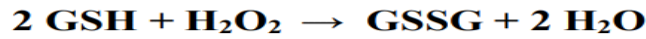
GST, bütün memeli türlerinde olduğu gibi bitkilerde, omurgalılarda, böceklerde, maya ve bakterilerde de bulunur. Hücrede sitozolde ya da mikrozomal kısımlarda bulunabilir. GST'lar alkiller, aril halidler, laktonlar, epoksitler, kinonlar, esterler ve aktiflenmiş aklenler gibi yapısal olarak farklı substratların büyük bir kısmını katalizleme yeteneğine sahiptirler.

GST sayısal olarak çok fazla substrat tanımına rağmen, bu substratların ortak özellikleri çoğu hidrofiliktir ve elektrofilik bir merkez taşımaktadırlar. GST'lar hücrelerin ve organizmaların ilaçlar, pestisitler, herbisitler ve antibiyotikler için direncin geliştirilmesinde bulunurlar (89).

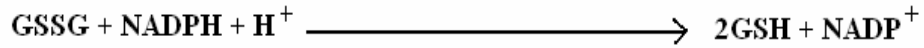
3.3.1.2.3. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)

Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px, EC 1.11.1.12), elektron donörü olarak GSH kullanarak H_2O_2 veya organik $ROOH$ 'leri H_2O veya karşılık gelen alkollere indirgenmesini katalize eden çok sayıda izozim ailesinin genel adıdır. GSH-Px, birbirinin aynısı olan dört adet protein alt biriminden meydana gelmiştir.

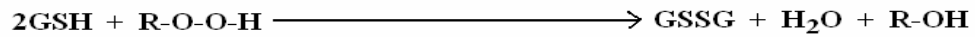
Bu alt birimlerden her birinde bir adet selenyum atomu bulunan tetramer yapıda bir enzimdir. GSH-Px yüksek oranda hücre sitoplazmasında bulunur ve H₂O₂'in neden olduğu oksidatif hasara karşı hücreleri koruyarak H₂O₂'den OH·nin oluşumunu engeller (90, 91). Enzim aktivitesi eritrositler ve karaciğerde en fazladır (92). Bu yüzden eritrositlerde meydana gelen oksidatif strese karşı en etkili antioksidan enzim olarak bilinir. GSH-Px aktivitesinde azalma meydana gelirse H₂O₂ miktarını artar ve bunun sonucunda hücrelerde şiddetli hasar meydana gelir. GSH, H₂O₂ molekülünü indirgeyerek GSSG oluşumu için oksitlenir. Bu tepkime esnasında GSH-Px H₂O₂'yi H₂O indirger. Daha sonra GSSG, GR enzimi yardımı ile GSH-Px aktivitesinin devamlılığını sağlamak için NADPH'ı kullanılarak yeniden GSH formuna dönüştürür. Aşağıdaki reaksiyonları katalizler ve böylelikle H₂O₂'in ve organik ROOH'lerin indirgenmesini sağlar (84, 93).



Glutasyon redüktaz
(GR)



Glutasyon Peroksidaz
(GSH-Px)



3.3.2. Eksojen (Sekonder) Antioksidanlar

3.3.2.1. Vitamin Yapıda Olan Eksojen Antioksidanlar

- C Vitamini (Askorbik asit)
- E Vitamini (α -Tokoferol)
- B9 Vitamini (Folik asit)
- A Vitamini (β -karoten) (91)

3.4. Oksidatif Stres

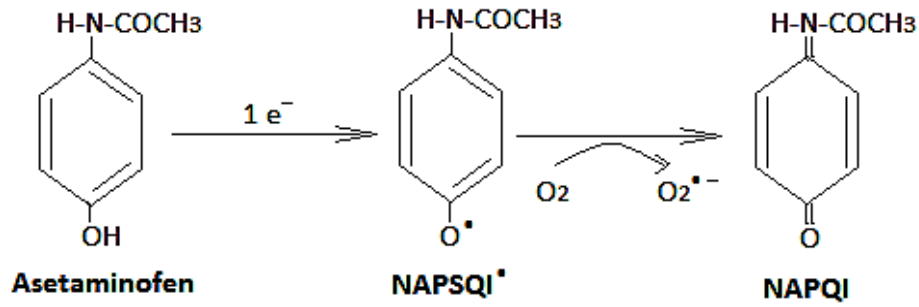
Vücutta denge halinde bulunan prooksidan/antioksidan maddelerin dengesinin bozularak prooksidan lehine doğru kayarsa potansiyel hücresel hasar meydana gelir ve bu durum 'oksidatif stres' olarak adlandırılır. Organizmada serbest radikallerin üretimi/atılımı sürekli olarak denge halindedir. Oksidatif denge olarak adlandırılan bu durum devam ettiği müddetçe serbest radikaller organizmada herhangi patolojik bir sonuca neden olmaz. Fakat serbest radikal oluşum hızının arttığı durumlarda veya serbest radikalleri yok etme hızında azalma olursa yeniden 'oksidatif stres' denilen durum gözlenir ve durumun sonucu olarak doku hasarı meydana gelir (36).

3.4.1. Asetaminofenin Oksidatif Stres ile İlişkisi

Asetaminofen kullanımının uzun yıllardır güvenilirliği hakkında birçok çalışma yapılmaktadır. Asetaminofen klirensi çocuk ve yetişkinlere oranla yeni doğanlarda daha düşüktür. Metabolik dönüşümünden sonra renal yolla atılan asetaminofenin metabolik dönüşümü, karaciğerde glukuronik asit ve sülfat ile konjuge edilerek gerçekleşmektedir. Bunun yanında az bir kısmı değişmeden atılırken aşağı yukarı %8-10'luk bir kısmı da toksik bir metaboliti olan NAPQI'e dönüşmektedir (3, 94).

Oksidatif stres ve bu durumun sonucu olarak LPO tüm canlı organizmalar için risktir ve serbest radikal zincir reaksiyonlarını şiddetini arttırabilir. Oksidatif stres asetaminofen tarafından indüklenen hepatotoksisitede ana faktördür.

Toksik dozda asetaminofenin metabolizmasının karaciğerde oksidatif stres oluşturarak hepatositlerin ölümüne neden olduğu ve hepatotoksik etki mekanizmasında serbest radikallerin çok önemli bir yere sahip olduğu ileri sürülmektedir. Buna göre, doz aşımı asetaminofen bir elektron oksidasyonu ile N-Asetil-P-benzosemikinonimin (NAPSQI[•]) radikaline dönüşür. NAPSQI radikalinin O₂^{•-}'e bir elektron vermesi sonucunda O₂^{•-} radikali ve NAPQI meydana gelir. Bu reaksiyonun sürekli O^{•-} radikalinin salınımına neden olduğu ve LPO'nu indüklediği düşünülmektedir (Şekil 15) (95).



Şekil 15: NAPSQI Radikalinin Oluşması (95).

Oksidatif stresin önemli göstergelerinden biri olan LPO, asetaminofenin toksisitesinin oluşturduğu önemli sonuçlarından birisidir. Asetaminofen toksisitesi ile oluşan oksidatif stresle LPO eş zamanlı gerçekleşebilmektedir. Bu durumda bozulmuş olan hücre membranı hücrenin ölümü ile sonuçlanmasına neden olmaktadır (95, 96). Oksidatif stres ve LPO, asetaminofenin hepatik metabolizması sırasında meydana gelen radikallerle ilgili olaylardır. ROT ve RNT türleri doğrudan mitokondriyal DNA hasarına neden olur (97). Jaeschke ve ark. (96) yaptıkları çalışmada uygulanan yüksek doz asetaminofenin hayvanların karaciğer mitokondrilerinde ROT düzeyinde artışa neden olduğu bu artışın ise oksidatif stres ile sonuçlandığını ileri sürmüşlerdir.

H_2O_2 ve $O_2^{\cdot-}$ radikalleri asetaminofen metabolizmasının aktivasyonu sonucu oluşan ürünlerdir. Asetaminofenin metabolizması sırasında oluşumu artan $O_2^{\cdot-}$ radikalleri, H_2O_2 miktarının yükselmesine ve böylece H_2O_2 'teki artışa bağlı olarak da $OH^{\cdot}$ radikallerinin artışına neden olmaktadır. Bu oluşan $OH^{\cdot}$ radikalleri lipitlerle reaksiyona girerek LPO'nu başlatır.

Asetaminofenin metabolizması sonucu reaktif bir metaboliti olan NAPQI oluşur ve bu metabolit birçok proteinle birlikte mitokondrial proteinlere de bağlanarak hem mitokondrial hem de hücrel oksidatif stresi başlatır. Bu oksidatif stresin bir sonucu olarak oluşan $O_2^{\cdot-}$ radikalleri mitokondri matriksi içerisinde $NO^{\cdot}$ ile reaksiyona girerek $ONOO^-$ oluşur ve bu oluşan ROT ile RNT'leri mitokondri DNA'sının hasarlanmasına sebep olurken mitokondriyal membranın da permeabilitesini kaybetmesine sebebiyet verir. Bunların bir sonucu olarak da hücre nekrotik hücre ölümü yolağına girer (96, 98).

Asetaminofen kullanımının neden olduğu temel problem, insanlarda ve deney hayvanlarında genellikle hepatik nekroza ve nefrotoksik etkilere yol açan yüksek dozlarının kasıtlı ya da kasıtsız olarak alınması ile yanlış kullanımıdır (96). Hepatik mitokondrideki GSH tüketimi asetaminofenin neden olduğu hepatotoksisitedeki en önemli mekanizma olarak görülür. Asetaminofen uygulanan gruplardaki GSH miktarının tükenmesi NAPQI ile GSH'ın konjugasyonundan oluşan merkaptürik asitten ileri geldiği bildirilmiştir (99). Oluşan NAPQI hızlı bir şekilde özellikle karaciğerde GSH aracılığı ile konjugasyona uğrayarak detoksifiye edilmektedir. Asetaminofenin aşırı dozda alınmasıyla CYP450 mikrozomal enzimleri aracılığıyla reaktif ara metabolit olan NAPQI miktarının artmasıyla hepatik nekroza ve ileri aşamalarda ise karaciğer yetmezliğine neden olduğu görülür (28). Vücutta NAPQI'nin aşırı birikimi GSH'un bağlanmasını sağlar ve hücrede var olan GSH depolarını tüketir bu da hücrede oksidatif stresinin oluşmasına neden olur.

Hepatik GSH depolarının tükenmesine bağılı olarak NAPQI'nin vücuttan atılamayan kısmı kovalent bağlanma yoluyla hücresel makromoleküllerle birleşebilir. NAPQI ile proteinlerin -SH gruplarının oksidasyonu ile protein/protein ve protein/GSH arasında disülfid köprüleri oluşmakta böylece NAPQI ve proteinler arasındaki bu kovalent bağlar hücre fonksiyonlarında kayıplara ve hücre ölümüne neden olmaktadır (96).

Yapılan çalışmalarda yüksek dozlarda asetaminofen alımının KAT ve GSH-Px gibi antioksidan enzim aktiviteleri ile hücre içi antioksidan sisteminin bir parçası olan GSH düzeylerini azalttığı bildirilmiştir (54, 55, 100). Mokhtar ve ark. (100), ratlara yüksek doz (650 mg/kg, oral) asetaminofen uygulaması yapmışlardır ve sonucunda asetaminofenin plazma GSH seviyesi ile KAT aktivitesi önemli ölçüde azalmıştır. Karaciğer doku homojenizatlarındaki yüksek MDA seviyeleri, asetaminofenin indüklediği ROT üretimindeki artışa bağılı olarak oksidatif stresin bir sonucudur. Bu durum LPO'nu ve plazma membranına verilen hasarı göstermektedir. Naguib ve ark. (101) asetaminofen ile indüklenmiş hem karaciğer hem de böbrek dokusunda ortaya çıkan hasarın mikroskopik incelemesini yapmışlardır. Karaciğerde sentriolobüler nekrozun, yağlanmanın ve karaciğer parankimine sızmış lenfositlerin varlığından bahsetmişlerdir. Böbrekte ise proksimal tübülün koagülatif nekrozundan ve yer yer kanamaların olduğunu ortaya koymuşlardır. Asetaminofene bağılı karaciğer ve böbrek dokularında MDA ve NO[•] düzeylerinin artmış olması buna karşılık GSH ve paraoksonaz aktivitelerindeki düşüşün hücre içi oksidan/antioksidan dengesi için oksidan yöne kaydığının bir göstergesidir. Aynı şekilde doku kesitlerinin ışıık mikroskobu altında histolojik incelenmesi ile de oksidan yönde artan dengenin dokularda oluşturduğu hasar net bir şekilde görülmüştür. Yousef ve ark. (102) asetaminofen ile oluşturdukları hepatotoksisitede ışıık mikroskobu altında karaciğer doku kesitlerini incelemişlerdir. Asetaminofen grubu histolojik görüntülerinde şişmiş sentriolobüler hepatositler, oldukça fazla vakuolleşmiş sitoplazma ve lekeli çekirdek yapısı görmüşlerdir.

3.5. Propolis

Propolis (bee glue), arılar tarafından bitkilerin tomurcuk ve eksüdalarından toplanan reçinenin kendi tükürük enzimleri (β -glikosidaz), polen ve balmumu ile karıştırılarak çeşitli amaçlar için kullanılan, iyi bilinen reçineli bir maddedir (103). Propolis ilk kez Yunanlılar tarafından keşfedildiği için etimolojisini Yunancadan alır, kovan korumasındaki ana işlevi nedeniyle ('pro'- 'önde' veya 'girişte') ve ('polis'- 'topluluk' veya 'şehir') kelimelerinden türetilmiş ve 'kovanın savunulmasındaki madde' anlamına gelmektedir (104).

Propolis üretimi, arıların bitki reçinelerini elde etmek için bitkilerin alt kısımlarını çeneleriyle koparmasıyla başlar. Daha sonra, arılar bu reçineyi ön ayaklarıyla hareket ettirirler ve arka ayaklarında paketlerler. Reçine kovana taşındıktan sonra arıların tükürüğü ile karıştırılır ve tükürükte bulunan enzimler tarafından kısmen hidrolize edilip kovanlara yapıştırılır ve balmumu ile karıştırılır (105, 106). Bu kompleks bileşik daha sonra arılar tarafından onları diğer böceklerle ve mikroorganizmalara karşı korumak ve kovanları onarmak gibi çeşitli amaçlar için kullanılır. Propolis arı tutkalı olarak da bilinir. Nedeni; arıların kovayı savunmak için bu madde karışımını kullanmasıdır. Bu korumayı, kovan duvarlarındaki boşlukları doldurarak, soğuk günlerde kovana girişi azaltarak ve ayrıca davetsiz misafirlerin karkaslarını mumyalayıp çürümelerini önleyerek sağlarlar. Propolis ayrıca antiseptik etkinliği ve antimikrobiyal özellikleri nedeniyle koloniyi hastalıklardan korur (107, 108).

Antik çağlardan beri insanlık propolisi geleneksel tıp başta olmak üzere farklı alanlarda kullanmışlardır (109). Antik Yunanistan'da propolis, kutanöz ve bukkal enfeksiyonlar için dezenfektan ve antiseptik olarak kullanılmıştı. Mısırlılar ise propolisi çürümeyi önleyici özelliğinden dolayı çoğunlukla kadavralarını mumyalamak için kullanmışlardır (110). Orta çağda propolis esas olarak Arap doktorlar tarafından kullanılmıştır 18. yüzyıldan beri propolis, Londra farmakopesi tarafından resmi bir ilaç olarak kabul edilmiştir. 17. ve 20. yüzyıllar arasında propolisin, antibakteriyel aktivitesinden dolayı Avrupa'da çok popüler hale gelmiştir. İkinci Dünya Savaşı sırasında ise propolis, antimikrobiyal ve anti-inflamatuar bir ajan olarak yaraların tedavisinde kullanılmıştır (105).

Propolis üretmek için kullanılan farklı kıtalar, bölgeler ve bitki türleri, bileşimini birbirinden farklı kılar. Ham propolisin tam bileşimi kaynağa göre farklılık gösterir. Propolisin bileşimini, bulunduğu coğrafi konum, bölge, iklim, elde edildiği kaynak ve bitkiye göre, mevsimler, toplanma zamanı büyük oranda farklılık göstermektedir. Propolisin kimyasal bileşimleri farklı olsada, antibakteriyel, antifungal, antiviral, antiparazitik, antiinflamatuvar, antiproliferatif ve antioksidan gibi benzer aktiviteleri vardır (111, 112).

Propolisin Kaynağını Oluşturan Bitkiler;

- Kavak (*Populus spp.*)
- Kayın (*Fagus sylvatica*)
- Huş (*Betula alba*)
- Kestane (*Castanea sativa*)
- At kestanesi (*Aesculus hippocastanum*)
- Akçaağaç (*Alnus glutinosa*)
- Çeşitli koniferlerdir (112).

Kavak türü propolis yaygın olarak bulunduğu için hem kimyasal hem de tıbbi açıdan en iyi bilinen ve en fazla çalışılmış propolis türü olarak bilinir (113).

3.5.1. Propolisin Fiziksel, Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

Propolisin rengi, toplandığı zamana ve toplandığı yerin coğrafik yapısına, iklimi ve elde edilen bitki kaynağına bağlı olarak sarı-yeşilden koyu kahverengiye kadar farklılık gösterebilmektedir (114). Düşük sıcaklıkta sert ve donmuş bir yapıya sahip iken yüksek sıcaklıkta yumuşak ve yapışkan bir yapıya sahiptir, 0° C'de ise kırılgan özelliği bulunmaktadır. Erime noktası genel olarak 60- 69 °C arasındadır (Şekil 16) (115, 116).



Şekil 16: Yeşil- Kahverengi Ham Propolis Örnekleri (115)

Ham propolisin bileşimi kaynağına göre farklılık göstermekle birlikte, genellikle %50 oranında reçine, %30 oranında mum, %10 oranında esansiyel ve aromatik yağlar, %5 oranında polen ve %5 oranında diğer organik maddeler (amino asit, mineral, vitaminler içeren çeşitli maddeler ile bioflavonoidler olarak bilinen bileşiklerin yüksek aktiviteli karışımları) oluşturmaktadır (Tablo 4) (117).

Tablo 4: Propolisin Kimyasal Yapısı (117)

Bileşik Sınıfı	Bileşen Grupları	Miktarı
Reçine	Flavonoidler, fenolik asitler ve esterleri	%43- 55
Mumlar ve yağ asitleri	Balmumu ve bitkisel orjin	%23- 35
Esansiyel yağlar	Uçucular	%10
Polen	Proteinler (16 serbest aminoasit> %1)	%5
Diğer organik ve mineral maddeler	Çoğunlukla demir ve çinko, mineral ketonlar, laktonlar, kinonlar, steroidler, benzoik asit, vitamin ve şekerler	%5

Dünyada farklı bölgelerden toplanmış olan propolis örneklerinin içeriğinde 200'den fazla kimyasal bileşik olduğu tanımlanmıştır. Propolisin içeriğinde; "polifenoller (flavonoid aglikonlar, fenolik asitler ve onların esterleri, fenolik aldehitler, alkoller ve ketonlar), seskuiterpen kinonlar, kumarinler, steroidler, amino asitler ve inorganik bileşikler" gibi çeşitli kimyasal bileşikler bulunmaktadır. Propolisin yapısında "pinosembrin, akasetin, krisin, rutin, katesin, naringenin, galangin, luteolin, kamferol, apigenin, mirisetin, kuersetin gibi flavonoidlerin yanı sıra kafeik asit ve sinnamik asit gibi fenolik asitler de bulunmaktadır. Ayrıca propoliste magnezyum, kalsiyum, iyot, potasyum, sodyum, Cu, çinko, manganez ve Fe gibi mineraller, A, B₁, B₂, B₆, C ve E vitaminleri ile

çok sayıda yağ asidi tanımlanmıştır" Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanmış propolislerin ana bileşenlerinin naringenin, galangin, krisin, pinobaksin, kuarsetin gibi flavonoidler ve kafeik asit gibi fenolik asitler içerdiği raporlanmıştır (118, 119).

Propolis örneklerinden izole edilen bileşiklerin en önemli grubu flavonoid pigmentleridir. Flavonoidler, flavon çekirdeğine sahip bitkisel orijinli, düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Günümüze kadar tanımlanan 4.000'den fazla bitkisel orijinli flavonoid çeşidi mevcuttur (Tablo 5). Flavonoidler, büyük oranda bitkilerin sahip oldukları koku, renk ve aromalardan da sorumludur. İnsan beslenmesi için önemli olan bu bileşikler sekonder bitki metabolitleridir ve insanlar tarafından sentezlenemezler (120, 121). Propolisin yapısında bulunan flavonoidler temel olarak antioksidan aktiviteden sorumludurlar (122).

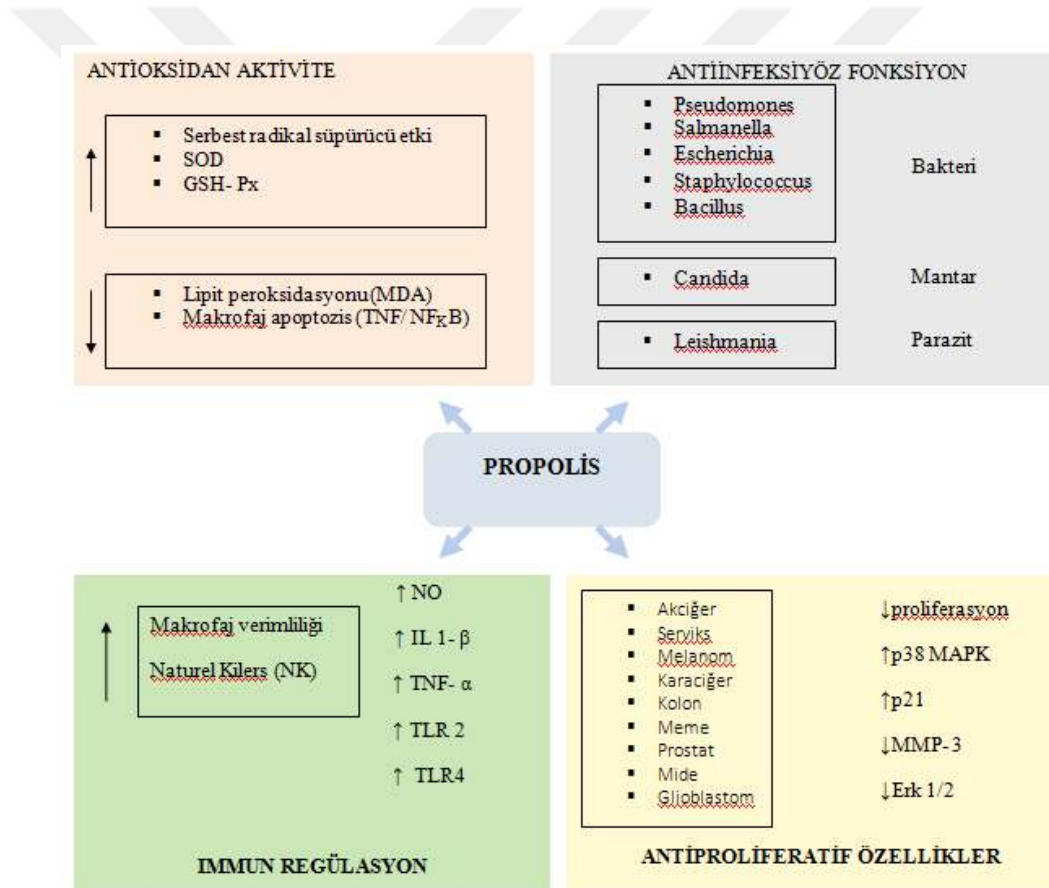
Tablo 5: Propolis İçerisinde Bulunan Flavonoid Türleri (121)

Flavonoid Türü	Bileşik
Flavononlar	Pinosembrin, naringin, hesperidin
Flavonlar	Apigenin, acacetin, krisin, luteolin

Propolisin;

- Antiinflatuar (115)
- İmmünomodületör (122)
- Antioksidan (123, 124)
- Antibakteriyel ve Antiviral (112)

- Antifungal (123)
- Antitümör (112)
- Anestezik ve Sitostatik (123)
- Hepatoprotektif (112)
- Antimutajenik (122)
- Antibiyotik gibi etkileri bulunmaktadır (Şekil 17) (123).



Şekil 17: Propolisin Aktiviteleri (125)

Günümüze kadar, Türk propolisinin ise antibakteriyel (126), antifungal (127) antioksidan (128), antikarsinojenik (129) gibi çok sayıda biyolojik aktivitesi

gösterilmiştir. Propolisin yapısında bulunan bileşiklerin biyolojik aktiviteleri Tablo 6'da özetlenmiştir.

Tablo 6: Propolisin Yapısındaki Bileşiklerin Biyolojik Aktiviteleri (130)

Bileşik	Biyolojik Aktiviteler
Galangin	Antiinflamatuvar, antioksidan, antiviral, antibakterial, hepatoprotektif
Kafeikasit fenil esteri (CAPE)	Antiinflamatuvar, antibakterial, antitümör, hepatoprotektif, antikanser
Kafeikasit	Antibakterial, antifungal, antiviral, antiinflamatuvar
Krisin	Antiinflamatuvar, antiviral
İzopentil ferulat	Antiviral
Akasetin	Antiviral, antiantioksidan, antiinflamatuvar
Pigenin	Antiviral
Kaempferol	Antiviral, antiülser
Kuersetin	Antiviral, antibakterial, antihistamin antiülser, kapiller güçlendirici
Rutin	Antiviral
Hesperitin	Antiülser
Naringin	Antiülser
Pinocembrin	Antibakterial, antifungal, lokal anestezi
Pinobanksin	Antimikrobiyal, antifungal
Prenillenmiş P-kumarin	Antibakterial, sitotoksik
Diterpenik asitler	Antibakterial, sitotoksik
Kaffeoilkuinik asit türevleri	İmmunomodulator, hepatoprotektif
Dikeafeoilkuinik asit türevleri	Güçlü antiantioksidan
Atrepilin C (Brezilya propolisi)	Antitümör
Propol (Brezilya propolisi)	Güçlü antiantioksidan

Propolisin farmakolojik etkileri içeriğindeki farklı maddelerden kaynaklanmaktadır. Antimikrobiyal etki gösteren bileşenleri; "kafeik asit fenil ester (CAPE), pinocembrin, ferulik asit ve galangindir. Antifungal etki gösteren bileşenleri ise; pinobanksin, pinocembrin, benzil ester, sakuranetin ve pterostilben, bunlara ilaveten antiviral komponentleri, kafeik asit fenil ester, kuersetin ve luteolindir" (129). Propolis inflamatuvar süreçte, nötrofiller tarafından oluşturulan serbest radikalleri yakalar (131).

Ayrıca, hidrofolat redüktaz enzimi ve PG sentezini inhibe ederek antiinflamatuvar etki gösterir. Akut inflamasyonda lipooksijenaz ve COX üretimini baskılar (132). Propolis, trombosit agregasyonunu ve eikosanoid sentezini inhibe ederek immün sistem düzenleyici etki gösterir. Propolis, toksik olmayan dozlarda kullanıldığında bazı antibiyotiklerin antibakteriyel etkisini arttırıcı etki gösterir (133). Bakteriyel hücre bölünmesini engeller, bakteriyel hücre duvarı ve sitoplazmasını bozar ve bakteriyel enfeksiyon sırasında fagositleri uyarır. HIV-1 enfeksiyonunu anlamlı bir şekilde inhibe eder. HIV-1 enfekte hastaların lenfositlerinin immün yanıtını geliştirir. Propolisin antiinflamatuvar özelliğinin olduğu, dermatitlere karşı antibakteriyel krem olarak kullanıldığı ve doku yenileme özelliğine sahip olduğu bildirilmiştir (129). Makrofajlar, konak savunma mekanizmalarını içeren doğal ve kazanılmış bağışık yanıtta önemli role sahip hücrelerdir. Fagositoz, enzim ve sitokin salınımı, serbest radikallerin oluşumu gibi fonksiyonlara sahip bu hücreler, konağın mikroorganizmalarla mücadelesinde vazgeçilmez yere sahiptir. Ancak makrofajların fazla aktivasyonu, tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), interlökin 1 beta (IL-1 β) ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin fazla üretimi nedeniyle, hücrelerde hasara ve inflamatuvar barsak hastalıkları ve romatoid artrit gibi inflamatuvar hastalıklara yol açar. Propolisin makrofajları aktive ederek nonspesifik bağışıklık sistemi üzerinde düzenleyici rol oynadığı bilinmektedir (134, 135).

3.5.2. Propolisin Antioksidan Özellikleri

Propolisin yapısında bulunan temel bir bileşen olan flavanoidler ve türevlerinin, antioksidan etki göstererek serbest radikalleri temizleyebilme özelliğine sahiptir. Bazı flavonoid türleri PUFA'nin peroksi radikalleri ile reaksiyona girip radikal temizleyici bir etki yaparak özellikle LPO başlangıç aşamasında iken etki gösterirler. Flavonoidler antioksidan etkilerini, peroksit iyonları $^1\text{O}_2$, H_2O_2 ve LPO radikallerini ortamdan uzaklaştırarak gösterirler ve yapılarında bulunan OH iyonları sayesinde bu yetenekleri ön plana çıkarmaktadır. Flavonoidlerin, serbest radikalleri ortamdan uzaklaştırmaları ve temizlemeleri gibi işlevlerinin yanı sıra, COX ve lipooksijenaz enzimlerini inhibe ederek antioksidan etki gösterebilmektedir (136).

Propolis üzerinde yapılan çalışmalarda propolisin LPO'nu önlediği ve serbest radikal oluşumunu indirdiği belirtilmiştir (136, 137).

Propolisin antioksidan etki göstermesinde özellikle propolisin ana bileşenlerinden biri olan CAPE'nin de önemli role sahip olduğu bildirilmiştir. CAPE, ROT'nin üretimini engellemektedir. Propolis kullanılarak yapılan çalışmalarda propolisin LPO'nu düşürerek serbest radikal oluşumunu azalttığı bildirilmiştir. Propolisin etkili olduğu en önemli antioksidan mekanizması; serbest radikallerin neden olduğu DNA hasarlarını önleyebilecek özellikleri olmasından ve LPO' ya neden olan polimerize zincir reaksiyonlarını kırıcı özelliği ile reaktif oksijen radikallerini dokulardan uzaklaştırıcı etki göstermesinden kaynaklanmaktadır. Propolisin antioksidan etkisi alkoksi radikaller ve daha az olarak da O_2^- karşı serbest radikal temizleme etkilerinin sonucudur (138).

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Deney Hayvanlarının Bakım ve Beslenmeleri

Çalışmada toplam 41 adet 2,5 aylık Wistar-Albino ırkı erkek ratlar kullanılmıştır. Araştırmaya başlamadan önce Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan (Protokol No: 2020/06) sayılı karar ile araştırma için etik kurul izni alınmıştır. Bütün deney hayvanları Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi (FÜDAM) tarafından temin edilmiştir. Deneysel uygulamalar, laboratuvar hayvanlarının bakımı ve kullanımı şartlarına uygun olarak yürütülmüştür (12 saat aydınlık: 12 saat karanlık ve 24±3 °C). Deneysel uygulamalar süresince ratlara standart ticari rat yemi (pellet yem) ve musluk suyu ad libitum sağlanmıştır (Tablo 7).

Tablo 7: Rat Yeminin Bileşimi ve Kalori Değeri

Maddenin Adı	Değer
Kuru Madde	%93,63
Ham Protein	%34,15
Ham Yağ	%3,00
Metabolik Enerji	2095 kcal/kg
Kalsiyum	%3,36
Sodyum	%1,09
Magnezyum	%0,50
Çinko	286,80 mg/kg
Demir	920,00 mg/kg
Bakır	29,33 mg/kg

Ham Maddeler: Balık unu, mısır, buğday, ayçiçeği küspesi, çavdar, mineral maddeler

4.2. Kullanılan Gereçler

4.2.1. Cihazlar

- Spektrofotometre (Thermo-Genesis 10S UV-VIS)
- Soğutmalı Santrifüj (NÜVE NF800R)
- Homojenizatör (CAT R50D)
- Derin Dondurucu (İlShin)
- pH Metre (Thermo Scientific Orion Star A111)
- Su Banyosu (NÜVE ST 402)
- Hassas Terazî (Sartorius)
- Vorteks (Heidolph)

4.2.2. Kimyasal Maddeler

Araştırmamızda kullanılan kimyasal maddelerin tümü analitik saflıkta olup Merck, Sigma, Cayman firmalarından satın alınmıştır.

4.3. Yöntemlerin Uygulanması

4.3.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması

Hayvanlar 5 gruba ayrılmıştır;

- 1. Grup:** Kontrol grubu (ratlara herhangi bir tedavi verilmemiştir) (n:7)
- 2. Grup:** Propolis uygulanan grup (200 mg/kg/gün, gavaj, 7 gün) (n: 7)
- 3. Grup:** Asetaminofen uygulanan grup (2 g/kg/gün, gavaj, tek doz) (n: 9)
- 4. Grup:** Propolis+Asetaminofen uygulanan grup (Propolis 200 mg/kg/gün, gavaj, 7 gün)+(Asetaminofen 2 g/kg, gavaj, tek doz) (n:9)
- 5. Grup:** Asetaminofen+Propolis uygulanan grup (Asetaminofen 2 g/kg, gavaj, tek doz)+(Propolis 200 mg/kg/gün, gavaj, 7 gün) (n:9)

4.3.2. Asetaminofen ve Propolis Uygulaması

Asetaminofen serum fizyolojik (%0,9'luk NaCl) içinde, propolis ise %40'lık etanolde çözülmüştür. Propolis uygulaması 7 gün boyunca gavaj yoluyla her gün yapılmıştır. Propolis+Asetaminofen uygulanan grupta; propolis uygulamasına asetaminofen uygulamasından 7 gün önce başlanmış ve 7 gün boyunca propolis uygulamasına devam edilmiştir. Yedinci günde gavaj yoluyla asetaminofen tez doz halinde uygulanmıştır. Asetaminofen+Propolis uygulamasında; asetaminofen ve propolis aynı gün gavaj yoluyla verilmiş ve propolis uygulamasına 7 gün süre ile devam edilmiştir. Deney protokolü tamamlandıktan sonraki 8. günde ratlar sakrifiye edilerek deney sonlandırılmıştır.

4.4. Örneklerin Toplanması ve Biyokimyasal Analizler

Uygulamaların sonunda ratlar sakrifiye edilerek kan ve karaciğer doku örnekleri biyokimyasal incelemeler için alınmıştır. Kan örnekleri antikoagülan (EDTA) içeren tüplerde toplanarak plazmalarını ayırmak için +4 °C'de 3.000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Eritrositler serum fizyolojik ile 3 defa yıkanarak hemolizat hazırlanmıştır. Hazırlanan hemolizat ve karaciğer doku örnekleri biyokimyasal analizler yapılincaya kadar -80 °C'de saklanmıştır.

4.4.1. Kan Örneklerinin Hazırlanması

4.4.1.1. MDA Tayini için Hazırlanması

MDA tayini için alınan EDTA'lı kan örnekleri 3.000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek plazmaları ayrılmış ve plazmada MDA düzeylerine bakılmıştır.

4.4.1.2. GSH Tayini için Hazırlanması

1:10 oranında distile su ile dilüe edilen tam kanın 1:1,5 oranında çöktürücü solüsyonuyla sulandırılan kan örneklerinde ise GSH düzeyleri ölçülmüştür.

4.4.1.3. KAT Tayini için Hazırlanması

Plazması ayrılan EDTA'lı kan örnekleri, serum fizyolojik ile 3 kez yıkandıktan sonra eritrositler 1:5 oranında distile su ile sulandırılarak Hb tayini

yapılmıştır. Daha sonra dilüe edilmiş bu kan örnekleri 1:100 oranında 50 mM fosfat tamponuyla ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH:7.0) tekrar sulandırılmış ve hazırlanmış bu hemolizatlarda KAT aktivite tayini yapılmıştır.

4.4.1.4. GSH-Px Tayini için Hazırlanması

Tam kanın distile su ile 1:20 oranında sulandırılmasıyla elde edilen hemolizatlarda GSH-Px aktivite tayini, ayrıca 1:5 oranında sulandırılması ile elde edilmiş hemolizatlarında ise Hb düzeyleri ölçülmüştür. Kanda GST aktivitesi çok düşük olduğu için ölçülememiştir.

4.4.2. Doku Örneklerinin Alınması, Hazırlanması ve Homojenizasyonu

4.4.2.1. MDA, GSH, KAT, GST ve Protein Tayini için Doku Örneklerinin Hazırlanması

Doku örneklerinin suyu iki süzgeç kâğıdı arasında alındıktan sonra tartılarak distile su ile 1:10 oranında (ağırlık/hacim) sulandırılıp, kırılmış buz içerisinde teflon-cam homojenizatörle homojenize edilmiştir.

Hazırlanan homojenatlar 3.500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatantlarda MDA, GSH, KAT, GST ve protein tayinleri yapılmıştır.

4.4.2.2. GSH-Px Tayini için Doku Örneklerinin Hazırlanması

Doku örnekleri saf su içinde 1:10 oranında (ağırlık/hacim) sulandırıldıktan sonra kırılmış buz içerisinde homojenize edilmiş ve oluşan homojenatlar 1,5 ml'lik ependorflara konularak soğutmalı santrifüjde 14.000 rpm'de 55 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucunda süpernatantlar alınmış ve süpernatantlarda GSH-Px aktivitesi ve protein tayini yapılmıştır.

4.5. Kanda ve Dokuda MDA, GSH, KAT, GSH-Px, GST, Protein ve Hemoglobin Analizleri için Kullanılan Yöntemler

4.5.1. Plazmada ve Dokuda MDA Düzeyinin Tayini

Prensip: MDA tayini Placer ve ark. (73)'nın modifiye ettiği yöntemle göre yapılmıştır. Bu yöntem LPO'nun aldehit ürünlerinden biri olan MDA ile TBA'nin reaksiyonu temeline dayanmaktadır. Oluşan MDA, TBA ile pembe renkli bir kompleks oluşturmaktadır ve bu çözeltinin absorbanşı 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülerek LPO'nun derecesi saptanmıştır (Tablo 8).

Metodun Ayıraçları

1- TBA: 0,67 g TBA 80 ml %10'luk perklorik asitte çözülür ve 100 ml'ye saf su ile tamamlanır.

2- %10 Triklorasetik Asit (TCA): 10 g TCA distile suda çözülerek 100 ml'ye tamamlanır. Ayraç koyu renkli şişede oda sıcaklığında saklanır.

3- Standart: Tetraetoxipropan

4- Renk Ayıracı: 3 kısım TCA solüsyonu ve 1 kısım TBA solüsyonu reaktif şişeye konularak 1 dakika magnetik karıştırıcıda karıştırılır. Ayraç günlük hazırlanır.

Deneyin Yapılışı

Tablo 8: Plazma ve Doku MDA Düzey Ölçümü

	Kör (ml)	Standart (ml)	Örnek (ml)
Örnek	-	-	0,25
Standart	-	0,25	-
Serum Fizyolojik	0,25	-	-
Renk Ayıracı	2,25	2,25	2,25

Tüpler karıştırıldıktan sonra 100 °C 20 dakika bekletilmiştir. Musluk suyu altında soğutma işleminden sonra tüpler 3.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek üst faz absorbanansı 532 nm’de okunmuştur.

MDA Düzeyinin Hesaplanması

MDA (nmol/ml) = Örneğin OD / Standartın OD × Standartın Konsantrasyonu

MDA Düzeyleri; Plazmada nmol/ml, dokuda ise nmol/g doku olarak hesaplanmıştır.

4.5.2. Kanda ve Dokuda GSH Düzeyinin Tayini

Prensip: GSH düzeyi Ellman ve ark. (139) tarafından belirlenen yöntemle göre tayin edilmiştir. Bu metod 5,5’dithiobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) eklendiğinde-SH gruplarının oldukça stabil sarı renk oluşturması esasına dayanan spektrofotometrik bir yöntemdir (Tablo 9).

Metodun Ayıraçları

1- Çöktürücü Solüsyon: 1,67 g glasiyel metafosforik asit, 0,2 g disodyum EDTA ve 30 g NaCl tartılır ve 100 ml distile su içerisinde çözünür.

2- Fosfat Ayırıcı: 0,3 M Na₂HPO₄ tartılarak distile su ile 1 L’ye tamamlanır. +4 °C’de saklanır.

3- Elman Ayırıcı: 20 mg DTNB %1’lik Na-sitrat çözeltisi ile 100 ml’ye tamamlanır.

4- GSH Standartı: 2 mg/dl GSH solüsyonu hazırlanır.

Deneyin Yapılışı

Tüplerde bulunan 1 ml distile su (kör) ve 1 ml örnekler üzerine 1,5 ml çöktürücü solüsyondan konulup, vortekslendikten sonra 3.000 rpm’de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen bu süpernatant deney ortamında kullanılmıştır.

Tablo 9: Kan ve Doku GSH Düzey Ölçümü

	Kör (ml)	Örnek (ml)	Standart (ml)
Süzüntü	0,25	0,25	0,25
Na ₂ HPO ₄	1	1	1
Elman Ayıracı	0,125	0,125	0,125

Tüpler hazırlanıp vortex ile karıştırıldıktan sonra 412 nm’de köre karşı absorbanslar okunmuştur.

GSH (µmol/ml) = (Standartın Konsantrasyonu) x (Örneğin Absorbansı) / (Standartın Absorbansı) x Dilüsyon

GSH Düzeyi; kanda ve dokuda µmol/ml olarak hesaplanmıştır.

4.5.3. Kan ve Dokuda KAT Aktivitesinin Tayini

Prensip: Eritrosit ve doku KAT aktivitesini ölçümü için Aebi (140) metodu kullanılmıştır. KAT H₂O₂’in yıkımını katalize eder. H₂O₂’in KAT tarafından yıkım hızı, H₂O₂’in 240 nm dalga boyunda ışığı absorbe etmesinden yararlanılarak spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (Tablo 10).

Metodun Ayraçları

1- 50 mM Fosfat Tamponu (pH: 7.0): 6,81 g KH₂PO₄ tartılarak 1 L saf suda çözündürülerek hazırlanır. 8,9 g Na₂HPO₄ (2 H₂O) tartılarak 1 L saf suda çözündürülerek hazırlanır. Na₂HPO₄ (2H₂O) üzerine KH₂PO₄ eklenerek pH 7.0’ye ayarlanır.

2- 30 mM H₂O₂ Çözeltisi: 0,34 ml %30'luk H₂O₂ fosfat tamponu ile 100 ml'ye tamamlanır.

Deneyin Yapılışı

Tablo 10: Kan ve Doku KAT Aktivite Ölçümü

	Kör (ml)	Örnek (ml)
Fosfat Tamponu	1	-
H ₂ O ₂	-	1
Örnek	2	2

240 nm'de kör ile sıfır ayarı yapıldıktan sonra örneğin 0. (A₁) ve 30. (A₂) saniye içindeki absorbans farkı ölçülmek suretiyle KAT aktivitesi hesaplanmıştır.

KAT Aktivitesinin Hesaplanması

$$k = (2.3 / 30) \times (\log OD1 / OD2) \times \text{Dilüsyon}$$

KAT'ın Spesifik Aktivitesi; Eritrositte bulunan aktivite k/g Hb, dokuda bulunan aktivite ise k/mg protein olarak hesaplanmıştır.

4.5.4. Dokuda GST Aktivitesinin Tayini

Prensip: Doku GST aktivite ölçümünde Habig ve ark. (141)'nın metodu kullanılmıştır. Enzim aktivitesi 37 °C'de 340 nm'de GSH ve 1-klor-2,4-dinitrobenzen (CDNB) kullanılarak dakikada oluşan S-2,4 dinitrofenil glutatyonun 1 µmol'unu katalizleyen enzim miktarının ölçülmesiyle belirlenir. GSH ile CDNB bileşiğinin konjugasyonu sonucu oluşan ürün 1-(S-glutatyonil)-2,4 dinitrobenzen spektrofotometrik olarak 340 nm'de ölçülür. Bir ünite enzim, 25°C'de bir dakikada 1µmol substratı (CDNB), 1-(S-glutatyonil)- 2,4 dinitrobenzene çeviren enzim aktivitesidir (Tablo 10).

Metodun Ayraçları

- 0,1 M Tris Tamponu (pH 7.4):** 6,05 g Tris tartılır ve saf suda çözülür. pH 7.4'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 500 ml'ye tamamlanır.
- 1 mM CDNB:** 2 mg CDNB tartılır ve 10 ml etanol içerisinde çözülür.
- 5 mM GSH:** 15 mg GSH tartılır ve 10 ml saf suda çözülür.

Deneyin Yapılışı

Tablo 11: Doku GST Aktivite Ölçümü

	Kör (µl)	Örnek (µl)
CDNB	100	100
GSH	100	100
Tris Tampon (pH: 7.4)	2,2	2,2
Distile Su	100	-
Örnek	-	100

Vortexlenerek 340 nm dalga boyunda 0. ve 2. dakikadaki OD ölçülmüştür.

GST Aktivitesinin Hesabı

$$\text{GST Aktivitesi (U/ml)} = \Delta\text{OD} / t \times V \text{ toplam} / 0.0096 \times V\text{örnek}$$

ΔOD = Optik Dansite Değişimi

9,6 = 1 µmol CDNB'nin 1 cm'lik ışık yolunda verdiği OD değeri

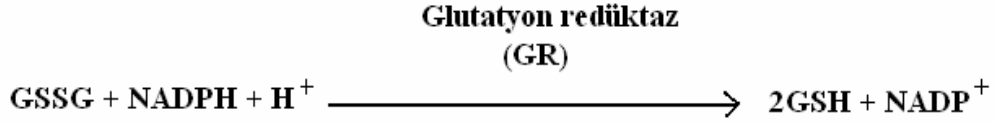
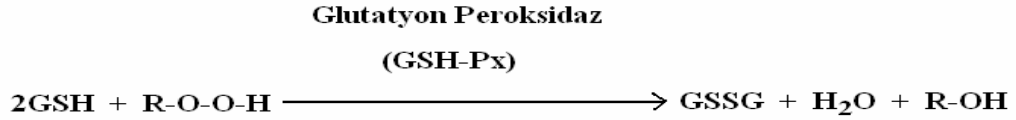
V toplam = Toplam hacim

V örnek = Örnek hacmi

GST'm Spesifik Aktivitesi; dokuda U/g protein olarak hesaplanmıştır.

4.5.5. Kanda ve Dokuda GSH-Px Aktivitesinin Tayini

Prensip: Kan ve dokuda GSH-Px aktivitesi Beutler (142) metodu kullanılarak ölçülmüştür. GSH-Px, GSH'un GSSG'a oksidasyonunu H_2O_2 kullanarak katalizler. GSSG'nin oluşum hızı GR reaksiyonu aracılığıyla ölçülür.



Reaksiyon ortamındaki t-butilhidroperoksit (t-BOOH)'in (bu enzim ölçümlerinde en uygun peroksid substratıdır) her bir molekülünün redüksiyonu için 1 mol GSSG oluşur. GSSG'un GSH'a redüksiyonu ise GR enziminin katalizlediği reaksiyonla oluşur. Bu reaksiyonda GSSG'nin her bir molünün redüksiyonu için 1 mol NADPH okside olur. GSH-Px aktivitesi spektrofotometrik olarak 340 nm'deki sistemin OD'sindeki düşüşten hesaplanır (Tablo 12).

Metodun Ayraçları

1- 1 M Tris-HCl Tamponu (pH: 8): 121,14 gr Tris tartılarak 1 L distile su içerisinde çözülür. 1,68 gr EDTA ilave edilerek pH: 8'e ayarlanır.

2- 0,1 M GSH: 0,3 g GSH 10 ml distile suda çözülür. GSH solüsyonları taze hazırlanmış olmalıdır.

3- 10 U/ml Glutatyon Redüktaz (GR): 1 ml'de 10 U olacak şekilde distile su ile hazırlanır. 7,22 µl GR 1 ml distile suda çözülür

4- 2 mM NADPH: 0,05 g NADPH 30 ml distile su içerisinde çözülür.

5- 7 mM t-BOOH: (%70'lik t-BOOH'in yaklaşık 1:1000 sulandırılmasından elde edilmistir). Günlük olarak hazırlanır.

Deneyin Yapılışı

Tablo 12: Kan ve Doku GSH-Px Aktivite Ölçümü

	Kör (µl)	Örnek (µl)
Tris Tampon (pH:8.0)	100	100
GSH	20	20
GR	100	100
NADPH	100	100
Örnek	10	10
Distile Su	670	660
37 °C'de 10 dakika preinkübe edilir.		
t-BOOH	-	10

Karışımın 0. ve 2,5. dakikalardaki OD'deki azalma 340 nm'de kaydedilmiştir.

GSH-Px Aktivitesinin Hesaplanması

$$\text{GSH-Px (U/ml)} = (\text{OD}_1 - \text{OD}_2) / t \times 1 / 6,22 \times 0,01$$

OD₂: 2,5 dakika sonundaki absorbans

OD₁: 0. dakikadaki absorbans

t: 2,5 dakika

1: Küvetin toplam hacmi (ml)

0,01: Örnek hacmi (ml)

6,22: 1µmol NADPH'in verdiği absorbans

GSH-Px'in Spesifik Aktivitesi; eritrositte aktivite U/mg Hb, dokuda aktivite U/g protein olarak hesaplanır.

4.5.6. Hemoglobin Tayini

Prensip: Hemoglobin tayini Siyanomethemoglobin yöntemi (143) ile yapılmıştır. Ferrisiyanür Hb’de bulunan Fe^{+2} ’yi oksitleyerek +2 değerlikten +3 değerlikli (Fe^{+3})’e çevirirerek, methemoglobine dönüşmesini sağlar. Bundan sonra potasyum siyanid ile stabil bir pigment olan siyanomethemoglobin oluşur. Siyanomethemoglobinin absorbandsı 546 nm’de okunmuştur (Tablo 13).

Metodun Ayıraçları

1- Drabkin Çözeltisi: 50 mg KCN, 200 mg $K_3Fe(CN)_6$ ve 1g $NaHCO_3$ tartılarak bir miktar saf suda çözülür ve 1 L’ye tamamlanır. Koyu renkli şişede 1 yıl dayanır.

2- Hb Standartı: 18 g liyofilize Hb standartı 100 ml distile suda çözülür. Bu standart 18 g/dl Hb içerir.

Deneyin Yapılışı

Tablo 13: Hb Düzey Ölçümü

	Kör (ml)	Standart (ml)	Örnek (ml)
Hemolizat	-	-	0,02
Hb Standartı	-	0,02	-
Drabkin Çözeltisi	5	5	5

Tüpler iyice karıştırılır. Oda ısısında 20 dakika bekletilir. 546 nm’de absorbandslar köre karşı okunur.

Hb Düzeyinin Hesaplanması:

$$Hb (g/dl) = (\text{Örneğin OD} / \text{Standartın OD}) \times 18$$

4.5.7. Dokuda Protein Tayini

Prensip: Homojenatlarda var olan protein miktarı modifiye Lowry (144) yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. Alkali bakır tartarat ayırıcı peptid bağları ile kompleks oluşturur.

Her 7 ya da 8 amino asit artığı 1 atom Cu' ı bağlar. Cu ile muamele edilmiş karışıma fenol ayıracı ilave edildiğinde mavi-mor renk meydana gelir. Oluşan bu rengin şiddeti 650 nm dalga boyunda okunur. Protein konsantrasyonu ile oluşan renk arasında yüksek konsantrasyonlar için lineer bir ilişki olmadığından örnekler sulandırılarak ölçümler yapılmıştır (Tablo 14).

Metodun Ayraçları

1- Alkali Bakır Ayıracı: 10 g Na₂CO₃, 0,1 g potasyum tartarat ve 0,05 g bakır sülfat, 0,5 N NaOH içinde çözülür ve 100 ml'ye tamamlanır. Bu çözelti oda sıcaklığında 30 gün dayanıklıdır.

2- Fenol Ayıracı: 2 N Folin-Ciocalteu-Fenol ayıracından 3,75 ml alınır, saf su ile 67,5 ml'ye tamamlanır. Bu çözelti örnek sayısına göre çalışma anında günlük olarak hazırlanır.

3- Protein Standartı: 50 µg/ml Sığır Serum Albumin (BSA)

Deneyin Yapılışı:

Tablo 14: Protein Düzey Ölçümü

	Kör (ml)	Standart (ml)	Örnek (ml)
Örnek	-	-	1
Distile Su	1	-	-
Standart	-	1	-
Alkali Bakır Ayıracı	1	1	1
Tüpler iyice karıştırılıp 10 dk oda ısısında bekletilir.			
Fenol Ayıracı	4	4	4

Tüpler hemen iyice karıştırılır ve 5 dakika boyunca 55 °C'de bekletilmiştir. Inkubasyon sonrası musluk suyu altında hemen soğutulmuştur. Daha sonra 650 nm'de standart ve örnek tüplerinin absorbansı kör tüpüne karşı okunmuştur.

Protein Düzeyinin Hesaplanması:

Protein (µg/ml) = (Örneğin OD / Standartın OD) x Standartın Konsantrasyonu x Dilüsyon

4.6. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışma sonucunda elde edilen veriler İstatistiksel analiz için IBM SPSS Statistics 21 paket programı kullanılarak hesaplanmıştır. Grup ortalamaları arasındaki farklılıkları belirlemek amacıyla tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) kullanılarak hesaplanmıştır. Post-hoc olarak Duncan testinden faydalanılarak, tüm değerler ortalama±ortalamanın standart hatası (ortalama±SEM) şeklinde hesaplanmıştır. Grup ortalamaları arasındaki farklılıkları belirlemek amacıyla tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) kullanılarak hesaplanmıştır.

5. BULGULAR

Kontrol ve asetaminofen uygulanan grupların karaciğer doku görünümü Şekil 18’da verilmiştir.



Şekil 18: Kontrol (a) ve Asetaminofen (b) Grubunun Karaciğer Doku Görünümü

(a)

(b)

Karaciğer dokusu makroskopik görünüm olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında asetaminofen uygulanan grupta karaciğerin büyüdüğü, konjesyon nedeniyle renginin koyulaştığı tespit edilmiştir.

5.1. Kan MDA ve Antioksidan Düzeyleri

2 gr/kg asetaminofen ve 200 mg/kg/gün propolis uygulanan deney gruplarının kan MDA ve GSH düzeyleri ile KAT ve GSH-Px aktivitelerinin ortalama değerlerinin istatistiksel karşılaştırması Tablo 15’te gösterilmiştir.

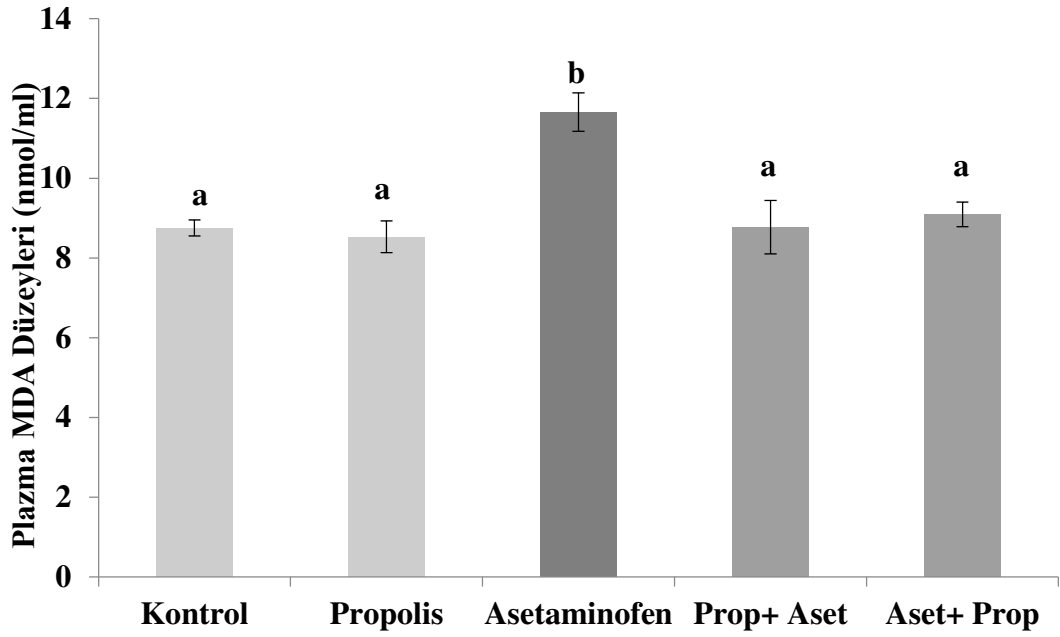
Tablo 15: Asetaminofen Uygulanan Ratlarda Propolisin Plazma MDA, Eritrosit GSH Düzeyleri ile KAT, GSH- Px Aktiviteleri

Gruplar	MDA (nmol/ml)	GSH (μ mol/ml)	KAT (k/g Hb)	GSH-Px (U/g Hb)
Kontrol	8,75 $\pm$ 0,20 ^a	46,79 $\pm$ 0,91 ^{ab}	65,47 $\pm$ 3,59 ^a	234,12 $\pm$ 5,81 ^a
Propolis	8,53 $\pm$ 0,40 ^a	49,28 $\pm$ 1,10 ^a	67,15 $\pm$ 9,00 ^a	235,65 $\pm$ 25,04 ^a
Asetaminofen	11,66 $\pm$ 0,48 ^b	40,62 $\pm$ 0,92 ^c	44,43 $\pm$ 2,89 ^b	193,92 $\pm$ 8,53 ^b
Prop + Aset	8,77 $\pm$ 0,67 ^a	46,32 $\pm$ 0,69 ^{ab}	66,79 $\pm$ 4,28 ^a	239,57 $\pm$ 9,95 ^a
Aset + Prop	9,09 $\pm$ 0,31 ^a	45,51 $\pm$ 0,29 ^b	58,76 $\pm$ 4,22 ^a	217,96 $\pm$ 7,35 ^{ab}
P	0,001	0,001	0,001	0,05

^{a,b,c}; Aynı satırda yer alan farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

5.1.1. Kan MDA Düzeyi

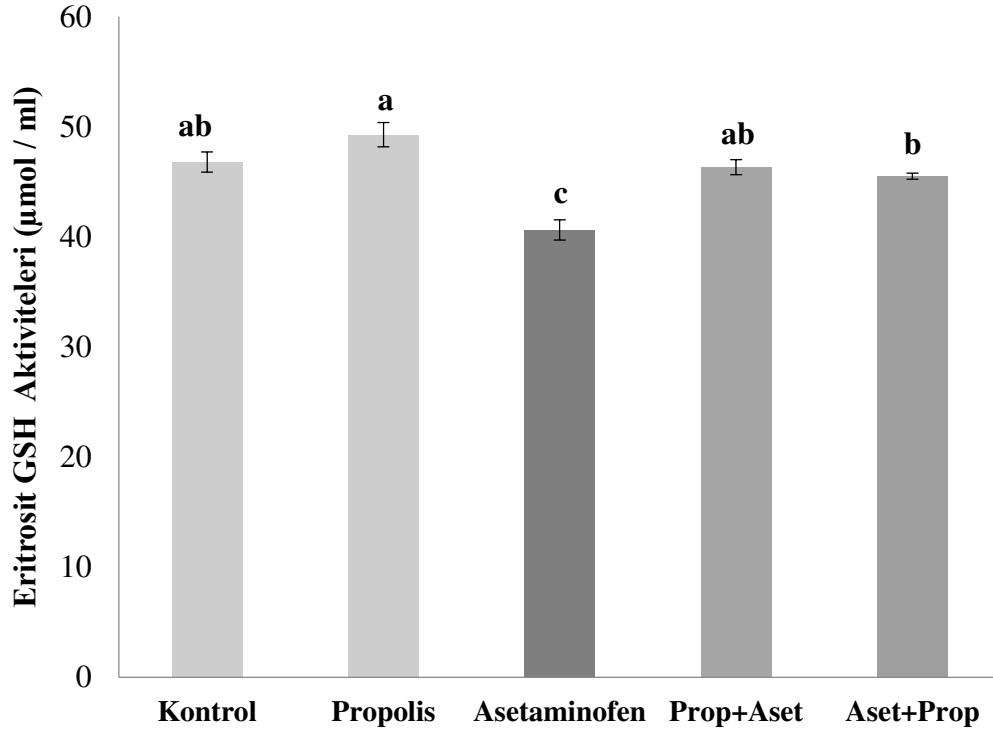
Plazma MDA düzeyinde kontrol grubu ile kıyaslandığında asetaminofen uygulanan grupta önemli bir artış gözlenmiş ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$). Propolis, propolis+asetaminofen, asetaminofen+propolis uygulanan gruplar kontrol grubu ile ayrı ayrı kıyaslandığında MDA düzeylerinde istatistiksel olarak önemli bir fark saptanmamıştır. Plazma MDA düzeyleri propolisin asetaminofen uygulamasından önce veya asetaminofen ile birlikte uygulandığı gruplarda asetaminofen uygulanan gruba göre daha düşük bulunmuş ve kontrol grubuna yaklaşmıştır ($p<0,001$). Propolisin asetaminofen uygulamasından önce başlandığı grupta plazma MDA düzeylerindeki azalışın diğer gruplara göre daha fazla olduğu gözlenmiştir (Şekil 19).



Şekil 19: Asetaminofen ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarında Plazma MDA Düzeyleri

5.1.2. Kan GSH Düzeyi

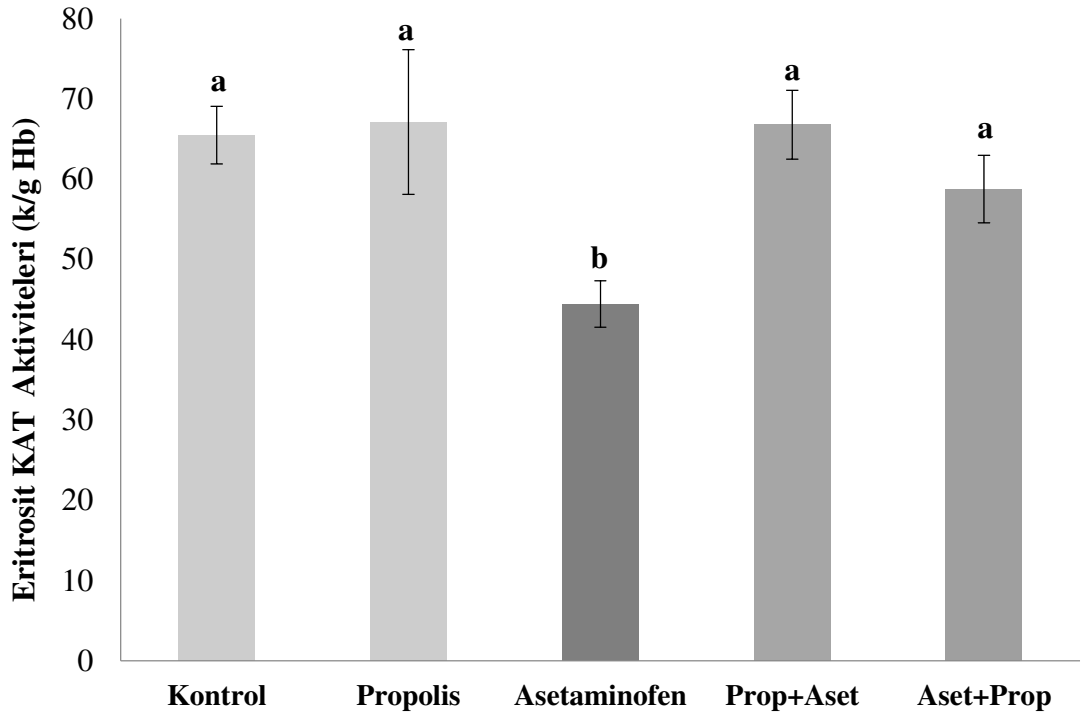
Kan GSH düzeylerinde kontrol grubuna göre asetaminofen uygulanan grupta istatistiksel olarak önemli derecede bir azalma gözlenmiş ($p<0,001$). Kontrol grubu propolis, propolis+asetaminofen, asetaminofen+propolis grupları ile ayrı ayrı kıyaslandığında GSH düzeylerinde istatistiksel olarak önemli bir fark saptanmamıştır. Propolis+asetaminofen ve asetaminofen+propolis grupları asetaminofen uygulanan grup ile ayrı ayrı kıyaslandığında bu iki grupta GSH düzeylerinde önemli bir artış gözlemlenmiş ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$) (Şekil 20).



Şekil 20: Asetaminofen ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarında Kan GSH Düzeyleri

5.1.3. Kan KAT Aktivitesi

Kan KAT aktivitelerinde, kontrol grubuna göre asetaminofen uygulanan grupta azalma görüldüğü belirlenmiştir ve istatistiksel olarak bu azalma anlamlı bulunmuştur ($p < 0,001$). Propolis, propolis+asetaminofen, asetaminofen+propolis uygulaması yapılmış gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kan KAT aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Asetaminofen grubuna göre propolis+asetaminofen, asetaminofen+propolis uygulanan gruplar ayrı ayrı kıyaslandığında kan KAT aktivitesinde önemli bir artış olduğu tespit edilmiş, bu artış propolis+asetaminofen uygulanan grupta daha belirgin olup istatistiksel olarak bu artış anlamlı bulunmuştur ($p < 0,001$) (Şekil 21).



Şekil 21: Asetaminofen ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarında Kan KAT Aktiviteleri

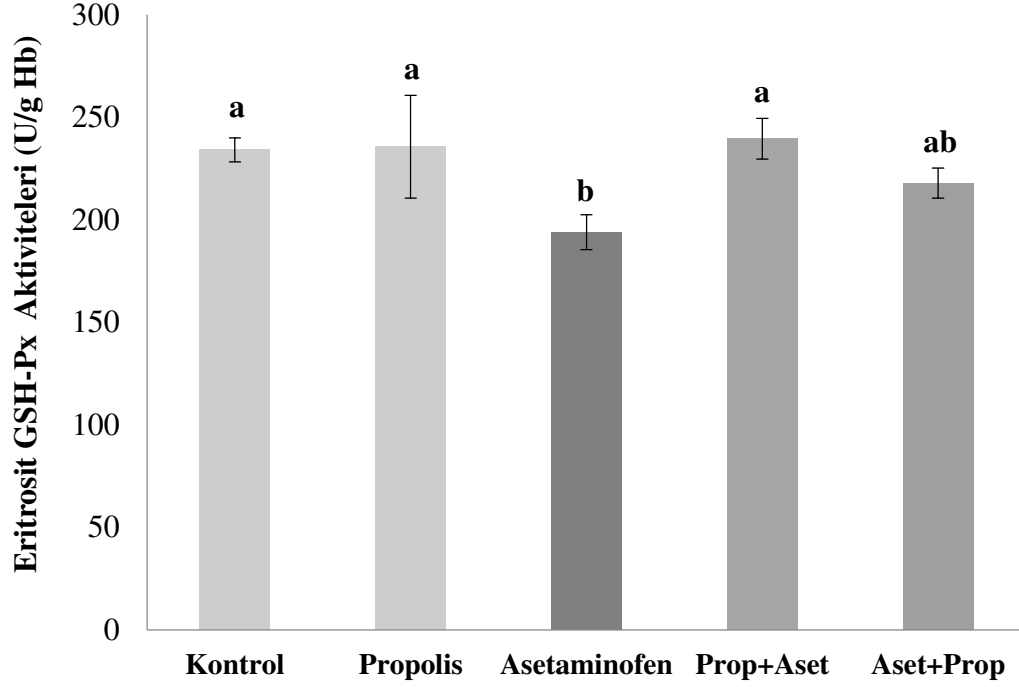
5.1.4. Kan GST Aktivitesi

Rat kanında GST aktivitesi ölçülemeyecek düzeyde olup, tespit edilememiştir

5.1.5. Kan GSH-Px Aktivitesi

Kan GSH-Px aktivitelerinde kontrol grubuna göre asetaminofen uygulanan grupta önemli bir düşüş gözlenmiş ve istatistiksel olarak bu azalma anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Propolis, propolis+asetaminofen, asetaminofen+propolis uygulanan gruplar kontrol grubu ile kıyaslandığında GSH-Px aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Asetaminofen+propolis uygulanan grup asetaminofen uygulanan grup ile kıyaslandığında kan GSH-Px aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Propolis+asetaminofen uygulanan grup asetaminofen uygulanan grup ile

kıyaslandığında kan GSH-Px aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Şekil 22).



Şekil 22: Asetaminofen ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarında Kan GSH-Px Aktiviteleri

5.2. Karaciğer Oksidan ve Antioksidan Düzeyleri

2 gr/kg asetaminofen ve 200 mg/kg/gün propolis uygulanan deney gruplarının karaciğer MDA, GSH düzeyleri, KAT, GST ve GSH-Px aktivitelerinin ortalama değerlerinin istatistiksel karşılaştırması Tablo 16'da gösterilmiştir.

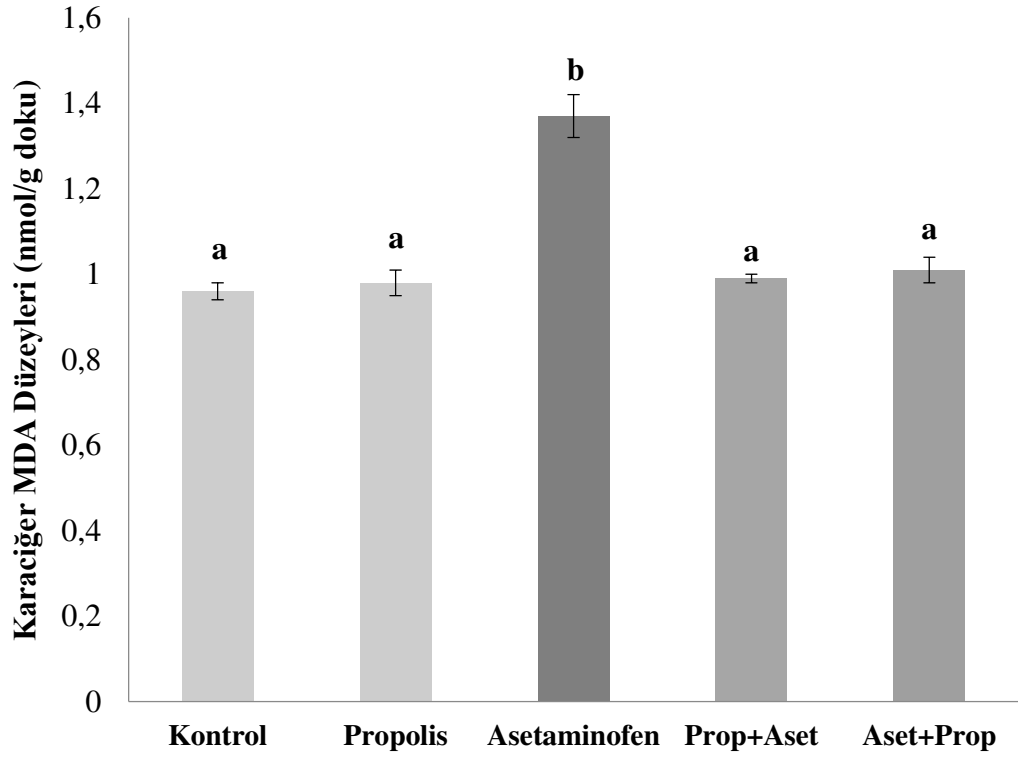
Tablo 16: Deneyisel Gruplara Ait Doku Karaciğer MDA, GSH, KAT ,GST, GSH-Px Aktiviteleri

Gruplar	MDA (nmol/g prot.)	GSH (μmol/ml)	KAT (k/g prot.)	GST (U/g prot.)	GSH-Px (U/g prot.)
Kontrol	0,96±0,03 ^a	9,24 ± 0,13 ^{ab}	39,28 ± 1,82 ^a	30,03±1,19 ^a	11,49 ± 1,51 ^a
Propolis	0,98±0,03 ^a	9,49±0,11 ^a	37,80±3,68 ^a	28,25±1,66 ^{ab}	11,78±0,99 ^a
Asetaminofen	1,37±0,05 ^b	8,05±0,15 ^c	27,37±0,74 ^c	24,12±0,47 ^c	6,84±1,06 ^b
Prop. + Aset.	0,99±0,01 ^a	9,05±0,09 ^{ab}	37,22±0,50 ^a	27,67±1,08 ^{ab}	10,92±0,61 ^a
Aset. + Prop.	1,01±0,03 ^a	8,74±0,14 ^b	32,97±1,51 ^b	26,12±1,09 ^{bc}	8,15±1,21 ^{ab}
P	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001

^{a,b,c}; Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

5.2.1. Karaciğer MDA Düzeyi

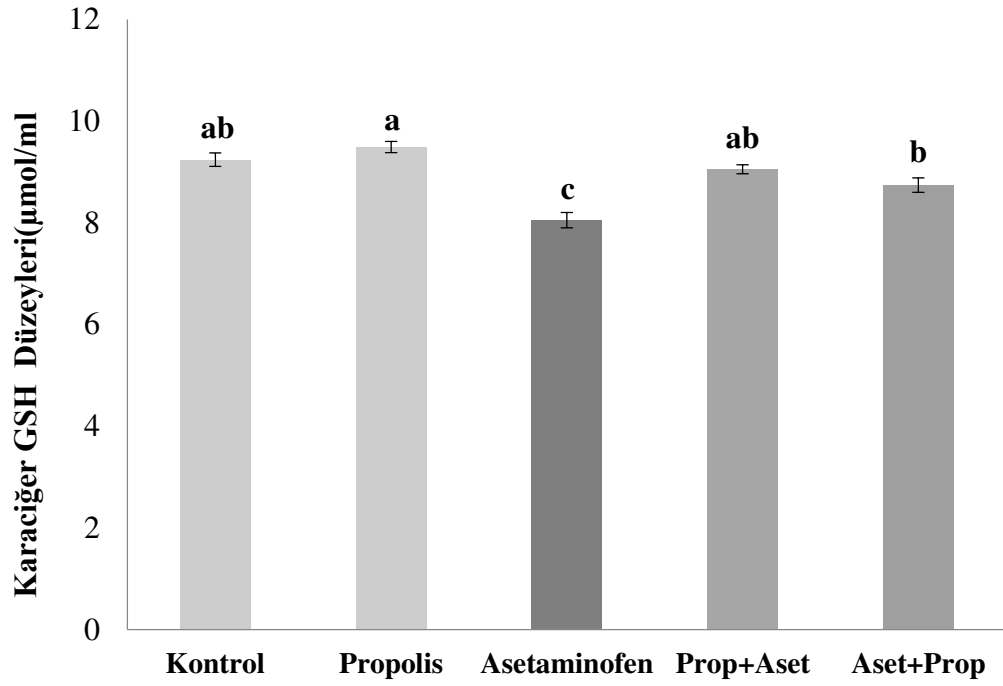
Karaciğer dokusunda MDA düzeyleri, kontrol grubuna göre asetaminofen uygulanan grupta daha yüksek olarak ölçülmüş ve aradaki fark istatistiksel bakımdan anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$). Propolis, propolis+asetaminofen ve asetaminofen+propolis uygulanan gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Propolis+asetaminofen ve asetaminofen+propolis uygulanan gruplar asetaminofen uygulanan grup ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptanmıştır ($p<0,001$). Propolis+asetaminofen uygulanan gruptaki azalışın daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Şekil 23).



Şekil 23: Asetaminofen ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarında Karaciğer MDA Düzeyleri

5.2.2. Karaciğer GSH Düzeyi

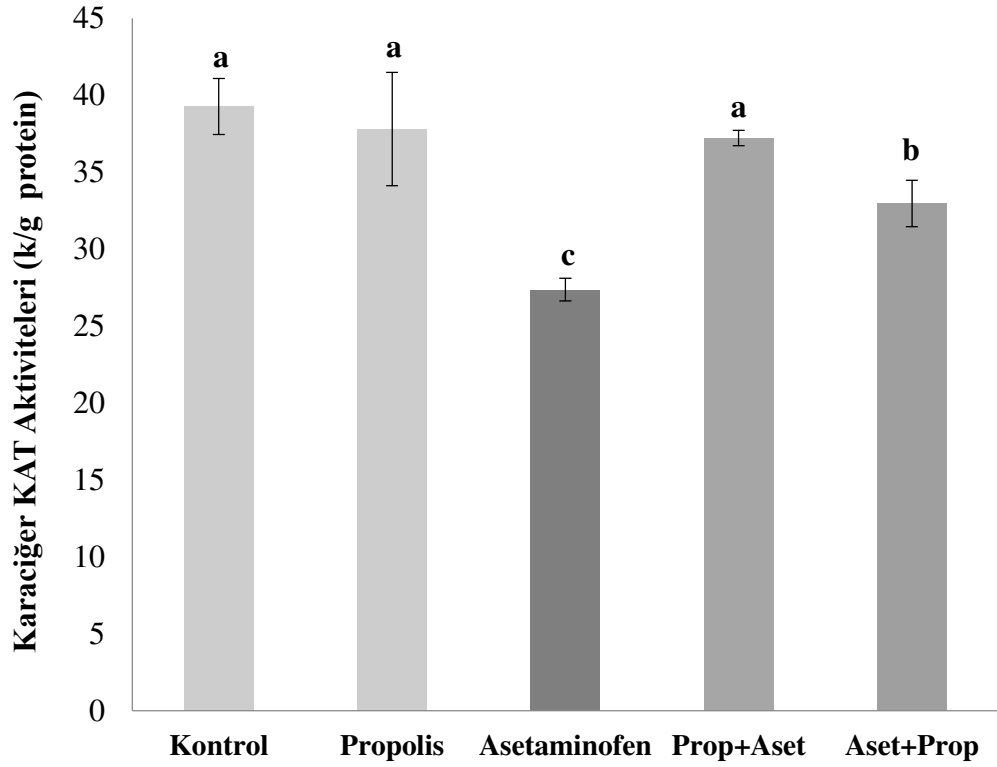
Karaciğer GSH düzeyinde asetaminofen grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş belirlenmiştir ($p<0,001$). Propolis, propolis+asetaminofen, asetaminofen+propolis grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Propolis+asetaminofen, asetaminofen+propolis uygulanan gruplar asetaminofen uygulanan grup ile kıyaslandığında karaciğer GSH düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu gözlenmiştir ($p<0,001$). Karaciğer GSH düzeyleri, propolisin asetaminofen ile birlikte uygulandığı grupta asetaminofen+propolis uygulanan gruba göre daha yüksek bulunmuş ve kontrol grubuna yaklaşmıştır ($p<0,001$) (Şekil 24).



Şekil 24: Asetaminofen ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarında Karaciğer GSH Düzeyleri

5.2.3. Karaciğer KAT Aktivitesi

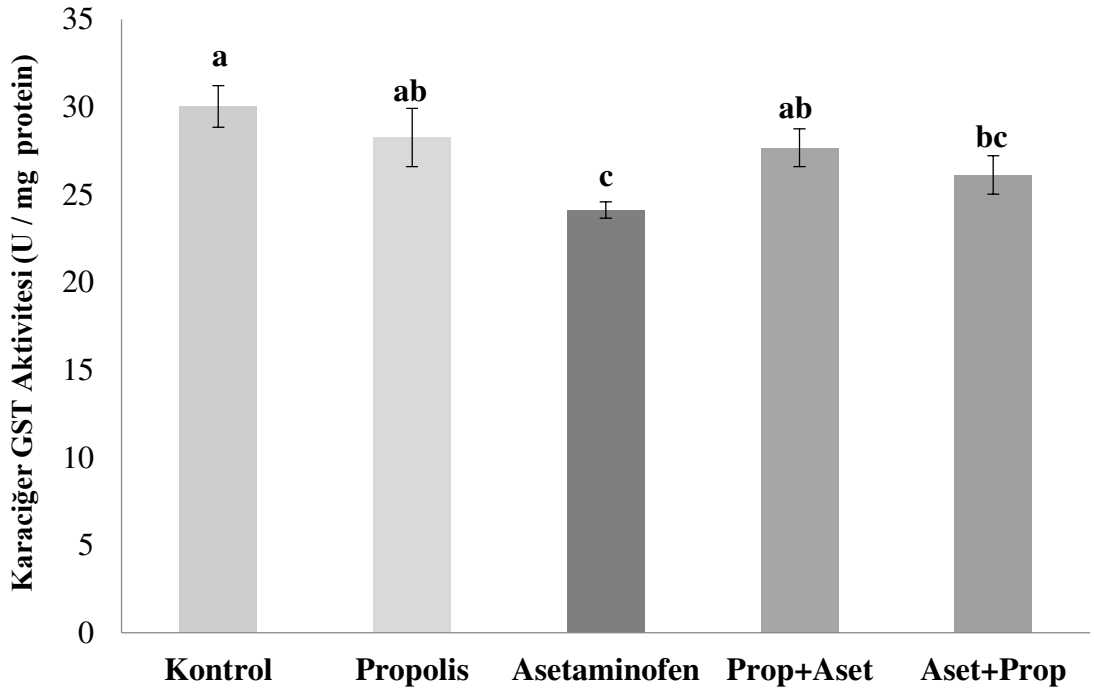
Karaciğer dokusunda kontrol grubuna göre asetaminofen ve asetaminofen+propolis uygulanan gruplar ayrı ayrı karşılaştırıldığında KAT aktivitesinde istatistiksel olarak önemli düşüş bulunmuştur ($p<0,001$). Propolis, propolis+asetaminofen uygulamasının yapıldığı gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında KAT aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Propolis, propolis+asetaminofen, asetaminofen+propolis uygulamasının yapıldığı grup asetaminofen uygulanan grup ile ayrı ayrı karşılaştırıldığında KAT aktivitesinde artış olduğu gözlenmiştir ($p<0,001$). Propolis+asetaminofen uygulanan grup asetaminofen+propolis uygulanan gruba kıyasla kontrol grubuna daha fazla yaklaşmıştır (Şekil 25).



Şekil 25: Asetaminofen ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarında Karaciğer KAT Aktiviteleri

5.2.4. Karaciğer GST Aktivitesi

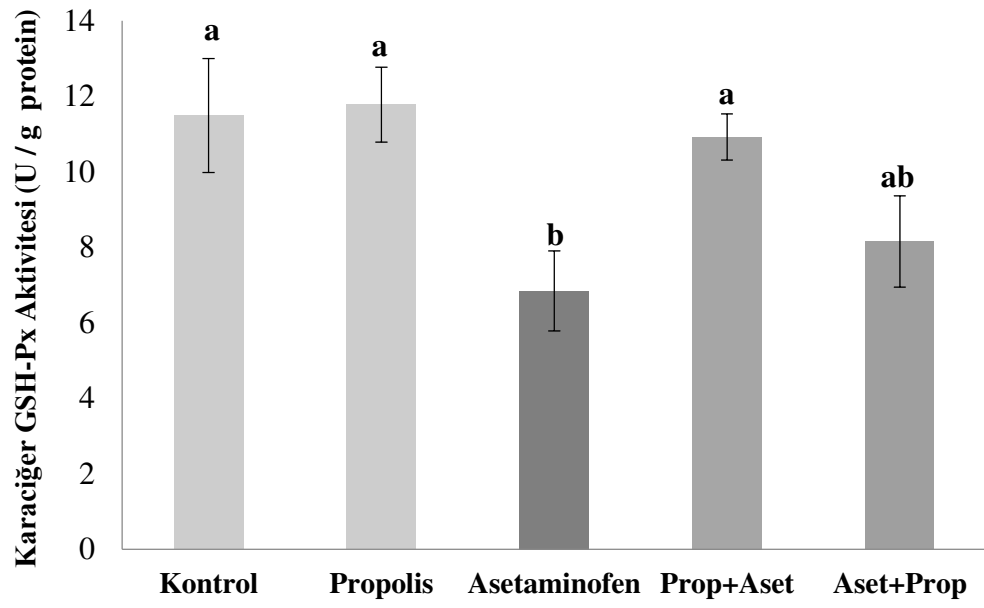
Asetaminofen uygulanan grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında karaciğer GST aktivitesinde önemli bir düşüş gözlenmiş ve bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$). Propolis, propolis+asetaminofen uygulanan gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında karaciğer GST aktivitesinde bir değişiklik gözlenmemiştir. Propolis+asetaminofen uygulanan grup asetaminofen uygulanan grup ile karşılaştırıldığında GST aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu saptanmıştır. ($p<0,001$). Asetaminofen+propolis uygulanan grup asetaminofen uygulanan grup ile kıyaslandığında karaciğer GST aktivitesinde bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 26).



Şekil 26: Asetaminofen ve Propolis Uygulanan Ratlarda Karaciğer GST Aktiviteleri

5.2.5. Karaciğer GSH-Px Aktivitesi

Asetaminofen uygulanan grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında karaciğer GSH-Px aktivitesinde asetaminofen uygulanan grupta önemli bir düşüş gözlenmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$). Propolis, propolis+asetaminofen, asetaminofen+propolis uygulanan gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında GSH-Px aktivitesinde bir değişiklik gözlenmemiştir. Propolis+asetaminofen uygulanan grup asetaminofen uygulanan grup ile karşılaştırıldığında karaciğer GSH-Px aktivitesi asetaminofen grubuna göre daha yüksek saptanmıştır ve bu yükseliş istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$). Asetaminofen+propolis uygulanan grup asetaminofen uygulanan grup ile kıyaslandığında karaciğer GSH-Px aktivitesinde bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 27).



Şekil 27: Asetaminofen ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarında Karaciğer GSH-Px Aktiviteleri

6. TARTIŞMA

Çalışmada; asetaminofen uygulanan ratların kan ve karaciğer dokularında meydana gelebilecek oksidatif hasara karşı propolisin koruyucu ve/veya tedavi edici etkisi olup olmadığı araştırılmıştır.

Karaciğer çok sayıda fizyolojik süreç için kritik bir merkez olarak işlev göstermektedir. Bunlar arasında; makro besin metabolizması, kan hacmi regülasyonu, bağışıklık sistemi desteği, lipid ve kolesterol homeostazı, birçok ilaç ve ksenobiyotik bileşiklerin parçalanması yer almaktadır. Karaciğer anatomik, fizyolojik ve biyokimyasal rolü nedeniyle alkol, ilaç ve zehir gibi zararlıları detoksifiye etme özelliğine sahiptir. İlaçlar, toksik etki ve kullanım kolaylığından dolayı zehirlenmeler arasında ilk sıralardadır (145).

Asetaminofen, tek başına veya diğer maddelerle kombinasyon halinde bulunan, reçetesiz satılan, tüm dünyada yaygın olarak kullanılan 'analjezik' ve 'antipiretik' özellikleri ile tanınan bir ilaçtır. Asetaminofenin doz aşımı, deneysel hayvan modelleri ve insanlarda ciddi hepatotoksisiteye ve hatta karaciğer yetmezliğine neden olabilir. Yüksek dozda asetaminofen tüketimi insan karaciğeri için toksiktir, ancak biyolojik olarak dönüştürüleceği sülfat ve glukuronik asidin toksik olmayan konjugatları olarak elimine edileceği için terapötik dozlarda kullanılması güvenlidir (146). Asetaminofen, gastrointestinal sistem üzerine çok az yan etki gösterir fakat her yıl tüm dünyada meydana gelen karaciğer zehirlenmeleri içinde asetaminofen kaynaklı hepatotoksitite üst sıralarda yer almaktadır (147).

Farklı yollarla, farklı dozlarda asetaminofen uygulanan ratların karaciğer dokusunda yapmış olduğu değişikliklere ilişkin birçok literatür mevcuttur. Sabina ve ark. (148) farelere hepatotoksisiteyi indüklemek amacı ile asetaminofeni 900 mg/kg tek doz intraperitoneal (i.p.) yolla, He ve ark. (149) 350 mg/kg tek doz subkutan yolla, Anbarasu ve ark. (150) ratlara 750 mg/kg gavaj yoluyla 72 saatte bir uygulamışlardır.

Fareler üzerinde yapılan birçok deneysel çalışmalarda asetaminofenin 300 mg/kg ve bunun üzerindeki dozlarının akut karaciğer nekrozuna sebep olduğu tespit edilmiştir. Literatürlerde bulunan veriler göz önüne alındığında asetaminofenin 750 mg/kg, 1, 2 ve 3 g/kg dozları farklı yollarla uygulandığında benzer hasarların meydana geldiği fakat doza bağlı olarak şiddetlerinin farklı ölçülerde olduğu tespit edilmiştir (151, 152). Çalışmamızda gavaj yoluyla 2 g/kg uygulanan asetaminofenin dozu ilgili literatürlere göre belirlenmiştir (153-158). Asetaminofen doz aşımı, hepatik nekroza ve lezyona, böbrek hasarına ve hatta insanlarda ve deney hayvanlarında ölüme yol açabilmektedir (159).

Asetaminofen terapötik dozlarda kullanıldığında küçük bir kısmı değişmeden vücuttan atılırken büyük bir kısmı ise yüksek oranda karaciğerde ve belli bir oranda böbreklerde biyotransformasyona uğrayarak vücuttan atılır. Asetaminofen sülfat ve glukuronid konjugasyonu olarak atılmakla birlikte küçük bir kısmı reaktif bir metaboliti olan NAPQI'e dönüşmektedir. NAPQI karaciğerde CYP450 sisteminde asetaminofenin metabolize edilmesi sırasında oluşmaktadır (160). Aşırı doz asetaminofen alımı sonrası bu zararlı metabolit karaciğerde hasara neden olmaktadır. Bu hasarlanma süreci şöyle özetlenebilir; asetaminofen tedavi dozlarında kullanıldığında bir miktar NAPQI meydana gelir, meydana gelen bu metabolit GSH tarafından detoksifiye edilir. NAPQI temel olarak -SH grubu içeren yapılara bağlanma eğiliminde olduğundan NAPQI oluşurken hızlı bir şekilde özellikle hücresel GSH'a bağlanır ve bu yolla detoksifiye edilir (8, 20, 21). Fakat aşırı dozlarda asetaminofen kullanımı sonrası hücre içinde aşırı miktarda NAPQI meydana gelir, buna karşılık olarak azalan GSH düzeyleri artan NAPQI miktarını karşılayamaz hale geldiğinde asetaminofenin reaktif bir metaboliti olan NAPQI, diğer -SH içeren hücresel proteinlere bağlanarak mitokondriyal solunumun baskılanmasına ve hücresel hasarın gelişmesine neden olmaktadır. Ayrıca tüketilen ATP mitokondriyal oksidatif strese neden olabilmektedir. ATP tüketimi hepatositler ve sinüzoidal endotelial hücrelerde, selüler onkotik nekroza yol açar. CYP450 tarafından metabolize edilen asetaminofen aynı zamanda ROT'lerinin de oluşmasına neden olur (23, 159).

Vücutta bulunan antioksidan savunma sisteminin yetersiz kaldığı durumlarda denge oksidanlar lehine kayarak oksidatif stres meydana getirir, hücre membranı ve diğer hücre bileşenlerinin değişimiyle sonuçlanan oksidatif stres, lipidlerin ve diğer makro moleküllerin oksidatif tahribatına yol açarak doku hasarına, kronik hastalıklara, hücrenin nekroz ve ölümüne sebep olmaktadır (81, 85). Aynı zamanda birçok farklı hastalık için kullanılan ilaçlar vücutta birikir ve bunun sonucunda serbest radikaller meydana gelir. Oksidatif stresin asetaminofen toksisitesinde önemli bir role sahip olduğu kabul edilip, asetaminofenin reaktif ara ürünü olan NAPQI oksidasyonundaki artışı, $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 ve $OH^{\cdot}$ oluşumlarında artışa sebep olmakta ve $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 ve $OH^{\cdot}$ 'de lipidlerle reaksiyona girerek LPO'nu başlatmaktadır (160). Oluşan NAPQI birçok proteinle birlikte mitokondriyal proteinlere de bağlanmaktadır. Mitokondri matriksinde $O_2^{\cdot-}$ radikalleri $NO^{\cdot}$ ile birleşerek daha reaktif bir ürün olan $ONOO^{\cdot}$ radikalini oluştur. Mitokondri içerisinde genişleyip yayılan oksidatif stres mitokondri membranının permeabilitesinde bozukluğa neden olarak mitokondriyal faktörlerin (Endonükleaz G, Apoptoz Uyarıcı Faktör, Sitokrom C) hücre içine salınımını tetikler (28).

Karaciğer hasarı meydana getirmek amacıyla asetaminofen uygulanan ratların hasarlanma sürecinin araştırıldığı çalışmalar incelendiğinde, asetaminofen uygulanan gruplarda kontrol gruplarına göre ROT'nin yüksek, antioksidan enzim aktivitelerinin ise düşük bulunduğu belirtilmiştir (148-150). Asetaminofen kaynaklı ortaya çıkan hepatotoksositeye neden olan en önemli mekanizmalardan biri ROT'ne bağlı olarak görülen LPO'dur. Serbest radikallerin PUFA'ni etkilemesi sonucu olarak LPO başlar. Oksidatif stres altındaki dokularda LPO'nun hücre fonksiyon kaybında rolü bulunmaktadır. MDA, LPO'nun son ürünüdür ve LPO'nun en yaygın kullanılan biyobelirteçlerinden biridir. MDA, serbest radikallerin oluşturduğu etkiler ile makro moleküllerin oksidatif hasarı sonucu ortaya çıkmakta ve oksidatif strese maruz kalan dokularda MDA düzeylerinde anlamlı olarak artış görülmektedir (161).

Literatür verilerini incelediğimizde yapılan benzer deneysel çalışmalarda, asetaminofen ile oluşturulan oksidatif strese MDA düzeylerinin arttığı, uygulanan koruyucu yöntemlerin de MDA düzeylerini azaltarak asetaminofen toksisitesini engellediği gözlenmiştir (157, 162). Yapar ve ark. (58) toksik dozda asetaminofen uyguladıkları farelerde L- karnitin karaciğer üzerine koruyucu etkisini inceledikleri çalışmalarında, uygulamalardan 24 saat sonra aldıkları kan örneklerinde toksisite oluşturulan grupta MDA düzeylerinde artış olduğunu bildirmişlerdir. L- karnitin tedavisi sonrası ise MDA düzeylerinde azalma tespit edilmiştir. Indahsari ve ark. (163) toksik dozlarda asetaminofen alımının neden olduğu karaciğer hasarını Moringa yaprağı ekstresinin ne ölçüde azaltabileceğini göstermek amacıyla ratlara 2 g/kg dozunda oral yolla asetaminofen ve farklı dozlarda Moringa yaprağı ekstresi uygulamışlardır. Asetaminofenin toksik dozunun uygulandığı grup, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında MDA, AST ve ALT düzeylerinde bir artış görülmüştür. Moringa yaprağı ekstresi ratlarda MDA düzeyini azaltmıştır. Kurniawan ve ark. (164) sıçanlara 7 gün boyunca her gün oral yolla 180 mg/200 g asetaminofen uygulanmış ve karaciğerde meydana gelen toksisite üzerine Aloe vera yaprağının etanol özütünün, hepatoprotektif etkisini incelemeyi amaçlamışlardır. Bu çalışmalarında kontrol grubuna göre asetaminofen uygulanan grupta plazma MDA düzeylerinde artış meydana geldiği gözlemlenmiştir. Aloe vera yaprağının uygulandığı grupta ise MDA düzeylerinde azalma olduğu bildirilmiş ve Aloe vera yaprağının etanol özütünün hepatoprotektif etkisi gösterilmiştir. Gül ve ark. (165) asetaminofen toksisitesinde ozon terapisinin koruyucu etkisini inceledikleri çalışmalarında uygulamadan 24 saat sonra alınan kan örneklerinde toksisite oluşturulan grupta MDA değerlerinde, kontrol grubuna göre artış saptamışlardır. Ozon uygulaması yapılan grupta ise toksisite grubuna göre düşüş görülmüş ve asetaminofen toksisitesinde ozon terapisinin koruyucu etkisi gösterilmiştir.

Zhao ve ark. (166) ratlar ile yaptıkları çalışmalarında 2,5 g/kg dozunda asetaminofen uygulayarak toksisite meydana getirmişler ve bu toksisiteye karşı Rhein koruyucu etkilerini araştırmışlardır. Asetaminofen uygulanan grupta plazma MDA düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde artış görülmüştür.

Tedavi grubunda ise toksisite grubuna göre MDA düzeylerinde düşüş meydana gelmiştir. Kuvandik ve ark. (167) ratlara 1 g/kg dozunda asetaminofen uygulayarak oluşturulmuş toksisitede karaciğer dokusunda MDA düzeylerinde artış görülmüştür.

Hsu ve ark. (59) 350 mg/kg i.p. olarak asetaminofen uyguladıkları farelerde oluşturdukları hepatotoksisite sonrası S-allyl sistein ile S-propil sisteinin koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, toksisite oluşturulmuş grupta plazma ve karaciğer dokularında MDA düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla artış saptamış ve tedavi grubunda ise S-allyl ile S-propyl'in MDA değerlerini azalttığı görülmüştür.

Çalışkan (168) yaptığı çalışmada asetaminofen ile deneysel toksisite oluşturarak oksidatif durumu LPO'nun ölçümünü sağlayan TBARS metoduyla değerlendirmiştir. Asetaminofen grubunda karaciğer dokusu ve kandaki TBARS düzeyleri, diğer gruplara göre anlamlı olarak yüksek, asetaminofen+nar suyu grubunda ise TBARS düzeyleri asetaminofen grubuna göre anlamlı ölçüde düşük saptanmış ve nar suyunun oksidatif strese karşı koruyucu olabileceğini gösterilmiştir. El-Maddawy ve ark. (169) 2 g/kg dozunda asetaminofeni oral yolla uyguladıkları çalışmalarında ratların hem karaciğer hem de böbrek dokularında MDA düzeylerini ölçmüşlerdir. Asetaminofen uygulanan gruptaki MDA düzeyleri kontrol grubuna göre önemli ölçüde arttığını bildirmişlerdir.

Yaptığımız çalışmada 2 g/kg dozunda uygulanan asetaminofen plazma ve karaciğer dokularında LPO için bir biyobelirteç olan MDA düzeylerinde toksisite oluşturulan grupta önemli derecede artışa neden olmuştur. Bu artış LPO'nun varlığını göstermektedir. Asetaminofen uygulanan grupta plazma ve karaciğer dokularında MDA düzeylerindeki artış asetaminofenin toksik bir metaboliti olan NAPQI'den kaynaklandığı düşünülmektedir. Yüksek dozda alınan asetaminofen karaciğerde CYP450 enzim sistemi yoluyla LPO'na ve hücrel hasarlara yol açan NAPQI'a dönüştürülerek metabolize olmaktadır (22). MDA düzeylerinde meydana gelen bu artış vücutta detoksifiye edilemeyen yüksek miktarda serbest radikal oluşumuna sebebiyet vermektedir.

Yüksek miktarda oluşan bu serbest radikaller ise vücutta bulunan oksidan ve antioksidan dengesini bozmakta ve oksidatif strese neden olmaktadır. Asetaminofen uygulanan ratlarda artmış MDA düzeyleri daha önce bildirilen bulgular (153, 157, 158, 169) ile uyum içindedir.

Karaciğer GSH için ana depo olan bir organdır. GSH serbest radikal artışına ve LPO oluşmasına bağlı olarak meydana gelen ürünlerle kolayca reaksiyona girerek, metabolizma için zararlı olan kimyasal reaktif toksik bileşiklere veya oksidatif strese karşı hücrel savunmada rol alan en önemli antioksidanlardan biri olarak bilinir. GSH asıl kaynağını yapısında kükürt bulunduran amino asitlerden özellikle sistein ve metiyoninden alır ve serbest radikalleri detoksifiye etmede önemli bir role sahiptir. GSH önemli bir antioksidan ve indirgeyici ajandır, hücrenin oksido-redüksiyon dengesini sürdürüp endojen ve eksojen kaynaklı oksidanların neden olduğu zararlı etkilere karşı hücreleri korumaktadır. GSH'un en önemli görevi, enzim ve proteinlerin tiyol gruplarının indirgenmesi ile redükte formlarının yeterli düzeylerde olmasını sağlamaktır. Yapısında tiyol grubu bulunduran birçok enzim düşük hızda fakat okside olarak ya da oksijenin direkt etkisi ile hızlı bir şekilde aktivitelerini kaybederler. GSH kendisi okside olarak tiyol gruplarını tekrar indirger ve bu grupların aktivasyonunu sağlar. Oksidatif hasardan kaynaklanan LPO ürünleriyle reaksiyona girerek GSSG'ye dönüşür. Özellikle H_2O_2 'nin elimine edilmesinde GSH'un oksitlenebilirliğinden faydalanılır (153, 170, 171). Serbest radikal hasarı ve LPO ile GSH düzeylerinin arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışmalarda LPO ürünlerinde artış, GSH düzeylerinde düşüşler saptanmıştır (172, 173).

Yapılan çalışmalarda yüksek doz asetaminofenin, hücrel GSH düzeylerini azaltırken, LPO'nun artmasına sebep olduğu gösterilmiştir. Manda ve ark. (174) tarafından yapılan çalışmada asetaminofen ile karaciğer toksisitesi oluşturulan grupta kandaki GSH düzeyleri ve GSH-Px aktivitelerde kontrol grubuna göre azalma ve verilen β -karoten tedavisi ile bu değerlerde artış saptanmıştır. Yapar ve ark. (58) yaptıkları benzer bir çalışmada asetaminofen ile indükledikleri karaciğer toksisitesinde serum ve karaciğer doku örneklerinde GSH düzeylerinin azaldığını ve verilen L-karnitin uygulaması ile bu azalmış GSH değerlerinin arttığını tespit

etmişlerdir. Hsu ve ark. (59) yaptıkları çalışmada ise 24 saat sonra alınan kan ve karaciğer dokularında GSH düzeyi, GSH-Px ve KAT aktivitelerinin asetaminofen ile zehirlenen grupta kontrol grubuna göre azaldığı, verilen S-allyl ve S-propyl ile de bu değerlerin arttığı saptanmıştır. Parmar ve ark. (175)'nin yapmış oldukları çalışmada asetaminofen ile toksisite oluşturulan grupta GSH düzeyinin azaldığını gözlemlemişlerdir. Abdul Hamid ve ark. (176) oral yolla 7 gün boyunca 750 mg/kg asetaminofen uyguladıkları grubun böbrek MDA düzeylerinin kontrol grubu ile karşılaştırdıklarında önemli derecede artış olduğunu, buna karşılık GSH düzeylerinde de anlamlı derecede düşüş olduğunu göstermişlerdir.

Şener ve ark. (177) tarafından yapılan çalışmada karaciğer ve böbrek dokularında GSH düzeyleri asetaminofen ile zehirlenen grupta, kontrol grubuna göre azalma göstermiş ve asetaminofen ile birlikte N-asetilsistein (NAC) tedavisi verilen grupta ise GSH düzeyleri artış göstermiştir. Terneus ve ark. (178) tarafından yapılan bir çalışmada 250 mg/kg i.p. dozunda asetaminofen uygulanarak hepatotoksisite oluşturulan farelerde NAC ve S-adenozil- L-metiyoninin tedavi edici etkileri karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada karaciğer doku GSH düzeyleri asetaminofen ile zehirlenme oluşturulan grupta, kontrol grubuna göre azalma göstermiş ve bu değerler NAC ve S-adenozil- L-metiyoninin ile tedavi sonrasında ise artış göstermiştir. Yine bir başka çalışmada Galal ve ark. (179) tek doz (2 g/kg) asetaminofen uygulanan grupta karaciğer MDA düzeylerinde 3 kat anlamlı bir artışın, GSH aktivitelerinde %66 oranında azalmanın, GSH-Px düzeylerinde ise %51 azalmanın olduğunu yüzdelik olarak göstermişlerdir. Naguib ve ark. (101) farelerde tek doz 500 mg/kg asetaminofen uyguladıkları çalışmada hepatotoksisiteyi ve nefrotoksisiteyi incelemişlerdir. Hem karaciğer de hem de böbrekte sonuçların birbirine korele olduğunu göstermişlerdir. Sonuçlara göre asetaminofen grubunda karaciğer ve böbrek MDA düzeylerinde artışın olduğunu, GSH düzeylerinde ise azalmanın olduğunu belirtmişlerdir. Hücrelerde oksidatif stres oluşmasına neden olan asetaminofen, H₂O₂ ve oldukça yüksek olan toksik metabolitlerinin birikmesi ile enzim aktivitesinde azalmalara neden olmaktadır.

Çalışmamızda kan ve karaciğer doku örneklerinde GSH düzeylerinin asetaminofen ile indüklenen hepatotoksisitede istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı tespit edilmiştir ($p<0,001$). Yapılan çalışmalar incelendiğinde GSH düzeylerinin toksikasyon grubunda azalması bizim yapmış olduğumuz çalışma ile uyumluluk göstermektedir (58, 174, 175, 177). GSH düzeylerindeki azalmanın; asetaminofenin CYP450 sistemi ile NAPQI'a dönüşümünden sonra hızlı bir şekilde GSH'un -SH grubuna bağlanmasıyla gerçekleştiği düşünülmektedir. Asetaminofen ile yapılan toksikolojik çalışmalarda kabul edilen genel düşünce, doğal antioksidan özellikte olan ve hücrede bulunan GSH'un toksik maddenin yaptığı etkiden dolayı aşırı derece azalmasına bağlı olarak, hücrenin savunmasız kalması ve bunun sonucunda da hasar oluşumunun tetiklendiği kabul edilmektedir (180, 181). Asetaminofenin toksik dozlarında oksidatif stresin aracı maddesi olarak NAPQI aşırı oluşur ve karaciğerde bulunan GSH depolarını tüketirler. Yüksek doz asetaminofen, öncelikle karaciğerde metabolize olduğu için intraselüler proteinlere bağlanır ve ciddi hepatotoksisiteye sebep olur. NAPQI, GSH düzeylerini azaltır ve bu azalmaya bağlı olarak LPO'nda artış meydana gelir. Asetaminofenin zararlı etkilerinden korunmada önemli rol oynayan GSH, ROT ile -SH grubunun doğrudan etkileşimi ile enzimatik olmayan bir antioksidan olarak hareket edebilir veya bir kofaktör olarak, ROT'ni enzimatik detoksifiye edebilir (182, 183). NAPQI yüksek oksidatif kapasitesi sayesinde oluşan tiyol oksidasyonunun karaciğer toksisitesinde önemli bir yer tuttuğu düşünülmektedir. NAPQI ile proteinlerin -SH gruplarının oksidasyonu ile protein-protein ve protein-GSH arasında disülfid köprüleri oluşmakta böylece NAPQI ve proteinler arasındaki bu kovalan bağlar hücre fonksiyonlarında kayıplara ve hücre ölümüne yol açmaktadır (28, 160). GSH miktarının tükenmesi serbest radikallere karşı vücudu savunmasız bırakır. Bu durumda ortaya oksidatif stres çıkar. Akabinde antioksidan savunma sistemlerinin bozulmasıyla ROT'nin düzeylerinde artış görülür. Bu da karaciğer hasar oluşumuna etki eder. Aynı zamanda azalan GSH düzeylerinin; GSH-Px, SOD ve GST gibi antioksidan enzim seviyelerinin düşmesine sebebiyet vererek ROT'nin antioksidan kapasiteyi aşarak artan ROT'nin LPO'na yol açtığı düşünülmektedirler (184, 185).

Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemi, LPO'na karşı doğal koruyucudur. GST, GSH ile asetaminofen-GSH konjugatları oluşturmak üzere konjugasyonu katalize eder. Asetaminofen uygulanan grupta karaciğer MDA seviyesinde artış görülürken, GSH düzeyi ve GST aktivitesinde önemli derecede düşüş gözlemlenmiştir. Baali ve ark. (186) hepatotoksisite modeli oluşturmak için ratlara oral yoldan 750 mg/kg tek asetaminofen uygulamışlar ve *L. corniculatus*'un karaciğerde meydana gelecek oksidatif stres ve inflamatuvar belirteçler üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Karaciğerde GSH düzeyinin, GST ve SOD aktivitelerinin azaldığını, *L. corniculatus*'un ön tedavinin ise doza bağlı olarak GSH ve antioksidan enzim aktivitelerini önemli derecede artırdığını bildirmişlerdir. Raj Kapoor ve ark. (187) sıçanlarda asetaminofen kaynaklı hepatotoksisite üzerinde *Phyllanthus polyphyllus*'un koruyucu etkisini araştırdıkları çalışmalarında 750 mg/kg oral gavaj yolla asetaminofen uygulamışlar ve GSH-Px ve GST aktivitelerinde kontrol grubuna kıyasla önemli derecede düşüş olduğunu bildirmişlerdir. Hasanein ve Sharifi (188) ratlarda asetaminofen ile indüklenen oksidatif hasara ve hepatotoksisiteye karşı rosmarinik asidin etkileri araştırdıkları çalışmalarında ratlara bir hafta boyunca farklı dozlarda rosmarinik asit uygulaması yapmışlar ve ratlara 7. günde i.p. olarak 500 mg/kg asetaminofen vermişlerdir. Sonuç olarak MDA düzeylerinde önemli ölçüde yükseliş, ayrıca GSH ve GST düzeylerinde de düşüş gözlemlenmiştir.

Çalışmamızda asetaminofen uygulanan grupta karaciğer wuGST aktivitesi kontrol grubuna göre daha düşük tespit edilmiş ve aradaki azalma istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,001$). GSH, NAPQI'nin detoksifikasyonunda ve asetaminofen kaynaklı karaciğer hasarının önlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. NAPQI doğrudan GSH tarafından detoksifiye edildiğinden GST ve hepatik GSH seviyelerindeki düşüş muhtemelen bu süreçte GSH'un NAPQI detoksifiye etmek için yoğun kullanımından kaynaklanmaktadır.

Enzimatik antioksidanlardan KAT'ın en iyi aktivite gösterdiği organ karaciğerdir. H_2O_2 su ve O_2 'e dönüştürerek yüksek oranda reaktif $OH^\cdot$ oluşumunu engelleyerek hücreyi oksidatif hasardan korur.

Asetaminofen uygulanarak yapılan çalışmalarda hepatotoksisite oluşturulan ratlarda lipit peroksidazlar ve ROT'ne bağlı olarak KAT aktivitesinin inaktive olduğu ve enzim aktivitesinin düştüğü tespit edilmiştir. Dokuları LPO'na karşı koruyan enzimatik antioksidanlardan biri olan KAT aktivitesinde azalma meydana gelirse serbest oksijen radikallerinin birikmesine neden olabilir (59, 100, 153, 189, 190, 191, 192). Parmar ve ark. (175)'nin yaptıkları çalışmada asetaminofen ile hepatotoksisite oluşturulan ratlarda KAT aktivitesinin düştüğünü, 200 mg/kg *Taraxacum officinale* uygulanmasının ise enzim aktivitesini arttırarak asetaminofen toksisitesinden karaciğeri koruyup, aşırı miktarda serbest radikal birikimini önleyebileceği kanısına varılmıştır.

Wu ve ark. (191) yaptıkları çalışmalarında asetaminofenin GSH düzeyini ve antioksidan enzim (KAT, SOD, GSH-Px) aktivitelerini inhibe ettiği raporlamışlardır. Bu da asetaminofenin ROT, LPO ve protein oksidasyon ürünlerinin oluşumu için redoks dengesizliğini indüklediğini düşündürmüştür. Akgün (192) ratlarda deneysel asetaminofen toksikasyonunda folik asitin koruyucu etkilerinin araştırıldığı çalışmasında doku KAT aktivitesinin kontrol grubuyla kıyaslandığında toksikasyon oluşturulan grupta azaldığı saptanmıştır. KAT aktivitesinin hem asetaminofen+NAC hem de asetaminofen+folik asit grubunda asetaminofen grubuna göre istatistiksel olarak yüksek olduğu, hatta kontrol ve asetaminofen+folik asit grubu arasında bir fark olmadığı belirlenmiştir. Aktaş Şenocak ve Apaydın Yıldırım (153) hepatotoksisite oluşturmak amacıyla ratlara 2 g/kg dozunda asetaminofen uygulamışlar ve *Taraxacum officinale*'in koruyucu etkisini incelemişlerdir. Kontrol grubuna kıyasla toksikasyon grubunda plazma MDA düzeylerinde artış, kan ve karaciğer KAT aktivitelerinde azalma meydana gelmiştir. Tedavi uygulanan gruplarda MDA düzeyleri yeniden azalmış, KAT aktiviteleri ise artmıştır. Parmar ve ark. (175) yaptıkları çalışmalarında asetaminofen uygulanarak karaciğer hasarı oluşturulan grupta kontrol grubuna göre karaciğer dokusunda MDA düzeylerinde artış, GSH düzeyi ve KAT aktivitesinde düşüş meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Yan ve ark. (193) asetaminofen kaynaklı karaciğer hasarında karnosin ve histidinin koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmalarında ratlara asetaminofen uygulaması sonrası enzim aktiviteleri incelendiğinde KAT ve GSH-Px aktivitelerinde düşüş saptamışlardır.

Sundari ve ark. (194) ratlara asetaminofeni (2 g/kg) oral olarak uygulamış ve deney sonunda karaciğer dokusu SOD, KAT aktiviteleri ile GSH düzeyinde azalma ve MDA düzeyinde artış olduğunu bildirmişlerdir. El-Boshy ve ark. (195) D vitaminin asetaminofen toksisitesinde koruma sağlayıp sağlamadığını araştırdıkları çalışmalarında 1200 mg/kg oral olarak asetaminofen verilen ratların karaciğer ve böbrek dokularında KAT ve GSH-Px enzim aktiviteleri asetaminofen grubunda önemli ölçüde azalmıştır.

GSH-Px, peroksidaz aktivitesi gösteren bir enzim ailesinin genel adıdır. Bu enzim ailesinin ana biyolojik rolü organizmayı oksidatif hasardan korumaktır. Aynı zamanda GSH-Px lipid hidroperoksitleri hücre membranından uzaklaştırarak LPO'nun zincir reaksiyonunu sınırlandırmaktadır (196). Yousef ve ark. (102) asetaminofen uygulamasının ratlarda GSH-Px, GST, SOD ve KAT aktivitelerinde (plazma, beyin, akciğer, kalp, karaciğer, böbrek ve testislerde) ve GSH düzeyinde önemli düşüşe paralel olarak, MDA düzeyinde yükselmeye neden olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca oksidatif hasar, histolojik incelemede doğrulanan belirgin hepatik nekroz, yüksek plazma transaminazları, alkalın fosfataz ve laktat dehidrojenaz ile ilişkilendirilmiştir.

Galal ve ark. (179) balın asetaminofen kaynaklı hepatotoksisiteye karşı potansiyel koruyucu etkisini araştırdıkları çalışmalarında ratlara 2 g/kg dozunda asetaminofen uygulaması yapmışlardır. Asetaminofen uygulanan grupta karaciğer MDA düzeylerinde artış, GSH içeriğinde ve GSH-Px aktivitesinde ise kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede bir düşüş saptanmıştır. Bu çalışmada bal ile ön tedavi, LPO'nda asetaminofenin neden olduğu artışı düşürmüş, GSH düzeyi ve GSH-Px aktivitesini artırmıştır. Bu bulgular, balın oksidatif stresi azaltmasının balın hepatoprotektif etkilerinin mekanizmasında önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir. Çalışmamızda asetaminofenden önce uygulanan propolisin koruyuculuğunun daha iyi olduğu saptanmıştır.

Nwobodo ve ark. (197) *Azadirachta indica* (tesbih ağacı) yaprak sulu ekstraktının asetaminofen kaynaklı hepatotoksistide antioksidan enzimler üzerindeki etkilerini araştırdıkları çalışmalarında ratlara 800 mg/kg dozunda asetaminofen uygulamışlardır. Uygulama neticesinde kan ve karaciğer dokularında GSH-Px aktivitesinde azalma gözlemlenmiştir ve tedavi edici bitkisel ajanla azalan aktivite arttırılmıştır. Gökalp ve ark. (198)'nce yapılan bir çalışmada kırmızı küre hücrelerinde izoniazid ile oluşturulan oksidatif hasara karşı CAPE nin iyileştirici etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada kan GSH-Px aktiviteleri izoniazid ile oluşturulan zehirlenme grubunda kontrol grubuna göre azalma tespit edilmiş ve verilen CAPE tedavisi ile bu azalan değerlerde artış saptanmıştır.

Azarmehr ve ark. (199) sıçanlarda asetaminofen kaynaklı hepatotoksistide üzerinde su teresi ekstraktının hepatoprotektif ve antioksidan aktivitesini araştırdıkları çalışmalarında sıçanlara tek doz oral yolla 2 gr/kg asetaminofen uygulamışlar ve asetaminofen grubunda GSH-Px aktivitesinde önemli bir azalma kaydetmişlerdir.

Çalışmamızda rat kan ve karaciğer dokularında KAT ve GSH-Px aktiviteleri asetaminofen uygulanan grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde düşük ($p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,05$, $p<0,001$). Bu antioksidanların düşük olması Asetaminofenin antioksidan kapasiteyi azaltarak oksidatif stresi arttırdığını göstermektedir.

Günümüzdeki çalışmalar, karaciğer fonksiyonunu sürdürmek ve karaciğer hastalıklarını tedavi etmek amacıyla doğal ürünleri kapsamlı bir şekilde araştırmaktadır. Karaciğer hasarını önlemek amacıyla birçok doğal bileşiklerin kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır (172, 179, 187, 192). Doğal antioksidanlar biyolojik olarak dokuların normal yapılarından kaynaklanan hasarları önlemekte ve olumlu sonuçlar göstermektedir. Doğal apiterapik antioksidanlardan sık kullanılanlara propolis, arı sütü, polen, CAPE örnek verilebilmektedir. Bu amaçla arı ürünlerinin bağışıklık ve koruyuculuk üzerine ciddi etkileri bulunmakla birlikte karaciğer üzerine herhangi önemli bir yan etkilerine rastlanmamıştır.

Arı ürünleri içinden propolis en yüksek miktarda fenolik bileşikler içeren üründür ve bu yüzden hem antioksidan hem de radikal temizleyici aktiviteleri için çalışmalar yapılmıştır (200, 201).

Propolis esansiyel ve aromatik yağlar, reçineler, mumlar, polenler ve çeşitli organik maddeler içerir. Ayrıca propolis, polifenoller, flavonoidler, aromatik asitler ve diterpenik ve fenolik asitler gibi bir dizi biyoaktif madde de içerir. Bu bileşenler, karaciğer yaralanmalarında koruyucu etkiler ve antimikrobiyal, antikanser, antiinflamatuvar, antioksidan ve antiülser aktiviteleri gibi propolisin biyolojik aktivitelerinden sorumlu olabilir (117, 119).

Propolisin son yıllarda üstünde durulan ve tartışılan özelliklerinden bir diğeri de antioksidan etkisidir. Propolis ve diğer antioksidan maddeler ile yapılan araştırmalarda, propolisin LPO'nu önlediği ve serbest radikal oluşumunu indirdiği belirtilmiştir. Propolisin asetaminofen ile birlikte uygulanmasının, asetaminofenin karaciğer ve böbrek fonksiyonu üzerindeki olumsuz etkisini önemli ölçüde azalttığını göstermiştir (202, 203).

Propolisin antioksidan etkisi içeriğinde bulunan flavanoidlerden ileri gelmekte ve propolis ekstraktının kuru ağırlığının %25-30'unu flavonoidler oluşturmaktadır (136). Propolis bileşiminde bulunan organik maddelerden flavonoidler, PUFA'nin peroksi radikalleriyle reaksiyona girip serbest radikal temizleyici rol oynayarak, LPO'nun başlangıç aşamasına etki edebilirler. Flavanoidlerin, serbest radikalleri ortamdaki temizlemeleri ve uzaklaştırabilmeleri gibi işlevlerinin yanı sıra, lipooksijenaz ve COX enzimlerini inhibe ederek antioksidan etki gösterebilmektedir (137).

Antioksidan kapasiteleri göz önüne alındığında son yıllarda arı ürünleri ile ilgili birçok çalışma mevcuttur. Basim ve ark. (204) yaptıkları çalışmada polen ve propolis ekstraktlarının antibakteriyal aktiviteye sahip olduklarını göstermiştir. Bhadauria ve Nirala (203), yaptıkları çalışmada etanolik propolis özütlerinin sıçanlarda yüksek dozda verilen asetaminofen ile oluşan karaciğer hasarını önlediğini bildirmişlerdir.

Yapılan bir başka çalışmada Kanbur ve ark. (205) asetaminofen ile oluşturulan hepatotoksisteyi önlemede arı sütünün etkili olduğunu raporlamışlardır. Bu çalışmalarla terapötik olarak hepatotoksiste önlenebileceği düşüncesi ortaya çıkmaktadır.

Korish ve Arafa (206) tarafından sıçanlarda lipopolisakkarit ile oluşturulan endotoksemi, hepatik hasar ve nöronal hasara karşı CAPE'in etkileri araştırılmış, çalışma sonucunda hepatosit nekrozu, apoptozis, şiddetli hemoraji ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu gözlenmiştir. Kontrol grubundaki sıçan karaciğerleri makroskopik olarak incelendiğinde kırmızı renkte izlenirken, lipopolisakkarit enjekte edilen gruptaki örnekler koyu kırmızı ya da siyah ve çok konjesyon gözlenmişlerdir. Lipopolisakkaritten önce CAPE uygulanan gruplarda ise belirlenen karaciğer hasarının önemli ölçüde azaldığı saptanmıştır. Çalışmamızda asetaminofen uygulanan grupta karaciğerin büyüdüğü, konjesyon nedeniyle renginin koyulaştığı gözlenmiştir.

Bizim çalışmamızda kullanmış olduğumuz antioksidan madde olan propolis; antiinflamatuvar, antikanser, antioksidan ve bağışıklığı uyarıcı özellikleri olan ve bilinen hiçbir yan etkisi de bulunmamaktadır (136). Propolis ile yapılmış çeşitli deneysel çalışmalarda; Bhadauria ve ark. (207) karbon tetraklorürün neden olduğu oksidatif stresi ve oluşan karaciğer hasarını önlediği, Kolankaya ve ark. (208) alkolün neden olduğu oksidatif stresle oluşan lipid değişiklikleri ve karaciğer hasarına karşı, Kısmet ve ark. (209) deneysel obstrüktif sarılık modelinde oksidatif stres üzerinden oluşan karaciğer hasarına karşı koruyucu etkisinin olduğunu saptamışlardır. Aynı şekilde Benguedouar ve ark. (210) doksorubisin ve vinblastinin yol açtığı mitokondriyal strese karşı ortaya çıkan karaciğer ve kalp toksisitesi üzerine propolisin olumlu etki gösterdiğini bildirilmişlerdir. Propolis ile ilgili yapılan in-vivo ve in-vitro çalışmalarda, antioksidan etkinliğinin doz bağımlı ve yüksek polifenolik içerikleriyle ilgili olduğu gösterilmiştir (198, 200-204, 209).

Karaciğer hasarında belirgin koruyucu etkisi olan propolisin (50 ve 100 mg/kg dozlarında) asetaminofen ile birlikte uygulanmasının, asetaminofenin karaciğer ve böbrek fonksiyonu üzerindeki olumsuz etkisini önemli ölçüde azalttığı, hematolojik toksisiteyi önlediği gösterilmiştir (202). Bununla birlikte, farelerde yapılan deneysel bir çalışmada propolisin oral 100 mg/kg dozunun antioksidan, oral 300 mg/kg dozunun prooksidan etki gösterdiği öne sürülmüştür (211). Kaya ve ark. (212) ratlarda siklofosfamidin sebep olduğu kardiyotoksistide propolisin koruyucu rolünü göstermek için ratlara 200 mg/kg/gün gavaj, 7 gün boyunca propolis uygulamışlardır. Siklofosfamidin yan etkilerinin azaltılması noktasında antioksidan özelliği bilinen propolisin tedaviye destek olarak kullanılabileceği kanısına varılmıştır. Yine Altay (213) siklofosfamid uygulanan ratlarda nefrotoksiste üzerine propolisin etkilerini incelediği çalışmasında ratlara 200 mg/kg/gün dozunda propolis uygulamış ve siklofosfamid toksisitesine karşı propolisin koruyucu etkisinin olduğunu bildirmiştir.

Yılmaz ve ark. (200) 200 mg/kg/gün propolisi oral olarak uyguladıkları deneysel çalışmada, Aflatoksin B1 uygulanan ratlarda oksidatif stresin neden olduğu karaciğer hasarına karşı propolisin LPO'nu inhibe ederek hepatoprotektif etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. Çalışmamızda yukarıdaki çalışmalarla uyumlu olarak propolisin dozu ve uygulama süresi belirlenmiş olup, propolis oral olarak 200 mg/kg dozunda asetaminofenden önce ve asetaminofen ile birlikte uygulanmıştır (200, 212-214).

Zhao ve ark. (214) propolisin farelerde inorganik civa kaynaklı oksidatif stres üzerindeki koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmalarında oksidatif stres ve antioksidan enzimlerdeki değişiklikleri değerlendirilmişlerdir. Propolis (200 mg/kg) tedavisi LPO ve GSSG seviyesini inhibe ederken, GSH seviyesini arttırmıştır. Antioksidan enzimlerin aktiviteleri, yani SOD, KAT, GST ve glukoz-6-fosfat dehidrojenazda propolis uygulamasından sonra kontrole yaklaşmıştır. Sonuçlar, propolisin civa kaynaklı toksisiteye karşı antioksidan savunmasını arttırdığını ve hepatoprotektif ajan olarak terapötik potansiyele sahip olduğuna dair kanıt sağladığını göstermektedir.

Bir başka koruyucu etkisi olduğu bilinen polen ile çalışma yapan Eraslan ve ark. (215) pestisit ile sıçanlarda oluşturduğu oksidatif stres parametrelerinden MDA, SOD, KAT, GSH-Px parametrelerini incelemişler ve polen ekstraktları ile beslenmenin oksidatif hasara karşı iyileştirici etkisini raporlamışlardır.

Propolisin etanolik özütünün (200 mg/kg), sıçanlarda asetaminofen (20 mg/kg) kaynaklı subkronik hepatorenal hasara karşı etkilerinin değerlendirildiği çalışmada asetaminofen uygulaması serum transaminazları, alkalik fosfataz, laktat dehidrojenaz, γ -glutamil transpeptidaz, bilirubin ve serum proteinlerini önemli ölçüde artırırken, hemoglobin, kan şekeri ve albümini azaltmıştır. GSH, SOD ve KAT aktiviteleri, hepatik CYP'ler, anilin hidroksilaz ve amidopirin-N-demetilaz, asetaminofen intoksikasyonundan sonra önemli ölçüde azalmıştır. LPO, asetaminofen uygulamasından sonra her iki organda da önemli derecede yükselme göstermiştir. Propolis, kan biyokimyasal parametrelerde, CYP enzimlerinde ve oksidatif stres belirteçlerinde asetaminofen kaynaklı değişiklikleri tersine çevirerek iyileştirici etkiler sergilemiştir. Karaciğer ve böbreğin histopatolojik analizi biyokimyasal bulgularla uyumlu olup, propolisin asetaminofen kaynaklı hepatorenal hasara karşı iyileştirici potansiyeli olduğu sonucuna varılmıştır (203).

Kamış ve Karabağ (154) bal arılarının bitki özütlerinden toplamış olduğu propolisin aktif bileşeni olan CAPE'in inflamasyon ve oksidatif stres üzerine etkisini inceledikleri çalışmalarında ratlara 2 g/kg dozunda gastrik sonda yardımı ile oral olarak asetaminofen uygulamışlardır. Asetaminofen uygulanan ratların karaciğerlerinde nasıl bir hasar oluştuğunu ve asetaminofen+CAPE, asetaminofen+NAC gruplarının kontrol grubuna göre nasıl bir etki oluşturduğunun incelendiği çalışmada karaciğer dokusunda, MDA, total antioksidan, total oksidan seviye, GSH, TNF- α , IL-1 β , IL-18 düzeylerini, KAT, SOD aktiviteleri ve serumda AST, ALT düzeyleri incelenmiştir. Asetaminofen indüklü hepatotoksisite modelinde asetaminofen uygulanan grupta oksidatif stres parametrelerinin ve sitokin seviyelerinin istatistiksel olarak arttığı, CAPE ve NAC verilen gruplar ile asetaminofen grubu karşılaştırıldığında CAPE'nin meydana gelen inflamasyon ve oksidatif strese karşı koruyucu bir etki gösterdiği gözlenmiştir.

Karaciğer hasarında erken ortaya çıkan TNF- α diğer inflamatuvar sitokinlerin yapımını da tetiklemektedir. Elde edilen veriler, CAPE'nin karaciğer hasarına neden olan durumlarda hepatositlerdeki hasarın önlenmesi veya azaltılması açısından tedavide kullanılabilecek bir alternatif olabileceğini akla getirmektedir.

Ashwag ve ark. (216) tarafından yapılan çalışmada tamoksifen ile hepatotoksisite oluşturulan ratlarda CAPE'nin antitümöral etkinliği araştırılmıştır. Bu çalışmada zehirlenmeden 24 saat sonra alınan doku örneklerinde; hepatotoksisite oluşturulan grupta, kontrol grubuna göre doku GSH değerlerinin azaldığı ve CAPE ile tedavi edilen grupta bu değerlerin arttığı tespit edilmiştir.

Gonzalez ve ark. (217) farelerde yüksek dozda (600 mg/kg) oral olarak asetaminofen ile indüklenen bir akut hepatotoksisite modelinde 25, 50 ve 100 mg/kg dozlarında i.p. olarak verilen propolis ekstraktının etkilerini incelemişlerdir. Bu deneysel modelde yüksek doz asetaminofen fare karaciğerinde toksisite meydana getirmiştir. Propolis asetaminofenin karaciğer GSH üzerindeki azaltıcı etkisini tersine çevirmiştir. Propolisin karaciğer GSH üzerindeki bu etkisi doza bağımlı olup, propolis dozları artırıldığında bu etki daha da artmıştır. Propolisin, asetaminofenin iyi bilinen antidotu olan NAC'ninkine benzer bazı etkiler gösterdiği sonucuna varılmıştır.

Seo ve ark. (218) propolisin asetaminofen tarafından indüklenen hepatotoksisite üzerindeki koruyucu etkilerini ve hepatoprotektif etki mekanizmasını araştırmışlardır. Sıçan hepatosit kültüründe, propolis (1, 10, 100, 200 ve 400 µg/ml, 24 saat) ön tedavisi, doza bağlı bir şekilde asetaminofenin sitotoksitesini önemli ölçüde azaltmış, farelerde ise propolis ile ön tedavi (10 ve 25 mg/kg, 7 gün) asetaminofen (400 mg/kg, ip) tarafından indüklenen hepatik nekrozun mortalitesini, insidansını ve şiddetini azaltmıştır. Yedi gün boyunca propolis uygulamasından sonra sıçanlarda, propolis (50 ve 100 mg/kg), CYP450 monooksijenazların (P4502E1) aktivitesini azalttığını, ancak GST ve fenolsülfotransferaz aktivitelerini önemli ölçüde artırdığını bildirmişlerdir. Öte yandan, propolis (10 ve 25 mg/kg) uygulanan farelerde, P4501A2, 2B1, 3A4 ve 2E1'in aktivitelerinin dramatik bir şekilde inhibe edildiğini ve fenolsülfotransferaz aktivitesini önemli ölçüde arttığını belirtmişlerdir. Bu sonuçlar, propolisin karaciğer hasarı üzerinde koruyucu bir etkiye sahip olduğunu ve etkisinin faz I enzimlerinin inhibisyonu ve faz II enzimlerinin indüksiyonu ile açıklanabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda antioksidan özellikteki propolisin GSH'nın oksidatif yolla tüketilmesine engel olarak doku düzeylerinde artışa yol açtığı, bu artışında özellikle propolisin önce uygulandığı grupta belirgin olduğu tespit edilmiştir ($p<0,001$). Bu da bize propolisin asetaminofen ile oluşan toksisitede literatür ile uyumlu olarak oksidatif strese etkili olduğunu düşündürmektedir. Propolis, asetaminofenin indüklediği GSH tüketimini geri çevirme özelliğinde olup, böylelikle de hücre ölümünü önlemekte ve ayrıca oksijen radikallerini temizlemektedir. Asetaminofenin neden olduğu karaciğer hasarının patogeneğinde CYP450 izoformlarının, tükenmiş GSH'un ve aşırı ROT'nin rol oynadığı bilinmektedir. Propolis çeşitli CYP450 izofomunu inhibe etmektedir. Bu nedenle propolis, CYP450'nin inhibisyonu yoluyla asetaminofen toksisitesini düşürerek antioksidan etkinlik göstermiş olabilir (179).

Yapılan bir çalışmada asetaminofen ile zehirlenen gruptaki plazma KAT aktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı olmasa da azaldığı, CAPE uygulanan grupta ise KAT aktivitesinin tedavi grupları içinde en belirgin artışı gösterdiği ancak bunun istatistiksel bir anlamı olmadığı bildirilmiştir (181).

Çetin ve ark. (219) sıçanlarda metotreksatın neden olduğu hepatotoksisite üzerine propolisin koruyucu etkisini araştırdıkları çalışmalarında metotreksat uygulanan grupta KAT ve GSH-Px aktivitelerinin belirgin olarak azaldığını rapor etmişlerdir. Tedavi edici olarak propolis eklenmesiyle metotreksat uygulanan sıçanların karaciğerindeki GSH-Px aktivitelerini anlamlı olarak arttırmıştır. KAT aktivitesinde görülen rakamsal iyileşme istatistiksel olarak anlamlı seviyelere ulaşamamıştır. Bu da propolisin metotreksatın neden olduğu oksidatif stresi azalttığını ve bu azalmanın büyük olasılıkla propolisin yapısında bulunan antioksidan bileşiklerden kaynaklandığını düşündürmüştür.

Yagmurca ve ark. (220)'nin yaptıkları bir çalışmada ratlarda doksorubisin ile nefrotoksisite oluşturularak CAPE'nin koruyucu etkisi araştırılmıştır. Ratlardan alınan plazma GSH-Px aktivitelerine bakıldığında doksorubisin ile zehirlenen ratlardaki değerler kontrol grubuna göre azalmış, daha sonra verilen CAPE tedavisi ile azalmış olan bu değerlerin arttığı görülmüştür.

Galal ve ark. (179) balın asetaminofen kaynaklı hepatotoksisiteye karşı potansiyel koruyucu etkisini araştırdıkları çalışmalarında ratlara 2 g/kg dozunda asetaminofen uygulaması yapmışlardır. Asetaminofen uygulaması karaciğerde LPO'da artışa, GSH depolarında ve GSH-Px aktivitesinde anlamlı derecede bir düşüşe sebep olmuştur. Bu çalışmada bal ile ön tedavi, LPO'nu düşürürken antioksidanları kontrol grubuna yaklaştırmıştır. Bu bulgular balın hepatoprotektif etkilerinin mekanizmasında önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir. Attia ve ark. (221) çalışmalarında farelere oral yolla klorpirifosun uygulamasının oksidatif stresi indükleyerek serbest radikaller oluşturmaya ve antioksidan veya oksijen serbest radikal süpürücü enzim sistemini değiştirmeye neden olduğunu bildirmişlerdir. Toksisite oluşturulan grupta testis dokusunda LPO seviyesi önemli ölçüde artmış, KAT, SOD, GSH-Px ve GST gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerinde ve GSH düzeyinde önemli derecede bir düşüş görülmüştür.

Propolis ekstraktının klorpirifos ile birlikte veya tek başına uygulanması LPO seviyesini normalize ederken KAT, SOD, GSH-Px ve GST aktivitelerini ve GSH içeriğini arttırmıştır. Propolis özütünün sıçan testislerinde klorpirifos kaynaklı oksidatif stresi önemli ölçüde azalttığı ve propolis özütü ile ön tedavinin koruyucu etkisinin antioksidan özelliklerinden kaynaklanabileceği sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızda kan ve karaciğer GSH düzeyleri, KAT, GST ve GSH-Px aktivitelerinin asetaminofen ile toksisite oluşturulan grupla karşılaştırıldığında propolis uygulanan gruplarda arttığı, MDA düzeylerinin ise azaldığı ve bu değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$, $p<0,001$). Kan ve karaciğer MDA düzeylerinin ise propolis uygulanan grupta azaldığı saptanmıştır. Bulgularımız daha önceki çalışmalar ile uyumlu olup, bu sonuçlar propolisin asetaminofen toksisitesinde antioksidan özelliğini desteklemektedir (154, 181, 203). Propolis+asetaminofen ile asetaminofen+propolis grupları kıyaslandığında asetaminofenden önce uygulanan propolisin asetaminofenden sonra uygulanan propolisten daha etkin bir özelliğe sahip olduğu gözlenmiştir. Özellikle asetaminofenden önce propolis uygulaması rat kan ve karaciğer dokularında antioksidan aktivitelerini arttırarak asetaminofenin neden olduğu toksisiteden karaciğeri koruyup aşırı miktarda serbest radikal birikimini önleyebileceği kanısına varılmıştır.

7. SONUÇ

Sonuç olarak asetaminofenin MDA düzeyini yükselttiği ve GSH, KAT, GST, GSH-Px gibi antioksidanların aktivitelerini düşürdüğü saptanmıştır. Bu bulgular karaciğer oksidatif hasarını ortaya koymaktadır. Propolis tedavisinde ise azalan antioksidanların yeniden arttığı, MDA düzeyinin ise düştüğü görülmüştür. Özellikle propolisin asetaminofenden önce uygulanması, asetaminofen kaynaklı oluşacak hasara karşı karaciğeri korumaktadır. Bu etkinin propolisin ve etken maddelerinin antioksidan özelliğinden kaynaklanmaktadır. Elde edilen veriler ışığında, propolisin karaciğer hasarına neden olan durumlarda karaciğer oksidatif hasarının önlenmesi veya azaltılması açısından tedavide kullanılabilecek bir alternatif olabileceğini akla getirmektedir. Bu da bundan sonraki çalışmalara yol göstermesi açısından önemli bir sonuç olarak değerlendirilebilir.

8. KAYNAKLAR

1. Morse HN, Ueber eine neue Darstellungsmethode der Acetylamidophenole. Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft, 1878; 11: 232-233.
2. Chan A, Hepp P. Das Antifebrin, ein neues Fiebermittel. Centralbl Klein Med 1886; 7: 561-564.
3. Bertolini A, Ferrari A, Ottani A, et al. Paracetamol: New Vistas of an Old Drug. CNS Drug Reviews 2006; 12: 250-275.
4. Von, Mering J. Beitrage zur Kenntniss der Antipyretica. Ter Monatsch 1893; 7: 577-587.
5. Brodie BB, Axelrod J, İnsandaki asetanilidin kaderi (PDF). J Pharmacol Exp Ther, 1948; 94 (1): 29-38.
6. Korolkovas, A, Essentials of medicinal chemistry. J Pharm Sci 1988; 66 (6): 910-910.
7. Chu CR, Izzo NJ, Papas NE, Fu FH. In vitro exposure to 0.5% bupivacaine is cytotoxic to bovine articular chondrocytes. Arthroscopy 2006; 22 (7): 693-699.
8. Graham GG, Scott KF. Mechanism of action of paracetamol. Am J Ther 2005; 12: 46-55.
9. Madenoğlu H, Bozoğlu H, Ratlarda oluşturulan parasetamol hepatotoksitesitesi üzerine flumazelinin terapötik etkinliğinin araştırılması. Tıpta Uzmanlık Tezi, Kayseri: Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2009.
10. Kabak H, Kullanılan bazı tıbbi ilaçların canlı aktif çamur biyokütlesi tarafından adsorplanma özelliğinin incelenmesi. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2008.

11. Hawton K, Ware C , Mistry H , et al. Why patients choose paracetamol for self poisoning and their knowledge of its dangers. *BMJ* 1995; 310(6973): 1- 164.
12. Kayaalp O. Akılcıl Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 13 Baskı. Ankara, Pelikan Yayıncılık, 2012: 868-883.
13. Smith SH. potential analgesic mechanisms of asetaminofen. *Pain Physician* 2009; 12 (1): 269-80.
14. Hinz B, Brune K. Cyclooxygenase-2, 10 years later. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300: 367-375.
15. Pairet M. Engelhardt G. Distinct isoforms of cyclooxygenase: possible physiological and therapeutic implications. *Fundamental and Clinical Pharmacology* 1996; 10(1): 1-15.
16. Józwiak-Bebenista M, Nowak JZ. Paracetamol: mechanism of action, applications and safety concern. *Acta Pol Pharm* 2014; 71 (1): 11-23.
17. Ghanem IC, María JP, Manautou JE, Mottino DA. Acetaminophen; from liver to brain: new insights into drug pharmacological action and toxicity. *Pharmacol Res* 2016; 109: 119-131.
18. Boutaud O, Aronoff DM , Richardson JH , Marnett LJ , Oates JA. Determinants of the cellular specificity of acetaminophen as an inhibitor of prostaglandin H(2) synthases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(10): 7130–7135.
19. Muth- Selbach US, Tegeder I, Brune K, Geisslinger G. Acetaminophen inhibits spinal prostaglandin E2 release after peripheral noxious stimulation. *Anesthesiology* 1999; 91 (1): 231- 9.
20. Bessems JG, Vermeulen NP. Paracetamol (acetaminophen)-induced toxicity: molecular and biochemical mechanisms, analogues and protective approaches. *Critical Reviews in Toxicology*, 2001; 31: 55-138.

- 21.** Josephy DP. The molecular toxicology of acetaminophen. Drug Metabolism Reviews, 2005; 37: 581-594.
- 22.** Jaramillo-Juárez F, Macías-Pérez JR, Martínez-Saldaña MC, et al. F-Actin Distribution Changes Provoked by Acetaminophen in the Proximal Tubule in Kidney of Adult Male Rat. Microscopy Research 2016; 4 (3):
- 23.** Tittarelli R, Pellegrini M, Scarpellini MG, et al. Hepatotoxicity of paracetamol and related fatalities. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2017; 21(1): 95- 101.
- 24.** Sirtori C, Kuhlmann J, Tillement JP, Vrhovac B. Clinical Pharmacology. Italy: Companies; 2000. 383, 862-871.
- 25.** Paracetamol (Acetaminophen). Erişim: ([http:// www. world of molecules. com/drugs/tylenol.htm](http://www.worldofmolecules.com/drugs/tylenol.htm)). Erişim tarihi: 01.05.2009.
- 26.** Hendrickson R, Bizovi KE. Chapter 34: Acetaminophen. LR Goldfrank, N Flomenbaum, Howland MA, Hoffman RS, Lewin NA, Nelson LS. Goldfrank's Toxicology Emergencies. 8 th. Ed., New York: McGraw-Hill Professional Publishing, 2006: 523-543.
- 27.** Lee WM, Acetaminophen and the U.S. Acute liver failure study group, lowering the risks of hepatic failure hepatology 2004; 40: 6- 9.
- 28.** Jaeschke H, Bajt ML. Intracellular signaling mechanisms of Acetaminophen induced liver cell death. Toxicological sciences 2006; 89: 31-41.
- 29.** Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, et al. Mechanisms of hepatotoxicity. Toxicological Sciences 2002;65 (2): 166-76.
- 30.** Brunton LL. Goodman& Gilman tedavinin farmakolojik temeli. Ö Süzer (Çeviren). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2009, Bölüm IV, 27, 671-716.
- 31.** Shinde A, Ganu J, Naik P. Effect of free radicals & Antioxidants on oxidative stress: A review. J Dental Allied Sciences 2012; 1(2), 63-66.

- 32.** Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. 3rd ed. New York: Oxford University Press. 10-121. 1999.
- 33.** Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007 ;39 (1): 44-84.
- 34.** Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact* 2006; 160 (1):1- 40.
- 35.** Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev* 2002; 82 (1): 47- 95.
- 36.** Karabulut H, Gülay MŞ. Serbest Radikaller. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi 2016; 4(1): 50-59.
- 37.** Miller DM, Buettner GR, Aust SD. Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions. *Free Radic Biol Med* 199; 08(1), 95-108.
- 38.** Valko M, Morris H, Cronin MTD. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 2005;12 (10): 1161-208.
- 39.** Cadenas E, Sies H. The lag phase. *Free Radic Res* 1998; 28 (6): 601-9.
- 40.** Kovacic P, RS Pozos RS, Somanathan R, Shangari N, O'Brien PJ. Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: focus on electron transfer, free radicals, and structure-activity relationships. *Curr Med Chem.* 2005;12 (22): 2601-23.
- 41.** Smith C, Mark's A, Lieberman M. Mark's. Temel Tıbbi Biyokimyası Klinik Yaklaşım Mine Eİ (çeviren) 2.baskı, Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri, 2007.
- 42.** Buonocore G, Groenendaal F. Anti-oxidant strategies. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 2007; 12: 287-295.

43. Kılınç K, Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. Hacettepe Tıp Dergisi 2002; 33:110-118.
44. Akkuş T. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya, Mimoza Yayınları, 1995: 1-80.
45. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. Lab Invest 1982; 47 (5): 412- 26.
46. Aust SD, Morehouse LA, Thomas CE. Role of metals in oxygen radical reactions. J Free Radic Biol Med 1985; 1 (1): 3-25.
47. Nordberg J, Arner ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. Free Radic Biol Med 2001; 31(11): 1287-312.
48. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chem 1995; 41(12): 1819-1828.
49. Halliwell B. Free radicals antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence. The Lancet 1994; 344: 721-724.
50. Malo C, Wilson JX. Glucose modulates vitamin C transport in adult human small intestinal brush border Membrane Vesicles. J Nutr 2000; 130: 63–69.
51. Aruoma OI. Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. J Am Oil Chemists Soc 1998; 75 (2): 199-212.
52. Atalık KE, Doğan N. Nitrik oksit ve fizyolojik etkileri. Genel Tıp Derg 1997; 7: 167-9.
53. Bruckdorfer, R. The basics about nitric oxide. Mol Aspects Med 2005; 26 (1-2): 3-31.
54. Powell DW. Immunophysiology of intestinal electrolyte transport. Page 591 in Handbook of Physiology 6. The Gastrointestinal System, IV. Intestinal Absorption and Secretion. Am Physiol Soc, Bethesda, MD, (1991).

55. Odabasoglu F. Antioksidan vitaminler. Pharma Şark 2006; 1 (1): 19–21.
56. Schmassmann A. Mechanisms of ülcer healing and effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs. Am. J. Med. 1998; 104: 43–51.
57. Dündar Y, Aslan R. Hekimlikte oksidatif stres ve antioksidanlar. Afyon, AKÜ 2000; 1-35.
58. Yapar K, Kart A, Karapehlivan M ve ark. Hepatoprotective effect of L-carnitine against acute acetaminophen toxicity in mice. Exp Toxicol Pathol 2007; 59 (2):121-8.
59. Hsu CC, Lin CC, Liao TS, Yin MC. Protective effect of s-allyl cysteine and spropyl cysteine on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. Food Chem Toxicol 2006; 44(3): 393- 7.
60. Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. APMIS 2007;115(2): 81-103.
61. Xu H, Lin L, Yuan WJ. Antiarrhythmic effect of endothelin-A receptor antagonist on acute ischemic arrhythmia in isolated rat heart. Acta Pharmacologica Sinica 2003; 24:37-44.
62. Marnett LJ. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. Toxicology 2002; 181-182: 219-22.
63. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. FASEB Journal 2003; 17:1195-214.
64. Stadtman ER. Role of oxidant species in aging. Curr Med Chem 2004; 11 (9): 1105-12.
65. Dündar Y, Aslan R. Hekimlikte oksidatif stres ve antioksidanlar. Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları 2000; 29: 1-35.

66. Çakatay U, Kayalı R. Protein oksidasyonunun klinik önemi. Cerrahpaşa Tıp Dergisi 2004; 35: 140-149.
67. De Zwart LL, Meerman JHN, Commendeur JNM, Vermeulen NPE, Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. Free Radic Biol Med 1999; 26 (1- 2): 202–26.
68. Davies KJ, Goldberg AL. Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes. J Biol. Chem 1987; 262 (17):8220-6.
69. Gutteridge J M. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chem 1995; 41(12): 1819-28.
70. Wu D, Cederbaum AI. Alcohol, oksidative stres and free radical damage. Alcohol Res Health 2003; 27 (4): 277-284.
71. Gueraud F, Atalay M, Bresgen N, et al. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. Free Radical Research 2010; 44 (10): 1098-124.
72. Gutteridge JM. Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. Clinical Chemistry 1995; 41(12): 1819-1828.
73. Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC. Estimation of product of lipid peroxidation (Malondyaldehyde) in biochemical systems. Analitical Biochemistry Anal Biochem 1966; 16 (2): 359-64.
74. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. Toxicology 2003; 189: 41-54
75. Knight JA, Pieper RK, McClellan S. Specificity of the Thiobarbituric Acid Reaction: Its Use in Studies of Lipid Peroxidation. Clinical Chemistry 1988; 34(12): 2433-2438.
76. Horton AA, Fairhurst S. Lipid peroxidation and mechanism of toxicity. Crit Rev Toxicol 1987; 18 (1): 27-79.

77. Sans RG, Chozas MG. The Thiobarbituric Acid (TBA) Reaction in Foods: A Review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1998; 38(4): 315-350.
78. Şener G, Yeğen Berrak Ç. İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Klinik Gelişim Dergisi* 2009; 22: 5-13.
79. Sen S, Chakraborty R. The Role of Antioxidants in Human Health. American Chemical Society, Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention and Therapy Chapter 2011; 1: 1-37.
80. Yavaşer R. Doğal ve Sentetik Antioksidan Bileşiklerin Antioksidan kapasitelerinin Karşılaştırılması. Fen Bilimleri Enstitüsü. Kimya Anabilim Dalı. Yüksek Lisans tezi, Aydın: Adnan Menderes Üniversitesi, 2011.
81. Memişoğulları R. Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. *Dicle Tıp Fakültesi Dergisi* 2005; 3: 30-39.
82. Willcox JK, Ash SL, Catignani GL. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2004; 44(4): 275-295.
83. Mao GD, Thomas PD, Lopaschuk GD, Poznansky MJ. Superoxide dismutase (SOD)-catalase conjugates. Role of hydrogen peroxide and the Fenton reaction in SOD toxicity. *The J Biol Chem* 1993; 268 (1): 416-20.
84. Zhang L, Maiorino M, Roveri A, Ursini F. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: specific activity in tissues of rats of different age and comparison with other glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta* 1989;1006: 140–143.
85. Yıldırım, H. Süleymanşah konaklama tesislerinde Leishmaniazis (şark çıbanı) olan çocuk hastalarda adenoazin deaminaz (ADA) ve oksidatif stres parametrelerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Şanlıurfa: Harran Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2016.
86. Dickinson DA, Forman HJ. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical Pharmacology* 2002; 64: 1019-1026.

- 87.** Kidd, P. M. Glutathione: Systemic Protectant Against Oxidative and Free Radical Damage. *Alternative Medicine Review* 1997;2(3): 155-176.
- 88.** Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* 2005; 45: 51- 88.
- 89.** Çağlar MK, Bilgin R. Glutatyon-s-transferaz enziminin epiklorohidrin ara kolu üzerinden magnetik demir nanopartiküllere kovalent immobilizasyonu ve karakterizasyonu. *Çukurova Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi* Yıl 2018; Cilt: 36-5.
- 90.** Herbette S, Roeckel-Drevet P Drevet JR. Seleno-independent glutathione peroxidases. *FEBS J* 2007; 274 (9): 2163-80.
- 91.** Sen S, Chakraborty R. The Role of Antioxidants in Human Health. *American Chemical Society, Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention and Therapy* 2011; 1083: 1-37.
- 92.** Fırat S. Kobaylarda Radyasyonla Oluşan Akciğer Hasarında Doku Glutatyon, Glutatyon Peroksidaz, Glutatyon-S-Transferaz Düzeyleri ve N-Asetil Sistein'in Bu Sistem Üzerindeki Etkisi. *Uzm. Tezi, Ankara: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya A.B.D, 1997.*
- 93.** Davies, KJA. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life* 2000; 50 (4): 279-89.
- 94.** Scialli AR, Ang R, Breitmeyer J, Kraliyet MA. Childhood asthma and use during pregnancy of acetaminophen. A critical review. *Reprod Toxicol* 2010; 30 (4): 508- 19.
- 95.** Horton, AA, Fairhurst S. Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity. *Crit Rev Toxicol* 1987;18 (1): 27- 79.
- 96.** Jaeschke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts. *Gastroentel Hepatol* 2011; 26 (1): 173-179.

97. Somani R, Pawar S, Nikam S, Shiroadkar P, Kadam V. Microwave Assisted Synthesis and Antimicrobial Activity of Some Schiff's Bases. *International Journal of ChemTech Research* 2010;2 (2): 860-864.
98. Bond GR, Wiegand CB, Hite LK. The difficulty of risk assessment for hepatic injury associated with supra-therapeutic acetaminophen use. *Vet Hum Toxicol* 2003; 45 (3): 150–153.
99. Sumanth M, Rana AC. In vivo antioxidant activity of hydroalcoholic extract of *Taraxacum officinale* roots in rats. *Indian Journal of Pharmacology* 2006; 38: 54- 55.
100. Mokhtar IY, Sahar AM, Omar B, Marwa IEG, Laila AA. Potential protective effects of quercetin and curcumin on paracetamol-induced histological changes, oxidative stress, impaired liver and kidney function and haematotoxicity in rat 2010;19(12), 1962-1967.
101. Naguib YM, Azmy RM, Samaka RM, Salem MF. *Pleurotus ostreatus* opposes mitochondrial dysfunction and oxidative stress in acetaminophen induced hepato-renal injury. *BMC Complement Altern Med* 2014; 15; 14:494
102. Yousef MI, Omar SAM, El-Guandi MI, Abdelmegid LA. Potential protective effects of quercetin and curcumin on paracetamol-induced histological changes, oxidative stress, impaired liver and kidney functions and haematotoxicity in rat. *Food Chem. Toxicol* 2010; 48: 3246-3261
103. Toret VC, Sato HH, Pastore GM, Park YK. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013; 2013: 697390.
104. Bankova VS, de Castro SL and Marcucci MC, Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 2000; 31 (1), 3- 15.
105. Meyer W. Propolis bees and their activities. *Bee World* 1956; 37:25–36.

- 106.** Rufatto LC, Santos DAS, Marinho F, et al. Red propolis: chemical composition and pharmacological activity. *Asian Pac J Trop Biomed* 2017; 7:591–598.
- 107.** Zabaïou N, Fouache A, Trousson A, et al. Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. *Chem Phys Lipids* 2017; 207 (Pt B): 214-222.
- 108.** Salatino A, Teixeira EW, Negri G, Message D. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *Evid Based Complement Alternat Med* 2005; 2(1): 33-38
- 109.** Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol* 1998; 36:347-363.
- 110.** Sforcin JM. Biological properties and therapeutic applications of propolis. *Phytother Res* 2016; 30 (6): 894-905.
- 111.** De Freitas MCD, de Miranda MB, de Oliveira DT, et al. Biological activities of red propolis: A review. *Recent Pat. Endocr. Metab. Immun. Drug Discov* 2017; 11 (1) :3- 12.
- 112.** Bankova, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology* 2005; 100 (1-2): 114-7.
- 113.** Silici S, Kutluca S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *J Ethnopharmacol* 2005; 99: 69- 73.
- 114.** Banskota AH, Nagaoka T, Sumioka LY, et al. Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. *J Ethnopharmacol* 2002; 80 (1): 67- 73.
- 115.** Ghisalberti, E. Propolis: A Review. *Bee World* 1979; 60: 59- 84.

- 116.** Woo KS, Park JS. Eucalyptus propolis beverages with their composition and effects. In Mizrahi A, Lensky Y. (Eds), Bee Products Properties, Applications and Apitherapy. Plenum Press, New York 1997; 125-128.
- 117.** Marcucci MC. Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity, *Apidologie*; 1995; 26 (2): 83- 99.
- 118.** Walker P, Crane E. Constituents of propolis, *Apidologie*; 1987; 18: 327–34.
- 119.** Koru O, Toksoy F, Acikel CH, et al. In vitro antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens. *Anaerobe* 2007;13(3- 4): 140-45.
- 120.** Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J of Nutr Biochem* 2002; 13: 572-584.
- 121.** Jasprica I, Mornar A, Debeljak Z, et al. In vivo study of propolis supplementation effects on antioxidative status and red blood cells. *Journal of Ethnopharmacology* 2007; 110: 548- 554.
- 122.** Hepşen İF, Tilgen F, Er H. Propolis: Tıbbi özellikleri ve oftalmolojik kullanımı. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi* 1996; 3: 386-391.
- 123.** Isla MI, Nieva Moreno MI, Sampietro AR, Vattuone MA. Antioxidant activity of argentine propolis extracts. *J of Ethnopharm.* 2001; 76: 165-170.
- 124.** Mohammadzadeh S, Sharriatpanahi M, Hamed M, et al. Antioxidant power of iranian propolis extract. *Food Chem* 2007; 103: 729-733.
- 125.** Zabaïou N, Fouache A, Trousson A. Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product *Chem Phys Lipids*. 2017; 207 (Pt B): 214-222.

- 126.** Kartal M, Yıldız S, Kaya S, Kurucu S, Topçu G. Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. *J Ethnopharmacol* 2003; 86: 69-73.
- 127.** Koç AN, Silici S, Ayangil D, Ferahbas A, Cankaya S. Comparison of in vitro activities of antifungal drugs and ethanolic extract of propolis against *Trichophyton* and *T. mentagrophytes* by using a microdilution assay. *Mycoses* 2005; 48: 205-210.
- 128.** Orhan H, Marol S, Hepsen IF, Sahin G. Effects of some probable antioxidants on selenite induced cataract formation and oxidative stress related parameters in rats. *Toxicology* 1999; 139: 219-232.
- 129.** Ozkul Y, Silici S, Eroglu E. The anticarcinogenic effect of propolis in human lymphocytes culture. *Phytomedicine* 2005; 12: 742-747.
- 130.** Yalçın CÖ. Türk Propolis Ekstraktlarının İyonizan (Γ-Gama) Radyasyonla Uyarılmış İnsan Fibroblast Hücre Serileri Üzerine Olası Radyoprotektif Etkisinin Değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Trabzon: Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2012.
- 131.** Volpert R, Elstner E. Biochemical activities of propolis extracts, II. Photodynamic Activities, *Z. Naturforsch* 1993; 48: 858-862.
- 132.** Mirzoeva OK, Calder PC. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 1996; 55(6): 441-449.
- 133.** Harish Z, Rubinstein A, Golodner M, et al. Suppression of HIV-1 replication by propolis and its immunoregulatory effect. *Drugs Exp. Clin. Res* 1997; 23: 89- 96.
- 134.** Jin M, Iwamoto T, Yamada K, et al. Effects of chondroitin sulfate and its oligosaccharides on toll-like receptor mediated IL-6 secretion by macrophagelike J774.1 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2011; 75(7): 1283-9.

- 135.** Sforcin JM, Propolis and the immune system: a review, *J Ethnopharmacol* 2007; 113 (1): 1-14.
- 136.** Türkez H, Yousef MI, Geyikoglu F. Propolis prevents aluminum-induced genetic and hepatic damages in rat liver. *Food Chem Toxicol* 2010; 48 (10): 2741-6.
- 137.** Koc AN, Silici S. Comparative study of in vitro methods used to analyse the antifungal activity of propolis against *Trichophyton rubrum* and *T. Mentagrophytes*. *Ann Microbiol* 2008; 58: 543- 47.
- 138.** Gabbianelli R, Falcioni G. Antioxidative and gastroprotective activities of anti-inflammatory formulations derived from chestnut honey in rats. *Nutrition Research* 2006; 26 (3): 130–137.
- 139.** Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961; 7: 88-95
- 140.** Aebi H. Catalase. In vitro. *Methods in Enzymology* 1984; 105: 121-126.
- 141.** Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 1974; 249(22): 7130-7139.
- 142.** Beutler E. Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods. Grune and Stratton, New York: 1975.
- 143.** Frankel SS, Reitma S, Sonnenwirth AC. Grandwoh's clinical laboratory methods and diagnosis. C. A. Reading and L. E. Glynn (Editors). 7th edition. St Louis, USA 1970: 403-404.
- 144.** Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.

- 145.** Trefts E, Gannon M, Wasserman DH. The liver. *Curr Biol* 2017; 27(21): 1147-1151.
- 146.** Hamid A, Lee LS, Karim SR, Jufri NF. Hepatoprotective effects of zerumbone against paracetamol-induced acute hepatotoxicity in rats. *Malays J Med Sci* 2018; 25 (2): 64-71.
- 147.** Emet M. Asetaminofen (Parasetamol) Zehirlenmesi. *Türkiye Klin J EmergMed* 2016; 2: 51-57
- 148.** Sabina EP, Pragasa SJ, Kumar S, Rasool M. 6- gingerol, an active ingredient of ginger, protects acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao* 2011; 9(11): 1264-9.
- 149.** He YY, Zhang BX, Jia FL. Protective effects of 2,4-dihydroxybenzophenone against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *World J Gastroenterol* 2011; 17 (21): 2663- 2666.
- 150.** Anbarasu C, Raj Kapoor B, Kalpana J. Protective effect of *Pisonia aculeata* on paracetamol induced hepatotoxicity in rats, *Test Journal* 2011; 1 (3): 167–172.
- 151.** Doudar SM, Boor PJ, Ahmed AE. Potentiation of the hepatotoxic effect of acetaminophen by prior administration of salicylate. *J Pharmacol Exp Ther* 1985; 233 (1): 242- 8.
- 152.** Corcoran GB, Racz WJ, Smith CV, Michell JR. Effects of N- acetylcysteine on acetaminophen covalent binding and hepatic necrosis in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 1985; 232: 864-72
- 153.** Aktaş Şenocak E, Apaydın Yıldırım B. Ratlarda parasetamol ile oluşturulan hepatotoksisite üzerine taraxacum officinale etanol ekstraktının etkisi. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2017; 6 (1), 11-18.
- 154.** Kamiş N, Karabağ F. Parasetamol indüklü hepatotoksisite modelinde kafeik asit fenil ester’ in inflamasyon ve oksidatif stres üzerine etkisinin

araştırılması. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi 2019;14 (3), 290-298.

- 155.** Akther N, Shawl AS, Sultana S, Chandan BK, Akhter M. Hepatoprotective activity of Marrubium vulgare against paracetamol induced toxicity. J Pharm Res 2013; 7: 565-570.
- 156.** Albayrak A, 2013: Serotonin-7 reseptörlerinin parasetamol ile indüklenen deneysel karaciğer toksisitesindeki yeri ve önemi. Türk Farmakoloji Derneği Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası Bilimsel Etkileşme Seminerleri Programı, Bursa.
- 157.** Karcioğlu SS, Palabiyik SS, Bayir Y, Karakus ve ark. The Role of raas Inhibition by aliskiren on paracetamol-Induced hepatotoxicity model in rats. J Cell Biochem 2016; 117(3): 638- 646.
- 158.** Uzkeser M, Karakus E, Albayrak A ve ark. Protective effect of Panax ginseng against N-acetyl-paminophenol-induced hepatotoxicity in rats. African Journal of Pharmacy and Pharmacology Vol 2012; 6(36), 2634-2642.
- 159.** Jaeschke H, Knight TR, Bajt ML. The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity. Toxicol Lett 2003; 144 (3): 279-288.
- 160.** James LP, Mayeux PR, Hinson JA. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. Drug Metabolism and Disposition, 2003, 31: 1499-1506.
- 161.** Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. Clin Chem 1997; 43: 1209- 1214.
- 162.** Dewi NFO. Efek Antioksidan Ekstrak Etanol Buah Kurma Sakkari (Phoenix Dactylifera) Pada Tikus Jantan Yang Diusduksi Parasetamol. Akultas Farmasi Universitas Muhzmmzdiyah Surakarta, 2015.

- 163.** Indahsari NK, masfufatun M, DR. ER. Potensi Ekstrak Daun Kelor (*Moringa Oleifera*) sebagai Hepatoprotektor pada Tikus Putih (*Rattus novergicus*) yang Diinduksi Parasetamol Dosis toksik. *Jurnal Ilmiah Kedokteran* 2016; 5: 58-66.
- 164.** Kurniawan J, Bangsawan PI, Andrian. Uji Efek Hepatoprotektor Ekstrak Etanol Daun Lidah Buaya (*Aloe Vera L.*) Terhadap Kadar Malondialdehid Plasma Tikus Jantan Galur Wistar Yang Diinduksi Parasetamol, *Jurnal Mahasiswa PSPD FK Universitas Tanjungpura*, 2014.
- 165.** Gul H, Uysal B, Cakir E, et al. The protective effects of ozone therapy in a rat model of acetaminophen-induced liver injury. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2012; 34 (1): 81-6.
- 166.** Zhao YL, Zhou GD, Yang HB, Wang JB, Shan LM, Li RS, Xiao XH. Rhein protects against acetaminophen-induced hepatic and renal toxicity. *Food Chem. Toxicol* 2011; 49 (8): 1705-1710.
- 167.** Kuvandik G, Duru M, Nacar A, Yonden, et al. Effects of erdosteine on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Toxicol Pathol* 2008; 36 (5): 714-719.
- 168.** Çalışkan D. Ratlarda Parasetamole Bağlı Akut Karaciğer Toksisitesinde Nar Suyunun Koruyucu Etkisi, Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Isparta, 1-18. 2014.
- 169.** El-Maddawy ZK, El-Sayed YS. Comparative analysis of the protective effects of curcumin and N-acetyl cysteine against paracetamol-induced hepatic, renal, and testicular toxicity in Wistar rats. *Environ Sci Pollut Res Int* 2018;25 (4): 3468-3479.
- 170.** Ekinci M. Bronsiyal Astımlı Çocuklarda Glutatyon-S-Transferaz Gen Polimorfizminin Bir Risk Faktörü Olarak Belirlenmesi. Uzmanlık Tezi, İstanbul: Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2006.

- 171.** Farombi EO, Nwankwo JO, Emerole GO. The effect of modulation of glutathione levels on markers for aflatoxin B1-induced cell damage. *Afr J Med Sci* 2005; 34(1): 37-43.
- 172.** Yılmaz S, Yılmaz E. Effects of melatonin and Vitamin E on oxidative–antioxidative status in rats exposed to irradiation *Toxicology* 2006; 222(1-2): 1-7.
- 173.** Yılmaz S, Atessahin A, Sahna E, Songul Ozer, Karahan İ, Özer S. Protective effect of lycopene on adriamycin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity *Toxicology* 2006; 218 (2-3): 164-71.
- 174.** Manda K, Bhatia A. Role of β -carotene against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Nutrition Research* 2003; 23: 1097-1103
- 175.** Parmar SR, Vashrambhai PH, Kalia K. Hepatoprotective activity of some plants extract against paracetamol induced hepatotoxicity in rats. *Journal of Herbal Medicine and Toxicology* 2010; 4, 101- 106.
- 176.** Abdulhamid Z, Budin SB, Wen Jie N, et al. Nephroprotective effects of zingiber zerumbet smith ethyl acetate extract against paracetamol-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *J Zhejiang Univ Sci B* 2012;13 (3): 176-185.
- 177.** Şener G, Şehirli AÖ, Ayanoglu-Dülger G. Protective effects of melatonin, vitamin E and *N*-acetylcysteine against acetaminophen toxicity in mice: a comparative study. *J Pineal Res* 2003-35(1):61-8.
- 178.** Terneus MV, Brown JM, Carpenter AB, Comparison of S-adenosyl- L-methionine (S-AMe) and N-acetylcysteine (NAC) protective effects on hepatic damage when administered after acetaminophen overdose. *Toxicology*. 2008; 244: 25–34.
- 179.** Galal RM, Zaki HF, El-Nasr MM, Agha AM. Potential protective effect of honey against paracetamol-induced hepatotoxicity. *Arc Iran Med*, 2012;15 (11): 674-680.

- 180.** Pauli-Magnus C, Stieger B, Meier Y, Kullak-Ublick GA, Meier PJ. Enterohepatic transport of bile salts and genetics of cholestasis. *J Hepatol* 2005; 43, 342-357.
- 181.** Küçük, E. Parasetamol Toksisitesi ile Karaciğer Hasarı Oluşturulan Ratlarda Kafeik Asit Fenetil Ester'in Tedavi Edici Etkisi, Tıpta Uzmanlık Tezi, Afyon 2009.
- 182.** Guengerich FP, Johnson WW, Ueng YF, Yamazaki H, Shimada T. Involvement of cytochrome p450, glutathione-S-transferase and epoxide hydrolase in the metabolism of aflatoxin B1 and relevance to risk of human liver cancer. *Environ Health Perspect* 1996; 104 (3): 557-562.
- 183.** Lotlikar PD, Jhee EC, Insetta SM, Clearfield MS. Modulation of microsome-mediated aflatoxin B1 binding to exogenous and endogenous DNA by cytosolic glutathione-S-transferases in rat and hamster livers. *Carcinogenesis* 1984; 5: 269-76.
- 184.** Ferah, I. İnflksimabın Parasetamolle İndüklenen Akut Karaciğer Toksisitesi Üzerine Etkilerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 7-72, 2012.
- 185.** Ozkaya O, Genc G, Bek K, Sullu Y. A case of acetaminophen (paracetamol) causing renal failure without liver damage in a child and review of literature. *Ren Fail* 2010;32: 1125-1127.
- 186.** Baali N, Mezrag A, Bouheroum M. Anti-inflammatory and antioxidant effects of lotus corniculatus on paracetamol-induced hepatitis in rats. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem* 2020;19(2):128-139.
- 187.** Raj Kapoor B, Venugopal Y, Anbu J, et al. Protective effect of phyllanthus polyphyllus on acetaminophen induced hepatotoxicity in rats. *Pak J Pharm Sci* 2008; 21 (1): 57-62.
- 188.** Hasanein P, Sharifi M. Effects of rosmarinic acid on acetaminophen-induced hepatotoxicity in male Wistar rats. *Pharm Biol* 2017; 55 (1): 1809-1816.

- 189.** Mark R.S, O'brien PJ. Fully-Automated Spectrophotometric Method for Measurement of Antioxidant Activity of Catalase. Clin Biochem 2000; 33: 525–534.
- 190.** Scott MD, Lubin BH, Zuo L. Kuypers FA. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. J Lab Clin Med 1991; 118: 7–16.
- 191.** Wu CT, Deng JS, Huang WC. Salvianolic Acid C against Acetaminophen-Induced Acute Liver Injury by Attenuating Inflammation, Oxidative Stress, and Apoptosis through Inhibition of the Keap1/Nrf2/HO-1 Signaling. Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2019; 1-13.
- 192.** Akgün E. Ratlarda Deneysel Parasetamol Toksikasyonunda Folik Asit'in Koruyucu Etkilerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Aydın: Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2019.
- 193.** Yan SL, Wu ST, Yin MC, Chen HT, Chen HC. Protective effects from carnosine and histidine on acetaminophen-induced liver injury. Journ of Food Science 2009; 74, 259-260.
- 194.** Sundari K, Karthik D, Ilavenil S, et al. Hepatoprotective and proteomic mechanism of Sphaeranthus indicus in paracetamol induced hepatotoxicity in wistar rats. Food Bioscience, 2013;1: 57-65.
- 195.** El-Boshy M, BaSalamah MA, Ahmad J, et al. Vitamin D protects against oxidative stress, inflammation and hepatorenal damage induced by acute paracetamol toxicity in rat. Free Radical Biology and Medicine 2019; 141: 310-321.
- 196.** Lima ES, Roland IA, Maroja MF. Vitamin a and lipid peroxidation in patients with different forms of leprosy. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2007; 49: 211-214.

- 197.** Nwobodo EI, Nwosu DC, Ogbodo SO, et al. Effects of *Azadirachta indica* leaf aqueous extract on the antioxidant enzymes in paracetamol induced hepatotoxicity in Wistar rats. 2018 *Int. J. Biol. Chem. Sci*, 12(1), 1-10.
- 198.** Gokalp O, Uz E, Cicek E, Ameliorating role of Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) against isoniazid-induced oxidative damage in red blood cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2006; 290: 55-59.
- 199.** Azarmehr N, Afshar P, Moradi M, et al. Hepatoprotective and antioxidant activity of watercress extract on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Heliyon* 2019; 5 (7): 20-72.
- 200.** Yilmaz S, Kandemir FM, Kaya E, Ozkaraca M. Chemoprotective effects of propolis on aflatoxin b1-induced hepatotoxicity in rats: Oxidative damage and hepatotoxicity by modulating TP53, oxidative stress. *Current Proteomics* 2020;17(3): 191-199.
- 201.** Kaya E, Yılmaz S, Ceribasi S. Protective role of propolis on low and high dose furan-induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. *J Vet Res* 2019; 63(3): 423.
- 202.** El Menyiy N, Al-Waili N, El Ghouizi A, Al-Waili, Lyoussi B. Evaluation of antiproteinuric and hepato-renal protective activities of propolis in paracetamol toxicity in rats. *Nutr Res Pract* 2018;12 (6): 535-540.
- 203.** Bhadauria M, Nirala SK. Reversal of acetaminophen induced subchronic hepatorenal injury by propolis extract in rats. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2009; 27 (1):17-25.
- 204.** Basim E, Basim H, ve Özcan M. Antibacterial Activities of Turkish Pollen and Propolis Extracts Against Plant Bacterial Pathogens *J Food Eng* 2006; 77: 992–996.
- 205.** Kanbur M, Eraslan G, Beyaz L, et al. The effects of royal jelly on liver damage induced by paracetamol in mice, *Exp Toxicol Pathol* 2009; 61(2): 123-13.

- 206.** Korish AA, Arafa MM. Propolis derivatives inhibit the systemic inflammatory response and protect hepatic and neuronal cells in acute septic shock. *Braz J Infect Dis* 2011; 15: 332-338.
- 207.** Bhadauria M, Nirala SK, Shukla S. Propolis protects CYP 2E1 enzymatic activity and oxidative stress induced by carbon tetrachloride. *Mol cell Biochem* 2007; 302: 215-224.
- 208.** Kolankaya D, Selmanoglu G, Sorkun K, et al. Protective effects of Turkish propolis on alcohol-induced serum lipid changes and liver injury in male rats. *Food Chemistry* 2002; 78: 213-17.
- 209.** Kismet K, Sabuncuoglu MZ, Kilicoglu SS. et al. Effect of propolis on oxidative stress and histomorphology of liver tissue in experimental obstructive jaundice. *Eur Surg Res* 2008; 41: 231-37.
- 210.** Benguedouar L, Boussenane HN, Wided K. et al. Efficiency of propolis extract against mitochondrial stress induced by antineoplastic agents (doxorubicin and vinblastin) in rats. *Indian J Exp Biol* 2008; 46: 112-19.
- 211.** Öztürk B. Farede Deneysel Depresyon Modelinde Propolisin Antidepresan Etkinliğinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Kayseri, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2015.
- 212.** Kaya E, Yılmaz S, Çolakoğlu N. Ratlarda siklofosfamidin sebep olduğu kardiyotoksitede propolisin koruyucu rolü. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2018; 66 (1), 13-20.
- 213.** Altay Z. Siklofosfamid uygulanan ratlarda nefrotoksisite üzerine propolisin etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Elazığ; Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2016.
- 214.** Zhao JQ, Wen YF, Bhadauria M, et al. Protective effects of propolis on inorganic mercury induced oxidative stress in mice. *Indian J Exp Biol* 2009; 47: 264-269.

- 215.** Eraslan G, Kanbur M, Silici S. Effect of carbaryl on some biochemical changes in rats: The ameliorative effect of bee pollen. *Food Chem Toxicol* 2009; 47: 869-891.
- 216.** Ashwag AA, Hana MG, Hesham A. Caffeic acid phenethyl ester protects against tamoxifen-induced hepatotoxicity in rats. *Food Chem Toxicol* 2009; 47: 1689–1695.
- 217.** Gonzalez R, Ramirez D, Rodriguez S, et al. Hepatoprotective effects of propolis extract on paracetamol-induced liver damage in mice. *Phytotherapy Research* 1994; 8 (4) 229-232.
- 218.** Seo KW, Park M, Song YJ, Kim SJ, Yon KR. The protective effects of Propolis on hepatic injury and its mechanism. *Phytother Res* 2003; 17 (3): 250-253.
- 219.** Çetin A, Kaynar L, Eser B, et al. Beneficial effects of propolis on methotrexate-induced liver injury in rats. *Acta Oncologica Turcica*, 2011; 44 (1): 18-23.
- 220.** Yagmurca M, Erdogan H, Iraz M. Caffeic acid phenethyl ester as a protective agent against doxorubicin nephrotoxicity in rats. *Clin Chim Acta*. 2004; 348 (1- 2): 27-34.
- 221.** Attia ve ark. Antioxidant role of propolis extract against oxidative damage of testicular tissue induced by insecticide chlorpyrifos in rats, *Pesticide Biochemistry and Physiology* 2012; 103 (2): 87-93.