

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**ALKOLE BAĞLI KARACİĞER HASARININ
ÖNLENMESİNDE SARIMSAK, VİTAMİN E VE
MELATONİN ETKİLERİNİN KIYASLANMASI**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Serpil FIRAT
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. İsmail TEMEL**

MALATYA – 2005

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**ALKOLE BAĞLI KARACİĞER HASARININ
ÖNLENMESİNDE SARIMSAK, VİTAMİN E VE
MELATONİN ETKİLERİNİN KIYASLANMASI**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Serpil FIRAT
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. İsmail TEMEL**

**Bu tez, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından
2004-73 proje numarası ile desteklenmiştir.**

TEŐEKKÖR

Tez çalıŐmalarım boyunca bana yardımlarını esirgemeyen tez danıŐmanım Sayın Doç. Dr. İsmail TEMEL'e, tezimin laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan sevgili arkadaşım Biyolog Őule GÖRSOY'a, numunelerin alınmasında yardımlarını esirgemeyen Dr. Mustafa İraz'a ve biyokimya uzmanlık eğitimimi tamamlamamda emeği geçen, başta anabilim dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Engin M. GÖZÖKARA olmak üzere tüm anabilim dalımız hocalarına, eğitimim süresi boyunca benden samimiyetlerini esirgemeyen tüm çalışma arkadaşlarıma, sevgi ve desteğini asla esirgemeyen aileme sonsuz sevgi ve Őükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	IV
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Karaciğerin Yapısı ve Fonksiyonları	3
2.1.1 Karaciğerin Makroskopik Anatomisi	3
2.1.2 Karaciğerin Mikroskopik Anatomisi.....	3
2.1.3. Karaciğerin Sitolojisi.....	5
2.1.3.1. Hepatositler	5
2.1.3.2. Endotel Hücreleri.....	6
2.1.3.3. Kupffer Hücreleri	6
2.1.3.4. Stellat Hücreler.....	7
2.1.3.5. Safra Kanalı Epitel Hücreleri	7
2.2. Karaciğerin Biyokimyasal Fonksiyonları.....	7
2.2.1. Karbohidrat Metabolizması	7
2.2.2. Lipid Metabolizması.....	8
2.2.3. Safra Tuzları Sentezi ve Salınımı.....	8
2.2.4. Depolama Fonksiyonu.....	9
2.2.5. Sentez Fonksiyonu	9
2.2.6. Detoksifikasyon Fonksiyonu	9
2.3. Alkol.....	9
2.3.1. Alkol Metabolizması	10
2.3.2. Alkolik Karaciğer Hastalığı (ALD) ve Oluşum Mekanizması	11
2.3.3. Alkolik Karaciğer Hastalığı Patolojisi	12
2.3.3.1. Yağlı Karaciğer	12
2.3.3.2. Alkolik Hepatit.....	12
2.3.3.3. Alkolik Siroz	13
2.4. Serbest Radikaller Ve Antioksidan Sistem	14
2.4.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROS).....	14
2.4.2. Reaktif Nitrojen Türleri	15
2.4.3. Süperoksit Radikali (O_2^-)	15
2.4.4. Hidrojen Peroksit (H_2O_2).....	15
2.4.5. Hidroksil Radikali (OH^{\cdot}).....	16
2.4.6. Serbest Radikallerin Etkileri	17
2.4.6.1. Membran Lipidlerine Etkisi (Lipid Peroksidasyonu).....	17
2.4.6.2. Proteinlere Etkisi	18
2.4.6.3. Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkisi	19
2.4.6.4. Karbohidratlara Etkisi.....	19
2.4.7. Antioksidan Savunma Sistemleri	19
2.4.7.1. Endojen Antioksidanlar	20
2.4.7.2. Ekzojen Antioksidanlar (İlaçlar)	20
2.4.8. Nitrik Oksid (NO)	21
2.4.9. NO Sentezi.....	22
2.4.10. Süperoksit Dismutaz (SOD, süperoksit oksidoredüktaz: EC 1.15.1.1).....	23
2.4.11. Katalaz (CAT, H_2O_2 oksidoredüktaz: EC 1. 11. 1. 6)	24

2.4.12. Glutatyon Peroksidaz (GPx, Glutatyon H ₂ O ₂ oksidoredüktaz: EC 1.11.1.9).....	25
2.4.13. Malondialdehid (MDA).....	26
2.5. E Vitamini	27
2.5.1 Vitamin E'nin Metabolizması.....	28
2.5.2 Vitamin E'nin Biyokimyasal Etkisi	28
2.5.3. Vitamin E'nin Antioksidan Etki Mekanizması.....	28
2.6. Sarımsak	30
2.6.1. Sarmısağın İçeriği ve Sarımsak Preperatları.....	30
2.6.2. Sarmısağın Genel Etkileri.....	32
2.6.3. Sarmısağın Antioksidan Etkisi.....	33
2.7. Melatonin.....	34
2.7.1. Melatoninin Antioksidan Etkisi	35
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	37
3.1. Sıçanların temini ve deney grupları	37
3.2. Kan ve dokuların elde edilmesi ve analizlere hazırlanması	37
3.3. Doku Homojenizasyon Tamponları	38
3.4. Biyokimyasal Analizler.....	38
3.4.1. Nitrik Oksit (NO) Tayini	38
3.4.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini.....	42
3.4.3. Katalaz (CAT) Aktivite Tayini	44
3.4.4. TBARS Tayini	45
3.4.5. Redükte Glutatyon Tayini.....	46
3.4.6. GPx Aktivite Tayini	47
3.4.7. Protein Tayini.....	49
3.4.8. ALP, AST ve ALT Tayinleri	49
3.5. İstatistiksel Analizler.....	49
4. BULGULAR	50
4.1 Serum ALP, ALT ve AST düzeyleri.....	50
4.2. Serum TBARS düzeyleri.....	50
4.3. Serum NO düzeyleri.....	51
4.4. Karaciğer TBARS düzeyleri.....	51
4.5. Karaciğer NO düzeyleri.....	52
4.6. Karaciğer SOD Aktivite Düzeyleri.....	52
4.7. Karaciğer CAT Aktivite Düzeyleri.....	53
4.8. Karaciğer GPx Aktivite Düzeyleri.....	53
4.9. Karaciğer GSH düzeyleri	54
5. TARTIŞMA	57
6. ÖZET	63
7. SUMMARY.....	64
KAYNAKLAR.....	65

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADH	: Alkol dehidrogenaz
ALDH	: Aldehit dehidrogenaz
ALD	: Alkolik karaciğer hastalığı
BHT	: Bütilenmiş hidroksitoluen
BHA	: Bütilenmiş hidroksianizol
CAT	: Katalaz
eNOS	: Yapısal nitrik oksit sentaz
DAS	: Diallyl sülfid
DADS	: Diallyl disülfid
DATS	: Diallyl trisülfid
eNOS	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
FAD	: Flavin adenin dinükleotit
FMN	: Flavin mononükleotit
GER	: Granüllü endoplazmik retikulum
GPx	: Glutasyon peroksidaz
HDL	: Yüksek dansiteli lipoprotein
4-HNE	: 4-Hidroksinonenal
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HOCL	: Hipokloröz asit
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
MDA	: Malondialdehit
MEOS	: Mitokondriyal enzim okside eden sistem
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotit
NADH	: İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit
nNOS	: Nöronal nitrik oksit sentaz
NO	: Nitrik oksit
NO₂	: Nitrojen dioksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
O₂	: Süperoksit radikali
OH	: Hidroksil radikali
O₂	: Singlet oksijen
O₃	: Ozon
ONOO⁻	: Peroksinitrit anyonu
PUFA	: Çoklu doymamış yağ asidi
ROOH	: Lipid hidroperoksit
RO	: Alkoksil radikali
RO₂	: Peroksil radikali
SR	: Serbest radikal
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBARS	: Tiyobarbitürik asit reaktif maddeler
VLDL	: Çok düşük yoğunluklu lipoprotein

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bir fermentasyon ürünü olan etil alkol, meyve ve tahıllardaki karbohidratlardan kolaylıkla elde edilebildiği için, tarihte yer alan tüm toplumlarda üretilmiş ve günümüze kadar yaygın biçimde kullanılagelmiştir. Sanayileşme süreci sadece alkol üretimini değil alkol kullanımına bağlı sorunları da arttırmıştır. Alkole bağlı sorunlar sadece alkol kullanan kişileri değil tüm toplumları derinden etkiler hale gelmiştir.

Etanol suda kolay çözüldüğünden ve absorpsiyonu kolay olduğundan alındıktan sonra hızla kan dolaşımına katılır ve dokulara dağılır. % 90'ı ince barsakların üst kısmından emilir. Neredeyse tamamı karaciğerde metabolize edilir ve bu nedenle toksik etkilerin en çok görüldüğü organ karaciğerdir. Oluşan ilk patolojik bozukluk, karaciğer yağlanmasıdır ve alkole bağlı karaciğer hastalığının ilk basamağı olarak nitelendirilebilir. Metabolizma sonucu oluşan asetaldehidin kendisi de toksik bir madde olup, aldehid oksidaz tarafından metabolize edildiğinde, demir varlığında serbest radikal oluşumuna yol açar. Çeşitli hücresel yapılarla bileşik oluşturarak, bu yapıların antijenik özellik kazanmalarına ve immun cevap oluşumuna neden olur. Alkolün etkisiyle lipopolisakkaritlerin barsaktan geçişi arttığı için karaciğere nötrofillerin ve makrofajların infiltrasyonu başlar ve olay yağlanmanın ötesine geçerek bir inflamasyona dönüşür ve kişide alkolik hepatit bulguları ortaya çıkar. Bu dönem, alkolik karaciğer hastalığının ikinci evresidir. Son evre olan siroza gidiş, yıllar alabileceği gibi hepatit bulguları ortaya çıkmadan doğrudan sirotik evreye girebilir. Bu üç dönem genellikle birbirini takip ederse de alkole karşı direnç kişisel farklılıklar gösterdiği için hastalık eşiği olarak belirli bir doz tanımlamak mümkün değildir.

Hastalığın kötüye gidişini engellemede en etkili yol, hiç kuşkusuz alkolün bırakılmasıdır. Ancak geri dönüşün olduğu evre aşılmışsa bu tedbirin de yararı olmayacaktır ve başka tedavi yollarına başvurmak gerekecektir. Tedavi için uygun ilaçların seçilmesi veya geliştirilebilmesi için de, alkolün vücuda nasıl zarar verdiği bilinmeli ve bu zararları bertaraf etmede etkili bileşikler belirlenmelidir. Bu araştırmalar için denenen bir çok sentetik ve doğal maddeler mevcuttur ve bunlardan bazıları da tıpkı sarımsak preperatlarında olduğu gibi bitkisel kökenlidir.

Sarımsak asırlardır bilinen ve kullanılagelen bir bitki olduğu için, çok farklı preperatları geliştirilmiştir. Günümüzde de bunların ticari şekilleri kullanıma sunulmuştur. Bunlar; dehidrate sarımsak tozu, sarımsak yağı, doğal sarımsak suyu, kuru sarımsak ekstresi ve benzeri preperatlardır.

Sarımsak genel olarak, antioksidan, antibakteriyel, antifungal, antitrombotik, hipolipidemik, antikarsinojen ve bir çok başka etkisi halen araştırılmakta olan bir bitkidir. Ancak yüksek dozlarının oksidan etkisi olduğu ve kullanımının sınırsız olamayacağı da araştırmalar sonucu ortaya çıkan bir özelliğidir.

Alkolün metabolizması sonucu ortaya çıkan zararlı metabolitlerin en önemlilerinden biri de serbest radikallerdir. Bunların acilen zararsız hale getirilmesi gerekir. Bu amaçla antioksidan özelliğı kanıtlanmış preperatlarla birlikte sarımsak gibi önemli antioksidan potansiyele sahip besin maddelerinden de yararlanılabilir.

Alkol ile birlikte alınması kolay besin maddelerinin, alkole bağılı zararlı etkileri ortadan kaldırmada pratik faydalarının olacağını düşünmekteyiz.

Alkole bağılı karaciğer yağlanması ve alkolik hepatitlerde sarımsağın iyileştirici etkisini araştırmak ve bu etkiyi vitamin E ve melatonin gibi güçlü antioksidanların etkileriyle karşılaştırmayı amaçlamaktayız.

Çalışmamızın alkole bağılı karaciğer hasarı oluşumu, hastalıktan korunma ve tedavi süreçlerini açıklamaya katkıda bulunacağına inanmaktayız.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğerin Yapısı ve Fonksiyonları

2.1.1 Karaciğerin Makroskopik Anatomisi

Karaciğer karın boşluğunun sağ üst bölgesinin önemli bir kısmını kaplayan en büyük abdominal organdır. Erişkin erkekte 1400-1500 gram, erişkin kadında ise 1200-1400 gram ağırlığa sahiptir. Falsiform ligaman tarafından sağ ve sol loblara ayrılır. Arka yüzde “kaudat lob”, sağ alt yüzde de “kuadrat lob”denilen iki küçük lob daha mevcuttur. Ön yüzün küçük bir kısmı hariç, kaburga kemikleri karaciğeri tamamen kapatır. Ön yüzdeki bu küçük kısım, karın ön duvarıyla doğrudan temas halindedir (1).

Karaciğer, hilumda kalınlaşan ince bir bağ dokusu kapsülü (Glisson Kapsülü) ile örtülüdür. Hilumda, karaciğere portal ven ve hepatik arter girer, sağ ve sol hepatik kanallar ve lenfatikler çıkar (2).

Karaciğer kalp debisinin %25'ini alır. Abdominal organlar içinde çift kan kaynağına sahip tek organdır. Karaciğere hepatik arter 400 mL/dk, portal ven 1000 mL/dk kan getirir. Portal venin taşıdığı kan, karaciğere gelen kanın %70'ini oluşturur. Portal ven kan basıncı 10 mmHg, hepatik arter kan basıncı ise 5 mmHg kadar olup, karaciğer venlerinde 200-400 mL kan birikir. Bu kan, muhtemel şok veya hipovolemide sistemik dolaşımın takviye edilmesinde kullanılır (3,4).

Karaciğerde sentezlenen safra kanaliküller yolu ile, intrahepatik safra kanalcıklarına, buradan da sağ ve sol karaciğer safra kanallarına doğru akar. Sağ ve sol safra kanalları porta hepatiste birleşerek “ductus hepaticus communis” i oluştururlar. Biraz daha distalde safra kesesinden gelen “ductus cysticus”un da katılımıyla “ductus choledochus” adını alan safra kanalı duodenumun ikinci kısmına açılır (4).

Karaciğerin sinir pleksusu; T 7-10. sempatik gangliyonlar, sağ ve sol vagal sinir ve sağ frenik sinirden gelen dalların çölyak pleksus ile birleşmesinden oluşur. Bu pleksusa ait lifler karaciğer içinde hepatik arter, portal ven ve safra yolları ile beraber seyreder (5).

2.1.2 Karaciğerin Mikroskopik Anatomisi

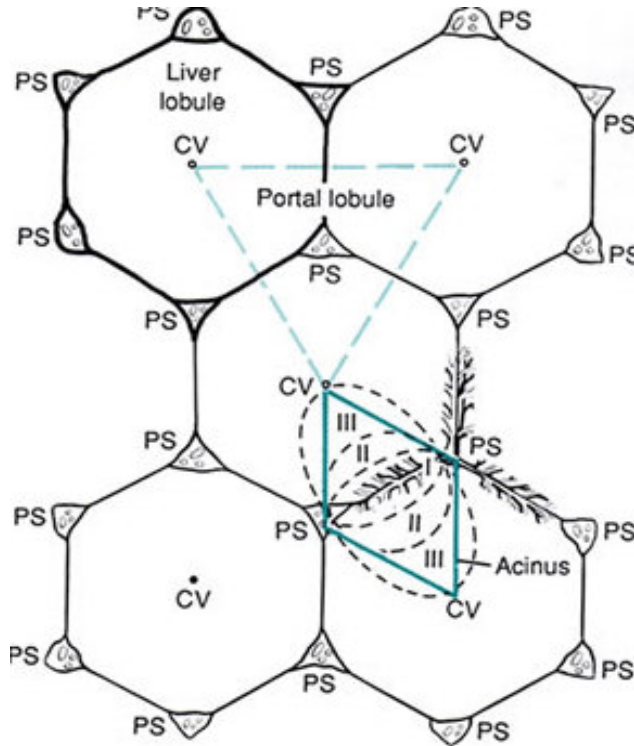
Karaciğer lobülleri; klasik lobül, portal lobül ve hepatik asinüs olmak üzere üç farklı şekilde incelenebilir.

Klasik Karaciğer Lobülü: Tüm köşelerini portal triadın oluşturduğu altıgen şekilli yapıdır. Santral ven bu yapının ortasında yer alır.

Portal Lobül: Bu yapı, merkezi portal alan olan ve köşelerini santral venlerin oluşturduğu hayali bir üçgendir (6).

Hepatik Asinüs (Rappaport asinüsü): Hepatik asinüs, karaciğerin fonksiyonel anatomik birimidir. Kan damarları, asinüsün periferine doğru ışınal şekilde dağılırlar ve sinüzoidleri oluşturarak santral hepatic vene drene olurlar (4).

Asinüs üç bölgeye ayrılır. Bu alanların metabolik fonksiyonları birbirlerinden farklıdır. Alanlardan birincisi portal trakta en yakın olanıdır ve oksijence en zengin kanı alır. Üçüncüsü ise en uzak ve oksijenlenmesi en az olan ve bu nedenle iskemik hasara en duyarlı olan alandır (7).



Şekil 1: Karaciğer lobulleri

<http://www.deltagen.com/targethistologyatlasatlas>

PS: portal sistem, **CV:** santral ven

2.1.3. Karaciğerin Sitolojisi

Sinüzoidlerin iç yüzeyini endotel hücreleri ve Kupffer hücreleri kaplar. Böylelikle bu geniş damar sisteminde akan kanın şekilli elemanları hepatositlerle temas etmez. Sinüzoidal endotel hücreler arasında 0,5 µm'lik açıklıklar vardır ve çapı 0,5 µm'den küçük olan partiküller göreceli olarak bu açıklıktan daha kolay geçerler (6). Böylece makromoleküllerin bir kısmı hepatositler tarafından kandan alınıp katabolize edilirken, bir kısmı da (lipoproteinler, albumin, fibrinojen gibi) kana verilirler.

Karaciğerde beş tür hücre bulunmaktadır. Bunlar hepatositler, endotel hücreleri, Kupffer hücreleri, stellat hücreler ve safra kanalı epitel hücreleridir. Tüm hücre tiplerinin %80'ini hepatositler oluşturur.

2.1.3.1. Hepatositler

Bu hücreler polihedral, altı ya da daha fazla yüzeyli ve 20-30 µm çapında, çok sayıda mitokondri ve bir miktarda düzgün yüzeyli endoplazmik retikulum içeriği nedeniyle eosinofilik boyanan hücrelerdir. İki hepatositin bitişik olduğu yerde, hücrelerin arasında tubuler bir aralık bulunur ve safra kanalikülü olarak adlandırılır. Hepatositler arasında bulunan sıkı bağlantı bölgeleri "Gap Junction"lar hücrelerin fizyolojik aktivitelerinin koordinasyonunda önemlidir (2).

Hepatositler, hem granüllü endoplazmik retikulum (GER) hem de granülsüz endoplazmik retikulum açısından oldukça zengindirler. GER, sitoplazma içinde dağılmış kümeler oluşturur. Bu yapılardaki poliribozomlarda, albumin ve fibrinojen gibi proteinlerin sentezi yapılır (2). Ayrıca GER'de çeşitli maddelerin vücuttan atılmasından önce inaktive ve detoksifiye edilmesi için gerekli olan oksidasyon, metilasyon ve konjugasyon reaksiyonları gerçekleştirilir.

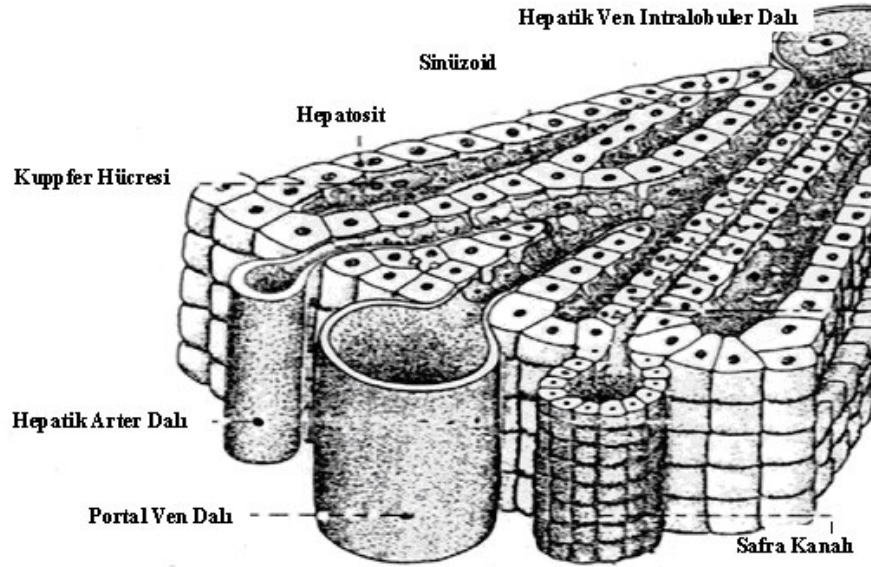
Hepatositler, organizmada yağ metabolizmasının merkezi konumundadırlar. Sentezledikleri safra tuzları barsak lümeninde miçel oluşumunu sağlar. Emilen yağ asitleri ya şilomikronlar içerisinde veya albumine bağlı olarak kan dolaşımında taşınırlar. Önemli bir kısmı karaciğer tarafından alınarak burada metabolize edilirler. Yağ asitlerinin bir kısmı mitokondride β-oksidasyon sürecine girer. Açlık durumunda ise yağ dokusundan serbest hale geçen yağ asitleri karaciğere taşınıp burada keton cisimlerine dönüştürüldükten sonra enerji kaynağı olarak kullanılmak üzere kas dokusuna gönderilirler (8).

2.1.3.2. Endotel Hücreleri

Karaciğer damar yönünden oldukça zengin bir organdır, bu nedenle endotel hücreleri açısından da zengindir. Sinüzoidler arteryel kan yanısıra venöz kan da ihtiva ederler, bu yüzden barsaklardan gelen ve organizmaya zararlı olabilecek çeşitli kimyasal maddeler (ksenobiyotikler) ve mikroorganizmalar için de kompleks bir filtre görevi görürler.

2.1.3.3. Kupffer Hücreleri

Orijin olarak monositlerinden köken alan ve perisinüzoidal alanda yerleşen, lokal makrofajlardır (8). Fagosit edilen mikroorganizmaları ve yabancı cisimleri yıkan lizozom içerirler. Immunglobulinler ve komplemanlar için reseptörleri vardır (4). Antijen sunan hücre olarak görev yaparlar ve hücresel immunitiyi aktive ederler (8). İnterlökinler (IL), tümör nekroz faktör (TNF), kollajenaz, prostoglandinler ve inflamatuvar cevaba katılan diğer faktörleri salgırlarlar (4).



Şekil 2: Karaciğerin yapısı

<http://www.bmb.leeds.ac.uk/teaching/icu3/lecture/12/index.htm>

2.1.3.4. Stellat Hücreler

Deniz yıldızı görünümündedirler. Sinüzoidlerin duvarında bulunurlar ve yüksek miktarda retinol içerirler. Organizmadaki retinol deposunun çok önemli bir kısmı bu hücrelerde bulunmaktadır. Stellat hücreler aktive olduklarında Disse mesafesine kollajen salgılamaya başlarlar. Bu da fibrotik süreci başlatan majör nedenlerdendir, ancak geri dönüşümsüz değildir. Hepatositten salınan metalloproteinaz enzimi, hasar gören alandaki fibrotik dokuyu parçalar ve yok eder. Stellat hücrelerin apoptoza uğratılmasıyla teorik olarak, fibroz doku oluşumunun yavaşlatılabileceği, hatta ortadan kaldırılılabileceği düşünülmektedir (8).

2.1.3.5. Safra Kanalı Epitel Hücreleri

Hepatosit arasındaki safra kanalcığından başlayan safra kanalları, safrayı kanın ters yönünde yani klasik lobulün merkezinden periferine doğru taşırlar. Periferde safra, safra kanalcıklarına ya da “Herring kanalları”na girer. Daha sonra Herring Kanalları portal triaddaki safra kanallarına açılır. Ana safra kanalı, duodenumun ikinci kısmında sonlanır (2).

2.2. Karaciğerin Biyokimyasal Fonksiyonları

Karaciğer; karbohidrat, protein, lipid, porfirin ve safra tuzları metabolizmasında görevli organdır. İmmunglobulinler hariç plazma proteinlerinin çoğunluğu karaciğerde sentezlenir. Burası aynı zamanda demir, glikojen, lipidler ve vitaminlerin depolandığı yerdir. Bunun dışında karaciğer, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu ile bilirubin, amonyak ve üre gibi metabolik son ürünlerin uzaklaştırılmasında önemli rol oynamaktadır (9).

Karaciğerin temel fonksiyonları şunlardır:

2.2.1. Karbohidrat Metabolizması

Karaciğer özellikle kanda normal glukoz konsantrasyonunun devamlılığının sağlanmasında önemli rol oynar. Karbonhidratça zengin öğünlerden sonra dolaşımdaki fazla glukozu ve monosakkaritleri alır. Glukoz dışındaki monosakkaritleri de glukozu çevirdikten sonra glikojen şeklinde depolar. Kan glukozunda düşme olduğunda, öncelikle depoda bulunan glikojen, glukozu dönüştürülür. Eğer depoda glikojen

tükenmişse, glukoneogenez yoluyla laktat, gliserol veya amino asitlerden glukoz sentezlenir ve kan glukoz dengesi korunur.

Karaciğer karbohidrat ve proteinin fazlasını yağ asidi ve trigliseride dönüştürerek depolanmak üzere yağ dokusuna gönderir.

2.2.2. Lipid Metabolizması

Karaciğer yağ asitlerini asetat ünitelerinden yeniden sentezlemesinin yanısıra plazmadan da alarak, yağların ve fosfolipitlerin sentezi için kullanır. Sonrasında bu molekülleri proteinlerle kompleks hale getirerek, lipoproteinler şeklinde kana verir.

Hepatositler yağ asitlerini keton cisimlerine dönüştürebilen hücrelerdir ve uzun süreli açlıktan sonra sinir dokusu keton cisimlerini enerji kaynağı olarak kullanmaya başlar. Ancak keton cisimleri miktarı çok arttığında, plazma pH değeri belirgin şekilde düşer ve şiddetli ketoasidoza yol açarak hızlı elektrolit değişimleri ve bilinç kaybına neden olur.

Karaciğer kolesterol sentezinin % 80'inin gerçekleştiği organdır. Kolesterol, hücre membranı, safra asitleri ve steroid hormonların sentezi için kullanılır. Ayrıca kolesterolün bir kısmı yağ asitleri ile esterifikasyonun ardından lipid damlacıkları şeklinde depolanır. Kolesterolün geri kalan önemli bir kısmı serbest ya da esterleşmiş formda "çok düşük dansiteli lipoproteinler" (VLDL) yapısına katılır, bunlar da diğer dokularda kullanılmak üzere kana verilirler. Ayrıca karaciğer, kolesterol ve kolesterol esterleri içeren lipoprotein komplekslerini kandan alır ve yıkıma uğratar.

2.2.3. Safra Tuzları Sentezi ve Salınımı

Safra tuzlarının tek sentez yeri karaciğerdir. Biyosentezleri kolesterole hidroksil gruplarının katılmasıyla başlar. Karaciğerden salgılanan safranın % 65'i safra asidi, % 20'si fosfolipid, % 4'ü kolesterol, % 5'i protein, % 0.3'ü ise bilirubin ve safra pigmentidir. Safra asitleri yağ sindiriminde ve emiliminde önemli olduklarından, yağda çözünen tüm vitaminlerin emilimi safra yardımıyla olur. Safra salınımındaki aksaklık K vitamini eksikliğine ve dolayısıyla pıhtılaşma faktörlerinin sentezinde bozulmaya yol açar.

2.2.4. Depolama Fonksiyonu

Karaciğer sadece karbohidratların değil bunun dışında, demir, yağda çözünen vitaminler (A, D, E, K), vitamin B12, folik asit, demir ve bakır'ı da depolar. Bu maddelerin eksikliklerinde depolandıkları yerden salınarak kullanılırlar. Ancak bakır gibi bazı maddelerin fazlaca depolanması sağlığı tehdit edebilir.

2.2.5. Sentez Fonksiyonu

Karaciğerde trigliserid, yağ asidi, kolesterol ve safra asidi sentezinin yanısıra birçok protein sentezi de gerçekleşir. Sentezlenen proteinlerden bazıları; albumin, prealbumin, seruloplazmin, α -1 antitripsin, haptogloblin, β_2 -mikroglobulin, transferrin, α -fetoprotein, transkobalamin, apoferritin ve çeşitli koagülasyon proteinleridir.

2.2.6. Detoksifikasyon Fonksiyonu

Karaciğer vücuda dışarıdan giren ilaç, ksenobiyotik ve çeşitli zararlı maddelerin detoksifikasyonundan sorumlu olduğu gibi, vücutta çeşitli metabolitlerin zararsız hale getirilmesinden de sorumludur.

Protein yıkımından ortaya çıkan amonyak, hücreler için toksik bir maddedir. Karaciğer, amonyağı mitokondriyel ve sitozolik enzimlerce katalizlenen bir takım reaksiyonlarla üreye dönüştürerek idrarla atılmasını sağlar.

Vücutta farklı dokularda sentezlenen hormonları metabolize ederek, atılmaya hazır hale getirir (9,10,11,12).

Hemoglobin yıkımından sonra açığa çıkan ve retiküloendotelial sistemde sentezlenen bilirubin de karaciğerde glukronik asitle konjuge edilerek suda erir hale getirildikten sonra safra yolu ile vücut dışına atılır.

Alkol ve ilaç bağımlılığı gibi durumlarda karaciğerin sürekli toksik maddelere maruz kalması, zamanla detoksifikasyon işlevinin bozulmasına neden olmaktadır. Özellikle günümüzde alkol kullanımının yaygın olması, buna bağlı sorunların daha sık karşımıza çıkmasına neden olmaktadır.

2.3. Alkol

Madde bağımlılıkları içerisinde en yaygın olanı alkol kullanımüdür. Etil alkol, meyve ve tahıllardaki karbohidratların fermentasyonu sonucu kolayca elde edilebildiği

için tarih boyunca hemen hemen her toplumda üretilmiş ve kullanılmıştır. Özellikle sanayi devriminden sonra alkol üretimi ve tüketimi hızla artmıştır. Bunun doğal sonucu olarak, alkole bağlı sorunlar da eş zamanlı olarak artmıştır. Alkolün kişilerde yaptığı ağır ruhsal ve bedensel bozukluklar yanında, kişiler arası ilişkiler bozulmakta, aile içi sorunlar artmakta ve aile hayatı olumsuz yönde etkilenmektedir. İş ve trafik kazalarında, yaralama, öldürme ve intihar olaylarında, iş ve işgücü kayıplarında alkol en önemli sorumludur (13).

Alkol, alınan miktara bağlı olarak etkisi çoğunlukla uzun dönemde ortaya çıkan ve fizyolojik bağımlılık oluşturan bir maddedir. Metabolize edildiği en önemli organ karaciğer olduğu için en çok etkilediği organ da karaciğerdir.

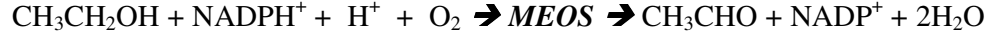
2.3.1. Alkol Metabolizması

Etanol başlıca iki yolda metabolize edilir:

1-İlk olarak etanol hepatosit sitozolünde *alkol dehidrogenazla* (ADH) “asetaldehide” okside olur. Asetaldehid de, mitokondriyal *aldehid dehidrogenaz* (ALDH) tarafından asetata dönüştürülür. Her iki basamakta da NAD, NADH’ye indirgenir. Sonuçta; karbohidrat ve lipit metabolizması etkilenir, glukoneogenez bozulur, sitrik asit döngüsüne giden substrat azalır. Asetil CoA, ketogenez ve yağ asidi sentezine yönelir. Mitokondrial yağ asidi β-oksidasyonunun azalmasıyla birlikte değişen redoks durumu da karaciğer yağlanmasına (steatozis) neden olur (14).



2-Etanol metabolizmasında ikinci temel yol, etanolla indüklenen mikrozomal etanol okside eden sistemdir. Bu sistemin temel bileşeni, sitokrom p-450 enzim ailesidir. CYP2E1, bu enzim ailesinin E alt grubundan bir enzimidir. Bu ikinci yıkılım yolunda alkol asetaldehite ve asetaldehit de asetata okside edilirken, eş zamanlı olarak NADPH da NADP’ye oksitlenir. Bu yol serbest demirle ilişkili olarak, oksidatif strese yol açan serbest radikaller üretir. Oksidatif stres yeterli büyüklükteyse, membran ve lipoproteinlerdeki lipitler peroksidasyona uğrar, sonrasında nekroz ve/veya apoptoz gelişir. Asinüsün perivenüler bölgesinde (3. zon), CYP2E1 düzeyi yüksektir. Bu bölgede karaciğerin diğer bölgelerine göre kan akımı daha kısıtlıdır. CYP2E1’in etanolla reaksiyonu sırasında oksijen kullanıldığından bu bölge doku hipoksisine daha duyarlıdır ve alkolden en erken etkilenen alandır (15).



MEOS'un etanol için K_m değeri 8-10 mM dır ve alkol dehidrogenazın K_m değerinden (0.2-2 mM) yüksektir. Bu nedenle uzun süreli alkol kullanıcılarında alkol metabolizmasında primer öneme sahiptir. CYP2E1, diğer P450 izoformlarına göre ortama daha fazla O_2 ve H_2O_2 salar ve bu nedenle indüksiyonu kronik alkoliklerdeki oksidatif stresin nedenlerinden birisidir (16).

3-Etanolün küçük bir kısmı da, peroksizomlarda katalaz tarafından okside edilir. Ancak karaciğerde, hidrojen peroksit konsantrasyonu düşük olduğu için bu oksidasyon yolunun alkol metabolizmasına katkısı önemsizdir (17).



Sürekli alkol alımı CYP2E1'in sentezini artırır. CYP2E1, etanolü asetaldehide oksitlediği gibi, aseton, bütanol, pentanol, anilin, parasetamol, pentan, halotan, izofluran, kloroform, kokain ve karbontetraklorür gibi bir çok maddeyi de oksitler. Ksenobiyotikler sitokrom P450 tarafından daha reaktif ürünlere dönüştürülebildiğinden, bu enzimin indüklenmiş olması nedeniyle ksenobiyotik metabolitleri hızla ortaya çıkar ve normaldekinden daha düşük düzeylerde alındıklarında dahi toksik etki gösterirler.

Etanol metabolizması sonucunda, asetaldehit, malondialdehit ve 4-hidroksinonenal (4-HNE) gibi bir çok reaktif ürün ortaya çıkar. Proteinlerle reaksiyona giren bu ürünler proteinlerin yapısını değiştirerek, immun yanıtı tetikleyen yeni antijenlerin ortaya çıkmasına neden olur. Böylelikle alkoliklerde inflamatuvar yanıt tetiklenmiş olur (18,19).

2.3.2. Alkolik Karaciğer Hastalığı (ALD) ve Oluşum Mekanizması

Alkol alımı gelişmiş ülkelerde görülen karaciğer hastalıklarının en yaygın nedenidir. Genel olarak riskli alkol dozu günde 80 gram olmakla beraber, kadınların mide mukozasında alkol dehidrogenaz düzeyi daha düşük olduğu için kan alkol konsantrasyonları erkeklere kıyasla daha kolay etkilenir. Kronik tüketim aralıklı alımdan daha risklidir (20).

Alkolik karaciğer hastalığı (ALD), etyolojisi bilinen ancak patolojisi karmaşık bir hastalıktır. Hastalığın mekanizmalarının belirlenmesi, yeni tedavi stratejileri geliştirilmesine olanak sağlar. Bireylerin ALD'ye maruziyetinin kişisel farklılıklar gösterdiği yaygın bir kanıdır. Alınan alkolün kümülatif dozu hastalık riskinin

belirlemede şüphe götürmeyen bir faktör olsa da, yoğun şekilde alkol kullananların çok küçük bir kısmı ALD'nin ilerlemiş formları olan hepatit, fibroz ve siroza ilerlerler (21).

Kronik alkol bağımlılığı; karaciğerde yağlanma, alkolik hepatit ve siroza neden olabilen bir hastalıktır. Bu değişiklikler birbirinden bağımsız olarak ortaya çıkabildikleri gibi, birlikte de bulunabilirler. Alkolik hepatitin, siroz gelişiminin ön şartı olup olmadığı tartışmalıdır. Ancak varlığı halinde, siroza gidişte alkol alımı devam etmiyor olsa dahi, siroz riski ortadan kalkmamaktadır. Ayrıca aşırı alkol alan kişilerin biyopsilerindeki yağlı değişikliğin ağırlığının gelecekteki fibroz ve siroz riskini haber verdiği prospektif çalışmalarda saptanmıştır (22).

2.3.3. Alkolik Karaciğer Hastalığı Patolojisi

2.3.3.1. Yağlı Karaciğer

Karaciğerde en sık rastlanan ve en zararsız olan belirtidir ve normale dönme ihtimali çok yüksektir. Alkole bağlı karaciğer yağlanmasında, karaciğer 4-6 kilogram ağırlığa ulaşan, yumuşak, sarı, yağlı ve kolay parçalanabilen bir organdır. Yağlanma önceleri lobüllerin merkezindeyken, olay ağırlaştıkça tüm lobülleri yaygın olarak tutar. Hepatositlerin çoğunda görülen makroveziküler steatoz, nükleusu iten geniş sitoplazmik lipit vakuollerinin birikmesiyle karakterizedir. Kimi hücrelerde mikroveziküler yağlanma da görülebilir. Yağ birikimi arttığında, komşu hepatositlerin plazma membranları yırtılarak lipogranülomlar ortaya çıkar. Olayın başlangıcında fibrotik dokuda artış yoktur veya çok azdır, ancak alkol alımının devam etmesiyle santral venler çevresinde ve perisinüzoidal Disse aralıklarında hafif fibroz başlar. Bunlar erken fibrotik değişikliklerdir ve alkol alımı devam ederse sirozun gelişeceğinin göstergesidir. Bu fibrotik değişim başlamadan önce alkol alımı kesilirse yağlı değişiklikler geri döner (22). Yağlanma karaciğer için “ilk vuruş etkisi” yapar. Bu da karaciğeri “ikinci vuruşa” yani inflamasyon ve nekroz gibi bir çok hasarlandırıcı faktöre daha duyarlı hale getirir (23). Yağlanma; endotoksin aracılı nekroinflamasyon (24) ve lipit peroksidasyonunun derecesini arttırır (25).

2.3.3.2. Alkolik Hepatit

Sürekli yoğun alkol alımını takiben oluşan klinik ve morfolojik bulguların toplamıdır. Histolojik olarak; hepatositlerde yer yer şişme ve nekroz, nekroz odakları etrafında ve içinde nötrofil birikimi mevcuttur. Vakaların çoğunda hepatositlerde

intrasitoplazmik hyalen materyal (Mallory Cisimcikleri) gözlenir. Lobüllerin merkezleri en ağır derecede etkilense de değişim tüm lobülde mevcuttur. Karaciğer hücrelerinin şişmesi ve balonlaşması yağ ve suyun birikimi kadar dışarı verilen proteinlerin birikmesinden de kaynaklanır. Mallory cisimciklerinin bulunuşu, alkolik hepatitte karakteristik ancak tanısız olmayan bir özelliktir. Bu yapılar prekeratinin ara filamanlarının kümeleşmesiyle oluşur, fakat aynı zamanda kaynağı bilinmeyen diğer proteinleri de içerir. Karaciğer hücre nekrozunu takiben nötrofillerin hakim olduğu bir infiltrasyon meydana gelir; daha az oranda lenfositler ve makrofajlar dainflamasyona katılırlar. Bu tablo tipik olmakla birlikte, değişikliklerin en önemlisi lobüllerin merkezinde fibrozun varlığıdır. Venüllerin çevresindeki santral skleroz, santral venleri tıkayabilir ve siroz bulguları gelişmeden evvel portal hipertansiyona neden olabilir. Alkol bağımlılığı devam eden kişilerde; yaygın nekroz, inflamasyon ve fibrozun görüldüğü alkolik hepatit gelişebilir. Bazı vakalarda genişlemiş kanaliküllerde safra tıkaçları, şişmiş hepatositlerde ve Kupffer hücrelerinde safra damlacıklarının görüldüğü intrahepatik kolestaz ortaya çıkabilir (22).

2.3.3.3. Alkolik Siroz

ALD'nin en son evresidir. Siroz, karaciğerin diffüz olarak fibrotik değişikliğe uğradığı, nodül oluşumu ve rejenerasyonlarla karakterize geri dönüşsüz bir hastalıktır. Hepatositlerin ölümüne yol açan uzun süreçler, fibrozis ve rejenerasyonla birlikte olduklarında siroz ortaya çıkar. Siroza neden olan durumlardan bazıları şöyle sıralanabilir:

- Kronik viral hepatitler
- Alkolik karaciğer hastalığı
- Safra yolu hastalıkları
- Primer hemokromatozis
- Wilson hastalığı
- Alfa-1 antitripsin eksikliği
- İdiyopatik

Sirozun oluşma hızı ve seyri, etyolojiye göre değişiklik gösterir. Alkol kullananlarda siroz, yavaş olarak ve uzun vadede ortaya çıkar. Önceleri karaciğer yağlı ve büyüktür. Yüzeyi düzgün, sarı kahverengi ve yağlı olup kesitinde mikronodüler siroz

paterni (1-3 mm çaplı nodüller) görülür. Fibroz artışıyla yağ miktarı azalır ve karaciğer daha kahverengi bir hal alır. İlerleyen dönemlerde karaciğer hücre rejenerasyonuna bağlı olarak dağınık ve daha geniş nodüller gelişir. Skar dokusu genişler ve postnekrotik paterni taklit eden makronodüler siroz ortaya çıkar. Karaciğer küçülür ve normal karaciğere göre ağırlığı azalır, hatta 1 kg'ın altına inebilir. Skar dokusu oluşumu ve rejenerasyon normal lobül yapısını bozarak ilerler, karaciğer parankimi azalır, fibroz daha da belirginleşir. Rezidüel hepatositlerde hala bir miktar yağ bulunur ve alkolik hepatite bağlı değişiklikler de eşzamanlı olarak görülebilir (22,26).

2.4. Serbest Radikaller Ve Antioksidan Sistem

Serbest radikaller, bir ya da birden fazla eşlenmemiş elektrona sahip, reaktivitesi yüksek, birçok metabolik ve patofizyolojik süreçte rol oynayan, değişken nitelikte kimyasal maddelerdir. Genel olarak normal aerobik mekanizmanın yan ürünü olarak tüm hücrelerde devamlı üretilen ve hasar verici potansiyelleri nedeniyle istenilmeyen bileşiklerdir. Zararları faydalarından çok daha fazladır. Serbest oksijen radikali biyokimyasında anahtar rolü olan maddeler oksijenin kendisi, süperoksid, hidrojen peroksid, geçiş metallerinin iyonları ve hidroksil radikali olup, bunlardan ilk dördünün çeşitli reaksiyonları sonucu hidroksil radikali meydana gelir. Geçiş metalleri, radikal olmamakla beraber katalizör etkisine sahip olmaları nedeniyle radikal oluşumunda önemlidirler (27,28).

2.4.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Biyolojik önemi olan serbest radikaller

- $O_2^{\cdot -}$ → süperoksid radikali
- OH^{\cdot} → hidroksil radikali
- RO^{\cdot} → alkoksil radikali
- RO_2^{\cdot} → peroksid radikali

Serbest radikal (SR) olmayan reaktif oksijen türevleri

- H_2O_2 → hidrojen peroksid
- $HOCl$ → hipokloröz asit
- O_2^{\cdot} → singlet oksijen
- O_3 → ozon

2.4.2. Reaktif Nitrojen Türleri

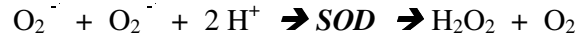
- NO^\cdot → nitrik oksit (radikal)
- NO_2^\cdot → nitrojen dioksit (radikal)
- ONOO^- → peroksinitrit (non-radikal).

NO^\cdot de serbest radikaldır ve ONOO^- ve NO_2^\cdot ile beraber reaktif nitrojen türevleri olarak anılır (27).

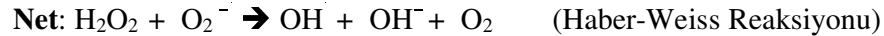
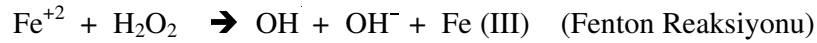
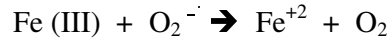
“Elektron taşıma sistemi”nde, elektron akışı işlemi vücuttaki tüm hücrelerin gereksinim duyduğu oksijenin % 85’ini kullanır ve bunun da yaklaşık % 5’i ROS’a dönüşür.

2.4.3. Süperoksit Radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

Temel açığa çıkış yeri elektron taşıma sistemidir. Buna ek olarak $\text{O}_2^{\cdot-}$, ksantin oksidaz ve monoamino oksidaz gibi bir çok oksidaz enziminin aktivitesi sonucunda da oluşur. $\text{O}_2^{\cdot-}$ radikalinin reaktivitesi OH^\cdot radikalinden daha azdır. Ancak dismutasyon reaksiyonu sonucunda H_2O_2 oluşturduğu için önemlidir.

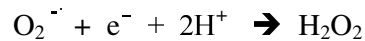
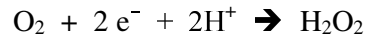


Ayrıca süperoksit radikali, demirin iki değerli forma indirgenmesini sağlayarak Fenton reaksiyonunu hızlandırır. Bu sayede OH^\cdot radikali oluşumuna dolaylı yoldan katkı sağlar (28,29).

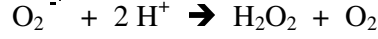


2.4.4. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron almasıyla veya süperoksitin bir elektron almasıyla peroksit molekülü oluşur. Peroksit molekülü de iki hidrojen atomu alarak hidrojen peroksiti oluşturur.



Biyolojik sistemlerde H_2O_2 'in üretiminin çoğu $\text{O}_2^{\cdot-}$ 'in dismutasyonu ile olur.



Bu dismutasyon, spontan olabildiği gibi superoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından da katalizlenebilir. H₂O₂ serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli rol oynar. Çünkü süperoksit ile reaksiyonu sonucunda, en reaktif ve en zararlı serbest oksijen radikali olan hidroksil radikalini oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılır. Bu reaksiyon “Haber-Weiss Reaksiyonu”dur. Demir katalizörlüğünde gerçekleşen ikinci şekline de “Fenton Reaksiyonu” denilmektedir (28).

2.4.5. Hidroksil Radikali (OH[·])

En reaktif biyolojik serbest radikaldir. Bu radikal çok çeşitli reaksiyonlarda üretilebilmektedir ancak en önemli kaynağı “Fenton Reaksiyonu”dur. H₂O₂'in ultraviyole ışıkla indüklenen homolitik fizyonu, iyonizan radyasyon etkisiyle, hipokloröz asitin superoksitle reaksiyona girmesiyle, ultrasound ile suyun homolitik fizyonu, litotripsi işlemi sırasındaki şok dalgalarının yüksek enerjisiyle, N-hidroksi-2-tiyopridon'un dekompozisyonu, kurutma, dondurma liyofilizasyon işlemleri ile OH[·] radikali ortaya çıkmaktadır. OH[·] radikalinin katıldığı tepkimeler temel olarak 3'e ayrılabilir. Bu reaksiyonlar, H çıkarılması, OH[·] eklenmesi ve elektron transferi olarak kısaca adlandırılabilir.

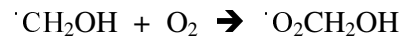
Hidrojen çıkarılmasına örnek olarak OH[·] radikalinin alkollerle reaksiyonu verilebilir.



etanol

hidroksietil
radikali

Oluşan karbon radikalini ileri reaksiyonları ile peroksil radikali oluşabilir:



peroksil radikali

Oksijen seviyeleri düşük olduğunda ise iki hidroksietil radikali bir araya gelip, bir kovalan bağ yardımıyla radikal olmayan bir bileşik oluştururlar.

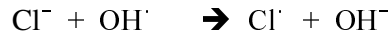
OH[·] radikalinin hidrojen çıkartması reaksiyonuna örnek olarak, lipid peroksidasyonunu başlatması verilebilir. Lipid peroksidasyonu başlatmak için metilen (-CH₂-) grubundan bir tane H atomunu kopartmak gerekir. Bir tane çift bağı olan veya çift bağ içermeyen yağ asitleri bu tür reaksiyonlara, poliansatüre yağ asitlerine (PUFA) göre

daha dirençlidirler. Bir çift bağ, komşu karbondaki hidrojen atomunun bağ enerjisini azaltır (allilik hidrojen).

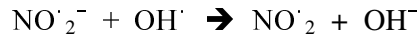


$\text{OH} \cdot$ radikalinin aromatik bileşiklerle reaksiyonu genellikle eklenme şeklindedir. Örneğin, $\text{OH} \cdot$ DNA'da guanine eklenerek 8-hidroksiguanin radikali oluşturur. Yine $\text{OH} \cdot$ radikali timin bazında bulunan bir çift bağa eklenir. Oluşan timin radikali ileri reaksiyonlara girer, oksijenle reaksiyonu sonucunda da timin peroksil radikali oluşur. Sonuç olarak $\text{OH} \cdot$ radikali eğer DNA yakınında oluşursa bazlara ve deosiriboz şekerlerine zarar vererek, band kırıklarına neden olur.

$\text{OH} \cdot$ radikalleri elektron transfer reaksiyonlarında rol alırlar: örneğin, halid iyonları ile



ve nitrit iyonu ile



$\text{OH} \cdot$ radikalinin karbonat (CO_3^{2-}) ile reaksiyonundan güçlü oksidan etkisi olan karbonat radikalleri ($\text{CO}_3 \cdot^-$) oluşur.

2.4.6. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller hücrelerde lipid, karbohidrat, protein, DNA ve enzimler başta olmak üzere tüm önemli bileşiklere etki ederler. Aerobik solunum ve kapiller geçirgenlik bozulur, hücrenin potasyum kaybı ve trombosit agregasyonunu artar.

Proteaz, fosfolipaz, elastaz, siklooksijenaz, ksantin oksidaz, lipooksijenaz, triptofan dioksijenaz ve galaktoz oksidaz gibi litik enzimleri aktive ederler. Alfa-1-antitripsin gibi savunmaya ait bazı enzimleri inaktive ederler.

2.4.6.1. Membran Lipidlerine Etkisi (Lipid Peroksidasyonu)

Lipitler en hassas grup oldukları için, serbest radikaller savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak seviyeye ulaştıklarında öncelikle hücre membranını etkilerler. Tüm biyomoleküller bu olaydan etkilenmekle beraber, lipidler hasara en duyarlı gruptur. Hücre membranlarında bulunan kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle reaksiyona girer ve peroksidasyon ürünleri oluşur.

PUFA'nın oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlı bir tepkimedir. Çünkü kendi kendini devam ettiren bir zincir reaksiyonudur. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan hasar geri dönüşümsüzdür.

Lipid peroksidasyonu, serbest radikal etkisiyle membranda bulunan poliansatüre yağ asidi zincirinden bir H atomu koparılmasıyla başlar. Bu yağ asidi zinciri lipid radikali özelliği kazanır. Oluşan lipid radikali dayanıklı olmayan bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Molekül içi çift bağların pozisyonlarının değişmesiyle dien konjugatları ve daha sonra lipid radikalinin moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipid peroksil radikali meydana gelir. Bu radikaller, membran yapısındaki diğer PUFA'ları etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksidlere dönüştürür. Böylece olay kendi kendine katalizlenerek devam eder.

Peroksidasyonla oluşan lipid peroksidlerinin yıkımı, geçiş metalleri iyonlarının katalizini gerektirir. Lipid peroksidler yıkıldığında oluşan aldehidler hücrede metabolize olurlar ya da hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonundan, tiyobarbitürik asitle reaksiyona giren ve ölçülebilen, malondialdehid (MDA) meydana gelir. MDA, lipid peroksidasyon derecesiyle iyi korelasyon gösteren bir moleküldür.

Lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Doğrudan membran yapısına ve dolaylı olarak da reaktif aldehidler üreterek diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Lipid radikalleri hidrofobik olduklarından reaksiyonların çoğu membrana bağlı moleküllerde meydana gelir. Peroksidasyonla oluşan MDA, membran bileşenlerinde çapraz bağlanmalara ve polimerizasyona neden olur. Sonuçta hücre yapısında, iyon transportunda ve enzim aktivitesinde bozulmalar ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsek membran özelliklerinin değişmeler meydana gelir (28,30).

2.4.6.2. Proteinlere Etkisi

Proteinler serbest radikal etkilerine PUFA'dan daha dirençlidirler ve zincir reaksiyonları daha yavaş ilerler. Proteinlerin serbest radikal saldırısından etkilenme derecelerini amino asit bileşimleri belirler. Doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllerin, serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metionin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikal hasarından kolaylıkla etkilenirler. Sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikaller

meydana gelir ve bu reaksiyonlar sonucu immunglobulin G ve albumin gibi çok sayıda disülfid bağına sahip proteinlerin üç boyutlu yapısı bozular. Proteinler üzerine olan serbest radikal hasarının birikmesi ya da proteinlerin spesifik bölgeleri üzerine yoğunlaşması hücre aktiviteleri ve canlılığı bakımından tehlikelidir (28,30).

2.4.6.3. Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkisi

Serbest radikallerin DNA'ya etkisi sonucu hücrede oluşan mutasyonlar, ölümcül olabilirler. Nükleik asit baz modifikasyonları, kromozom değişiklikleri veya DNA'daki diğer bozukluklar, hücrenin canlılığını tehdit eder. Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlara kolayca zarar verir. Aktive olan nötrofillerden salınan hidrojen perosit, membranlardan geçer ve hücre çekirdeğine ulaşarak, DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne neden olur. Bu sebepten DNA, serbest radikal hasarından kolaylıkla etkilenen önemli bir hedef moleküldür (28,30).

2.4.6.4. Karbohidratlara Etkisi

Serbest radikallerin karbohidratlar üzerinde de monosakkaritlerin otooksidasyonu ve polisakkaritlerin depolimerizasyonu gibi önemli etkileri vardır.

Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksid, peroksidler ve okzoaldehidler meydana gelirler. Okzoaldehidler, karbohidratların DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturabilmelerine neden olurlar. Diyabetin katarakt ve mikroanjyopatik komplikasyonları bu endenle oratay çıkar. Okside glukoz, lenste ve tüm bağ doku proteinlerinde çapraz bağlanmalara yol açarak, görme kalitesinin bozulmasına neden olur (31,32).

Bağ dokunun önemli bir bileşeni olan hiyaluronik asit, eklem aralığındaki sinovyal sıvıda bol miktarda bulunur. Hiyaluronik asit, eklemin inflamasyonu ile oksidatif hasara uğrar. İnflamasyonda eklem aralığına geçen polimorfonükleer lökositlerin aktivasyonu ile ortaya çıkan hidrojen peroksid (H_2O_2) ve süperoksit radikalleri (O_2^-) hiyalüronik asiti parçalar. Eklem aralığındaki inflamasyonda, serbest radikallerin rolü in vitro olarak da gösterilmiştir (31-33).

2.4.7. Antioksidan Savunma Sistemleri

Reaktif oksijen türlerinin oluşumlarını ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta bir çok savunma mekanizması geliştirilmiştir. Bunlar antioksidan

savunma sistemleri veya antioksidanlar olarak bilinirler. Antioksidanlar hücrenin hem sıvı hem de membran kısımlarında bulunabilirler.

Antioksidan maddeler başlıca altı mekanizma ile çalışırlar. Bunlar oluşan serbest radikalleri toplayıcı ve giderici etkileri ile bağlayarak veya kararlı hale getirerek; zincir kırıcı etki ile serbest radikal üreten kimyasal reaksiyonları durdurarak; baskılayıcı etki ile reaksiyon hızını azaltarak; onarıcı etki ile lipid, protein ve DNA gibi yapılarda oluşmakta olan biyolojik moleküler hasarı rejenere ederek; hücresel kinaz kayıplarını önleyip oksidasyon reaksiyonlarını durdurarak ve organizmadaki SOD gibi antioksidan enzimler ile enzimatik olmayan antioksidanların sentezini artırarak etkilerini gösterirler (34-38).

2.4.7.1. Endojen Antioksidanlar

1. Enzim Özellikli Antioksidanlar

- Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi
- Süperoksid dismutaz
- Katalaz
- Glutasyon Peroksidaz
- Glutasyon-S-transferaz
- Hidroperoksidaz

2. Enzim Özelliği Olmayan Antioksidanlar

- Lipid Fazda Bulunanlar: α - tokoferol (E vitamini) ve β -karoten
- Sıvı Fazda (hücre sitozolünde veya kan plazmasında) bulunanlar:

Askorbik asit, melatonin, urat, sistein, seruloplazmin, transferrin, laktoferrin, miyogloblin, hemogloblin, ferritin, metionin, albumin, bilirubin, glutasyon

2.4.7.2. Ekzojen Antioksidanlar (İlaçlar)

- **Ksantin Oksidaz İnhibitörleri:**

Tungsten, allopürinol, oksipürinol, folik asit, pterin aldehid

- **NADPH Oksidaz İnhibitörleri:**

Adenozin, lokal anestezipler, kalsiyum kanal blokerleri, non-steroid anti-inflamatuvar ilaçlar, cetiedil, diphenyline iodonium

- **Rekombinant Süperoksid Dismutaz**
- **Trolox-C** (E vitamini analogu)
- **Endojen Antioksidan Aktiviteyi Arttıran Maddeler:**

- Glutasyon peroksidaz aktivitesini arttıranlar:

Ebselen

Asetilsitein

- Diğer non-enzimatik serbest radikal toplayıcıları:

Mannitol,

Albumin,

Dimetilsülfoksit

- Demir redoks döngüsü inhibitörleri:

Desferoksamin ve seruloplazmin

Nötrofil adezyon inhibitörleri

Sitokinler: TNF ve interlökin-1

Barbitüratlar

Demir Şelatörleri

- **Gıda Antioksidanları**

- Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT)

- Bütillenmiş hidroksianizol (BHA)

- Sodyum benzoat

- Etoksikuin

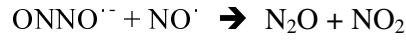
- Propilgallat

- Demir-süperoksid dismutaz (28)

2.4.8. Nitrik Oksit (NO)

Nitrik oksit (NO) “azot monoksit” de denilen renksiz bir gazdır. Organik çözücülerde daha iyi olmakla beraber suda da çözünebilir, hücre içinde ve hücreler arasında kolayca diffüzyona uğrayabilir. Yörüngesinde eşlenmemiş bir elektron taşıdığı için serbest radikallere dahil edilir. NO okside olup bir elektron kaybederse, nitrozonyum katyonu (NO⁺) meydana gelir. Bir elektron kaybettiğinde ise nitroksil

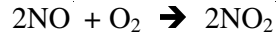
anyonu (NO^-) oluşur. Nitroksil kısa ömürlü ve reaktif bir moleküldür. NO^- ile reaksiyona girerek nitroz oksit (NO_2) ve OH^- radikali oluşturur.



NO^- , O_2 ile de reaksiyona girerek peroksinitrit oluşturur.



Havayla teması halinde, NO moleküler oksijenle reaksiyona girer ve kahverenkli nitrojen dioksit gazını (NO_2) oluşturur. NO_2 , NO 'den daha reaktif bir serbest radikaldir (29).



2.4.9. NO Sentezi

Nitrik oksid sentaz enzimi tarafından, L-arjininden, L-sitrülin ve NO sentezlenir. Bu sentez sırasında oksijen ve kofaktör olarak FAD, FMN, tetrahidrobiyopterin ve hem gerekir. Bu sentez sırasındaki oksidasyon beş elektron gerektirir ve bunu NADPH sağlar (29).

NOS izoformları temel olarak iki ana gruba ayrılır:

- a) Yapısal NOS (cNOS)
- b) İndüklenebilir NOS (i NOS)

cNOS aslında “endotelial NOS” (eNOS) ve “nöronal NOS”u (nNOS) ifade eden genel bir tanımdır. cNOS izoformlarının aktivitesi iyonize Ca^{+2} 'ye bağlıdır ve Ca^{+2} konsantrasyonu yükselene kadar inaktiftirler. Hücre içi iyonize Ca^{+2} arttığında oluşan kalsiyum kalmodulin kompleksi cNOS'un aktiflenmesini sağlar ve NO sentezlenir. Hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu azalınca cNOS aktivitesi azalır. Bu nedenle cNOS izoformları biyolojik sistemlerde düşük miktarlarda NO sentezlerler. Bu izoformlardan endotelial NOS (eNOS) damar endotelinde, nöronal NOS (nNOS) ise sinir sisteminde bulunur.

eNOS kaynaklı NO; düz kasları gevşeterek, kan basıncı ve akış hızını düzenler. Trombositlerin adezyon ve agregasyonlarını inhibe eder. Ayrıca endotel hücresi ve vasküler düz kas hücresi üzerinde antiproliferatif etkisi vardır.

Merkezi sinir sisteminde, presinaptik uçtan salınan glutamatın etkisiyle post sinaptik uçta nNOS aktive olur ve burada NO' sentezlenir. NO', sinir sisteminde sinapsların şekillenmesine yardımcı olur. Ayrıca kokunun ve ağrını algılanması, görme ve hafızanın oluşumu işlevlerinde de rol alır. Periferik sinir sisteminde ise nörotransmitter rolü haricinde, solunum fonksiyonlarında, penil ereksiyonda, gastrointestinal sistem motilitesinde, mesane sfinkterini işlevinde ve bu organların tümünün kan basıncı ve akış hızlarının düzenlenmesinde rol oynar. (39-42).

Üçüncü NO sentaz izoformu olan indüklenebilir NOS (iNOS) başta makrofajlar olmak üzere, hepatositler, damar düz kası, damar endoteli, astrosit ve kondrositler tarafından, bakteriyel ürünler ve sitokinlerle teması takiben üretilir. Bu izoform kalsiyum konsantrasyonundan etkilenmez. iNOS indüklendiği zaman, NO' üretimi cNOS'ta olduğu gibi kısa değildir, saatlerce hatta günlerce sürebilir. cNOS glukokortikoidlerden etkilenmezken, iNOS baskılanır. iNOS, özellikle nonspesifik immunitede önemli rol oynar. Bakteri, mantar, virüs, tümör hücreleri ve protozoonlara karşı sitotoksik veya sitostatik etki gösterir. İnflamatuvar ve otoimmün hastalıklarda da rol oynar (40,41).

2.4.10. Süperoksit Dismutaz (SOD, süperoksit oksidoredüktaz: EC 1.15.1.1)

Süperoksit dismutaz tüm aerobik canlılarda bulunan, zorunlu anaeroblarda bulunmayan bir metalloenzimdir ve süperoksit radikalinin hidrojen peroksite dismutasyonunu katalizler. İlk kez 1969 yılında Fridowich ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (43).



Süperoksit radikalleri spontan dismutasyona uğrayabilirler. Bu non-enzimatik olayın hızı enzimatik dismutasyona göre yavaştır. Spontan dismutasyonun hızı pH 7.4'te $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ dir. Oysa enzimatik dismutasyonun hızı aynı pH'da $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ dir. Enzim katalizörlüğünde reaksiyon 10^4 kat daha hızlı gerçekleşmektedir. SOD miktarı ve aktivitesi dokuların $p\text{O}_2$ 'ı arttıkça artmakta, $p\text{O}_2$ azaldıkça azalmaktadır. Enzimin çok yüksek aktivitesi düşünüldüğünde enzimatik dismutasyon hızının sadece süperoksitin diffüzyon hızıyla kısıtlanabileceği görülür. Enzim, oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksitin zararlı etkilerine karşı korur. Böylelikle hücrelerdeki lipid peroksidasyonu da inhibe olur (44).

Kofaktör olarak içerdikleri metal iyonlarına göre başlıca 3 tip SOD vardır: a) Cu-Zn SOD b) Mn SOD c) Fe SOD. İnsanda Cu-Zn SOD ve Mn SOD izomerleri bulunur. Fe SOD izomeri ökaryotik hücrelerde bulunmaz (45).

a)Cu-Zn SOD: Ökaryotik hücrelerin, sitozol, nükleer membran ve mitokondri-lerin membranlar arası bölgelerinde bulunur. Prokaryotlarda nadiren mevcuttur. 15600-16500 dalton ağırlığında iki monomerden oluşan bu dimerik enzimin toplam molekül ağırlığı 31000-33000 dalton arasındadır (44,46). Her bir alt birimde, bir Cu atomu, bir Zn atomu, bir sülfhidril grubu, bir asetillenmiş terminal amino grubu ve zincirleri bir arada tutan bir zincir içi disülfid bağı bulunmaktadır. Merkaptotanol, bu S-S köprüsünü redüksiyona uğratar, S-H haline getirir ve iki monomer birbirinden ayrılır (28,45,47).

Enzimin aktivite gösterebilmesi için Cu^{+2} bulundurması zorunluysen, enzimin stabilitesini sağlamaya yarayan Zn^{+2} 'nin yerine, Hg^{+2} , Cd^{+2} , Co^{+2} 'den herhangi biri geçebilir (44,48).

Cu-Zn SOD, hücrede en çok bulunan ve SOD izomerleri içerisinde en yüksek katalitik etkiyi gösteren alttıptir. Bu izomerin aktivitesi pH 5.5-10 arasında stabildir (28,49).

Bu enzim eritrositlerde de bulunur ve eritrositi hemolizden, membran lipitlerini peroksidasyondan ve hemoglobini ise methemoglobine oksidasyondan korur (45,49).

b)Mn SOD: Etki mekanizması Cu-Zn SOD ile aynıdır. Ökaryotlardaki tetramerik formun molekül ağırlığı 75000-90000 dalton arasındadır. (104) Dimer başına 0,5-1 atom karşılık gelecek şekilde +3 değerlikli mangan atomu içerir. (101) Cu-Zn SOD'dan farklı olarak siyanide dirençlidir. Monomerik peptid zinciri daha büyüktür ve pH değeri 7.8'in üzerine çıktıkça aktivitesi azalır (50,51).

2.4.11. Katalaz (CAT, H_2O_2 oksidoredüktaz: EC 1. 11. 1. 6)

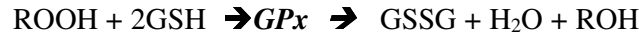
Katalaz enzimi yapısında dört adet hem grubu içeren alt üniteden oluşmuş kompleks bir hemoproteindir. Yapısında protestetik grup olarak Fe^{+3} içeren bir protoporfirin IX bulunur. Her alt birime bağlı bir molekül NADPH vardır. Her bir alt birim yaklaşık olarak 6000 dalton civarında bir molekül ağırlığına sahiptir. Katalaz, sitokrom sistemi içeren tüm aerobik hücrelerde bulunur (28,52). Enzim en çok peroksizomlarda olmak üzere endoplazmik retikulum ve sitozolde bulunur. Enzimin

aktivitesinin en yüksek olduğu organlar, karaciğer, böbrek, miyokard, çizgili kaslar ve eritrositlerdir (52-53).

Katalazın en önemli görevi H_2O_2 'in enzimatik yıkılımıdır (katalitik aktivite). Ancak H_2O_2 konsantrasyonu düşük olduğunda katalaz, küçük moleküllü elektron vericilerini indirgeyebilmekte (peroksidatik aktivite), lipid hidroperoksitler gibi büyük moleküllere etkili olamamaktadır (52,54).

2.4.12. Glutasyon Peroksidaz (GPx, Glutasyon H_2O_2 oksidoredüktaz: EC 1.11.1.9)

GPx, hidroperoksitlerin indirgenmesinde rol oynayan, 84000 dalton molekül ağırlığa sahip, sitozolik bir enzimdir. Tetramerik yapılı olup ve her monomerde birer adet olmak üzere 4 adet selenyum atomu içermektedir (45,47).



GPx'in aktif formu "*selenolat*" halidir ve peroksiti alkole indirgerken kendisi oksitlenerek "*selenik asite*" dönüşür. Redükte glutasyon, selenik aside bağlanır ve onu selenosülfite haline dönüştürür. İkinci bir glutasyon selenosülfide bağlanmasıyla enzim tekrar aktif formu olan "*selenolat*"a dönüşür. Enzim böylelikle yeni bir döngüye girmeye ve kullanılmaya hazırdır. Bu enzimatik reaksiyon sırasında, iki molekül redükte glutasyon oksitlenmiş olur. Oksitlenmiş glutasyonun tekrar döngüye girip kullanılabilmesi için NADPH ile indirgenmesi gerekir. Bu indirgenme olayını riboflavin içeren bir flavoprotein olan "*glutasyon redüktaz*" katalizler.



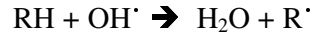
Şekil 3. Hidrojen peroksitin yıkılımı ve glutasyonun yeniden redüklenişi

2.4.13. Malondialdehid (MDA)

Lipid peroksidasyonu, A. L. Tappel tarafından “poliansatüre lipitlerin oksidatif bozulması” olarak tanımlanmıştır. Hücre ve organelleri çevreleyen membranlar, büyük oranlarda poliansatüre yan zincirlere sahiplerdir. Bu membranlarda, katıldıkları fonksiyonlarla orantılı olarak bulunan proteinlerin miktarı da artar. Bu durumda, lipidlerin yanısıra membrandaki proteinler de peroksidasyondan zarar görmektedir (55).

PUFA'lar, serbest radikallerin etkisine en duyarlı lipit yapılarıdır. Yağ asitlerinin peroksidasyonu, membranların akışkanlığı, geçirgenliği, hareket yeteneği ve transmembranik iyonik gradientleri bozulur. Oluşan tüm bu membran hasarları geri dönüşsüzdür (56).

Lipit peroksidasyonu, otooksidasyon olayları zinciridir. Organizmada oluşan reaktif serbest radikaller ile membran yapısında bulunan doymamış yağ asitlerinin (RH), karbon zincirindeki metilen gruplarının birinden bir H atomunun çıkarılmasıyla başlar. PUFA'nın karbon zinciri doymamış bir lipit radikali (R[•]) haline gelir. Bu reaktif radikaller içerisinde oksidasyonu en kolay şekilde başlatan OH[•] radikalidir.



Oluşan lipit radikali çok kararsızdır ve kararlı hale gelmeye çalışır. Bunun için çift bağların yerleri değişir ve “*dien konjugatı*” oluşur. Bu konjugatın oksijene maruz kalmasıyla lipit peroksil radikali (ROO[•]) meydana gelir. ROO[•] radikalleri kendi yapılarındaki değişimler sonrasında, endoperoksitleri oluştururlar. Ardından da, membran yapısındaki diğer PUFA'ların oksitleyerek yeni zincir tepkimeleri başlatırlar. Bunun için, PUFA'dan bir H atomu koparıp lipit hidroperoksitlere (ROOH) dönüştürler. Bu olaylar tekrarlayarak yayılır ve sonuçta oluşan ROOH; yüksek sıcaklığa maruz kalana kadar veya süperoksit anyonu, peroksil radikali ya da transiyon grubu metal iyonları ile temas edene kadar kararlı halde kalır. Lipit hidroperoksiller bu maddelerle karşılaştığında, parçalanırlar ve daha reaktif radikallere (lipit alkoksil: RO[•], lipit peroksil: ROO[•], aldehit, lipit aldehit ve alkil radikalleri) dönüştürler. Bunlardan özellikle lipit aldehitler (en bilinenleri 4-hidroksinonenal ve malondialdehittir), hücrenin diğer kısımlarına ulaşır hasarın yayılmasına neden olurlar. (55,57,58).

MDA, lipitlerin çoğunun oksidasyonu sırasında sadece küçük miktarlarda üretilir. Ancak demir tuzları varlığında karaciğer mikrozomlarında üretimi artar. MDA;

linolenik, araşidonik ve dokozahekzaenoik asitlerin peroksidasyonunun dışında, enzimatik olarak da oluşur (55).

Ortam pH'ı MDA'nın reaktivitesini etkileyen bir faktördür. Fizyolojik pH'ta MDA "enolat" anyonu şeklindedir ve reaktivitesi düşüktür. pH düştükçe, reaktivitesi artar. Fizyolojik şartlarda, serbest amino asitlere göre proteinler daha fazla MDA saldırısına maruz kalırlar. Meydana gelen modifikasyonlar sonucunda, intra-moleküler ve inter-moleküler protein çapraz bağları oluşur. MDA, DNA bazlarıyla da reaksiyona girip, mutasyonlara neden olabilir (55).

MDA dışında lipit peroksidasyonu sonucu ortaya çıkan başka aldehit bileşikleri de mevcuttur. Bunlar sıcak ortamda tiyobarbitürik asitle pembe renkli kromojenler oluşturdukları için, lipit peroksitlerin ölçümünde bu özellikten yararlanılır. Bu bileşiklerin tümüne birden kullanılan aside atfen "tiyobarbitürik asit reaktif maddeler" denilir ve kısaca "**TBARS**" şeklinde ifade edilir.

2.5. E Vitamini

Vitamin E, 1936'da Evans ve Sure adlı araştırmacılar tarafından izole edilmiştir. Deneysel olarak ratların bu bileşiği aldığında sağlıklı bir nesil sahibi olduklarını gözlemlediğinden Evans bu bileşiğe (tokos= doğurmak, phero= taşımak ve bileşiğin bir alkol olması nedeniyle "ol") "tokoferol" adını vermiştir. Evans ve Sure yapıları bakımından birbirlerine benzeyen iki bileşik elde etmişler ve bunlara alfa ve beta tokoferol adını vermişlerdir (59).

Daha sonra yapılan araştırmalarda bu grupta ilişkili iki bileşik daha bulunmuş, bunlara da gama ve delta tokoferol adı verilmiştir (60).

Tokoferoller açık sarı renkte ve yapışkan kıvamda maddelerdir. Bunlar lipitlerde ve birçok organik eriticide erirken, suda erimezler; bununla beraber alfa tokoferolün sodyum fosfat esterini suda erir. Vitamin E ısıya, alkalilere, asitlere ve ışığa karşı dayanıklıdır, fakat ultraviyole ışınlar karşısında kolayca bozular (60). Oksitlenince biyolojik etkisini kaybeder, oksijensiz ortamda 200 ° C'a kadar sıcaklığa dayanıklıdır (61).

Vitamin E aktivitesi gösteren bileşikler tokol veya tokotrienol çekirdeğine sahiptir. Her iki çekirdekte de 6-hidroksi kroman aromatik halkası vardır. Tokol ve tokotrienolü birbirinden ayıran 13 karbonlu yan zincirdeki çift bağların varlığıdır (59,62).

Sentetik dL- α - tokoferil asetat'ın 1 mg'ının aktivitesi 1 Uluslararası Birim vitamin E olarak kabul edilmiştir.

2.5.1 Vitamin E'nin Metabolizması

Oral yolla alınan tokoferol yağlar ve safra tuzlarının yardımıyla barsaktan kolayca emilir. Vitamin E plazmada β -lipoproteinlere bağlı olarak taşınır ve safra ile nisbeten küçük miktarlarda atılır.

Vitamin E karaciğer ve yağ dokularında depo edilir. Yaş ile depolama kapasitesi artar, ayrıca dişi hayvanların birçok organının erkekler göre daha yüksek miktarda vitamin içerdiği bulunmuştur. Bütün hayvanlarda vitamin E miktarı hipofizde, adrenal bezlerde ve uterusu daha yüksek bulunmuştur. Hücre içerisinde ise tokoferol mitokondri, mikrozom ve lizozomlarda konsantre olur.

2.5.2 Vitamin E'nin Biyokimyasal Etkisi

Biyolojik membranlardaki oksidatif bozulmada esas olan maddeler fosfolipit bileşikleridir. Fosfolipitlerdeki yapısal değişiklikler membranın yapısal harabiyetine ve hücre bütünlüğünün bozulmasına yol açar. Membranların lipit peroksidasyonundan fazla etkilenmeleri, fosfolipit bileşiklerinin çoklu doymamış yağ asiti taşımaları nedeniyledir.

Peroksidasyon oranı, fosfolipitlerde bulunan yağ asitlerindeki çift bağların sayısı ile doğrudan ilgili olduğundan, fosfolipitlerinde çoklu doymamış bağ içeren yağ asitlerini bulduran membranlar, lipit peroksidasyonuna dayanıksızdırlar. Selenyum ve vitamin E'nin her ikisinin de diyetle yeterince bulunmasının doku homojenatlarında, mitokondri ve mikrozomlarda lipit peroksidasyonunu engellediği bildirilmiştir (63).

2.5.3. Vitamin E'nin Antioksidan Etki Mekanizması

Özellikle α -tokoferol çok kolay oksitlenebilme yeteneğine sahiptir. Vitamin E'nin biyolojik ortamlarda gerçekleştirdiği işlev büyük oranda bu özelliğine dayanmaktadır. Antioksidan karakteri nedeniyle vitamin E aktif radikallerle reaksiyona girerek oksidasyona duyarlı moleküler yapıların istenmeyen oksidasyonlarının önlenmesinde ya da azaltılmasında etkili olur (64).

Vitamin E, serbest radikal türlerini toplayarak peroksidasyonun erken döneminde zar fosfolipitlerindeki çoklu doymamış yağ asitlerini korumada oksidatif

strese karşı ilk savunma hattını oluşturur (35,38). Bir diğer yol ile de singlet oksijen, süperoksit ve daha çok hidroksil radikallerini indirger (36). Bu işlevini peroksidasyon reaksiyon zincirini sonlandırarak gerçekleştirir. Vitamin E; radikal giderme, baskılama, onarma ve endojen savunmayı artırma mekanizmalarının tümünü kullanabildiğinden çok hızlı ve geniş bir antioksidan etki kapasitesine sahiptir (38).

Hücre genetik yapısı açısından güçlü bir mutajen oksidan metabolit olan peroksinitritin oluşum reaksiyonlarının önlenmesinde ve hem peroksil hem de nitrik oksitin toplanmasında gama tokoferol bir antioksidan olarak rol almaktadır (65). Vitamin E katkılı yemle beslenen ratlarda intraselüler antioksidan enzimler olan SOD (66) ve katalaz (37) düzeylerinin arttığı gösterilmiş, bu yolla vitamin E'nin endojen antioksidan savunma performansını yükselttiği ileri sürülmüştür. Tokoferolün antioksidan aktivitesi, birçok antioksidan savunma elemanının yetersiz kaldığı, oksijenin yüksek konsantrasyonlarında bile etkilidir. Eritrositler ve alveoler membranlar bu durumu açıklayan önemli örnekler olarak gösterilebilir (34,36,37).

Hayvan ve insanlarda yapılan çalışmalar tokoferollerin, mide, mesane, kolon, karaciğer, deri, meme, prostat ve akciğer kanseri gibi deneysel olarak oluşturulan veya spontan meydana gelen tümörlerin gelişmesini geciktirici hatta iyileştirici bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Kanserli organizmalarda azalan antioksidan kapasite ve kansere bağlı olarak bozulan metabolizmanın, periferik beslenme düzensizliği ve inflamasyon ile ilişkili olduğu sanılmaktadır (67-70).

Erişkin bireylerin % 30'unun sorunu olan hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalıklar antioksidanlardan yetersiz beslenmenin bir sonucu olup, özellikle vitamin E eksikliğinin rolü üzerinde durulmaktadır. Vitamin E yetmezliği olan kişilerde membran lipitlerinin ve özellikle omega 3 yağ asitlerinin radikal metabolitlerce yıkımı önlenememektedir. Ayrıca bu bireylerde membran geçirgenliği ve hareketliliğin azaldığı, hemoliz ve eritrosit fragilitesinin arttığı gözlenmiştir. Vitamin E'nin LDL oksidasyonunu önlediği ve bunu yaparken Cu^{+2} iyonlarını indirgeyen bir mekanizma ile çalıştığı ileri sürülmüştür. Trombosit membranı vitamin E miktarındaki artışın bu hücrelerde agregasyon yeteneğini düşürdüğü ve bu sayede vitamin E'nin trombosit agregasyonunu önleyebildiği ileri sürülmüştür (71-75).

Araştırmalara göre, UV, radyasyon ve ozona maruz bırakılan hayvanlarda α -tokoferol ve β -karoten uygulamaları SOD ve katalaz gibi hücresel endojen antioksidanların aktivitelerini artırarak deri hücrelerindeki yıkımı azaltmaktadır (65,76).

Deri yanıkları ve operasyon yaraları dahil çeşitli tipteki yaralanmaları takip eden dermizasyon ve epidermizasyonun vitamin E ile ilişkili olduğu gözlenmektedir (77).

Vitamin E'nin hücre içi kinaz kayıplarını önleyerek ya da en aza indirerek oksidasyonu ve diğer yıkımları önleyebileceği şeklinde bir mekanizmadan da söz edilmektedir. Aynı yolla kaslarda egzersize bağlı oksidatif stresin giderildiği, kasların fiziksel performansının artırıldığı ve dejeneratif nörolojik hastalıkların önlendiği sanılmaktadır (61,78,79).

Tanımlandığı ilk dönemlerde yalnızca fertilitede rol alan bir vitamin olduğu sanılan vitamin E'nin yıllar sonra antioksidan etkilerinin varlığı keşfedilmiştir. Vitamin E sadece oksidasyon reaksiyon zincirini kopararak antioksidan aktivite gösterdiği zannedildiğinden "zincir kırıcı antioksidan madde" olarak tanımlanmıştır. Günümüzde ise vitamin E'nin radikal giderme, zincir kırma, baskılama, onarma, hücrel kinaz kayıplarını önleme ve endojen savunmayı artırma mekanizmalarının tümünü kullanarak antioksidan etki gösterdiği ve bu nedenle geniş bir antioksidan etkiye sahip olduğu anlaşılmıştır.

2.6. Sarımsak

Sarımsak (*Allium Sativum*) Orta Asya'dan köken alan ve günümüzde 600'den fazla türü bilinen bir bitkidir. Tüm dünyada fizik ve mental sağlığı arttırmak için fonksiyonel bir besin, baharat ve ev ilacı olarak kullanılmaktadır. Antioksidan, antibakteriyel, antikarsinojen, antitrombotik, hipolipidemik ve diğer bir çok etkiye sahiptir. Son yıllarda sarımsağın antioksidan etkisi ve yaşlanma ile ilişkili çeşitli hastalıkların önlenmesindeki etkisine yönelik çalışmaların yanısıra, antikanser etkisi üzerinde de durulmaktadır (80-83).

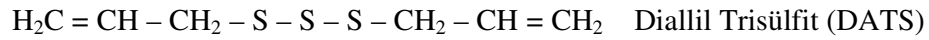
2.6.1. Sarımsağın İçeriği ve Sarımsak Preperatları

Sarımsağın ortalama % 65'i sudur. Kalanı ise fruktoz gibi karbohidratlar, sülfür bileşikleri, proteinler, lifler, serbest amino asitler yanısıra yüksek oranda saponinler, fosfor, potasyum, çinko ve orta düzeylerde selenyum, vitamin A ve C ile düşük düzeylerde vitamin B ve diğer bazı minerallerden oluşur. Ayrıca yüksek oranda fenolik bileşikler içerir (81,84).

Sarımsağa karakteristik kokusunu veren ve biyolojik aktivitesini sağlayan içerdiği organosülfür bileşiklerdir (85). Bu bileşiklerin % 85'ini alliin ve iki γ -glutamil

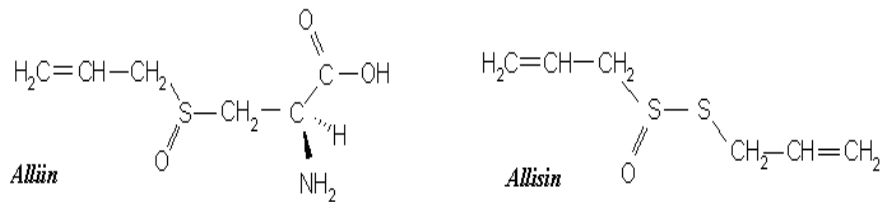
sistein oluşturur. Alliin, sarımsağın terapötik olarak aktif sülfür komponentidir (81). Sarımsak ezildiğinde, kesildiğinde veya çiğnendiğinde, alliin allinaz adlı enzimle reaksiyona girer ve allisin oluşur.

Allisin çok kararlı bir bileşik değildir. Saf allisinin oda sıcaklığındaki ömrü 2-16 saattir (86). Allisin hızla organosülfür bileşiklerine dönüşür. Bu bileşikler, diallil sülfid (DAS), diallil disülfid (DADS), diallil trisülfiddir (DATS). Bu bileşiklerin antikanserojen antiproliferatif, antioksidan özellikleri vardır (87).



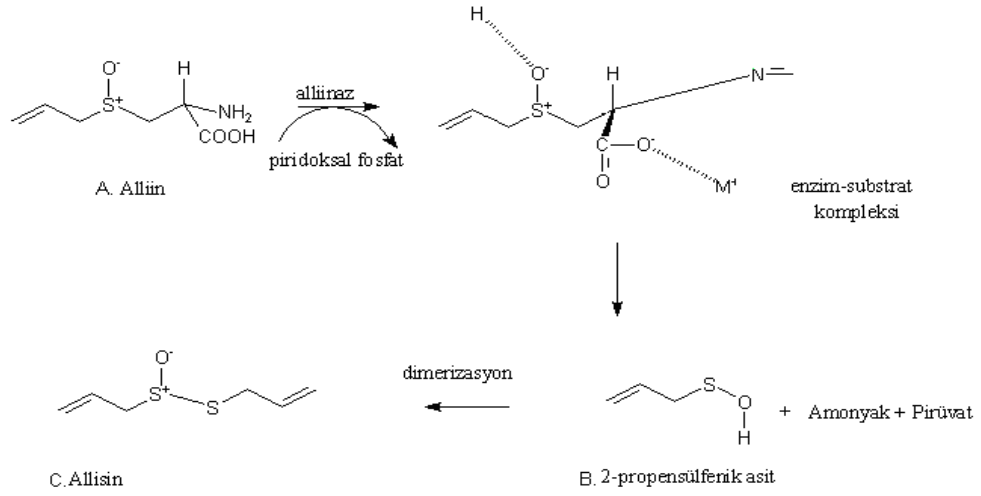
Sarımsağın içerdiği organosülfür bileşiklerinin biyolojik aktivitelerini, bileşimlerinde bulunan sülfür ve allil gruplarının sayısı belirler. Yapılan çalışmalarda DAS ve DADS'ın sadece Faz I ve Faz II metabolizma enzimlerini düzenlemekle kalmayıp, antioksidan sistem kapasitesini de iyileştirdiği belirlenmiştir (88-91).

Sarımsağa gösterilen yoğun ilgi nedeniyle uzun yıllardan beri, sarımsağın bir çok ticari preperatı üretilmiştir (81). Bu sarımsak preperatlarının hazırlanmasında, buhar distilasyonu, su çıkarma, kurutup toz haline getirme, alkole batırma gibi bir çok farklı metod kullanılmıştır. Bunların her birinin fizyolojik aktiviteleri farklıdır. Ticari olarak satılan bazı preperat türleri; dehidrate sarımsak tozu, sarımsak yağı, doğal sarımsak suyu ve kuru sarımsak ekstresi ve benzeridir. Bu preperatlar aktif bileşenlerinin farklılığı nedeniyle farklı etkinliktedirler. Örneğin; doğal sarımsak suyunda ajoene, kuru sarımsak ekstresinde S-allil-L-sistein ve buharda distile sarımsak yağında metil allil trisülfid denilen organosülfür bileşikler bulunmaktadır (87).



Şekil 4. Alliin ve alisin molekülleri

<http://www.chm.bris.ac.uk/webprojects2001/gray/morechemistry.htm>



Şekil 5. Alliinden, allisin oluşumu

<http://www.chm.bris.ac.uk/webprojects2001/gray/morechemistry.htm>

2.6.2. Sarmısağın Genel Etkileri

Bitkisel besinler açısından zengin diyetle beslenmek kronik hastalıkların ortaya çıkmasını önler. Bu besinlerden biri de sarımsaktır. Sarımsak tüm dünyada ateroskleroz, kanser, immun bozukluklar, yaşlanma, artrit, katarakt oluşumu, enfeksiyon ve tromboz oluşumu gibi çok çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (81,83,92).

Sarımsak; LDL kolesterolü ve oksidasyonunu azaltır, HDL kolesterolü artırır (81,92,93), ancak lipit ve lipoproteinler üzerine kanıtlanmış bir etkisi yoktur (18-19-20).

Sarımsak hücre içi kalsiyum mobilizasyonunu ve tromboksan-A2 sentezini inhibe ederek trombosit agregasyonunu baskılar, trombüs oluşumunu azaltır ve fibrinolitik aktiviteyi artırır (80,81,92). Sarımsak ekstresinin orta düzeyde bir anjiotensin dönüştürücü enzim inhibitörü etkisi de vardır (94,95).

Epidemiyolojik çalışmalar, sarımsağın kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu etkisi olduğunu düşündürmektedir. Kronik sarımsak tozu alımıyla aort sertliğinde yaşa bağlı artışlarda ve aort elastikiyetindeki azalmada gerileme görülmüştür (96). Ayrıca antiaritmik etkide olduğu ve miyokardı da nekrozdan koruduğu bildirilmiştir (97).

Sarımsak “endotelial nitrik oksid sentaz” (eNOS) aktivasyonuna, düz kas hücre membranı hiperpolarizasyonuna, akciğer damar tonusunda azalma ve “indüklenebilir

NOS” (iNOS) aktivitesinde azalmaya neden olur. Sarımsak NOS’dan bağımlı ve bağımsız bazı mekanizmalarla akciğer damar tonusunu azaltır ve hipoksik pulmoner hipertansiyonda yararlı olur (98,99).

Sarımsak kolon, akciğer ve deri kanseri hücrelerinin çoğalmasını inhibe eder, lipid peroksidasyonu azaltır ve antioksidan savunma mekanizmalarını düzenler. Ajoene, allisin, DAS, DADS ve DATS gibi organosülfür bileşiklerinin antikanserojen etkileri güçlüdür (92,100,101). Bu etkiyi organosülfürlü bileşikler muhtemelen NADPH: kinon oksiooredüktazı indükleyerek yaparlar (102).

Taze hazırlanmış sarımsak homojenatının aktif bileşeni allisindir ve antimikrobiyal etkidedir. Allisinin bu etkisine antibakteriyel, antifungal, antiparaziter ve antiviral etkileri dahildir.

Ancak tüm bu faydalı etkilerine ek olarak sarmısağın yüksek dozlarda kullanımı toksik etkilere yol açabilir. Deneysel çalışmalarda sıçanlara 24 saatlik açlıktan sonra 100mg/kg vücut ağırlığı dozunda sarımsak yağı verilmesinin ölümcül olduğu bildirilmiştir (103). Ayrıca duyarlı kişilerde sarımsak kontakt dermatit ve astmaya neden olabilmektedir (104).

2.6.3. Sarmısağın Antioksidan Etkisi

Sarmısağın en önemli biyokimyasal özelliklerinden biri antioksidan etkisidir. Sarmısağın en önemli bileşenlerinden olan allisin düşük konsantrasyonlarda antioksidan özellik gösterirken, yüksek konsantrasyonlarda pro-oksidan gibi davranabilir. Bazı deneysel çalışmalarda da DAS ve DADS’ın antioksidan etkinlikleri yüksek düzeyde bulunurken, DATS’ın etkinliğinin sınırlı olduğu belirlenmiştir (82,105).

Sarımsak yağının sıçan karaciğer ve eritrositlerindeki antioksidan sistemlere etkisini inceleyen bir çalışmada, eritrositlerde en fazla DATS olmak üzere, sarımsak yağı ve DADS’ın GSH miktarını önemli oranda arttırdığı, ancak karaciğer GSH’ını bu bileşenlerin hiç birinin etkilemediği saptanmıştır. Sıçan karaciğerinde DADS ve DATS, GSH redüktaz ve GSH S-transferaz aktivitesini anlamlı ölçüde arttırmış ancak GSH peroksidaz aktivitesini azaltmıştır (82).

Sarmısağın etanolde çözünen bileşeni, sıçan karaciğerinde tiyobarbitürik asit reaktif maddelerinin (TBARS) oluşumunu önler ve membranları lipid peroksidasyonuna karşı korur (106).

Kuru sarımsak ekstresi de eritrositlerde TBARS oluşumunu önleyerek lipit peroksidasyonunun neden olduğu eritrosit deformabilitesindeki azalmayı engeller, mikrosirkülasyonu düzenler. Böylelikle eritrositlerin yapı ve işlevi korunmuş olur (107). Sarımsak ve aktif bileşenleri genel olarak kalp, karaciğer, akciğer, beyin ve böbrek gibi çeşitli dokularda SOD, CAT, GSH-peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerini arttırmakta ve lipit peroksidasyonunu azaltmaktadır. Sonuç olarak lipit peroksidasyonuna ve oksidatif hasara bağlı olarak gelişen kronik hastalıkların önlenmesinde etkili olmaktadır (81, 92, 108).

2.7. Melatonin

Melatonin; pineal bezden (epifiz bezi) karanlıkta salgılanan, uyku, üreme, sirkadiyen ritim ve immünite gibi pek çok biyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde rol oynayan, 1958 yılında dermatolog Lerner tarafından tanımlanmış önemli bir hormondur (109,110).

Pineal bez memelilerde, ışık bilgisini nöroendokrin sinyallere dönüştürür, retinadan alınan görsel uyarılara cevap olarak melatonin ve başka hormonları salgılayabilir (109,110).

Melatonin sentezi gece-gündüz döngüsüne bağlı olarak sirkadiyen ritim gösterir. Aydınlıkta hiperpolarize olan retinal hücreler, karanlıkta depolarize olduklarında, melatonin sentezine başlarlar. Karanlıkta fotoreseptör hücrelerden salgılanan norepinefrinin etkisiyle, hem triptofanın dolaşımdan beze girişi artar, hem de b1 reseptörleri aracılığıyla membrandaki adenil siklaz aktive olur. Böylece intraselüler cAMP seviyeleri yükselir. Melatonin sentezi, dolaşımdaki triptofanın aktif transportla pinealosit içine alınmasıyla başlar. Hidroksilasyon reaksiyonuyla 5-OH triptofan oluşur. Sonra o da dekarboksile olarak serotonine dönüşür. Serotoninden de N-asetilasyon reaksiyonu ile melatonin (5-metoksi-N-asetiltriptamin) oluşmaktadır. Erişkinlerde gece, gündüze göre melatonin konsantrasyonu 3-10 kat daha yüksektir, ancak yaşlanma ile birlikte sentez azalır (111-115).

Melatonin sentezlendikten sonra pineal bezden doğrudan dolaşıma verilir. Lipofiliktir ancak, membran reseptörleri aracılığıyla hedef hücrelerine ulaşır. Beyinde çeşitli bölgelerde, ovaryumlar, barsak, kan damarları (109) ve karaciğerde (116), melatonin reseptörleri mevcuttur. Melatonin için ayrıca, sitozolik ve nükleer bağlanma reseptörleri de tanımlanmıştır (109).

Melatoninin başlıca yıkılım yeri karaciğerdir. İndol halkası 6. konumdan hidroksile olur, daha sonra sülfat veya glukuronik asitle konjugasyona uğrayarak idrarla atılır. Melatonin'in idrardaki başlıca metaboliti olan 6-sülfatoksi-melatoninindir ve bunun ölçümüyle de, sentez ve yıkıma ait bilgi edinilebilir (117).

2.7.1. Melatoninin Antioksidan Etkisi

Melatoninin antioksidan özelliği üç ana başlık altında toplanabilir :

1-Direkt antioksidan etki: Melatoninin OH[•], H₂O₂, O[•]₂, HOCl, NO[•], ONOO⁻ gibi oksidatif strese yol açabilen serbest radikalleri detoksifiye ettiği gösterilmiştir. Melatoninin antioksidan özelliği, yapısındaki pirol halkasından kaynaklanmakta olup, bu pirol halkasının enzimatik ya da nonenzimatik olarak yıkılmasıyla, N1-asetil-N2-formil-5-metoksikinüramin (AFMK) oluşur. Melatonin H₂O₂ varlığında da AFMK oluşturur. Bu metabolitin radikal tutucu aktivitesi vardır(117-119).

Melatonin yüksek affinite ile OH[•] radikalini bağlar ve indolil katyon radikalini oluşturur. Bu radikal de, O[•]₂'i yakalayarak AFMK'e dönüşür. AFMK, daha sonra arilamin formamidazın katalizlediği reaksiyonla N 1-asetil-5-metoksikinüramin (AMK)'e çevrilmektedir. İndolil radikalinin OH[•] varlığında oluşturduğu "3-hidroksimelatonin" metabolitinin idrar düzeyleri, radikal üretiminin bir göstergesi olarak kullanılabilir (117).

Yapılan çalışmalar, melatoninin en güçlü antioksidanlardan biri olduğunu kanıtlamıştır. Melatonin yayılmakta olan lipid peroksidasyonunu peroksil radikaline bağlanarak sonlandırır. Melatonin GSH'a göre 5 kat ve mannitole göre 14 kat daha güçlü şekilde OH[•] radikalini yakalar. Melatonin, NO[•] oluşumunu azaltan en güçlü indoldür ve in vitro şartlarda, ONOO⁻'in yol açtığı oksidasyonu önler ve ayrıca kendisi nitrasyona uğrayarak ONOO⁻'i detoksifiye eder; in vivo enflamasyon modelinde de nitrotirozin oluşumunu baskılar (117-119).

2- Antioksidan Enzim Aracılı Etki: Farmakolojik ve muhtemelen fizyolojik düzeylerde melatonin, SOD, GSH-Px, GSSG, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) ve g-glutamilsistein sentetaz gibi bazı antioksidan enzimlerin gen ekspresyonlarını veya aktivitelerini arttırarak oksidatif stresi baskılar (118,119).

3-Prooksidan Enzim Aracılı Etki: Melatoninin bazı prooksidan enzimleri inhibe ederek, serbest radikal oluşumunu azaltır (118,119). iNOS aktivitesi, fizyolojik melatonin düzeylerinde inhibe olur (121).

Melatonin hem suda ve hem de lipid fazda çözünebildiğinden, antioksidan etkisi organizmanın her bölgesine ulaşabilir. Kan-beyin bariyerini ve plasentayı geçer ve hücrenin tüm bölümlerine rahatlıkla ulaşarak, organizmayı serbest radikal hasarından korur. Hücre membranındaki fosfolipid tabakanın dış yüzeyine tutunan melatonin, radikallerle membrandan önce temasa geçerek onları etkisiz hale getirir ve membranı korur. Melatonin varlığında, elektron taşıma sisteminden kaynaklanan O^*_2 , H_2O_2 ve OH^* gibi radikallerin üretimi de azalmaktadır. Melatonin nükleusa kadar ulaşır ve DNA'yı oksidatif hasardan korur (111). Melatonin ayrıca, adezyon moleküllerinin ve inflamasyonda rol alan sitokinlerin sentezini azaltmaktadır (122).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Sıçanların temini ve deney grupları

Bu çalışmada kullanılan Wistar albino tipi erkek sıçanlar, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Merkezi (FÜTDAM)'dan alındı. Deney boyunca, havalandırması olan ve güneş ışığı alan odalarda, deney kafeslerinde tutulan sıçanlara yeterli miktarda standart pellet yem verildi.

Grup-1: Kontrol Grubu (n=8): Deney süresince sıçanlara normal besinlerine ilaveten içme sularına katılmak suretiyle % 1 oranında alkol verildi.

Grup-2: Alkol Grubu (n=8): Normal besinlerine ilaveten sıçanları alkole alıştırmak için başlangıçta içme sularına 3 gün süresince % 2.4 oranında, sonraki 3 gün süresince de % 5 oranında alkol eklendi. Daha sonra sularındaki alkol oranı % 10'a çıkarılarak 6 hafta boyunca bu oran korundu.

Grup 3: Sarımsak Grubu (n=8): Alkol grubuna benzer şekilde beslendi. % 10 oranındaki alkole ilaveten 6 hafta boyunca her gün gavaajla 250 mg/kg/gün dozunda çiğ sarımsak homojenatı verildi.

Grup 4: E vitamini Grubu: (n=8): Alkol grubuna benzer şekilde beslendi. % 10 oranındaki alkole ilaveten 6 hafta boyunca haftada iki kez, oral yoldan 200 mg/kg dozda E-vitamini verildi.

Grup 5: Melatonin Grubu (n=8): Alkol grubuna benzer şekilde beslendi. % 10 oranındaki alkole ilaveten 6 hafta boyunca her gün 10 mg/kg/gün dozunda melatonin cilt altına enjeksiyon yoluyla uygulandı.

3.2. Kan ve dokuların elde edilmesi ve analizlere hazırlanması

Deney protokolünün 6. haftası tamamlandıktan sonra sıçanlar genel anestezi altında sakrifiye edildi. Bunun için sıçanlara 75 mg/kg ketamin ve 5 mg/kg xylasine periton içine uygulanarak genel anestezi sağlandı. Karın derisi ve deri altı dokular açılarak, barsaklar dışarı alındı. Heparinle yıkanmış enjektörlerle, vena cava inferiordan kan örnekleri alındı ve 3000xg'de 10 dakika santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. Ratlar abdominal aortaları kesilip, kanatılarak öldürüldüler. Karaciğer, karın içi boşluğa bağlayan damar ve ligamanları kesilerek dışarı alındı. Kapsülü sıyrıldıktan sonra, vena hepatica'dan verilen SF ile perfüze edildi. Perfüze karaciğer dokusu sağ ve sol loblara

ayrıldıktan sonra, sağ lob % 10'luk formaldehit çözeltisine konularak patoloji laboratuvarına gönderildi. Sol lob dört eşit parçaya bölündükten sonra biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere alüminyum folyaya sarılarak, etiketlendi ve biyokimyasal analizlerin yapılacağı zamana kadar -20°C derin dondurucuda yaklaşık iki ay süreyle saklandı.

3.3. Doku Homojenizasyon Tamponları

a) 100 mmol/L Fosfat tamponu: 100 mL 0,2M KH_2PO_4 ve 50 mL 0.2 N NaOH hazırlanır. Yaklaşık 8 hacim KH_2PO_4 , 3 hacim NaOH ile karıştırılarak pH=7.0 fosfat tamponu elde edilir. İyonik konsantrasyonu 100 mM'a ayarlamak için, 100 ml karışıma 100 ml distile su eklenir.

b) % 1,5'lik KCl çözeltisi: 100 ml distile suya 1,5 gr KCl eklenerek çözünmesi sağlanır. TBARS çalışırken bu tampon homojenizasyon için kullanılır.

c) GPx tamponu: GPx analizi için son konsantrasyon 1 mmol/L olacak şekilde 100 mmol/L'lik fosfat tamponunun bir litresine 70 uL merkaptotanol eklenir.

3.4. Biyokimyasal Analizler

Deneyden önceki akşam sıçanlara ait karaciğer doku örneklerinden bir tanesi derin dondurucudan çıkartılarak buzdolabı ortamına alındı ve çözünmesi sağlandı. Ertesi sabah buzdolabından çıkarılan dokular serum fizyolojikle yıkanıp kurulandıktan sonra, makasla küçük parçalara ayrıldı. Doku ağırlığı tespit edildikten sonra, içi buz dolu kaplara yerleştirildi. Üzerlerine 10 volüm tampon 1/10 (w/v) ilave edildikten sonra homojenize edildi. Yöntemlerin benzerliği ve bir arada çalışılabilirliği göz önüne alınarak testler üç günde çalışıldı. Birinci gün; GSH, SOD ve CAT, ikinci gün MDA ve NO, üçüncü gün ise GPx çalışıldı. Tüm çalışmalar için yaş doku ağırlıkları yanısıra, protein tayinleri de yapıldı.

3.4.1. Nitrik Oksit (NO) Tayini

Nitrik oksit, sentezlendiği andan itibaren hızla nitrit (NO_2^-) ve nitrat (NO_3^-) dönüşmektedir. Bu nedenle, NO miktarını tayin edebilmek için NO_2^- ve NO_3^- düzeylerinin ölçülmesi gereklidir. Nitrat doğrudan ölçülemediği için, nitrite dönüştürülerek dolaylı yoldan düzeyi tespit edilir (123).

Kullanılan Reaktifler:

1. Kadmiyum granülleri: 0,3-1,6 mm partikül büyüklüğünde granüller kullanıldı.

2. 55 mmol/L NaOH: 1,1 gr NaOH alınır bir miktar d. suda çözülür ve son hacim 500 mL'ye tamamlanır.

3. 75 mmol/L ZnSO₄: 10,8 gr ZnSO₄ alınır bir miktar d. suda çözülür ve son hacim 500 mL'ye tamamlanır.

4. 0.2 mol/L Glisin-NaOH tamponu (pH=9.7):

a. 7.5 gr glisin tartılır ve yaklaşık 400 mL d. suda çözülür.

b. 0,1 N NaOH çözeltisi

Hazırlanan glisin çözeltisinin tamamına, pH=9.7 olana kadar (yaklaşık 50 mL) 0,1 N NaOH çözeltisi ilave edilir. pH 9.7'ye ayarlanınca son hacim 500 mL'e tamamlanır.

5. 0.77 mol/L N-naftiletilediamin (NNDA): 50 mg NNDA bir miktar d. suda çözülür ve son hacim 250 mL'ye tamamlanır.

6. 58 mmol/L Sülfanilamid: 250 mL'lik balon joje içine 2.5 gr sülfanilamid eklenir ve üzerine yaklaşık 50 mL 3N HCl ilave edilerek çözünmesi sağlandıktan sonra son hacim 250 mL olacak şekilde yine 3N HCl ile tamamlanır.

7. 5 mmol/L Bakır sülfat (CuSO₄): 250 mg CuSO₄.5H₂O'ı bir miktar d. suda çözülür ve son hacim d.su ile 200 ml'ye tamamlanır.

8. 0.2 N H₂SO₄: 2,8 mL derişik H₂SO₄ alınır ve içerisinde içerisinde 250 mL d. su bulunan balon jojeye sürekli karıştırılarak aktarılır ve son hacim 500 ml'e tamamlanır.

9. NO₂ Standardı:

a. 10 mmol/L Na₂B₄O₇ çözeltisi: 760 mg Na₂B₄O₇ alınıp bir miktar d. suda çözülür. Son hacim 200 ml'ye tamamlanır.

b. 0,1 mol/L NaNO₂: 69 mg NaNO₂ bir miktar Na₂B₄O₇ çözeltisi içerisinde çözülür. Son hacim Na₂B₄O₇ ile 100 mL ye tamamlanır. Çözeltinin nitrit konsantrasyonu 10 mmol/L'dir. Bundan çalışma için dilüsyonlar yapılır.

10. NO₃ Standardı: 102 mg KNO₃ , bir miktar Na₂B₄O₇ çözeltilinde çözüldükten sonra son hacim Na₂B₄O₇ çözeltilisi ile 100 ml'ye tamamlanır. Çözeltinin nitrat konsantrasyonu 10 mmol/L'dir.

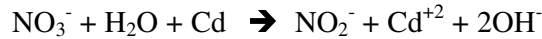
Not: Her iki standart çözelti de buzdolabında muhafaza edilir.

Deneyin Prensi: Deproteinize numunedeki nitrit, Griess reaksiyonuyla saptanır ve oluşan kromofor maddenin absorbanı 540 nm dalgaboyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. Ancak nitrat doğrudan ölçülemediği için, kadmiyum ile nitrite indirgendikten sonra ölçüm yapılır. Bu ikinci ölçüm "total nitrit" miktarını verir. Nitrat miktarı total nitrit ve direkt nitrit arasındaki farktan hesaplanır.

Deproteinizasyon: Numunelerden 0,5 ml alınıp, üzerine 2,5 ml NaOH pipetlenir. Tüpler vortekslenir ve üzerine 2 ml ZnSO₄ eklenir. Tüpler tekrar vortekslenir ve 3000xg'de santrifüj edilerek proteinler uzaklaştırılır. Çalışma için üstteki berrak kısım kullanılır.

Granüllerin Hazırlanması: Kadmiyum granülleri 3 defa d. su ile yıkanır. Kurulandıktan sonra CuSO₄ çözeltilisi eklenerek 1-2 dakika vortekslenir. Bakırla kaplanan granüllerin renkleri siyahlaşır. Üzerlerindeki solüsyon dökülür ve hazırlanmış olan glisin tamponla 3 kez yıkanır ve kurulanır. Hazırlanan granüller 10 dakika içerisinde kullanılmalıdır.

Bakır, kadmiyum granüllerinin yüzeyinde indirgenir ve gözenekli bir metalik tabaka oluşturur. Bu tabaka, kadmiyumdan nitrate elektron transferini hızlandırır.



Deneyin Yapılışı

Nitrit ve nitrat analizleri çalışma şemalarında ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

Nitrit Çalışma Seması

	<i>Kör</i>	Numune	Standart 1 5 µmol/L	Standart 2 10 µmol/L	Standart 3 50 µmol/L	Standart 4 100 µmol/L
Distile Su	0,5mL	---	---	---	---	---
Plazma	---	0,5mL	---	---	---	---
Standart	---	---	0,5mL	0,5mL	0,5mL	0,5mL
NaOH	2,5mL	2,5mL	2,5mL	2,5mL	2,5mL	2,5mL
ZnSO₄	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL

Tüpler iyice karıştırılır. 3000xg'de 10 dakika santrifüj edilir. Süpernatantlar Griess Reaksiyonunda kullanılır.

Süpernatant	2mL	2mL	2mL	2mL	2mL	2mL
NNDA	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL
Sülfanilamid	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL

Blank, numune ve standartlara ait süpernatantlar kendi tüplerine pipetlendikten sonra reaktifler üzerlerine eklenir ve vortekslenerek karışmaları sağlanır. 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır. Oluşan pembe renkli kromofor maddenin absorbansı spektrofotometrede 540 nm dalgaboyunda köre karşı ölçülür.

Nitrat Çalışma Şeması

	<i>Kör</i>	Numune	Standart 1 5 µmol/L	Standart 2 10 µmol/L	Standart3 50 µmol/L	<i>Standart4</i> 100 µmol/L
Distile Su	0,5mL	---	---	---	---	---
Plazma	---	0,5mL	---	---	---	---
Standart	---	---	0,5mL	0,5mL	0,5mL	0,5mL
NaOH	2,5mL	2,5mL	2,5mL	2,5mL	2,5mL	2,5mL
ZnSO₄	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL

Tüpler iyice karıştırılır. 3000xg'de 10 dakika santrifüj edilir. Deproteinize süpernatantlar deneyde kullanılır.

Süpernatant	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL
Tampon	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL
Kadmiyum	2,5-3 gr	2,5-3 gr	2,5-3 gr	2,5-3 gr	2,5-3 gr	2,5-3 gr

Kadmiyumla 60 dakika boyunca devamlı çalkalamak suretiyle redüksiyon işlemi gerçekleştirilir. Redükte süpernatantlar, Griess reaksiyonunda kullanılır.

Süpernatant	2mL	2mL	2mL	2mL	2mL	2mL
NNDA	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL
Sülfanilamid	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL

Tüm tüpler, iyice karıştırıldıktan sonra 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır. Oluşan pembe rengin absorbansı spektrofotometrede köre karşı 540 nm dalgaboyunda ölçülür.

Standart konsantrasyonları optik dansitelerine bölünerek faktör (F) tayini yapılır. Optik dansiteler bu faktörle çarpılarak numunede mevcut nitrit miktarları hesaplanır.

Hesaplama:

Numunenin konsantrasyonu = F x Numunenin optik dansitesi

En az üç farklı standart konsantrasyonu için F hesaplanır ve bu değerlerin aritmetik ortalaması, numune nitrit konsantrasyonlarının belirlenmesinde kullanılır.

3.4.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini

Kullanılan Reaktifler:

- 1. 0.3 mmol/L ksantin:** 9,13 mg ksantin bir miktar d. suda çözüldükten sonra son hacim 200 ml'ye tamamlanır.
- 2. 0.6 mmol/L etilendiamin tetraasetik asit-2 Na tuzu (EDTA):** 25 mg EDTA bir miktar d. suda çözüldükten sonra son hacim 100 ml'ye ile tamamlanır.
- 3. 150 µmol/L nitrobluetetrazolyum (NBT):** 12,3 mg NBT bir miktar d. suda çözüldükten sonra son hacim 100 ml'ye tamamlanır.
- 4. 400mmol/L Na₂CO₃:** 2,54 gr Na₂CO₃ bir miktar d. suda çözüldükten sonra son hacim 60 ml'ye tamamlanır.
- 5. 1 g/L Bovin Serum Albumin (BSA):** 30 mg BSA üzerine yaklaşık 15 mL serum fizyolojik (SF) ilave edilir. Köpürtmeden alt üst edilerek karıştırılır. Bir gece oda sıcaklığında bekleyerek çözünmesi sağlanır. Son hacim SF ile 30 mL'ye tamamlanır. Koyu renkli şişede +4°C'ta saklanır.

İlk beş çözeltinin yukarda belirlenen miktarları karıştırılarak assay reaktifi hazırlanır. Bu reaktif toplam 490 ml'dir. Koyu renkli şişede, +4 °C'ta saklanır. Açık saman sarısı rengin, maviye dönüşmesi reaktifin bozulduğuna işaret eder.

6. **2 mol/L (NH₄)₂SO₄:** 2,64 gr (NH₄)₂SO₄ alınıp 10 ml d. suda çözülür.
7. **167 U/L Ksantin Oksidaz (XO):** 10 µL XO alınıp üzerine, 2 mol/L'lık (NH₄)₂SO₄ çözeltisinden 1 mL eklenir. Tüp birkaç kez altüst edilerek karıştırılır. Enzim çözeltisi çalışma esnasında hazırlanmalıdır.
8. **0.8 mmol/L CuCl₂:** 10,8 mg CuCl₂ bir miktar d. suda çözüldükten sonra son hacim 100 ml'ye d.su ile tamamlanır. Bu çözelti oda sıcaklığında uzun süre dayanıklıdır.

Deneyin Prensi: SOD aktivitesi, Sun ve ark. tarafından tanımlanan (124), Durak ve ark. tarafından modifiye edilen (125), NBT indirgenmesi yöntemiyle çalışıldı. Reaktif içerisinde bulunan ksantin, ksantin oksidaz tarafından hipoksantine oksitlenirken ortaya çıkan süperoksit radikali numunede mevcut SOD için substrat görevi görür. Ortamda bulunan süperoksit radikali NBT'yi oksitlediği için mavi renkli formazan oluşur. Körün içerisinde SOD bulunmadığı için, tüm NBT oksitlenir. Bu nedenle körün absorbansı, numunelerin absorbanslarından yüksektir. Numunede ne kadar çok SOD mevcutsa NBT oksidasyonu o kadar fazla engelleneceği için, enzimatik reaksiyon sonucu ortaya çıkan renk de o kadar açık olur.

Numune Hazırlama

Homojenat santrifüj edilir. Supernatant 1/1 (v/v) oranında kloroform/etanol (3/5, v/v) karışımı içerisinde, vortexlenip 45 dk 3500xg de santrifüj edilir. Üstteki etanol fazından alınan numuneler deneyde kullanılır.

SOD Çalışma Şeması

	Kör	Numune
Substrat solusyonu	2,85ml	2,85 ml
Koloroform-etanol ekstraktı	- - -	100ul
Bidistile su	100uL	- - -
XO (167 Ü/L)	50uL	50 u/L
Tüpler oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilir.		
CuCl₂	1 ml	1 ml

Distile suya karşı körden başlanılarak 560 nm dalgaboyunda okunur.

SOD aktivitesinin hesaplanması

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

$$\% \text{ inhibisyon} = [(A_{\text{kör}} - A_{\text{numune}}) / A_{\text{kör}}] \times 100$$

A_{kör}: Körün absorbanası

A_{numune}: Numunenin absorbanası

$$\text{Aktivite (Ü/ml)} = [(\% \text{ inhibisyon}/50) \times (1/0.1)] \text{ mL}$$

$$\text{Spesifik Aktivite (Ü/mg protein)} = [\text{Ü/mL/mg/mL protein}].$$

3.4.3. Katalaz (CAT) Aktivite Tayini

Kullanılan Reaktifler:

a) 0.05 mol/L Fosfat tamponu (pH=7.0)

b) %30'luk H₂O₂ çözeltisi

Substrat Çözeltisi: 100 mL fosfat tamponu içerisine yaklaşık 100 µL %30'luk H₂O₂ çözeltisi eklenir. Bu çözeltinin 240nm dalga boyunda distile suya karşı absorbanası 0.500- 0.600 nm dir.

Deney Prensipleri: Katalaz enzim aktivite tayini Aebi yöntemine göre (126) yapıldı. Numunede mevcut katalaz enzimi substrattaki H₂O₂'yi su ve oksijene parçalamaktadır. Bu durum spektrofotometrede 240 nm uv dalgaboyunda absorbanası

azalmasına neden olmaktadır. Absorbans azalması dokuda mevcut enzim miktarı ile doğru orantılıdır.

Deneyin Yapılışı: Kör olarak fosfat tamponu kullanıldı ve spektrofotometrede 240 nm dalgaboyunda sıfır ayarı yapıldı. Hazırlanan substrata, numune eklenerek karıştırıldıktan sonra 3 dakika boyunca 30 sn aralıklarla absorbans azalması kaydedildi.

Katalaz Çalışma Şeması

	Kör	Numune
Fosfat tamponu	3 mL	-----
Substrat Çözeltisi	-----	2.99 mL
Numune	-----	0,01 mL

Hesaplama

Bir katalaz ünitesi: Birim zamanda bir mikromol H₂O₂'i su ve oksijene çeviren enzim miktarıdır.

$$k = \{ [2.3 \times \log (OD_1/OD_2)] / \Delta t (sn) \}$$

$$k/gr \text{ protein} = k / [(g/mL \text{ protein}) \times 1000]$$

k; reaksiyonun hız sabitidir.

3.4.4. TBARS Tayini

Kullanılan Reaktifler:

- % 0.37 TBA çözeltisi:** 0,25 mol/L HCl içerisinde, 3.7 g/L tiyobarbitürik asit (TBA) çözülür. 4,16 ml HCl alınır ve 200'ye d.su ile tamamlanır. Bunun 50 ml'sine 18.5 mg TBA eklenir.
- % 15 TCA çözeltisi:** 0,25 mol/L HCl içerisinde %15'lik triklorasetikasit (TCA) hazırlanır. HCl çözeltisinin 150 ml'sine 22.5 gr. TCA eklenir.
- 20 mmol/L stok standart:** 1,1,3,3 tetrametoksipropan standart hazırlamada kullanılır. 329 µl 1,1,3,3 tetrametoksipropan alınır ve etanolle 100 ml'ye tamamlanır. Bu çözelti 20 mmol/L konsantrasyona sahiptir. Buzdolabında, 1 ay saklanabilir. Çalışma günü bundan 10 µmol/L, 8µmol/L, 6 µmol/L, 4µmol/L, 2µmol/L, 1 µmol/L ve 0.5 µmol/L'lik standart çözeltiler hazırlanır.

Deney Prensipleri: Numune içinde mevcut MDA ve diğer tiyobarbitürik asitle reaksiyona giren bileşikler (TBARS), asit ortamda TBA ile ısıtılması sonucu pembe

renkli kromojen oluşturur. Pembe rengin şiddeti, numune konsantrasyonu ile doğru orantılıdır (127).

Deneyin Yapılışı: Vida kapaklı tüplere numune blank ve standartlar eklenir, üzerlerine TCA ve TBA ilave edilir iyice karıştırıldıktan sonra tüplerin kapakları sıkıca kapatılır. Kaynar su banyosunda 30 dakika inkübe edilir. Su banyosundan çıkartılıp soğuk musluk suyu altında soğutulur. Her tüpe 3 mL n-bütanol pipetlenir, iyice vortekslenir. 2000xg'de 10 dakika santrifüj edilir. 535 nm dalgaboyunda n-bütanole karşı süpernatantların absorbansları okunur. Standartların konsantrasyonlarının absorbanslarına bölünmesiyle elde edilen faktör kullanılarak numunelerin TBARS miktarları hesaplanır.

	Numune	Blank	Standart 10 µmol/L	Standart 6 µmol/L	Standart 2 µmol/L	Standart 1 µmol/L
Numune	250 µL	---	---	---	---	---
Distile Su	---	250 µL	---	---	---	---
Standart	---	---	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL
TBA	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL
TCA	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL

3.4.5. Redükte Glutasyon Tayini

Kullanılan Reaktifler

1. **% 10'luk triklorasetik asit (TCA):** 10 gr TCA, 100 ml distile suda çözülür.
2. **%1'lik trisodyum sitrat:** 100 mg'ı 10 mL d. suda çözülür.
3. **5,5'-Dittiyobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB) çözeltilisi:** 4 mg DTNB 10 mL %1'lik trisodyum sitrat içerisinde çözülür.
4. **0.3 mol/L Na₂HPO₄:** 4,25 gr Na₂HPO₄ 100 ml d.suda çözülür.

Deneyin Prensibi: Glutasyon analizinde Ellman metodu kullanıldı (128). Bu yöntem ortamda mevcut GSH'ın DTNB ile reaksiyonundan oluşan sarı-yeşilimsi rengin 410 nm dalga boyunda ki absorpsiyonunun ölçümü esasına dayanır.

Deneyin yapılışı: Eşit hacimde TCA ve homojenat tüplere pipetlenip iyice vortekslenir. 10 dk 3000xg'de santrifüj edilerek, protein çökeltisi uzaklaştırılır. Üstteki berrak kısım Na₂HPO₄ ve DTNB çözeltileriyle karıştırılır. 5 dakika İnkübasyon

ardından açığa çıkan sarı-yeşil rengin absorbansı spektrofotometrede 410 nm dalgaboyunda köre karşı okunur. Standartların konsantrasyonlarının absorbanslarına bölünmesiyle elde edilen faktör kullanılarak numunelerin GSH miktarları hesaplanır.

	Kör	Numune	Standartlar
Süpernatan	---	250 µL	---
Standartlar	---	---	250 µL
Na₂HPO₄	2000 µL	2000 µL	2000 µL
DTNB	250 µL	250 µL	250 µL
d.su	250 µL	---	---

3.4.6. GPx Aktivite Tayini

Kullanılan Reaktifler

1. Fosfat Tampon (5 mmol/L EDTA'lı):

a- 50 mmol/L Na₂HPO₄: 7.1 gr Na₂HPO₄ alınır, bir miktar distile suda çözüldükten sonra bir litreye tamamlanır.

b- 50 mmol/L KH₂PO₄: 6.8 gr KH₂PO₄ alınır, bir miktar distile suda çözüldükten sonra bir litreye tamamlanır.

Çalışma tamponunu (pH:7,0) hazırlamak için, 600 mL a ve 400 mL b çözeltileri içerisine, 2, 08 gr EDTA ilave edilir ve karıştırılır.

- 1. 150 mmol/L GSH:** 100 mg GSH alınır, son hacim 2 mL olacak şekilde EDTA'lı fosfat tamponunda çözülür. Çalışmanın hemen öncesinde hazırlanır.
- 2. 3 mmol/L NADPH:** 10 mg NADPH alınır, 2 mL EDTA'lı fosfat tamponu içerisinde kulanımdan hemen önce çözülür.
- 3. 1 mol/L NaN₃:** 65 mg NaN₃ alınır. Son hacim 1 mL olacak şekilde EDTA'lı fosfat tamponu içinde çözülür. Çalışmanın hemen öncesinde hazırlanır.
- 4. GSH redüktaz:** 30 mg enzim alınır, 3.2 mol/L amonyum sülfat içinde çözülür. Çalışmanın hemen öncesinde hazırlanır.
- 5. 50 mmol/L H₂O₂:** 15 µL H₂O₂ alınarak, 5 mL EDTA'lı fosfat tamponuna pipetlenir.

Deneyin Prensipleri: Glutasyon peroksidaz, hidroperoksitlerin suya dönüşümünü katalizlerken, redükte glutasyon da yükseltgenir. Yükseltgenen glutasyon, tekrar kullanılmak üzere glutasyon redüktaz ve NADPH varlığında indirgenir. GPx aktivitesi NADPH'in NADP'ye yükseltgenmesi sırasındaki absorbans azalmasının kaydedilmesiyle belirlenir (129).

GPx Çalışma Şeması

	Kör	Numune
Fosfat Tampon	2,65 mL	2,65 mL
GSH	0,10 mL	0,10 mL
NADPH	0,10 mL	0,10 mL
GSH redüktaz	0,01mL	0,01mL
NaN₃	0,01 mL	0,01 mL
Numune	_____	0,02 mL
D. Su	0,02 mL	_____
Tüpler oda sıcaklığında, 30 dakika inkübe edilir.		
H₂O₂	0,10 mL	0,10 mL

Üç dakika boyunca 30 saniyelik aralıklarla 340 nm'de absorbans değişimi kaydedilir. Absorbans azalmasının lineer olduğu bir dakikalık zaman dilimindeki azalma miktarı esas alınarak hesaplama yapılır.

Hesaplama

1 Ünite: Bir dakikada okside edilen NADPH'in mikromol cinsinden miktarıdır.

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

E = NADPH'in ekstinksiyon sabiti (6,22x 10³ L. mol⁻¹ . cm⁻¹)

V_t = total reaksiyon volümü (mL)

V_s = total reaksiyon içindeki numune volümü (mL)

L = Küvet çapı (1 cm)

$\Delta A/t$ = Dakikadaki absorbans değişimi

10⁶ = molü mikromole çevrim sabiti

3.4.7. Protein Tayini

Kullanılan Reaktifler

Coomassie Blue G: Protein tayininde Bradford yönteminden yararlanıldı (130). 100 mg Coomassie Blue G alınır, 50 mL metanolde çözülür. Bu solüsyona 100 mL (% 85'lik) fosforik asit H_2PO_4 ilave edilir ve hacim 200 mL'e distile su ile tamamlanır. Solüsyon koyu kırmızı renklidir. Koyu renkli şişede + 4 °C'ta uzun süre dayanıklıdır. Kullanılacağı zaman 1 hacim solüsyon, yaklaşık 2 hacim distile su ile seyreltilir.

Standart çözeltisi olarak kullanılmak üzere, laboratuvarımızda mevcut total protein kalibratörü 1/100 ve 1/50 oranında seyreltildi ve faktör tayini yapılarak protein miktarı hesaplanmasında kullanıldı. Araştırmamızda Bradford yöntemi laboratuvarımızda mevcut Olympus AU 600 otoanalizörüne adapte edilerek çalışıldı.

3.4.8. ALP, AST ve ALT Tayinleri

ALP; tampon olarak dietanol amin tamponun ve substrat olarak paranitrofenilfosfatın kullanıldığı, kinetik kolorimetrik GSSC (German Society for Clinical Chemistry) yöntemine göre çalışılmıştır.

AST ve ALT; tampon olarak tris tamponun ve koenzim olarak piridoksal fosfatın kullanıldığı, IFCC (International Federation for Clinical Chemistry) tarafından önerilen kinetik enzimatik uv metodlarla çalışılmıştır.

3.5. İstatistiksel Analizler

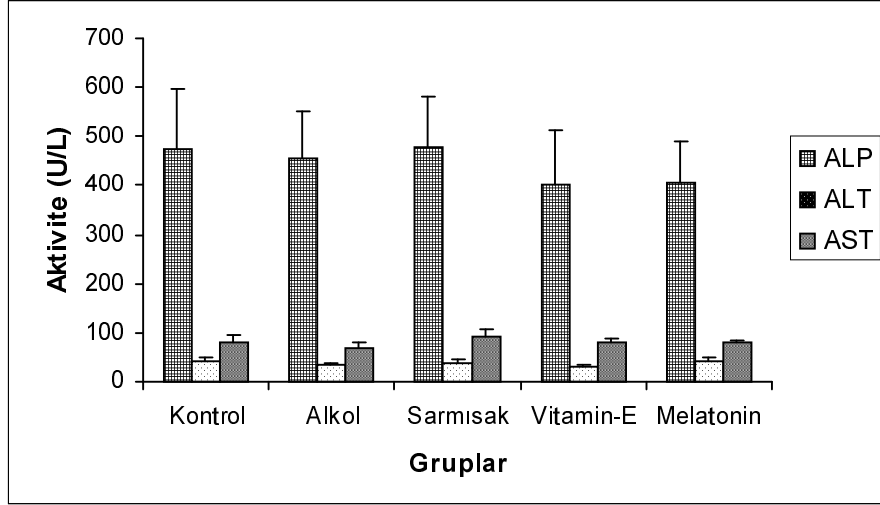
İstatistiksel değerlendirmeler SPSS 11.5 programı ile yapıldı. Tüm sonuçlar ortalama \pm standart sapma (SD) şeklinde ifade edildi. $p < 0.05$ değerleri istatistiksel anlamlılık sınırı olarak kabul edildi.

Sonuçlar one-way ANOVA ile analiz edildi. ANOVA'da istatistiksel olarak anlamlı bulunan sonuçlar Post-hoc karşılaştırmadan önce Levene testi ile homojenite analizi yapıldı. Homojen bulunan gruplara Tukey testi homojen olmayan veri gruplarına Tamhane testi uygulandı.

4. BULGULAR

4.1 Serum ALP, ALT ve AST düzeyleri

AST bakımından Sarımsak grubunda, Alkol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış mevcuttur. ALP ve ALT açısından gruplar arasında anlamlı fark saptanamamıştır.

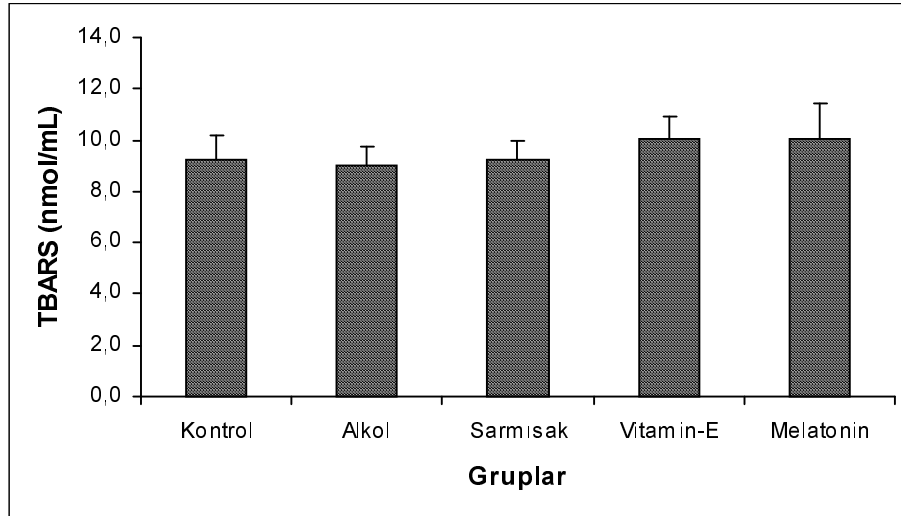


Şekil 1: Kontrol ve deney gruplarının serum ALP, ALT ve AST düzeyleri

* : Alkol grubuna göre anlamlı artış mevcuttur. (p = 0,003)

4.2. Serum TBARS düzeyleri

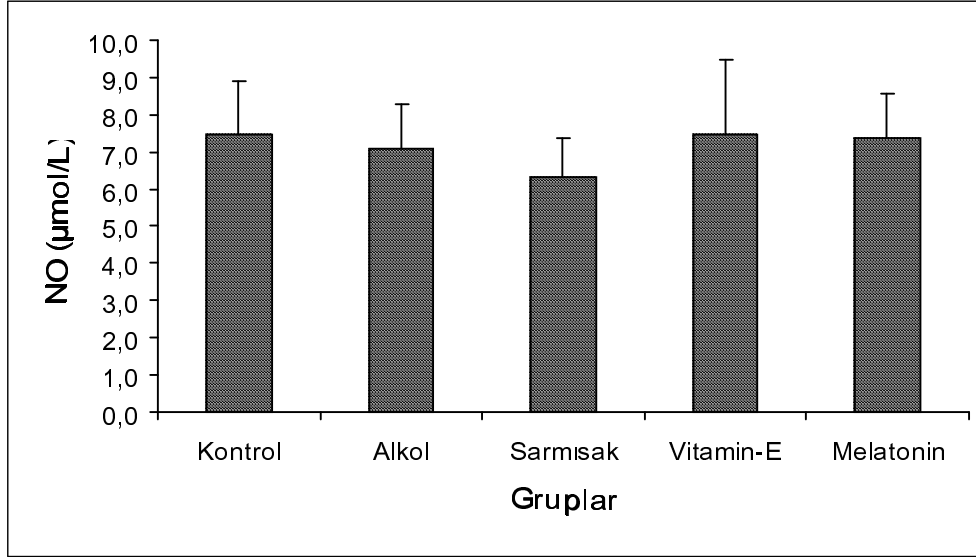
Sıçan serumlarında TBARS düzeyleri arasında anlamlı fark saptanamamıştır.



Şekil 2: Sıçan serumları TBARS düzeyleri.

4.3. Serum NO düzeyleri

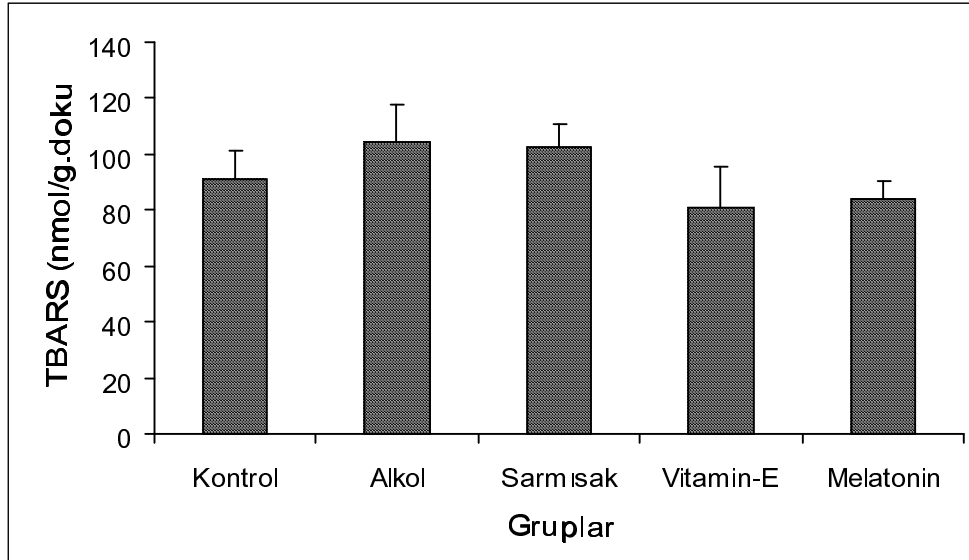
Sıçan serum NO düzeyleri arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır.



Şekil 3: Sıçan serumları NO düzeyleri

4.4. Karaciğer TBARS düzeyleri

Sıçanların karaciğer dokuları TBARS düzeyleri, alkol ve sarımsak alan gruplarda Vitamin E ve Melatonin alan gruplara göre anlamlı artış göstermiştir.



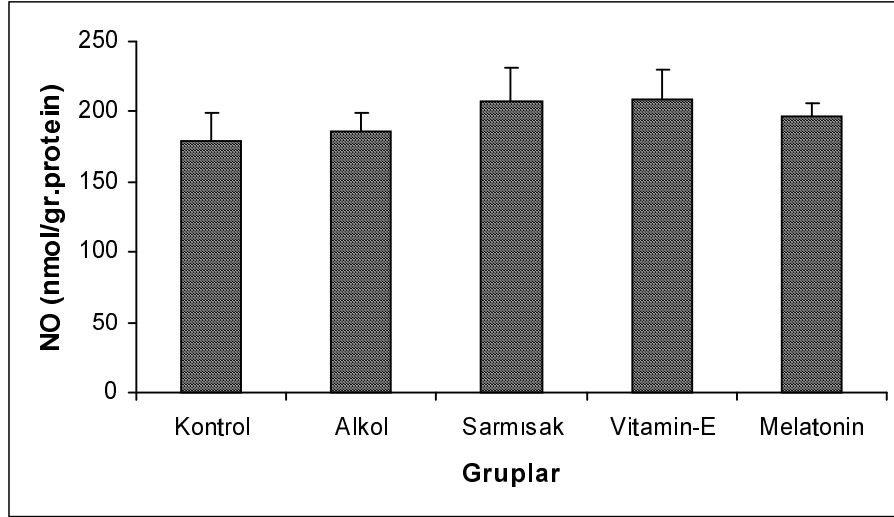
Şekil 4: Karaciğer dokularında TBARS düzeyleri

* : Vitamin E grubuna göre anlamlı artış mevcuttur. Alkol ve sarımsak grupları için p değerleri sırasıyla (p= 0,003 ve p= 0,006)

: Melatonin grubuna göre anlamlı artış mevcuttur. Alkol ve sarımsak grupları için p değerleri sırasıyla (p= 0,012 ve p= 0,027)

4.5. Karaciğer NO düzeyleri

Sıçan karaciğer NO düzeyleri Sarımsak ve E vitamini alan gruplarda Kontrol grubuna göre anlamlı artış göstermiştir.

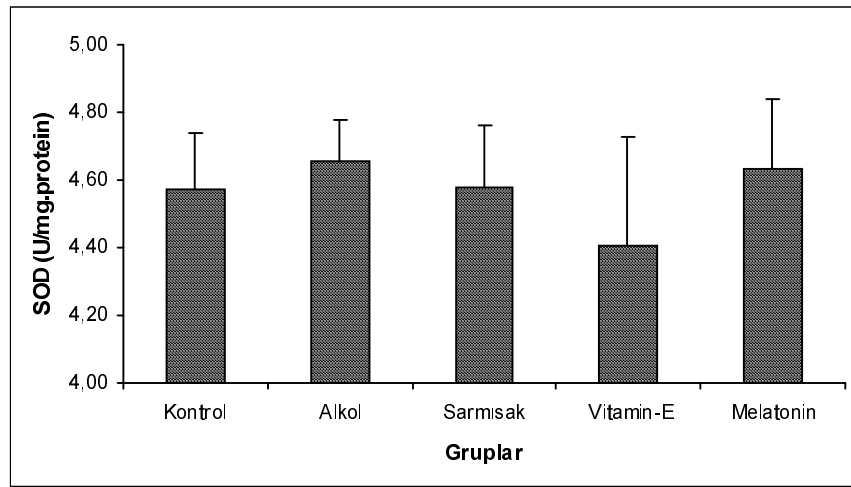


Şekil 5: Karaciğer dokusu NO düzeyleri

* : Kontrol grubuna göre anlamlı artış gösteren gruplar (p=0,034 ve p= 0,034)

4.6. Karaciğer SOD Aktivite Düzeyleri

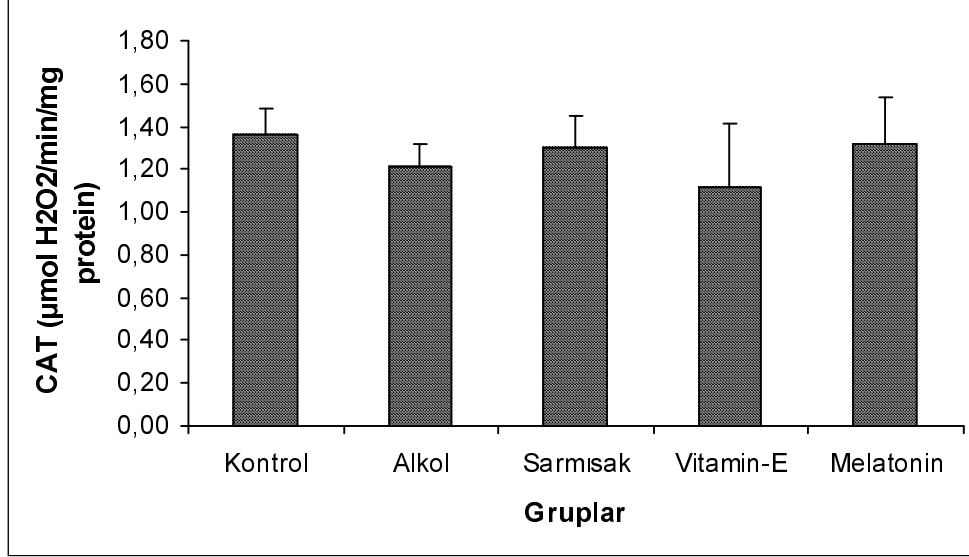
Sıçan karaciğerinde SOD düzeyleri bakımından gruplar arasında anlamlı fark yoktur.



Şekil 6: Karaciğer dokusu SOD düzeyleri

4.7. Karaciğer CAT Aktivite Düzeyleri

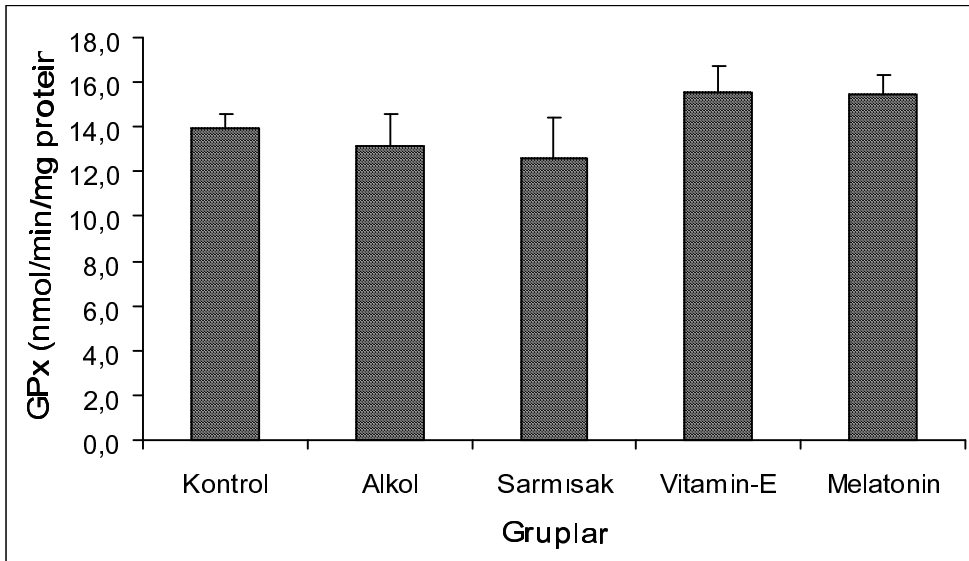
Sıçan karaciğer CAT düzeyleri yönünden gruplar arasında anlamlı fark bulunamamıştır.



Şekil 7: Karaciğer dokusu CAT düzeyleri

4.8. Karaciğer GPx Aktivite Düzeyleri

Melatonin ve vitamin E alan gruplarda, karaciğer GPx düzeyleri alkol ve Sarmısak alan gruplara göre anlamlı artış göstermiştir.



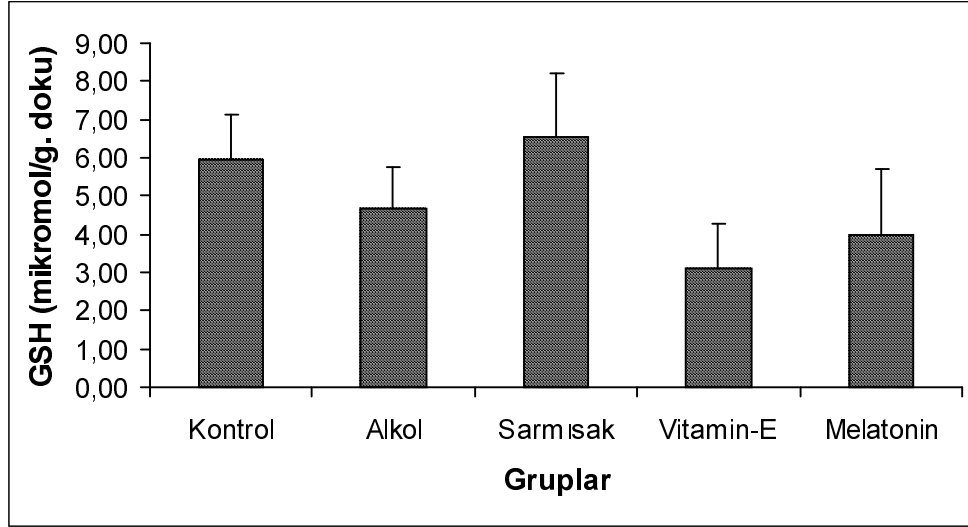
Şekil 8: Karaciğer dokusu GPx düzeyleri

* : Alkol ve Sarımsak gruplarına göre anlamlı artış mevcuttur. (p= 0,005 ve p= 0,001)

: Alkol ve Sarımsak gruplarına göre anlamlı artış mevcuttur. (p= 0,008 ve p= 0,001)

4.9. Karaciğer GSH düzeyleri

Melatonin ve vitamin E alan grupların GSH düzeyleri Sarımsak grubuna göre anlamlı azalma göstermiştir. Ayrıca vitamin E grubu GSH düzeyi kontrol grubuna göre de anlamlı azalma göstermiştir.



Şekil 9: Karaciğer dokusu GSH düzeyleri

□: Kontrol ve Sarımsak gruplarına göre anlamlı azalma mevcuttur. (p= 0,015 ve p= 0,002)

*: Sarımsak grubuna göre anlamlı azalma mevcuttur. (p= 0,002)

Tablo 1. Sıçan serum parametreleri grup ortalamaları

PARAMETRELER	KONTROL	ALKOL	SARIMSAK	E VİTAMİNİ	MELATONİN	ANOVA	
						F	P
ALP	473,4± 123,4 (n=7)	453,6± 95,4 (n=8)	477,1± 104,0 (n=8)	403,5±107,5 (n=6)	406,0±81,7 (n=7)	0,837	0,512
ALT	42,7±8,5 (n=7)	33,4±3,0 (n=8)	38,2± 8,1 (n=8)	30,2±4,2 (n=8)	41,1±9,9 (n=8)	4,096	0,008
AST	80,6±13,8 (n=6)	70,5±8,2 (n=8)	92,9±15,9 ^a (n=7)	82,0±7,7 (n=8)	78,6±6,8 (n=8)	4,140	0,008
NO	7,5±1,4 (n=7)	7,0±1,2 (n=8)	6,3±1,0 (n=8)	7,4±2,0 (n=7)	7,4±1,2 (n=8)	0,940	0,453
TBARS	9,2±0,9 (n=8)	9,0±0,8 (n=8)	9,2±0,8 (n=8)	10,0±0,9 (n=8)	10±1,5 (n=7)	1,852	0,142

a : Alkol grubuna göre anlamlı artış mevcuttur. P= 0,003

Tablo 2. Sıçan karaciğer doku homojenatları analiz parametreleri grup ortalamaları

PARAMETRELER	KONTROL	ALKOL	SARIMSAK	E VİTAMİNİ	MELATONİN	ANOVA	
						F değerleri	
						F	P
GSH	6,0±1,3 (n=6)	4,7±1,2 (n=7)	6,6±1,8 (n=7)	3,1±1,3 ^b (n=7)	4,0±1,9 ^c (n=8)	6,040	0,001
NO	189,6± 19,5 (n=8)	185,0±14,3 (n=8)	207,8±23,8 ^d (n=8)	208,7±21,9 ^d (n=7)	195,9±9,5 (n=8)	3,860	0,011
TBARS	91,0±10,2 (n=8)	104,1±13,8 ^{e, f} (n=8)	102,3±8,9 ^{e, f} (n=8)	81,0± 4,26 (n=7)	84,3±5,9 (n=7)	6,655	0,000
SOD	4,6±0,2 (n=8)	4,7±0,1 (n=7)	4,6±0,2 (n=8)	4,4±0,3 (n=8)	4,6±0,2 (n=7)	1,645	0,186
CAT	1,4±0,1 (n=8)	1,2±0,1 (n=8)	1,3±0,2 (n=8)	1,1±0,3 (n=7)	1,3±0,2 (n=7)	1,957	0,124
GPx	13,9±0,6 (n=7)	13,1±1,4 (n=8)	12,6±1,8 (n=8)	15,5±1,2 ^{g, h} (n=8)	15,4±0,8 ^{g, h} (n=8)	8,702	0,000

b : Kontrol ve sarımsak gruplarına göre anlamlı azalma mevcuttur. Sırasıyla p= 0,015 ve p= 0,002

c : Sarımsak grubuna göre anlamlı azalma mevcuttur. p= 0,002

d : Kontrol grubuna göre anlamlı artış mevcuttur. Sarımsak ve vitamin E gruplarının her ikisi için de p= 0,034

e : Vitamin E grubuna göre anlamlı artış mevcuttur. Alkol ve sarımsak grupları için sırasıyla p= 0,003 ve p= 0,006

f : Melatonin grubuna göre anlamlı artış mevcuttur. Alkol ve sarımsak grupları için sırasıyla p= 0,012 ve p= 0,027

g : Alkol grubuna göre anlamlı artış mevcuttur. E vitamini ve melatonin grupları için sırasıyla p= 0,005 ve p= 0,008

h : Sarımsak grubuna göre anlamlı artış mevcuttur. E vitamini ve melatonin grupları için sırasıyla p= 0,001 ve p= 0,001

Tablo 3. Çalışılan test parametrelerinin p değerleri

GRUPLAR	ALP	ALT	AST	s. NO	s.TBARS	dGSH	dNO	dTBARS	d. SOD	d.CAT	d. GPx
Kontrol-Alkol	0,996	0,235	0,419	0,982	0,994	0,563	0,970	0,202	0,936	0,500	0,777
Kontrol-Sarımsak	1,000	0,978	0,272	0,503	1,000	0,956	0,034	0,341	1,000	0,958	0,311
Kontrol-Vitamin E	0,740	0,067	0,999	1,000	0,492	0,015	0,034	0,830	0,519	0,114	0,118
Kontrol-Melatonin	0,737	1,000	0,997	1,000	0,539	0,133	0,412	0,665	0,985	0,989	0,153
Alkol-Sarımsak	0,991	0,792	0,003	0,805	0,996	0,173	0,133	0,998	0,948	0,884	0,921
Alkol-Vitamin E	0,894	0,696	0,229	0,986	0,273	0,307	0,128	0,020	0,169	0,876	0,005
Alkol-Melatonin	0,897	0,489	0,563	0,994	0,315	0,888	0,785	0,933	0,999	0,813	0,008
Sarımsak-Vitamin E	0,679	0,275	0,312	0,528	0,461	0,002	1,000	0,043	0,490	0,367	0,001
Sarımsak-Melatonin	0,672	1,000	0,103	0,564	0,508	0,020	0,701	0,989	0,990	1,000	0,001
Vitamin E-Melatonin	1,000	0,163	0,969	1,000	1,000	0,799	0,666	0,151	0,269	0,303	1,000

s: serum

d: doku homojenatı

5. TARTIŞMA

Karaciğer hastalıkları; konjenital, genetik, viral, iatrojenik ve toksik bir çok nedene bağlı olabilir. Toksik etkenlerden bir tanesi ve en yaygın olanı alkoldür.

Alkolün etabolize olduğu en önemli organ karaciğer olduğu için zararlı etkilere en fazla maruz kalan organ da karaciğerdir. Alkolün hasar oluşturma mekanizmalarında bir çok faktörün bileşik etki yaptığı kabul edilmektedir. Alkol kullanımına bağlı olarak gelişen zararlı etkiler basit bir yağlanmadan, hepatit, siroz ve hepatoselüler karsinoma kadar değişen büyük farklılıklar arzedebilir. Kullanılan alkol miktarı, kullanım süresi, genetik yatkınlıklar, beslenme ve yaşam tarzı ile ilgili faktörler farklı sonuçların ortaya çıkmasında etkili olabilirler.

Alkol, zararlı etkilerini en çok oksidan ve antioksidan dengeyi bozarak oluşturur. Alkolün, alkol dehidrogenazla yıkılmasıyla asetaldehit oluşur ve asetaldehit, asetata daha sonra da karbondioksit ve suya kadar yıkılabilir. Bu reaksiyonlar sırasında NAD, NADH'e indirgenir ve hücre büyük bir indirgeyici potansiyele ulaşır. Bu durum glikoneogenezde bozulmaya ve metabolizmanın ketogenez ve yağ asidi sentezine kaymasına neden olur (21). NADH kendisi doğrudan oksijeni indirgeyemez, ancak elektronlarını mitokondiyal solunum sistemine vererek oksijenin süperoksit oluşturmak üzere indirgenmesini sağlar. Normal metabolik koşullarda NAD'nin NADH'e indirgenmesi sitrik asit döngüsüyle bağlantılı ve hücrenin enerji ihtiyacını karşılamaya yönelik kritik öneme sahip olaydır (131).

Etanol metabolizmasında rol oynayan ikinci faktör mikrozomal etanol okside eden sistem (MEOS) dir. Etanol oksidasyonu sırasında bu sistem ve özellikle sitokrom p450'nin CYP2E1 izoformu aktive olduğunda, süperoksit radikali üretimi ve dolayısıyla oksidan stres artar.

Alkolün oksidasyonu sırasında üretilen asetaldehid, gerek glutatyon gibi antioksidanları tüketerek, gerekse ileri oksidasyona uğrayıp serbest radikal üretimini arttırarak oksidan-antioksidan sistem dengesini bozar ve ayrıca yapısal ya da fonksiyonel proteinlerle kovalan bağlar oluşturarak immun yanıtı tetikler (132,133). İmmun yanıtta etkili olan bir diğer molekül de, lipit peroksidasyon son ürünlerinden malondialdehittir. MDA, asetaldehitin bağlanma affinitesini 13 kat arttırır ve bu nedenle immun cevap oluşturabilecek moleküllerin üretimi hızlanır (134).

Tüm bu olaylar sırasında karaciğerin oksijen tüketimi artar ve sentrilobuler hipoksi oluşur. Buna bağlı olarak da, demir salınımında artma ve S-adenozil metionin (SAM) düzeylerinde azalma görülür. SAM azalması GSH sentezinde ve GSH'ın mitokondri içine taşınmasında azalmaya yol açar. SAM azalması ayrıca, proinflatuvar ve sitotoksik sitokinleri indükleyerek oksidatif stresin daha da artmasına neden olur. Alkole bağlı olarak hepatositlerde demir konsantrasyonunun artması oksidatif hasarı, makrofajlarda demir konsantrasyonunun artması da sitokin ekspresyonunu arttırır. Tüm bu süreçler, birbirini tetikleyen bir döngüye neden olur ve geri dönüşlü evreler aşılmamışsa alkolün kesilmesi ile kişi sağlığına kavuşabilir (135).

Alkol alımının zararlı etkilerini yok etmek veya en azından asgariye indirmek için, bir çok antioksidan özellikli madde üzerinde araştırma yapılmıştır. Bu maddelerin bazıları vücutta sentezlendiği gibi, bazıları da günlük yaşamın bir parçası olan gıdalarda bulunmaktadır. Antioksidan özelliği araştırılan maddelerden bazıları; yeşil çay, aloe vera, greylift, üzüm, sarımsak ve bunlardan üretilen preparatlar, vitaminler, bazı hormonlar (melatonin) ve daha bir çok doğal ya da sentetik maddelerdir.

Wu ve arkadaşları sıçan karaciğer ve eritrositlerinde sarımsak ve preparatlarının etkilerini incelemişlerdir. Eritrositlerde DATS'ın en fazla olmak üzere, sarımsak yağının, DAS ve DADS'ın redükte glutatyon düzeyini önemli ölçüde arttırdığı, ancak karaciğer GSH'ının bu preparatlardan etkilenmediği anlaşılmıştır. Yine bu çalışmada sıçanların karaciğerinde DADS ve DATS'ın GSH redüktaz ve GSH transferaz aktivitelerini anlamlı düzeyde arttırdığı ancak GPx aktivitesini azalttığı belirlenmiştir (82). Bu çalışmadan, sarımsağın etkinliğinin bileşenlerine göre farklılıklar gösterdiği anlaşılmaktadır.

Kim ve arkadaşları lipopolisakkaritlere ve sitokinlere cevaben iNOS eksprese eden makrofaj, primer sıçan hepatositleri ve sıçan aortik düz kas hücreleri gibi hücrelerde NO sentezinin sarımsak ekstraktı ile anlamlı ölçüde inhibe edildiğini göstermişlerdir. Sarımsak ekstraktı, LPS'lerle veya γ -IFN ile uyarılan makrofajlarda ve hepatositlerde aktif hale gelen NF-KB'yi inhibe eder ve iNOS gen ekspresyonu da dolaylı olarak inhibe olur (136).

Sarımsak homojenatının uygulandığı bir başka çalışmada Banerjee ve arkadaşları kronik sarımsak alımıyla, endojen antioksidanların sıçan kalbindeki değişimlerini araştırmışlardır. Lipid peroksidasyonunun 125, 250 ve 500 mg/kg

dozlarda anlamlı şekilde azaldığı, SOD aktivitesinin 125, 250 ve 500 mg/kg dozlarda, CAT aktivitesinin de 250 ve 500 mg/kg dozlarda arttığı görülmüştür. GSH ve GPx düzeylerinde doza bağımlı bir değişiklik görülmemiştir (137).

Banerjee ve arkadaşları, sıçanlara çiğ sarımsak homojenatını 125, 250 ve 500 mg/kg/gün dozlarda 30 gün boyunca oral yoldan vermişler ve ardından kalbi izole edip iskemi-reperfüzyon (IR) uygulamışlardır. Çalışmanın tüm sonuçları incelendiğinde; biyokimyasal ve histopatolojik bulguları olumlu yönde olan tek grubun 250 mg/kg dozda sarımsak homojenatı alan grup olduğu saptanmıştır (138 142).

Muckhreejee ve arkadaşları, bazı onkolojik hastalıkların tedavisinde kullanılan adriyamisin kardiyotoksik etkilerine karşı çiğ sarımsak ekstraktının koruyucu etkisini araştırdılar. Adriyamisine bağlı olarak; TBARS kontrole kıyasla anlamlı derecede artmış, SOD, CAT ve GPx azalmış bulundu. TNF- α ekspresyonu da artmış görünümde idi. Sarımsak verilen gruplarda TBARS'daki artma ve antioksidan enzimlerdeki azalma olumlu yönde düzelmiş, myokarddaki TNF- α ekspresyonu ve myosit hasarı azalmıştı. 250 mg/kg dozda sarımsak homojenatı alan grupta CAT ve GPx daha iyi, 500 mg/kg dozda sarımsak alan grupta ise SOD ve GPx daha iyi korunmuştu. 250 mg/kg dozda, myokardda TBARS düzeyleri daha düşüktü. Bu iki çalışmanın sonucunda sarmısağın etkilerinin doza bağımlılık gösterdiği ve farklı etkilerinin farklı dozlarda olduğu görülmektedir (139).

Sarmısağın düşük dozlardaki yararlı etkileri yüksek dozlarda kaybolur. 1000 mg/kg dozdaki myokardiyal hasar, 2000 mg/kg dozda da yüksek mortalite görülür. Sarımsak tozunun 2000 mg/kg'lık dozu veya yüksek dozda allisin, izole perfüze sıçan karaciğerinde hücre hasarına neden olur. Bu etki düşük dozlarda görülmez. Çiğ sarımsak suyu 5mL/kg dozda sıçanlarda mide hasarına bağlı ölümlere neden olmuştur (31). Aşırı sarımsak tüketimi ayrıca, anemi ve gastrointestinal sistem problemleri gibi toksik etkilere neden olmaktadır (28). Bu bulgular, doza bağlı olarak sarmısağın faydalı etkileri kadar zararlı etkilerinin de olabileceğini ispatlamaktadır (137). Çalışmamızda bu literatürler esas alınarak, sıçanlara sarımsak homojenatının 250 mg/kg/gün'lük dozda kullanılması uygun görülmüştür.

Ibrahim ve arkadaşlarının çalışmasında balıkyağı ile beslenen farelerden diyetlerinde E vitamini takviyesi olmayanlarda, E vitamini takviyesi olanlara göre anlamlı derecede, hepatik TBARS, konjuge dienler ve protein karbonil gruplarının

düzeyi artmıştı. Se-GPx, non-Se-GPx, katalaz ve glutatyon redüktaz aktiviteleri diyetdeki yağdan, vitamin E veya demirden etkilenmemişti. Balıkyağı alan gruplardaki bu farklılığın muhtemel nedeni balıkyağında PUFA'nın yüksek oranda olmasındandır. Bu nedenle bu grubun E vitamini ihtiyacı artmıştır. Bu çalışma PUFA'nın fazla alınmasının karaciğerdeki artmış peroksidatif hasarla ilişkili olduğunu ve E vitamininin lipit peroksidasyonunu önlemede öncelikli etkisi olabileceğini göstermektedir (140).

Wagner ve arkadaşları intakt ökaryotik hücre kültüründe vitamin E desteğinin oksidan strese karşı koruyucu etkilerini araştırdılar ve lipit radikalleri oluşumunun vitamin E konsantrasyonlarıyla ters orantılı olarak değiştiğini saptadılar. Besiyerindeki oksijen tüketimi ölçüldüğünde de vitamin E'nin 5-100 µM konsantrasyon aralığında oksidasyon hızını azalttığı sonucuna ulaştılar. 100 µM dozda, vitamin E düşük konsantrasyonlarına göre oksidasyon hızını 10 kat azaltmıştı. Serbest radikallerin peroksidasyon ürünlerinin miktarı hücre zarında oluşan hasarla paralellik gösterir ve hücrenin zar yapısı vitamin E konsantrasyonu arttıkça hasardan daha iyi korunur (141).

Genç ve arkadaşları karaciğerde etanolle indüklenen lipit peroksidasyonuna melatoninin etkisini araştırmışlar. Etanol enjeksiyonu ile MDA düzeylerinde, etanol öncesinde melatonin verilse de verilmese de anlamlı artışlar görülmüştür. Alkol alan ancak melatonin tedavisi almayan grupta, GSH seviyelerinde anlamlı azalma görülmüştür. Etanolden evvel melatonin ön tedavisi alan grupta GSH azalsa da değişiklik anlamlı bulunmamıştır. CAT düzeyi, etanol almayıp sadece melatonin alan grupta yükselmiş, hem alkol ve hem de alkol+melatonin alan gruplarda düşmüştür. GPx sadece melatonin grubunda yükselmiş, alkol ve melatonin+alkol alan grupta düşmüştür. Bu çalışmada etanol enjeksiyonu karaciğer SOD aktivitesini % 20 arttırmıştır. Etanol alan grupta, melatonin alan kontrollere göre % 58'lik artış mevcuttur ve çalışmadan elde edilen verilere göre, melatonin SOD gibi antioksidan savunma enzimlerini arttırmakta ancak MDA ve GSH düzeylerinde değişikliğe neden olmamaktadır (142).

Sokkary ve arkadaşları, kronik alkol verilen sıçanlarda melatonin (10 mg/kg/gün) lipit peroksidasyonunu inhibe eden etkisini araştırdıkları çalışmalarında, kronik alkol uygulamasıyla sıçanların testis, kalp, akciğer ve beyinlerinde MDA ve 4-hidroksialkenal düzeyleri anlamlı derecede arttığını ancak karaciğerlerinde değişiklik olmadığını saptadılar. Yalnızca melatoninin uygulandığı gruplarda kontrole göre bazal lipit peroksidasyon düzeylerinde herhangi bir değişiklik olmadığı görüldü. Melatonin

tedavisi alan alkolik gruplarda ise incelenen tüm dokularda lipit peroksidasyonu azalmıştı (143).

Yapılan çalışmalarda melatonin almayan sıçanların dahi safra salgılarında melatonin yüksek düzeyde bulundu. Bu durumda karaciğerin melatoninini safraya salgılayan olduğu düşünülebilir. Muhtemelen de melatonin karaciğerde diğer dokulara göre daha yüksek düzeydedir ve karaciğerin oksidasyona daha dirençli olmasının sebeplerinden biri de melatonin içeriğidir. Karaciğerin dayanıklılığının en önemli nedeni ise iyi gelişmiş antioksidan savunma sistemidir ve hepatositlerin hasar görmeleri için daha uzun süreli alkol alımı gereklidir (143).

Akut ve kronik alkol uygulamalarının glutatyon düzeylerine etkileri araştırıldığında farklı sonuçlar elde edilmiştir. Gueri ve Grisolia kronik alkol uygulamasıyla hepatik okside glutatyon düzeylerinde değişiklik görmezken, GSH içeriklerinde çelişkiler saptamışlardır. Bazı araştırmacılar GSH düzeylerinde değişiklik bulamazken, diğerleri azalma veya artma gördüler. Yapılan çalışmalardan çelişkili sonuçların elde edilmesine neden olan faktörler muhtemelen; deney modellerinin ve analiz yöntemlerinin farklı oluşu, kullanılan ilaç ve tedavi edici özelliği araştırılan maddelerin öngörülemez etkileri olabilir (142).

Normalde alkolik ratlarda karaciğer fonksiyonunun bozulması ve ALT düzeyinin artması beklenirken çalışmamızda gruplar arasında ALT düzeyleri bakımından bir farklılık oluşmamıştır. Bunun olası nedenleri arasında alkolün düşük dozlarının kullanılması, uygulamada alkolün içme suyuna katılarak gerçekleştirilmesi ve belki de en önemlisi deney süresinin alkolik hepatit oluşturmaya yetmemiş olması sayılabilir. Bilindiği gibi, insanlarda alkolik hepatit oluşması yıllar alabilen bir olaydır.

AST yönünden, sarımsak verilen grupta alkolik gruba göre istatistiksel olarak anlamlı artışın bulunmasını alkolle birlikte verilen sarımsak homojenatının gastrointestinal sistemdeki irritan etkisinin neden olduğu görüşündeyiz.

Sarımsak alan grupta GSH seviyesinin artması sarımsağın zengin organosülfür içeriğine bağlı olabilir. Vitamin E ve melatonin alan gruplarda GSH düzeylerindeki azalma bu grupların GPx düzeylerindeki artışa paralellik göstermektedir. Bu paralellik GPx enziminin antioksidan etki gösterirken daha fazla GSH kullanmasına yol açarak GSH düzeylerinin azalmasına neden olabilir.

Çalışmamızda melatonin ve vitamin E alan grupların GPx düzeyleri, alkol ve sarımsak homojenatı alan gruplara göre anlamlı oranda yüksek bulunmuştur. Bu durum oksidan stresin önlenmesinde daha fazla miktarda GSH tüketimine işaret eder. Bizim GSH sonuçlarımız da bu açıdan literatürle uyumlu bulunmuştur.

Sarımsağın antioksidan stresi azaltmada yeteri kadar başarılı olamamasının nedeni, vitamin E ve melatonine göre çok daha düşük antioksidan özelliğe sahip olması ve içerdiği organosülfür bileşiklerinin gastrointestinal sistemde oluşturduğu irritasyon olabilir.

Das ve arkadaşlarının çalışmasında sarımsağın antioksidan etkisini NO düzeylerini arttırarak gerçekleştirdiği ifade edilmektedir (144). Sooranna ve arkadaşları da sarımsak ekstraktının Ca-bağımlı NOS aktivitesini arttırdığını ifade etmişlerdir (145). Bizim çalışmamızda da, sarımsağın NO'yu arttırdığı görülmektedir. Bu artış muhtemelen literatürde ifade edildiği gibi NOS aktivitesinin artışına bağlı olabilir.

Çalışmamızda; alkolik ratlarda sarımsak homojenatının melatonin ve vitamin E'ye benzer şekilde antioksidan aktivite göstermesini beklememize rağmen sarımsak bu etkiyi tam olarak sağlayamamıştır. Öncelikle ratlarda deneysel alkolik hepatit oluşumu tam olarak gerçekleşmemiştir. Ayrıca sarımsak homojenatının antioksidan etkiden daha çok oksidan etki sergilediği görülmüştür. TBARS düzeylerinin artması bunun kanıtı olarak sunulabilir. Sarımsağın zengin organosülfür bileşikleri aynı zamanda önemli bir antioksidan olan GSH'ın düzeylerinde de artışa yol açmıştır. Bu durum bir çelişki olarak görülse de, sarımsağın farklı etkilerin olduğu ve bunların ortaya çıkışının doza bağımlı olduğunu unutmamak gerekir (137,139)

Sonuç olarak; sarımsağın vitamin E ve melatonin kadar kuvvetli bir antioksidan olmayıp hepatoprotektif etkisinin ancak organosülfür bileşiklerine ve GSH'a ihtiyaç duyulan durumlarda ortaya çıktığını söylebiliriz. Şayet bu çalışmada deneysel alkolik hepatit modeli tam olarak gerçekleşmiş olsaydı sarımsak homojenatı GSH düzeylerinde ortaya çıkan azalmayı kompanse ederek hepatoprotektif etki sergileyebilirdi, diyebiliriz.

6. ÖZET

Alkol kullanımına bağılı olarak ortaya çıkan zararlı etkilerin antioksidan tedavi ile önlenebileceğı düşünölmektedir. Bu maksatla antioksidatif etkiye sahip olduğı ileri sürölen sarımsağıın, gerçek anlamda kuvvetli antioksidan oldukları kanıtlanmış vitamin E ve melatonin ile birlikte alkoliklerde uygulanmasına karar verilmiştir.

Deneyssel hayvan modelinde erkek Wistar albino tipi sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar gece-gündüz doğıal aydınlatması olan laboratuvar ortamında tutuldular ve hazırlanan sarımsak homojenatı (250 mg/kg/gün, oral yoldan), E vitamini (200mg/kg, haftada iki kez, oral yoldan) ve melatonin (10 mg/kg/gün, cilt altına) sıçanlara 6 hafta boyunca uygulandı. Deneyssel işlemler sonrasında ratlar, abdominal aortaları kesilerek öldüröldü ve karaciğerleri alındı, verilen maddelerin oksidan/antioksidan sisteme etkileri araştırıldı.

Veriler istatistiksel açıdan incelendi ve sonuçlar değıerlendirildi. Buna göre; vitamine E ve melatonin karaciğerde lipit peroksidasyonunu alkol ve sarımsak gruplarına göre azaltmış, GPx enzim düzeylerini arttırmış ve GSH düzeylerini de anlamlı oranda azaltmıştır. Sarımsak grubunda GSH düzeylerindeki artış organosölfür içeriğıine bağılanırken, sarımsağıın hepatoprotektif etkisinin ancak organosölfür bileşiklerine ve GSH'a ihtiyaç duyulduğı durumlarda ortaya çıkacağı kanısına varılmıştır. Sarımsak homojenatının alkol kullanıcılarında koruyucu etkisinin tam olarak kanıtlanabilmesi için daha uzun süreli kronik alkol alan deney gruplarında çalışılmasının uygun olacağı anlaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Sarımsak, vitamin E, melatonin, antioksidatif etki

7. SUMMARY

It is thought that the harmful effects of alcohol could be prevented by antioxidant treatment. To achieve this aim, it is decided to feed alcoholic rats with garlic, which is suggested to have antioxidant properties and compare garlic's effects with vitamin E and melatonin, which's antioxidant properties have been proven.

Male Wistar albino rats were used in the experiments. The animals were housed in quiet rooms with diurnal light-and dark cycle and were given ethanol (10%, as sole drinking fluid), garlic homogenate (250 mg/kg/d, per oral), melatonin (10 mg/kg/d, subcutaneously) and vitamin E (200 mg/kg, two times a week, per oral) for 6 weeks. After the experimental procedure, the rats were killed by bleeding, the liver was removed and the oxidant and antioxidant parameters were studied.

The data is evaluated according to the statistical rules and the results were criticized. In relation with these information, when compared with the alcoholic and garlic groups vitamin E and melatonin caused, a statistically significant decrease in the ratio of lipid peroxidation and GSH levels, and a statistically significant increase in GPx enzyme levels when compared with the alcoholic and garlic groups. The increase in GSH levels in the garlic group might come from the organosulphur content of garlic and it is concluded that, garlic's hepatoprotective effect would be more efficient when there is a need for the organosulphur compounds and GSH. From that point of view, in order to prove the exact prophylactic effect of garlic in alcohol users, further studies with longer experimental procedures are needed to be processed.

Key Words: Garlic, vitamin E, melatonin, antioxidative effect

KAYNAKLAR

1. Dere F. Anatomi. 3. Baskı, Adana:1994: 633-655.
2. Junqueira LC, Carneiro J. Basic Histology. 10th ed. USA: 2003: 332-344.
3. Pocock G, Richards CD. Human Physiology, The Basis of Medicine. Oxford University Press. Oxford: 1999: 416-417.
4. Burtis CA, Ashwood ER. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. W. B. Saunders Company, 3rd ed. Philadelphia, London, Toronto: 1999: 1125-1177.
5. Ökten A. Temel ve Klinik Bilimler Ders Kitapları: Gastroenterohepatoloji. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul: 2001; 311.
6. Garner LP, Hiatt JL. Color Textbook of Histology. WB. Saunders Company, Philadelphia: 2001: 420-432.
7. Young B, Heath J. W. Weather's Functional Histology, A Text and Colour Atlas. Harcourt Publishers Ltd. 4th edition. London: 2000: 274-281.
8. Şentürk H. Serbest Radikal Hasarının Hepatobilier Sistem Hastalıklarındaki Rolü. Kocatepe Tıp Dergisi 5, 2004; 1-8.
9. Kaplan LA, Pesce JA, Kazmierczak SC. Clinical Chemistry, Theory, Analysis, Correlation. Mosby. Cincinnati: 2003: 493-497.
10. Liver Functions. <http://thedoctorslounge.net/forums/backup/topic-32.html>. 08.08.2005.
11. İliçin G, Ünal S, Biberoglu K, Akalın S, Süleymanlar G. Temel İç Hastalıkları Cilt1. Güneş Kitabevi, Ankara: 1996: 1077-1167.
12. Guyton A. C. Tıbbi Fizyoloji. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul: 1986; 1203-1211.
13. Alkol ve Madde Kullanım Bozuklukları. <http://www.lokman.cu.edu.tr/psychiarty/DERSNOT/alkol.htm>. 08.08.2005.
14. Day CP, James OF. Hepatic steatosis: innocent bystander or guilty party?. Hepatol 1998; 27: 1463-1466.
15. Tsukamoto H, Xi XP. Incomplete compensation of enhanced hepatic oxygen consumption in rats with alcoholic centrilobular liver necrosis. Hepatology 1989; 9: 302-306.
16. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford Science Publications. 3rd ed. New York: 1999: 573-574.
17. Toker N. Alkole bağlı karaciğer hasarında serbest radikallerin rolü. Aktüel Tıp Dergisi 2000; 5: 29-33.
18. Israel Y. Monoclonal and polyclonal antibodies against acetaldehyde-containing epitopes in acetaldehyde-protein adducts. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1986; 83: 7923-7927.
19. Albano E. Hydroxyethyl radicals in ethanol hepatotoxicity. Frontiers in Bioscience. 1999: 533-540
20. A. Pares et al., Histological course of alcoholic hepatitis. Influence of abstinence, sex and extent of hepatic damage. J. Hepatol. 1986; 2: 33-42.
21. Stewart S, Jones D, Day PD. Alcoholic liver disease: New insights into mechanisms and preventative strategies. Trends in Molecular Medicine, 2001; 7: 408-413.
22. Temel Patoloji Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Çeviri Editörü: Prof. Dr. Uğur Çevikbaş. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. 2. Baskı, İstanbul. 1994: 545-550
23. C.P. Day and O.F. James , Steatohepatitis: a tale of two 'hits'?. Gastroenterology 1998; 114: 842-845.

24. S.Q. Yang, Lin HZ, Lane MD, Clemens M, Diehl AM. Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997; 94: 2557-2562
25. P. Letteron, Fromenty B, Terris B, Degott C, Pessayre D. Acute and chronic hepatic steatosis lead to in vivo lipid peroxidation in mice. *J. Hepatol.* 1996; 24: 200-208
26. Karaciğer hastalıkları ders notu <http://www.patoloji.gen.tr/karacigerhast2004htm> 08.08.2005.
27. Preedy V.R, Seitz H. Florence. *Alcohol and Heart Disease.* USA: Taylor, 2002: 12; 120-122
28. Akkuş İ. *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri.* BASKI Konya:1995.
29. Halliwell B, Gutteridge J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford Science Publications. 3rd ed. New York: 1999: 36-104.
30. Wu D, Cederbaum A.I. *Alcohol, Oxidative Stress and Free Radical Damage.* *Alcohol Research and Health.* Washington: 2003; 27: 277-284
31. Lunec J. Free radicals: Their involvement in disease processes. Review. *Ann Clin Biochem* 1990; 27: 173-82.
32. Thornally P.J. Monosaccharide autooxidation in health and disease. *Environ Health Perspect* 1985; 64: 297-307.
33. Davies K.J.A, Delsignore M.A. Protein and carbohydrate damage and degradation by oxigen radicals. *J Biol Chem.* 1987; 18: 91-104.
34. Zintzen H. *Fat-souble vitamins in nutrition of ruminants.* Basel: La Roche; 1977.
35. Van-Der-Meulen JH, McArdle A, Jackson MJ, Faulkner JA. Contraction-induced injury to the extensor digitorum longus muscles of rats: The role of vitamin E. *J Appl Physiol.* 1997; 83: 817-823.
36. Packer L. Protective role of vitamin E in biological systems. *Am J Clin Nutr* 1991; 53: 1050-1055.
37. Evelson P, Ordonez C. P, Llesuy S, Boveris A. Oxidative stress and in vivo chemiluminescence in mouse skin exposed to UVA radiation. *J Photochem Photobiol B* 1997; 38: 215-219.
38. Stratton S. P, Lieber D. C. Determination of singled oxygen-specific versus radical-mediated lipid peroxidation in photosensitized oxidation of lipid bilayers: Effect of beta-carotene and alpha-tocopherol. *Biochem.* 1997; 36: 1291-1311.
39. Moncada S, Palmer R.M.J, Higgs E.A. Nitric oxide; Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991; 43 (29): 109-137.
40. Knowles R.G. Moncada S. Nitric Oxide Synthase in Mammals (review). *Biochem J. England,* 1994; 298: 249-258.
41. Marletta M.A. Nitric Oxide Synthase Structure and Mechanism. *J Biol Chem,* 1993; 268 (17): 1231-1235.
42. Loscalzo J, Welch G. Nitric Oxide and Its Role in Cardiovascular System. *Prog Cardiovasc Dis (USA).* 1995; 38(2): 87-104.
43. Mc Cord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. In function for erythrocyuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 1969; 244: 6049-6055.
44. Steinman H. Superoxide dismutases: Protein Chemistry and Structure-Function Relationships. In: *Superoxide dismutase,* Oberley LW (ed). CRC Press 1982; 1: 11-68.
45. Helle R. A, Jesper B. N, Flemming N. Antioxidative Enzyme Activities in Human Erythrocytes. *Clin Chem* 1997; 43 (4): 562-568.
46. Yost F. J, Fridovich I. An Iron Containing Superoxide Dismutase from E. Coli. *J Biol Chem.* 1973; 248: 4905-4913.

47. Pastor MC, Sierra C, Dolade M, Navarro E. Antioxidant Enzymes and Fatty Acid Status in Erythrocytes of Down's Syndrome Patients. *Clin Chem*. 1998; 44 (5): 924-929.
48. Kwan OK, Lee SM, Floyd RA, Park JW. Thiol-Dependent Metal Catalyzed Oxidation of Copper, Zinc Superoxide Dismutase. *Biochem Biophys Acta*. 1998; 1387: 249-256.
49. Marklund SL, Holme E, Hellner L. Superoxide Dismutase in Extracellular Fluids. *Clin Chem Acta*. 1982; 126: 41-51.
50. Keele BB, Mc Cord JM, Fridovich I. Superoxide Dismutase from Escherichia Coli. A new manganese Containing Enzyme. *J Biol Chem*. 1970; 245: 6176-81.
51. Weisiger R, Fridovich I. Superoxide Dismutase Organelle Specificity. *J Biol Chem* 1973; 248.
52. Jenkins RR, Teng J. Catalase Activity in Skeletal Muscle of Varying Fiber Types. *Experimentia*. 1981; 37: 67-68.
53. Avviram I, Shaklai N. The association of Human Erythrocyte Catalase With the Cell Membrane. *Arch Biochem Biophys*. 1981; 212: 329-337.
54. Percy ME, Can J. Catalase: An Old Enzyme with a New Role? (review). *Biochem Cell Biol*. 1984; 62: 1006-1014.
55. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford Science Publications, New York: 1999: 393-429.
56. Southorn PA, Powis G. Free Radicals in Medicine, Involvement in Human Disease. *Mayo Clin Proc*. 1988; 63: 390-408.
57. Esterbauer H, Schaour R. J, Zollner H. Chemistry and Biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde on Related Aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991; 11: 81-128.
58. Esterbauer H, Zollner H, Schaour R. J. Hydroxyalkenals: Cytotoxic Products of lipid Peroxidation. *ISI Atlas Sci* 1998; 1: 311-317.
59. Horwitt MK. Vitamin E: A reexamination. *Am J Clin Nutr*. 1979; 29: 568.
60. Aras K, Erşen G, Karahan S. *Tıbbi Biyokimya*. Ankara Üniversitesi Basımevi. Ankara: 1976.
61. Ersoy E, Bayşu N, Ertürk K, Üstdal KM. *Biyokimya*. Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi; 1979.
62. Zintzen H. News and reviews, vitamin E /selenium in ruminants. Basel: LaRoche; 1972.
63. Combs GF, Noguchi T, Scott ML. Mechanisms of action of selenium and vitamin E in protection of biological membranes. *Federation Proc*. 1975; 34: 11.
64. Jialal I, Fuller CJ. Oxidized LDL and antioxidants. *Clin Cardiol* 1993; 16: 16-19.
65. Christen S, Woodall AA, Shigenaga MK, Southwell PT, Duncan MW, Ames BN. Gamma-tocopherol traps mutagenic electrophiles such as NO and complements alpha-tocopherol: Physiological implications. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 1: 3217-3222.
66. Smith KL, Hogan JS, Weiss WP. Dietary vitamin E and selenium affect mastitis and milk quality. *J Anim Sci*. 75: 1997; 1659-1665.
67. He Y, Root MM, Parker RS, Campbell TC. Effects of carotenoid-rich food extracts on the development of preneoplastic lesions in rat liver antioxidant status. *Nutrition and Cancer*. 1997; 27: 238-244.
68. Morreale M, Livrea MA. Synergistic effect of glycolic acid on the antioxidant activity of alpha-tocopherol and melatonin in lipid bilayers and in human skin. *Biochem Mol Biol Int*. 1997; 42: 1093-1102.

69. Sigounas G, Anagnostou A, Steiner M. dl-alpha-tocopherol induces apoptosis in erythroleukemia, prostate, and breast cancer cells. *Nutr Cancer* 1997; 28: 30-35.
70. Mooney LA. Contribution of genetic and nutritional factors to DNA damage in heavy smokers. *Carcinogenesis*. 1997; 18: 503-509.
71. Galley HF, Thornton J, Howdle PD, Walker BE, Webster NR. Combination oral antioxidant supplementation reduces blood pressure. *Clin Sci Colh* 1997;92:361-5.
72. Karlsson J, Ronneberg R, Semb B. Vitamins Q and E, extracorporeal circulation and hemolysis. *Mol Cell Biochem*. 1997; 173: 33-41.
73. Thomas R, Neuzil J, Stocker R. Inhibition of LDL oxidation by ubiquinol-10: A protective mechanism for coenzyme Q in atherogenesis? *Mol Aspects Med* 1997; 18: 85-103.
74. Proudfoot JM, Croft KD, Puddey IB, Beilin LJ. The role of copper reduction by alpha-tocopherol in low-density lipoprotein oxidation. *Free Radic Biol Med*. 1997; 23: 720-728.
75. Calzada C, Bruckdorfer KR, Rice-Evans CA. The influence of antioxidant nutrients on platelet function in healthy volunteers. *Atherosclerosis*. 1997;128:97-105.
76. Thiele J, Traber MG, Tsang K, Cross CE, Packer L. In vivo exposure to ozone depletes vitamins C and E and induces lipid peroxidation in epidermal layers of skin. *Free Radic Biol Med*. 1997; 23: 385-391.
77. Wen Y, Doyle MC, Harrison RF, Feely J. The effect of hormone replacement therapy on vitamin E status in postmenopausal women. *Maturitas*. 1997;26:121-124.
78. Hirose J, Yamaga M, Ide J, Tanoue M, Takagi K. Reduced ischemia-reperfusion injury in muscle: Experiments in rats with EPC-K1, a new radical scavenger. *Acta Orthop Scand* 1997;68:369-373
79. Westermarck T, Aberg L, Santavuori P, Antila E, Edlund P, Atroschi F. Evaluation of the possible role of Coenzy Q10 and vitamin E in juvenile neuronal ceroid-lipofuscinosis. *Mol Aspects Med*. 1997; 18: 259-262.
80. Mayevx PR, Agrawal KC, Tou JS, et al: The Pharmacological Effects of Allicin, a Constituent of Garlic Oil: Agents Actions. 1988; 25 (1-2): 182-190.
81. Rahman K: Garlic and Aging: New Insights into an Old Remedy: Ageing Research reviews. 2003; 2: 39-56.
82. Wu CC, Sheen LY, Chen HW, et al: Effects of Organosulfur Compounds from Garlic Oil on the Antioxidation System in Rat Liver and Red Blood Cells: Food and Chem. Toxicol. 2001; 39: 563-569.
83. Lee BM, Park KK: Beneficial and Adverse Effects of Chemopreventive Agents: Mutation Res. 2003; 9480: 1-14.
84. Vinson JA, Hao Y, Su X, Zubik L. Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods: Vegetables. *J. Agri. Food Chem*. 1998; 46: 3630-3634.
85. Block E. The Chemistry of Garlic and Onion. *Sci. Am*. 1985; 252: 114-119.
86. Medicinal Propeties and a bit more chemistry , www.chm.bris.ac.uk/webprojects/2001/gray/morechemistry.htm, 08.08.2005.
87. Atmaca G. Sarımsak ve Antioksidan Etkisi. *Sendrom, Aylık Aktüel Tıp Dergisi*. Şubat 2004; 71-76.
88. Sumiyoshi H, Wargovich MJ. Chemoprevention of 1,2 Dimethyl-Hydrazine Induced Colon Cancer in Mice by Naturally Occuring Organosulfur Compounds. *Cancer Res*. 1990; 50: 5084-5087.

89. Sparnins VL, Barany G, Wattenberg LW. Effects of Organosulfur Compounds from Garlic and Onions on Benzo[a]pyrene-induced Neoplasia and Glutathione S-transferase Activity in the Mouse. *Carcinogenesis*. 1988; 9; 131-134.
90. Dwivedi C, John LM, et al. Effects of Oil-soluble Organosulfur Compounds from Garlic on Doxorubicin-Induced Lipid Peroxidation. *Anti-Cancer Drugs*. 1998; 9; 229-291.
91. Chen L, et al. Decrease of Hepatic Catalase Level by Treatment with diallyl sulfide and Garlic Homogenates in Rats and Mice. *J Biochem Mol Toxicol*. 1999; 13; 127-134.
92. Qi R, Wang Z. Pharmacological Effects of Garlic extract: *Trends in Pharma. Scien*. 2003; 24 (2); 62-63.
93. Aouadi R, Aouidet A, Elkadhi A, et al. Effect of Fresh Garlic (*Allium sativum*) on Lipid Metabolism in male Rats: *Nut Res*, 2000;20 (2); 273-280.
94. Suetsuna K. Isolation and Characterization of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitor Dipeptides Derived from *Allium Sativum L*(garlic): *J Nutr Biochem*. 1998; 9: 415-419.
95. Brandle M, al Makdessi S, Weber RK, et al. Prolongation of Life Span in Hypertensive Rats by Dietary Interventions. Effects of Garlic and Linseed Oil: *Basic Res Cardiol*, 1997; 92 (4): 223-32.
96. Breithaupt-Grogler K, Ling M, Boudolas H, et al. Protective Effects of Chronic Garlic Intake on Elastic Properties of Aorta in the Elderly: *Circulation*. 1997; 96(8): 2619-2655.
97. Martin N, Bardisa L, Pantoja C, et al. Cardioprotective Actions of Garlic (*allium Sativum*): *Arznei Forsch*, 1993; 43(2): 94-98.
98. Fallon M. B, Abrams GA, Abdel-Razek TT, et al. Garlic Prevents Hypoxic Pulmonary Hypertension in Rats: *Am. J. Physiol*. 1998; 275(19): 283-287.
99. Atmaca G. Nitrik Oksit, Nitrik Oksit Sentaz ve Sarımsak: *Kocatepe Tıp Dergisi*. 2001; 2; 217-223.
100. Wargovich MJ, Woods C, Eng VW, et al. Chemoprevention of N-nitroso Methyl Benzylamine-induced Oesophageal Cancer in Rats by Naturally Occuring Thioether. Diallyl Sulfide: *Cancer Res*. 1998; 48(23): 6872-75.
101. Lee S, Park S, Oh JW, et al. Natural Inhibitors for Protein Prenyltransferase; *Planta Med*. 1998; 64(4); 303-308.
102. Singh SV, Pan SS, Snavastara SK, et al. Differential Induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase by anticarcinogenic organosulfides from garlic: *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 244(3); 917-920.
103. Joseph PK, Rao KR, Sundaresh CS. Toxic Effects of Garlic Extract and Garlic Oil in Rats. *J Exp Biol*. 1989; 27(11): 977-979.
104. Perez-Pimiento AJ, Moneol, Santaolalla M, et al. Anaphylactic Reaction to Young Garlic: *Allergy*. 1999; 54 (6): 626-629.
105. Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, et al: Intake of Garlic and Its Bioactive Components. *J Nutr*. 2001; 131(13): 955-62.
106. Horie T, Murayama T, Mishima T, et al: Protection of Liver Microsomal Membranes from Lipid peroxidation by Garlic Extract. *Planta Med*. 1989; 55(6): 506-508.
107. Monguchi T, Takasugi N, Itakura Y. The Effects of Aged Garlic extract on Lipid peroxidation and the Deformability of Erythrocytes. *J Nutr*. 2001; 131(13): 1010-1015.
108. Borek C. Antioxidant Health Effects of Aged Garlic Extract. *J Nutr*, 2001; 131(3): 1010-1015.

109. Brzezinski A. Melatonin in humans. *N Engl J Med.* 1997; 336: 186-195.
110. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc.* 1958; 80: 2587-2594.
111. Arendt J. Melatonin. *Clin Endocrinol.* 1988; 29: 205-229.
112. Reiter RJ. Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev.* 1991; 12: 151-180.
113. Sugden D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. *Experientia* 1989; 45: 922-932.
114. Reiter RJ. Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered free radicals: a brief review. *Brazilian J Med Biol Res* 1993; 26: 1141-1155.
115. Poeggeler B, Reiter RJ, Tan D-X, Chen L-D, Manchester LC. Melatonin, hydroxyl radical mediated oxidative damage, and aging: A hypothesis. *J Pineal Res.* 1993; 14: 151-168.
116. Acuna CD, Reiter RJ, Menendez PA, Pablos MI, Burgos A. Characterization of high-affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver. *J Pineal Res.* 1994; 16: 100-112.
117. Hardeland R, Reiter RJ, Poeggeler B, Tan D-X. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: Antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neurosci Biobehav Rev.* 1993; 17: 347-357.
118. Beyer CE, Steketee JD, Saphier D. Antioxidant properties of melatonin-an emerging mystery. *Biochem Pharmacol.* 1998; 56: 1265-1272.
119. Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *J Biomed Sci.* 2000; 7: 444-458.
120. Tan D-X, Chen L-D, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ. Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J.* 1993; 1: 57-60.
121. Bettahi I, Guerrero JM, Reiter RJ, Osuna C. Physiological concentrations of melatonin inhibit the norepinephrine-induced activation of prostaglandin E2 and cyclic AMP production in rat hypothalamus: a mechanism involving inhibition of nitric oxide synthase. *J Pineal Res.* 1998; 25: 34-40.
122. Reiter RJ. Melatonin: Clinical Relevance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2003; 17: 273-285.
123. Cortas NK, Wakid NW. Determination of inorganic nitrite in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem* 1990; 36: 1440-1443.
124. Sun Y, Oberley LW, Li YA. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin. Chem.* 1988; 34: 497-500.
125. Durak I, Yurtaslan Z, Canbolat O., Akyol O. A methodological Approach to superoxide dismutase activity assay based on inhibition of nitroblue tetrazolium (NBT) reduction. *Clin. Chem. Acta.* 1993; 214: 103-104.
126. Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer HU (ed). *Methods of enzymatic analysis.* Academic press: New York and London, 1974: 673-677.
127. Buege, J. A. & Aust, S. D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978; 52: 302-310.
128. Ellman G. Tissue Sulfhydryl Groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 1959; 82: 52-155.
129. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 1967; 70: 158-170.
130. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248-254.

131. Hoek JB, Cahil A, Pastorino JG. Alcohol and mitochondria: a dysfunctional relationship. *Gastroenterology* 2002; 122: 2049-2063.
132. Tsukamoto H, Lu SC. Current concepts in the pathogenesis of alcoholic liver injury. *The FASEB Journal*. 2001; 15: 1335-1349.
133. Tuma DJ, Newman MR, Donohue TM, Sorrel MF. Covalent binding of acetaldehyde to proteins: participation of lysine residues. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 1987; 579-584.
134. Tuma DJ, Thiele GM, Xu D, Klassen LW, Sorrel MF. Acetaldehyde and malondialdehyde administration. *Hepatology*. 1996; 23: 872-880.
135. Rouault TA. Hepatic iron overload in alcoholic liver disease: Why does it occur and what is its role in pathogenesis? *Alcohol*. 2003; 2: 103-106.
136. Kim KM, Chun SB, Koo MS, Choi WJ, Kim TW, Kwon YG. *Free Radic Biol Med.* 2001; 30: 747-756.
137. Banerjee SK, Maulik M, Mancahanda SC, Dinda AK, Gupta SK, Maulik SK. Dose dependent induction of endogenous antioxidants in rat heart by chronic administration of garlic. *Life sciences*. 2002; 70:1509-1518.
138. Banerjee SK, Mukherjee PK, Maulik SK. Garlic as an antioxidant: The good, the bad and the ugly. *Phytother Res.* 2003; 17: 97-106.
139. Muckhreejee S, Banerjee SK, Maulik M, Dinda AK, Talwar KK, Maulik SK. Protection against adriamycin-induced cardiotoxicity by garlic: Role of endogenous antioxidants and inhibition of TNF- α expression. *BMC pharmacology*. 2003.
140. Ibrahim W, Lee US, Yeh CC, Szabo J, Bruckner G, Chow CK. Oxidative stress and antioxidant status in mouse liver: Effects of Dietary lipid, Vitamin E and Iron. *J Nutr.* 1997; 7: 1401-1406.
141. Wagner BA, Buettner GR, Burns CP. Vitamin E slows the rate of free radical-mediated lipid peroxidation in Cells. *Arc Biochem Biophys.* 1996; 334 (2): 261-267.
142. Genç S, Gürdöl F, Öner-İyidoğan Y, Onaran A. The effect of melatonin administration on ethanol-induced lipid peroxidation in rats. *Pharmacol Res.* 1998; 37 (1): 37-40.
143. El-Sokkary GH, Reiter RJ, Tan DX, Kim SJ, Cabrera J. Inhibitory effect of melatonin on products of lipid peroxidation resulting from chronic ethanol administration. *Alcohol and Alcoholism* 1999; 34: 842-850.
144. Das I, Khan NS, Sooranna SR. Nitric oxide synthase activation is a unique mechanism of garlic action. *Biochem Soc Trans* 1995; 34: 43-47.
145. Sooranna SR, Hirani J, Das I. Garlic can induce both GTP cyclohydrolase and nitric oxide synthase activity in choriocarcinoma cells. *Biochem Soc Trans* 1995; 23: 543S.