

**T.C.**  
**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ**  
**İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ**  
**BİOKİMYA ANABİLİM DALI**

**SİTOKROM P450 (CYP2E1) İNDÜKSİYONU YAPILAN DIŞI  
VE ERKEK SIÇANLARDA LİPOPOLİSAKKARİT  
UYGULAMASI İLE OLUŞTURULAN KARACİĞER  
HASARININ VE OKSİDATİF STRESİN  
KARŞILAŞTIRILMASI**

**Dr. Bilge DEPBOYLU**

**(Tez Danışmanı)**  
**Prof.Dr. Müjdat UYSAL**

**İSTANBUL**

**2007**

## Ö N S Ö Z

*Tez çalışmalarımın tüm aşamalarında ve uzmanlık eğitimim boyunca bana yol gösteren, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, her zaman desteğini hissettiğim ve her konuda bana yardımcı olan çok değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Müjdat UYSAL'a ve Biyokimya Anabilim Dalı'nın tüm öğretim üyelerine çok teşekkür ederim.*

*Tez çalışmamdaki patolojik incelemeleri titizlikle yapan İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Onkoloji Enstitüsü Patoloji bölümünden Dr. Vakur OLGAC'a, tezimin tüm aşamalarında yardımını esirgemeyen Araş. Gör. Murat GİRİŞ ve Dr. M. Seda Demirsöz başta olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma, tezimin yazımında ve düzenlenmesinde büyük katkıları olan Öğretmen Yılmaz AYDIN'a, bugünlere gelmemi sağlayan aileme ve bana her konuda destek olan sevgili eşime teşekkür ederim.*

*Dr. Bilge Depboyly*

*Bu tez İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğince desteklenmiştir.*

*Proje No: T-692 /30062005*

# İ Ç İ N D E K İ L E R

|                       |     |
|-----------------------|-----|
| ÖZET .....            | III |
| SUMMARY .....         | IV  |
| GİRİŞ ve AMAÇ .....   | 1   |
| GENEL BİLGİLER .....  | 4   |
| GEREÇ ve YÖNTEM ..... | 23  |
| BULGULAR .....        | 32  |
| TARTIŞMA .....        | 48  |
| KAYNAKLAR .....       | 52  |
| ÖZGEÇMİŞ .....        | 61  |

## Ö Z E T

Sitokrom P450 enzim ailesinin etanol tarafından indüklenen bir üyesi olan CYP2E1'in aktivasyonu ve endotoksemi alkolik karaciğer hasarının oluşumunda bağımsız iki risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Gerek CYP2E1 indüksiyonu, gerekse endotoksemi karaciğerde superoksit, peroksinitrit ve hidroksil radikali gibi zararlı radikallerin oluşumunu arttırmakta, oksidatif ve nitrozatif strese yol açmakta, apoptotik ve nekrotik hücre ölümüne neden olmaktadır. Öte yandan, dişilerin alkolik karaciğer hasarına duyarlılığının erkeklerden fazla olduğu ve bu durumun endotokseminin yarattığı Kupffer hücre aktivasyonundaki farklılıktan kaynaklanabileceği ileri sürülmektedir.

Çalışmamızda, CYP2E1 indüksiyonu yapılan dişi ve erkek sıçanlarda endotoksin (lipopolisakkarit; LPS) uygulamasının karaciğerdeki apoptotik ve nekrotik oluşumları etkileme potansiyeli karşılaştırıldı. 2 gün süreyle (200 mg/kg, i.p) pirazol injeksiyonu yapılarak CYP2E1 enzim sistemi indüklenen sıçanlara tek doz LPS (10 mg/kg; i.p) uygulandı ve 6 saat sonra incelemeler yapıldı. Apoptozis, Bax ve Bcl-2 ekspresyonları, kaspaz-3 aktivitesi ve in situ uç işaretleme tekniği (TUNEL) ile apoptotik hücreleri sayarak, nekroz ise serumda transaminaz aktiviteleri ölçümü ve histopatolojik olarak incelendi. Ayrıca karaciğerde lipid peroksit düzeyleri ve antioksidan sistem elemanları araştırıldı.

Sonuçlarımıza göre, CYP2E1 indüksiyonu, LPS'nin karaciğerde yarattığı inflamasyonu arttırdı ve nekroz gelişimine yol açtı. Serumda transaminaz aktivitelerinde de daha fazla bir artış oluşturdu. Pirazol+LPS grubundaki dişi sıçanlarda enzim aktivitelerindeki artışlar daha fazla olmasına rağmen, karaciğerin histopatolojik görünümünde iki cins arasında belirgin bir farklılık görülmedi. Bax ve Bcl-2 ekspresyonları, kaspaz-3 aktivitesi ve apoptotik hücre sayımlarına göre, pirazol+LPS grubundaki sıçanlarda karaciğerde apoptotik hücre ölümü arttı, ancak iki cins arasında bir farklılık bulunmadı. CYP2E1 indüksiyonunun, LPS'nin karaciğerde prooksidan-antioksidan dengede yarattığı değişiklikleri iki cinsten benzer şekilde arttırdığı saptandı.

Buna göre, CYP2E1 sistemi indüklenen dişi ve erkek sıçanlarda, endotoksin uygulaması karaciğerde apoptotik ve nekrotik süreçler ile prooksidan-antioksidan dengesini benzer biçimde etkilemektedir.

## S U M M A R Y

It has been accepted that the activation of CYP2E1, ethanol inducible member of cytochrome P<sub>450</sub> and endotoxemia are two independent risk factors in alcoholic liver disease. Both CYP2E1 induction and endotoxemia augment the formation of harmful radicals such as superoxide, peroxynitrite and hydroxyl radicals, lead to oxidative and nitrosative stress and cause apoptotic and necrotic cell death. On the other hand, it has been suggested that females have greater susceptibility to alcohol-induced liver damage than males and this state may originate from the difference in Kupffer cell activation triggered by endotoxemia.

In this study, the efficiency of endotoxin (lipopolysaccharide; LPS) administration on apoptotic and necrotic changes in the liver was investigated in CYP2E1-induced female and male rats. Rats were injected with pyrazole for two days to induce CYP2E1, and then LPS (10 mg/kg) was administered to rats and investigations were done after 6 hours. Apoptosis was determined by Bax and Bcl-2 expressions, caspase-3 activities and TUNEL assay. Necrosis was detected by the determination of serum transaminase activities and histopathological analysis of the liver. In addition, lipid peroxide levels and antioxidant system were measured in the liver.

According to our results, CYP2E1 induction augmented LPS-induced inflammatory reactions, and caused necrotic changes in the liver. Further increases in transaminase activities were observed in the serum. Although serum transaminase activities increased further in female rats in pyrazole+LPS group, there was no difference in histopathological appearance of the livers in two gender. According to Bax and Bcl-2 expressions, caspase-3 activities and apoptotic cell counts, apoptotic cell death increased in pyrazole+LPS group, but there was no difference between two gender. CYP2E1 induction was observed to exaggerate similarly the LPS induced disturbances in hepatic prooxidant-antioxidant balance in female and male rats. According to this, apoptotic and necrotic processes and the disturbances in prooxidant- antioxidant balance in the liver are similarly affected by endotoxin treatment in CYP2E1 induced female and male rats.

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Alkole bağı karaciğer hasarının mekanizması tam olarak bilinmemektedir (2,3,57). Bununla birlikte, sitokrom P<sub>450</sub> enzim ailesinin etanol tarafından indüklenen bir üyesi olan CYP2E1'in aktivasyonu ve endotoksemi alkolik karaciğer hasarının oluşumunda bağımsız iki risk faktörü olarak kabul edilmektedir (22,48,59,88,89,99,101).

Alkol, karaciğerde steatozis, apoptozis, nekrozis ve fibrozis gibi farklı tablolara neden olmaktadır (2,22,57). Oksidatif stresin alkolik karaciğer hasarının patogeneğinde önemli bir rol oynadığı kabul edilmekte ve alkolün oksidatif stresi arttırmasında birçok faktör etkili olmaktadır (2,3,4,22,48,57,65,66,91). Bunlar arasında alkol tarafından sitokrom P<sub>450</sub> enzimlerinin CYP2E1 formunun indüksiyonu önemli bir rol oynamaktadır (22,48,101). Etanol tarafından indüklenen CYP2E1, NADPH oksidaz aktivitesinin artmasına ve sonuç olarak süperoksit radikali ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşumuna neden olmaktadır (22,48,101). CYP2E1'in alkolik karaciğer hasarının oluşumunda etkili olduğu, CYP2E1 indüklendiğinde etanolün hepatotoksik etkisinin arttığı, inhibe edildiğinde ise azaldığı bulunmuştur (22,48,62,101).

Endotoksin (lipopolisakkarit; LPS), gram negatif bakterilerin hücre dışı membranının temel yapısal ve fonksiyonel bileşenidir (27,34). LPS karaciğerde Kupffer hücrelerini aktive ederek süperoksit radikalının ve tümör nekroz faktör (TNF $\alpha$ ) gibi sitokinlerin düzeylerini arttırmaktadır (34,60,78,79,84,97). Ayrıca LPS indüklenebilir nitrik oksit sintaz (iNOS) etkisiyle nitrik oksit oluşumunu arttırmakta (25,78) ve bu radikalın süperoksit radikaliyle birleşmesi ile son derece toksik peroksinitrit radikali oluşmaktadır (13,25). Endotoksemide gelişen organ hasarında Kupffer hücre aktivasyonunun ve oluşan radikallerin ve sitokinlerin etkin bir rol oynadığı kabul edilmektedir (13,25,60,78,97,103).

Endotoksemi etanole bağı karaciğer hasarının gelişiminde etkili bir faktör olarak benimsenmektedir (88,89,99). Endotoksinlerin alkolün hepatotoksik etkisini arttırdığı bulunmuştur (19,24,67,75). Etanolün barsak florasındaki endotoksinlere karşı geçirgenliği arttırdığı ve dolayısıyla portal dolaşıma daha fazla endotoksin geçtiği bildirilmiştir (76). Kupffer hücreleri antibiyotik tedavisi ve gadolinium klorür uygulaması ile inhibe edildiğinde alkole bağı karaciğer hasarının azaldığı bulunmuştur (1). Bu sonuçlar

endotoksemiye bağı Kupffer hücre aktivasyonunun alkolik karaciğer hasarında etkin bir rol oynadığını göstermektedir (88,89,99).

Gerek insanlarda ve gerekse deney hayvanlarında yapılan çalışmalar dişi ve erkeklerin alkole duyarlılıklarının farklı olduğunu göstermiştir (28,41,88,89). Etanol dişi sıçanlarda erkeklerle oranla daha kısa sürede ve daha yoğun karaciğer hasarı oluşturmaktadır (87,89). Alkole duyarlılık açısından iki cins arasında bu farklılığın nedenleri bilinmemektedir (89). Dişi sıçanlarda hormonal etkilerin yanısıra (42), etanol metabolizmasının daha hızlı olması (42,87), karaciğerde daha yoğun hipermetabolik durum oluşması (42,89), karaciğerde fagositoz kapasitesinin düşük olması (83) gibi çeşitli faktörler etkili olmaktadır. Ayrıca alkol verilen dişi sıçanlarda endotoksin düzeyleri erkek sıçanlardan daha yüksek bulunmuştur (41) Buna göre, dişilerde alkole bağı karaciğer hasarının daha yoğun olmasında endotokseminin yarattığı Kupffer hücre aktivasyonundaki farklılıkların etkili olabileceği düşünülmektedir (88,89,99).

Genel olarak hücre ölümü apoptozis ve nekrozis olarak tanımlanan iki farklı mekanizma ile gelişmektedir. Nekroz patolojik bir ölüm şekli olmasına rağmen, apoptoz hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelebilir (3,35,90,96). Apoptoz ve nekrozun gelişiminde organizmada superoksit, peroksinitrit ve hidroksil radikali gibi radikal oluşumundaki artışın yol açtığı oksidatif ve nitrozatif stresin etkin bir rol oynadığı saptanmıştır (33,45,49,61,74). Apoptozisten nekroza geçiş apoptozisin oluşum hızı ile fagositoz hızı arasında bir dengesizlik olduğunda görülür. Apoptozise uğrayan hücreler parçalanmadan ve inflamasyonu uyarmadan önce fagosit edildiği için inflamasyon gelişmemektedir. Karaciğerde apoptotik hücrelerin sayısı karaciğerin fagositoz kapasitesini aştığı zaman apoptotik hücreler parçalanmakta, inflamasyon ve nekroz gelişmektedir (33,35,61,90).

Bcl-2 ailesine ait proteinler apoptotik sinyal iletisinde mitokondri düzeyinde rol oynayan düzenleyicilerdir. Bunlardan Bcl-2 ve Bcl-X hücre ölümünü önlerken, Bax ve Bcl-XS hücre ölümüne yol açarlar. Antiapoptotik proteinler olan Bcl-2 ve Bcl-X mitokondri zar potansiyelini düzenleyerek mitokondriden sitozole sitokrom c çıkışını ve böylece kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivasyonunu önlerler ve böylece apoptozisi inhibe ederler. Buna karşılık, Bax dış mitokondri zarının permeabilitesini artırarak sitokrom c'nin mitokondriden sitozole geçişini indükler. Sonuç olarak Bcl-2 ve Bax, mitokondriden sitozole sitokrom c geçişini zıt yönde etkiler. Bu nedenle Bcl-2/Bax oranı apoptozisin varlığını gösteren güçlü bir göstergedir ve bu oran apoptotik bir uyarı alan hücrenin apoptozise olan yatkınlığını gösteren bir sigorta olarak tanımlanır. Denge Bcl-2 lehine

değişirse hücre ömrü artmakta, Bax lehine değişirse hücre ölüme gitmektedir (35,49,74,96).

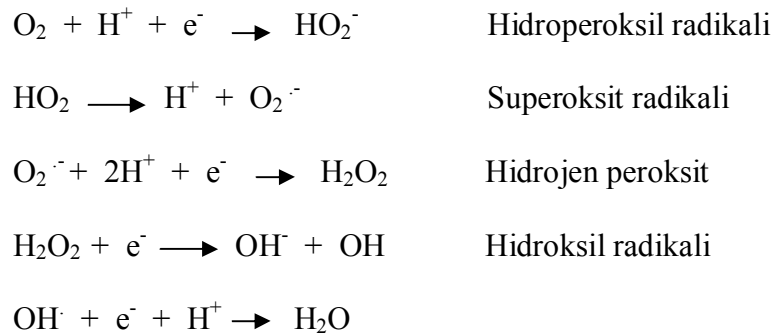
Çalışmamızda, alkolik karaciğer hasarında rol oynayan iki bağımsız faktörün, yani CYP2E1 indüksiyonunun ve endotokseminin birlikte, karaciğerde apoptotik ve nekrotik oluşumları etkileme potansiyeli dişi ve erkek sıçanlarda incelenmek ve karşılaştırılmak istendi. Bu amaçla 2 gün süreyle pirazol injeksiyonu yapılarak CYP2E1 enzim sistemi indüklenen dişi ve erkek sıçanlara periton içi tek doz LPS uygulandı ve uygulamadan 6 saat sonra karaciğerde apoptozis ve nekrozis ile prooksidan-antioksidan dengedeki olası değişimler araştırıldı. Apoptozis, Bax ve Bcl-2 ekspresyonları, kaspaz-3 aktivitesi ve in situ uç işaretleme tekniği (TUNEL) ile, nekroz ise serumda transaminaz aktiviteleri ölçümü ve histopatolojik olarak incelendi. Apoptoz ve nekroz gelişiminde prooksidan-antioksidan dengedeki değişimlerin rolünü belirlemek amacıyla lipid peroksidasyonunun göstergesi olan malondialdehit (MDA) ve dien konjugat (DK) düzeyleri ve antioksidan sistemi oluşturan glutatyon (GSH), E vitamini, C vitamini düzeyleri ile süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon transferaz (GST) düzeyleri ölçüldü.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. SERBEST RADİKALLER, OKSİDATİF STRES VE ANTİOKSİDAN SİSTEM

Serbest radikaller, dış orbitalinde paylaşılmamış bir elektron taşıyan bileşiklerdir. Ömürleri çok kısa olan ve kararsız bir yapı gösteren bu tanecikler organizmada hem metabolizma sırasında sürekli oluşurlar, hem de radyasyon, ilaçlar ve zararlı kimyasallar gibi çeşitli dış etkenlerin etkisi sonucunda ortaya çıkabilirler. Organizmada oluşan radikallerin çok önemli bir bölümü oksijen kaynaklıdır. Oksijen dışında azot, karbon ve kükürt merkezli radikaller de oluşmaktadır (Tablo 1) (38,50,70,95).

Aerobik organizmalarda yaşamın sürdürülebilmesi için oksijene mutlak gereksinim vardır. Oksijen hücrede bir dizi reaksiyondan geçerek suya dönüşmekte ve bu süreçte hücre kendisi için gerekli enerjiyi sağlamaktadır. Fakat bu süreçte oksijenin %2-3 kadarı suya dönüşmemekte, oksijen kaynaklı radikaller oluşmaktadır. Oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi ile superoksit radikali, iki elektron alarak indirgenmesi ile hidrojen peroksit oluşur. Üçüncü elektron ilavesi ile yüksek derecede reaktif hidroksil radikali oluşur. Dördüncü elektron eklenmesi ile su oluşmaktadır (38,50,70,95).



Serbest radikaller organizmada mitokondrinin yanı sıra hücrelerin tüm fraksiyonlarında zara bağlı veya serbest halde bulunan pek çok enzimin katalizlediği reaksiyonlar sırasında oluşmaktadır. Bunlar arasında mikrozomal karma fonksiyonlu oksidaz sistemi, sitoplazmada ksantin oksidaz, hücre zarına bağlı NADPH oksidaz ve lipooksijenazlar gibi enzimlerin kataliz ettiği reaksiyonlar sayılabilir (38,50,70,95).

**Tablo 1.** Oksijen ve azot kaynaklı reaktif bileşikler.

| Radikaller   |                               | Radikal olmayanlar  |                               |
|--------------|-------------------------------|---------------------|-------------------------------|
| Hidroksil    | HO ·                          | Hidrojen peroksit   | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |
| Alkoksil     | RO ·                          | Singlet oksijen     | *O <sub>2</sub>               |
| Peroksil     | ROO ·                         | Ozon                | O <sub>3</sub>                |
| Süperoksit   | O <sub>2</sub> · <sup>-</sup> | Hipoklorid asit     | HOCl                          |
| Nitrik oksit | NO ·                          | Lipit hidroperoksit | LOOH                          |
| Azot dioksit | NO <sub>2</sub> ·             | Peroksinitrit       | ONOO <sup>-</sup>             |

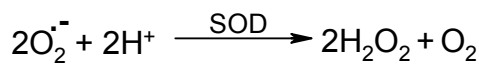
Organizmada sürekli biçimde serbest radikal niteliğinde bileşikler oluşmaktadır. Ancak bu radikallerin organizmaya zarar vermesi güçlü bir savunma sisteminin varlığı nedeniyle engellenmektedir. Bu nedenle serbest radikallerin oluşum hızı ile etkisizleştirme hızının dengede tutulması son derece önemlidir. Bu denge bozulduğu zaman, serbest radikallerin zararlı etkileri ortaya çıkmakta ve çeşitli organ ve sistemler olumsuz etkilenmektedir (94,104 ).

Antioksidanlar, radikal oluşumunu sınırlandırma, tetiklenen biyokimyasal reaksiyonların kırılmasını sağlama, oluşan radikalleri ortadan kaldırma ve hasarlı molekülleri tamir etme ve temizleme gibi çeşitli mekanizmalarla etkilerini göstermektedirler. Antioksidan sistem; enzimleri, suda ve yağda çözünen radikal tutucularını ve metal iyonlarını bağlayan proteinleri kapsamaktadır (Tablo 2) (70,102,104).

**Tablo 2.** Organizmada antioksidan sistem elemanları

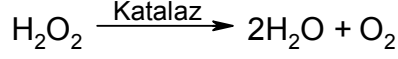
| Enzimler               | Suda çözünen<br>Radikal tutucuları | Yağda çözünen<br>radikal tutucuları | Metal iyonlarını<br>bağlayan proteinler |
|------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------------|
| ◆ Süperoksit dismutaz  | ◆ Glutasyon                        | ◆ Vitamin E                         | ◆ Ferritin                              |
| ◆ Katalaz              | ◆ Vitamin C                        | ◆ β-Karoten                         | ◆ Transferrin                           |
| ◆ Glutasyon            | ◆ Ürik asit                        | ◆ Bilirubin                         | ◆ Haptoglobin                           |
| ◆ peroksidaz           | ◆ Glikoz                           | ◆ Ubikinol                          | ◆ Seruloplazmin                         |
| ◆ Glutasyon redüktaz   | ◆ Sistein                          | ◆ Flavonoidler                      | ◆ Albumin                               |
| ◆ Glutasyon transferaz |                                    |                                     |                                         |

**SOD:** SOD enzimi süperoksit radikalini dismutasyona uğratarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlar.

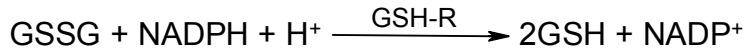
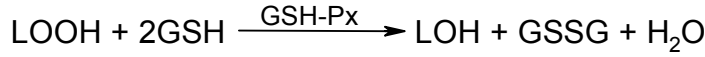


İnsanlarda SOD'un bakır ve çinko (Cu ve Zn) ve mangan (Mn) kapsayan iki izoenzimi bulunmaktadır. Cu-Zn SOD sitozolde, Mn-SOD mitokondride bulunur.

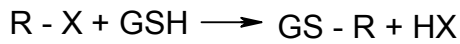
**Katalaz:** Tetramerik hemoprotein olan katalaz enzimi yüksek konsantrasyonda oluşan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i oksijen ve suya parçalayan reaksiyonu katalizler. Enzim, peroksizomlarda yerleşmiştir.



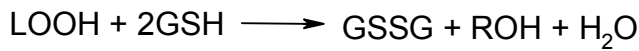
**GSH-Px:** GSH-Px gerek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve gerekse lipit hidroperoksitleri (LOOH) metabolize etmektedir. GSH-Px'ın selenyum bağımlı ve selenyum bağımsız iki farklı tipi vardır. Selenyum bağımlı formu hem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in hem de LOOH'ların metabolizmasında yer alırken, selenyuma bağımlı olmayan tipi sadece LOOH'ları metabolize etmektedir. Bu reaksiyonlarda GSH hidrojen verici olarak görev yapmakta, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve LOOH'lar indirgenirken, GSH oksitlenmiş şekline (GSSG) dönüşmektedir. Oksitlenmiş glutatyon ise NADPH'a bağımlı glutatyon redüktaz (GSH-R) tarafından tekrar GSH'a indirgenmektedir.



**GST :** GST dimerik yapıda olup sitozolde bulunmaktadır. Çok sayıda izoenzimi vardır. Yabancı maddelerin biyotransformasyonunda önemli rolleri olan GST'ler çeşitli endojen ve eksojen bileşiklerin GSH ile konjugasyonunu kataliz ederler.



GST'lerin bazı izoenzimleri GSH-Px aktivitesi göstererek LOOH'ların metabolizmasını da sağlarlar (38,94,104).



**GSH :** GSH hücre için en önemli antioksidan moleküldür ve serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidan hasara karşı korur. GSH zehirsizleştirme reaksiyonlarına doğrudan katıldığı gibi, bazı enzimlerin substratı veya kofaktörü olarak da görev yapmaktadır. Başta karaciğer olmak üzere pek çok dokuda yüksek oranda bulunur. Glutamat, sistein ve glisinden sentezlenen bir tripeptiddir ve sülfidril grupları açısından oldukça zengindir. GSH-Px, GSH-R ve GST gibi enzimlerin fonksiyonu için gereklidir. Ayrıca hücrenin protein yapısındaki sülfhidril (-SH) gruplarını

indirgenmiş halde tutarak pek çok proteinin ve enzimin inaktivasyonunu engeller. GSH aminoasitlerin membrandan transportunda da rol alır (70,102,104).

**Vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol ):** E vitamini yağda eriyen en kuvvetli antioksidan vitamindir ve yapısal olarak birbiri ile bağlantılı bir grup bileşiği kapsar (tokoferoller ve tokotrienoller). Bunların hepsi izoprenoid takısı içeren bileşiklerdir. Yapısında bulunan fenol halkasındaki hidroksil grubu aktif kısmını oluşturur ve molekülün antioksidan özelliği bu gruptan kaynaklanır (102,104).

**Vitamin C (Askorbik Asit) :** Askorbik asit suda çözünen en güçlü antioksidan moleküldür. İnsanlarda sentez edilmediği için diyetle alınması gerekir. Vitamin C yapıcı heksozlara benzer ve organizmada kolayca dehidroaskorbik aside oksitlenir. Superoksit radikali, hidroksil radikali ve singlet oksijen ile kolayca reaksiyona girerek onları etkisizleştirir. Sulu fazda bulunmasına karşın lipit peroksidasyonunu başlatıcı radikalleri temizleyerek lipitleri ve zarları da oksidan hasara karşı korur. E vitamininin tekrar rejenerasyonunda görev alır, tokoferoksil radikalının  $\alpha$ -tokoferole indirgenmesini sağlar. Böylece E vitamini ile birlikte etkin bir şekilde LDL'yi oksidasyona karşı korur. (102,104).

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmada güçlü bir savunma sistemi olmasına rağmen, bazı durumlarda savunma sistemi yetersiz kalmakta ve oksidatif stres gelişmektedir. Hasarın yerine bağlı olarak çeşitli organ ve sistemler etkilenmektedir. Serbest radikaller reaktif yapıları nedeniyle başta lipitler, proteinler ve nükleik asitler olmak üzere tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme ve onlara zarar verme özelliğindedir (38,50,95,104).

**a) Serbest radikallerin lipitlere etkisi:** Serbest radikallerin lipitler üzerindeki en önemli etkileri lipit peroksidasyonunun uyarılmasıdır. Lipit peroksidasyonu serbest radikaller tarafından başlatılan ve hücre membranlarında bulunan çok doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna yol açan kimyasal bir olaydır. Süperoksit radikali, hidroksil radikali, peroksil radikali ve alkoksil radikali, lipit peroksidasyonunu başlatan başlıca radikallerdir.

Lipit peroksidasyonu çok doymamış yağ asidi (LH) zincirindeki  $\alpha$ -metilen gruplarından hidrojen atomunun uzaklaşması ile başlar ve böylece yağ asidi zinciri bir radikal niteliği kazanır. Bu lipit radikali ( $L^{\cdot}$ ) dayanıksız bir bileşik olup bir dizi değişikliğe uğrar. İlk önce, molekül içi çift bağ aktarılması (rezonans) ile dien konjugatı oluşur. Bu yağ asidi radikali oksijen eklenmesiyle hızlı bir şekilde peroksil radikaline ( $LOO^{\cdot}$ ) dönüşür. Bu lipit peroksil radikalleri membran yapısındaki diğer çok doymamış yağ asidi

moleküllerinden hidrojen atomlarını çıkartarak yeni reaksiyonları başlatır, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipit hidroperoksitlerine (LOOH) dönüştür. Lipit hidroperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklerine dönüşmesi ile lipit peroksidasyon reaksiyonları sona erer (Şekil 1).

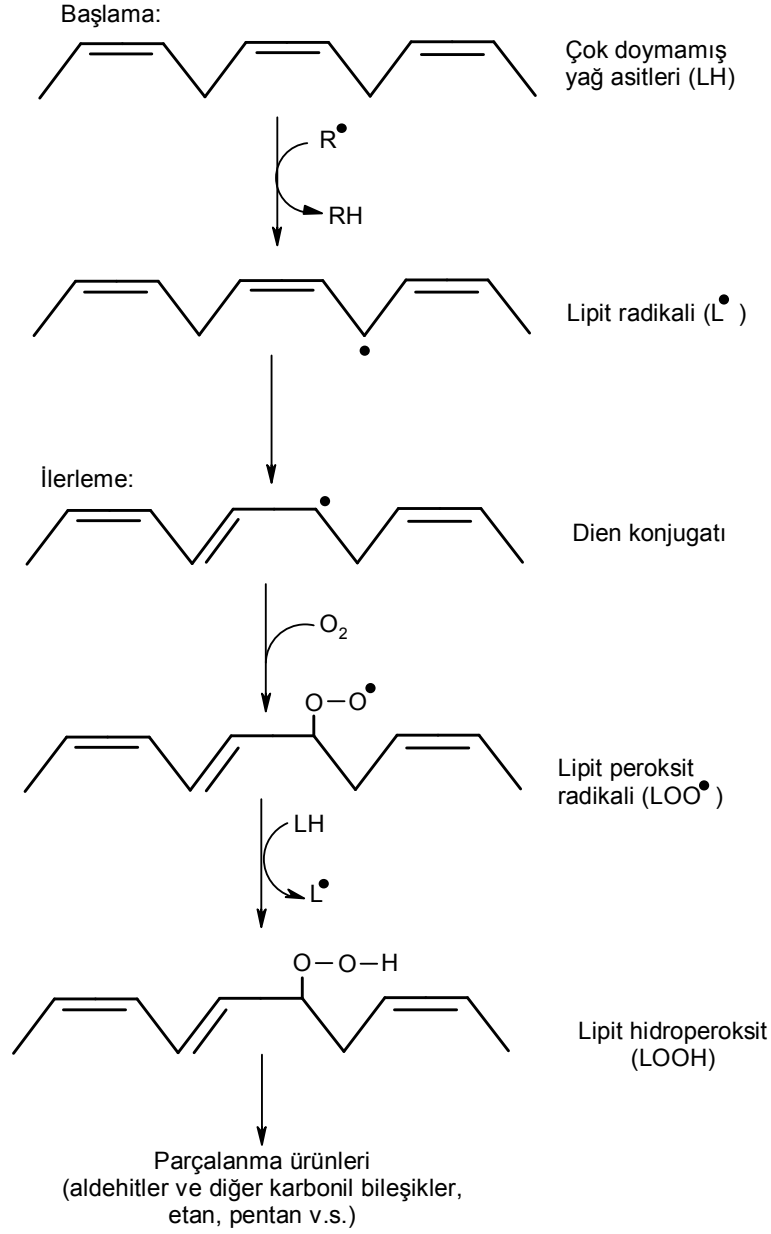
Hücre membranlarında lipit peroksidasyonu sonucu transport sistemi etkilenir, hücre içi ve dışı iyon dengeleri bozulur. Bunun sonucunda hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artar ve buna bağlı olarak proteazlar aktive olur. Bu olaylar hücre hasarında etkin bir rol oynar. Ayrıca lipit peroksidasyonun son ürünü olan aldehitler de sitotoksik etkilere sahiptir (38,50,95,104).

**b) Serbest radikallerin proteinlere etkisi:** Serbest radikaller proteinler üzerinde doğrudan veya dolaylı etki gösterebilir. Peptid bağları, prolin ve lizin gibi amino asitler serbest radikallerden oldukça kolay etkilenir. Protein oksidasyonu, özellikle histidin, tirozin, fenilalanin gibi amino asitlerde karbonil gruplarının oluşumu şeklinde olur. Lipit peroksidasyonun aldehit yapıdaki ürünleri, sistenin sülfidril grupları ile veya lizin ve histidinler ile kovalent bağlar oluşturarak proteinlerde fragmentasyon ve çapraz bağlanmalara yol açar. Bu olaylar proteinlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulmasıyla sonuçlanır (38,50,95,104).

**c) Serbest radikallerin nükleik asitler ve DNA üzerine etkisi:** Serbest radikallerin etkisi ile DNA yapısında yapısal değişimler olur. Bu yapısal değişimler pürin ve pirimidin bazlarında parçalanma, zincir kırılmaları, DNA denatürasyonu gibi çeşitli olayları kapsamaktadır (38,104).

Oksidatif stres çeşitli yöntemlerle gösterilebilir. Lipitlerdeki hasarı göstermek için genellikle lipit peroksidasyonu, protein hasarını belirlemek için protein karbonil grupları ölçümü kullanılmaktadır (38,104).

Nitrozatif stres ise, organizmada superoksit anyonu ile NO'nun birleşmesi ile oluşan son derece güçlü bir oksidan olan peroksinitrit oluşumundaki artış sonucu gelişmektedir. Peroksinitrit anyonu mitokondriyal elektron transport zincirini inhibe ettiği, proteinlerin sülfidril gruplarını oksitlediği, lipit peroksidasyonunu uyardığı ve tirozin gibi sinyal iletim yollarında etkin aminoasitleri nitratladığı için sitotoksiktir (9,36,69,70).



**Şekil 1.** Lipit peroksidasyonu reaksiyonları.

Günümüzde serbest radikallerin bir çok hastalığın ve patolojik durumun ortaya çıkışında önemli bir rol oynadığı kabul edilmektedir. Oksijen radikalleri ile ilgili bu patolojik durumlar çok geniş bir yayılım göstermektedir (Tablo 3). Serbest radikallerin yaşlanma, ateroskleroz, kanser oluşumu, iskemi-reperfüzyon hasarı; karaciğer hasarı gibi bir çok hastalıkta etkin bir rol oynadığı saptanmıştır (38,50,95).

**Tablo 3.** Serbest radikallerle ilişkili bazı patolojik durumlar

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"><li>❖ Yaşlanma</li><li>❖ Ateroskleroz</li><li>❖ Kanser</li><li>❖ İskemi-reperfüzyon hasarı</li><li>❖ Romatoid artrit</li><li>❖ Otoimmün hastalıklar</li><li>❖ Akciğer hastalıkları</li><li>❖ Kas hastalıkları</li><li>❖ Karaciğer bozuklukları</li><li>❖ Kan hastalıkları</li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>❖ Radyasyon hasarı</li><li>❖ İnflamasyon</li><li>❖ Diabetes Mellitus</li><li>❖ Beyin ve merkez sinir sistemi hastalıkları</li><li>❖ Böbrek bozuklukları</li><li>❖ Göz bozuklukları</li><li>❖ Cilt bozuklukları</li><li>❖ Gastrointestinal bozukluklar</li><li>❖ Beslenme yetersizlikleri</li></ul> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

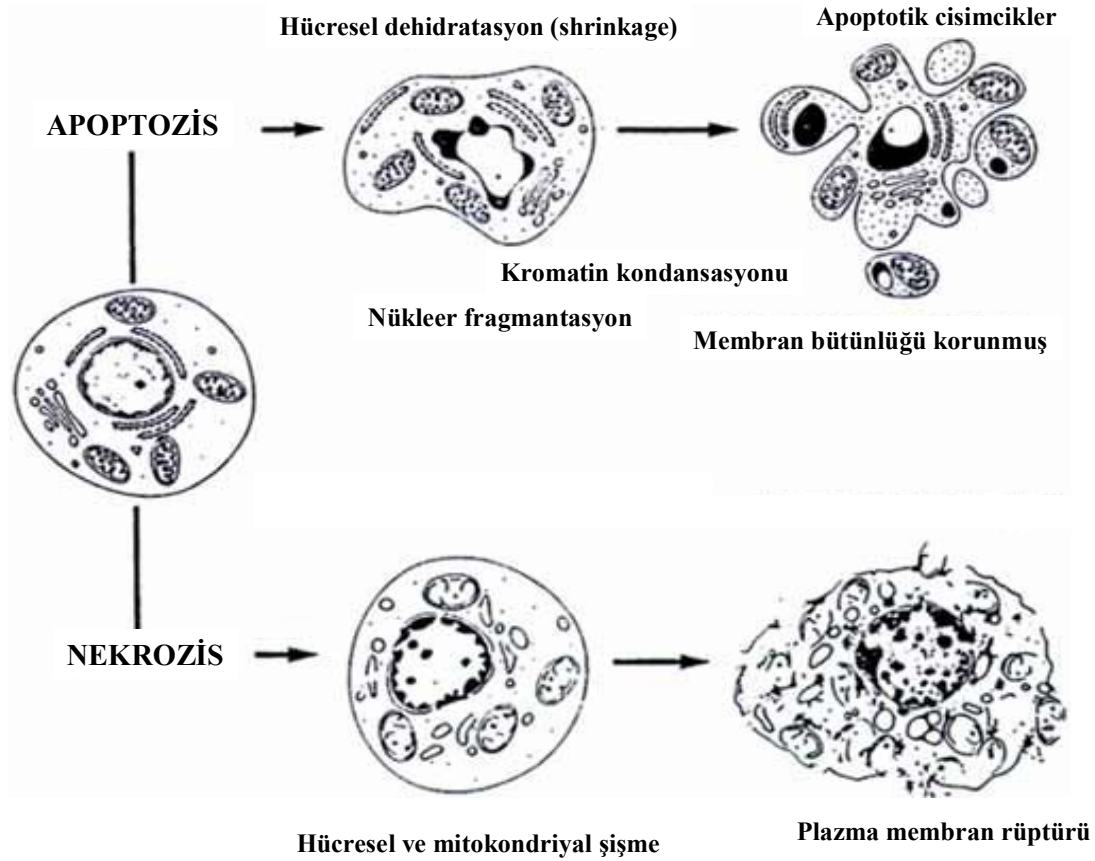
## 2.2. APOPTOZİS VE NEKROZİS

Genel olarak hücre ölümü iki farklı olayla gelişmektedir. Bunlar apoptozis ve nekrozis olarak tanımlanmaktadır. Apoptozisten nekrozise geçiş, apoptozisin oluşum hızı ile fagositoz hızı arasında bir dengesizlik olduğunda görülür. Apoptozise uğrayan hücreler parçalanmadan ve inflamasyonu uyarmadan önce fagositte edildiği için inflamasyon gelişmemektedir. Dokudaki apoptotik hücrelerin sayısı dokunun fagositoz kapasitesini aştığı zaman apoptotik hücreler parçalanmakta, inflamasyon ve nekroz gelişmektedir (33,35, 61,90).

Nekrozis patolojik bir ölüm şekli olmasına rağmen, apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelebilir. Nekrozisde hücre içine aşırı sıvı girmesi sonucu hücre şişerken (cell swelling), apoptotik hücre tam tersine küçülür (cell shrinkage). Nekrotik hücrenin kromatin paterni normal hücredekine benzemesine rağmen, apoptotik hücrenin kromatini nükleus membranının çevresinde toplanmakta (chromatin aggregation) ve kondanse olmaktadır (chromatin condensation). Nekrotik hücrenin plazma membranı bütünlüğünü kaybetmekte ve hücre içinden dışına hücre içi materyaller çıkmaktadır. Buna karşılık, apoptotik hücre membranı yapısal bütünlüğünü korumakta, ancak üzerinde küçük cepekler oluşmaktadır (membrane blebs). Nekrotik hücre sonuçta lizise uğramakta, apoptotik hücre ise küçük cisimciklere parçalanmaktadır (apoptotic bodies). Apoptotik cisimcikler membranla kaplıdır, değişen miktarlarda nükleus veya diğer hücre içi yapılar

içerirler. Nekroziste plazma membranının bütünlüğünün bozularak hasarlanması nedeniyle hücre içeriğinin dış ortama saliverilmesi sonucu inflamasyon uyarılır. Oysa apoptotik hücre veya cisimcikler plazma membranları hasarlanmadan komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosit edildiklerinden inflamasyon oluşmaz (Şekil 2) (33,61,90).

Apoptozisin en özgün yönü, DNA'nın internükleozomal bölgelerden yaklaşık 180-200 baz çifti veya bunun katları boyutunda DNA parçaları oluşturacak şekilde parçalanmasıdır. Bu durum agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsü imajının ortaya çıkmasına neden olur (ladder pattern). Apoptotik hücrede görülen önemli değişikliklerden biri de normalde plazma membranının iç yüzünde bulunan fosfatidil serinin membranın dış yüzüne doğru yer değiştirmesidir (phosphatidylserine translocation). Bu durum apoptotik hücrelerin komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınmasını sağlamaktadır (33,61,90).



**Şekil 2.** Apoptozis ve nekroziste hücredeki değişimler

Apoptotik süreci başlatan olaylar başlıca üç farklı nedene dayanmaktadır. Bunlar mitokondri hasarı, hücre yüzeyinde yeralan bazı reseptörlerin uyarılması ve nükleer DNA hasarıdır. Ancak bu farklı yollar arasında bazı etkileşimler de sözkonusudur (Şekil 3) (33,45,49, 61,74,96).

Mitokondride zar bütünlüğünde değişime yolaçan olaylar apoptozise neden olmaktadır. Bcl-2 ailesi mitokondrideki değişimlerden kaynaklanan apoptoziste çok önemli rol oynamaktadır. Bu ailenin üyelerinin bir kısmı apoptozisi indüklemekte (Bax, Bad, Bid, Bcl-X<sub>s</sub>), bir kısmı ise inhibe etmektedir (Bcl-2, Bcl-X<sub>l</sub>). Hücrenin yaşayabilirlik (survival) durumu bu ailenin pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerinin rölatif oranına bağlıdır. Anti-apoptotik özellikteki Bcl-2 mitokondri dış membranında bulunmakta ve iyon transportunu düzenlemektedir. Pro-apoptotik özellikteki Bax ve Bid ise sitozolde bulunmakta ve apoptotik uyarı ile mitokondri membranına bağlanmakta, burada küçük delikçiklerin (porlar) oluşumunu indüklemektedir. Böylece selektif iyon permeabilitesi kaybolmakta ve sitokrom c ve apoptozis-indükleyici faktör (AIF) mitokondriden sitozole çıkmaktadır (33,35,45,49).

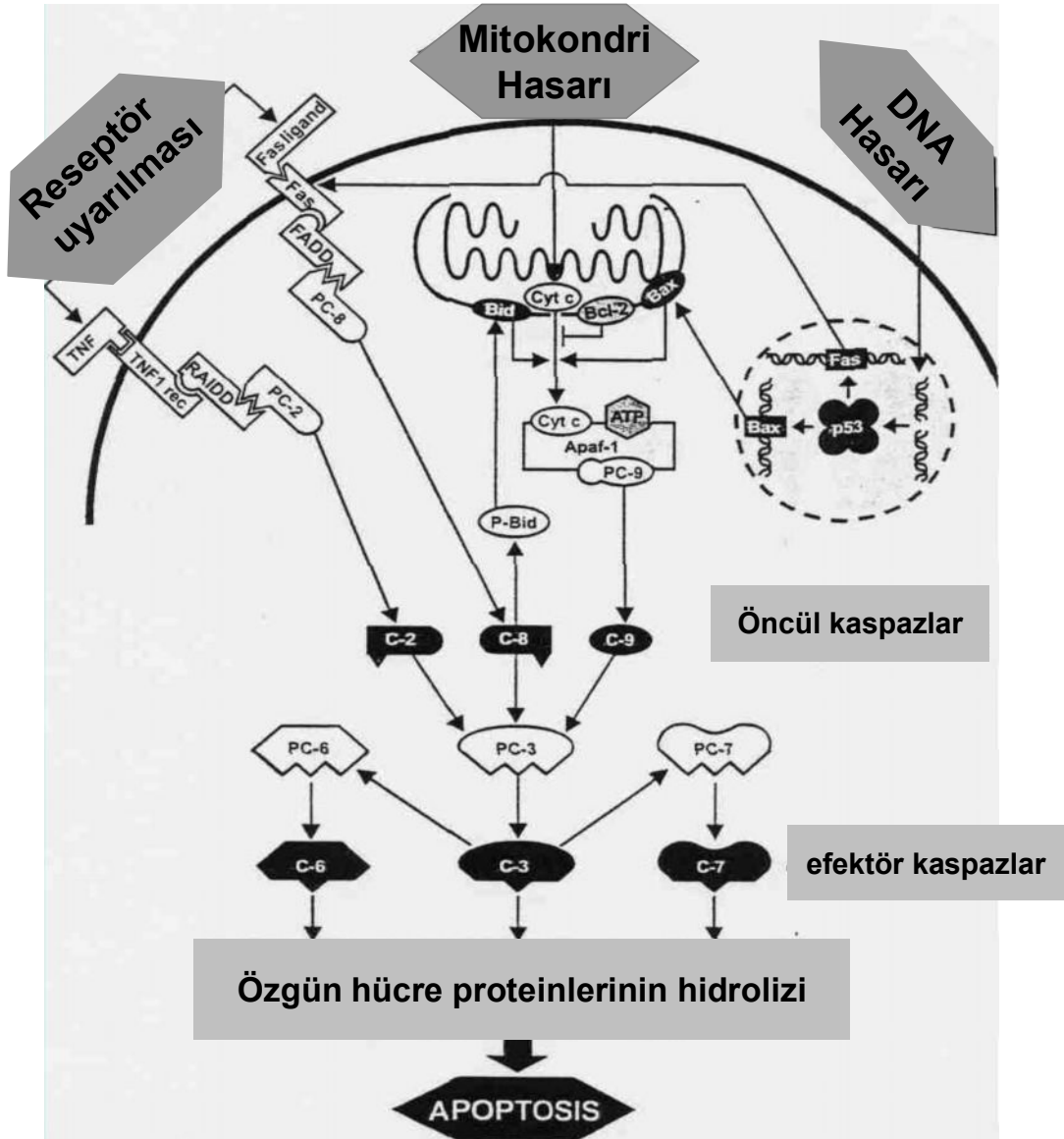
Sitokrom c, mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirinde yeralan bir proteindir. Sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salıverilmesi apoptotik bir hücrede geriye dönüşümsüz bir döneme girildiğini işaret etmektedir. Sitozole geçen sitokrom c, bir sitoplazmik protein olan Apaf-1'e (apoptotic protease activating factor-1) bağlanarak onu aktive etmekte, ardından ATP'nin de katılımıyla apoptozom adı verilen bir kompleks oluşmaktadır. Bu kompleks ise kaspazlar (caspase) olarak tanımlanan proteazların aktivasyonuna neden olmaktadır. Kaspazlar, zimojen (inaktif prekürsör) olarak sitoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sistein bulunan proteazlar olup günümüzde 14 tanesi tanımlanmıştır. Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek preteolitik bir kaskada (şelale tarzı reaksiyon dizisi) neden olurlar. Bazıları (Kaspaz 2,8,9) öncül kaspazlar olarak bilinirken, diğerleri (3, 6, 7) efektör kaspazlar olarak bilinir. Sitokrom c'nin sitoplazmaya çıkması sonucu oluşan apoptozom inaktif olan prokaspaz-9 (PC-9) 'un aktif kaspaz-9'a, aktif kaspaz-9 ise efektör kaspazların, özellikle kaspaz-3'ün aktivasyonuna neden olmaktadır. Bu aktivasyon apoptozisin karakteristik bulgularından biri olan kromatin kondansasyonuna ve DNA fragmentasyonuna neden olur. Bu apoptotik süreç kaspaz-bağımlı apoptozis olarak tanımlanır (33,35,45,49).

Apoptozis hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas ve tümör nekroz faktör reseptörü-1'in (TNFR-1) ilgili ligandları ile etkileşime girmesi ile de indüklenir. Bu hücre yüzey reseptörleri membranda bulunur ve TNFR ailesinin üyesidirler. Fas lenfoid

hücrelerde, hepatositlerde, bazı tümör hücrelerinde, akciğerlerde ve miyokardda bulunur. İlgili ligandına Fas ligand (FasL) denir. FasL, tümör nekroz faktör (TNF) ailesinin bir üyesidir. FasL sitotoksik T lenfositlerinde ve “natural killer” hücrelerde bulunur. Fas ve TNFR-1, ligandlarıyla bağlandıklarında ölüm uyarısı almış olduklarından bir seri protein-protein etkileşimleri gerçekleşir. Öncelikle kendilerine doğal olarak bağlı bulunan ve ölüm bölgeleri (death domain) adı verilen RAIDD (RIP associated ICH-1 homologous protein with a death domain) ve FADD (Fas associated death domain) ile etkileşime girer. Bu ölüm bölgeleri ise prokaspaz 8 (PC-8) veya prokaspaz 2 (PC-2)’yi aktifleştirerek kaspazların kaskad tarzında aktivasyonlarını başlatır (33,61,80,96).

Fas ve TNFR-1 aracılığıyla gerçekleşen ve ekstrinsik yol olarak da tanımlanan apoptotik süreç kaspaz 8 aktivasyonu ile mitokondriyal apoptotik mekanizmayı da uyarmaktadır. Kaspaz 8 aktivasyonu pro-Bid’in (P-Bid) Bid’e dönüşmesine ve dolayısıyla mitokondriden sitozole sitokrom c’nin çıkışına neden olur (33,96). Apoptozis genotoksik ajanların etkisiyle yaratılan ağır DNA hasarına yanıt olarak p53’ün indüksiyonuyla da başlatılabilir. İndüklenen p53, bir pro-apoptotik bcl-2 ailesi üyesi olan bax’ın ekspresyonunu arttırarak mitokondri aracılığıyla veya Fas ekspresyonunu arttırarak ekstrinsik yolla apoptozisi başlatabilir (33,49).

Apoptozis gelişiminde superoksit, peroksinitrit ve hidroksil radikali gibi radikal oluşumundaki artışın yol açtığı oksidatif ve nitrozatif stresin etkin bir rol oynadığı saptanmıştır (33,45,49,61,74 ). Bu radikallerin hem mitokondri, hem plazma membranı, hem de genom üzerine etkilerle apoptotik süreci tetikleyebileceği bildirilmiştir (33,45,49,61,74).



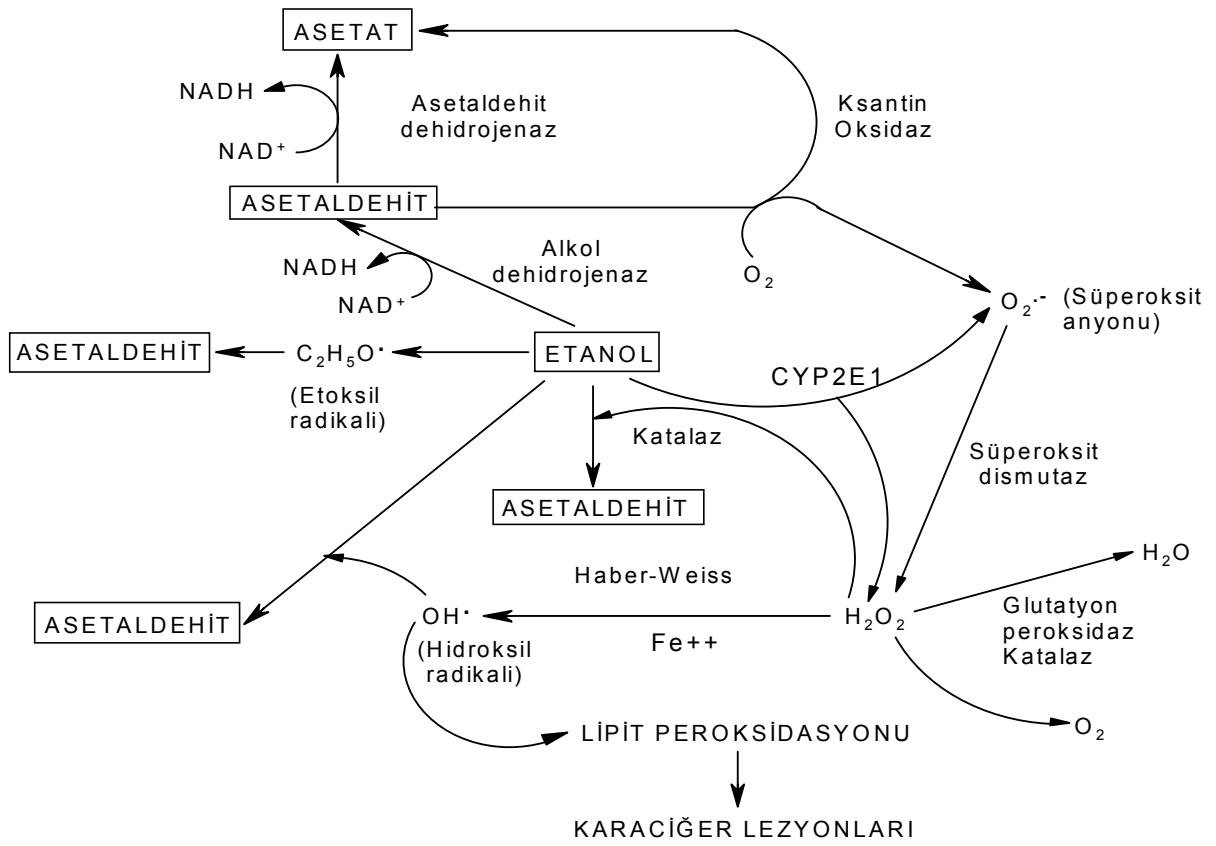
Şekil 3. Apoptozisi uyaran mekanizmalar.

### 2.3. ALKOLİK KARACİĞER HASARI, CYP2E1 VE OKSİDATİF STRES

Alkol bir çok toplumda önemli bir sağlık problemidir. Fazla miktarda ve uzun süre alkol alınmasıyla bir çok toksik etki ortaya çıkmaktadır. Bunlar içerisinde özellikle karaciğer hastalığı önemlidir. Alkolün etkisiyle karaciğerde yağlanma, apoptoz, hepatit ve siroz gibi farklı tablolar gelişmektedir (2,22,57). Alkolün karaciğer üzerindeki toksik etkilerinin patogenezinde hangi faktörlerin rol oynadığı uzun yıllardan beri araştırılmaktadır. Genel olarak, bu toksik etkilerden alkolün kendisinin değil, karaciğerdeki oksidasyon ürünlerinin sorumlu olduğu kabul edilmektedir (2,57). Akut ve kronik alkol uygulamalarından sonra karaciğerde meydana gelen patolojik değişikliklerin patogenezinde, karaciğerde NADH/NAD oranının artması, toksik bir bileşik olan asetaldehit birikimi, mitokondri hasarı, endotoksemi ve serbest radikal nitelikli bileşiklerin oluşması önemli bir rol oynamaktadır (2,3,4,14,22,57,65,66,91,101). Bunların her biri alkolik karaciğer hasarının oluşumunda etkili olmakla birlikte, özellikle serbest radikaller üzerinde durulmaktadır (2,3,4,22,57,65,66,91,101).

Mide ve barsaktan süratle emilen alkol, vena porta yoluyla karaciğer hücrelerine ulaşmakta ve oksitlenerek asetaldehite dönüşmektedir. Bu oksidasyon alkol dehidrojenaz (ADH), CYP2E1 ve katalaz olmak üzere 3 farklı enzim sistemi tarafından yapılmaktadır. ADH, CYP2E1 ve katalaz enzimlerinin etkisiyle oluşan asetaldehitin % 90 gibi büyük bir bölümü karaciğerde asetik aside oksitlenmektedir. Bu dönüşümü sitozolde ve mitokondride bulunan ve NAD<sup>+</sup> kullanan iki ayrı aldehit dehidrojenaz (ALDH) katalizlemektedir. Öte yandan, aldehit oksidaz ve ksantin oksidaz da bu dönüşüme katkıda bulunmaktadırlar (Şekil 4) (2,57,101).

Etanol normal düzeylerde genellikle alkol dehidrojenaz (ADH) enzimi tarafından oksitlenmesine karşılık, yüksek konsantrasyonlarda ve kronik koşulda CYP2E1 etkili olmaktadır (2,48,57,101). Önceleri mikrozomal etanol oksitleyici sistem (MEOS) olarak adlandırılan bu enzim 493 aminoasit içerir ve molekül ağırlığı 56820'dir. CYP2E1 geni 10. kromozom üzerinde yeralır ve 11413 baz çifti içerir (33,98). CYP2E1 indüksiyonundan sonra etanol toksisitesinin arttığı, buna karşılık CYP2E1 inhibitörleri kullanıldığında veya CYP2E1 “knockout” farelere etanol verildiğinde etanol toksisitesinin azaldığı bulunmuş ve bu bulgular etanol toksisitesinde CYP2E1'in etkin bir rol oynadığını göstermiştir (48,57,101).

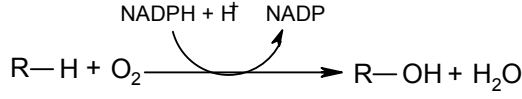


**Şekil 4.** Etanol ve asetaldehit metabolizması ve serbest radikal oluşumu.

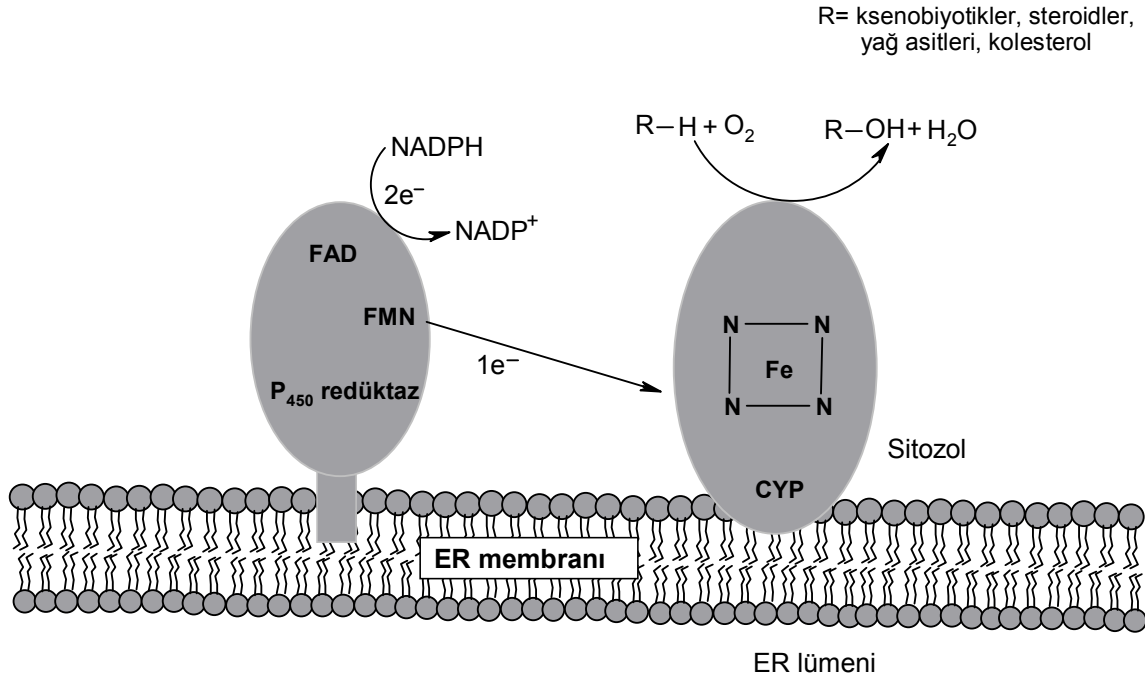
CYP2E1 ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda rol alan sitokrom P<sub>450</sub>'ye bağımlı mikrozomal hidroksilasyon sisteminin bir üyesidir. CYP2E1, etanolün yanı sıra, CCl<sub>4</sub>, asetaminofen, benzen, halotan ve halojenli bileşikler gibi çok sayıda toksik bileşiğin metabolizmasında ve aktivasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Nitrozaminler ve azobileşikler gibi prokarsinojenler de CYP2E1'in substratıdır. Bu bileşiklerin toksisitesinin CYP2E1 indüksiyonu ile arttığı bilinmektedir. CYP2E1'in katalitik etkinliği sırasında süperoksit radikali ve hidrojen peroksit gibi aktif oksijen türleri oluşur. CYP2E1 aynı zamanda radikal oluşturma özelliğine sahip NADPH oksidaz aktivitesi de göstermektedir (16,31,33,52,86,98).

Bilindiği gibi, sitokrom P<sub>450</sub> enzim sistemi, ilaçlar, kimyasal maddeler, insektisitler, petrol ürünleri gibi toksik maddeleri oksitlemektedir. Sitokrom P<sub>450</sub> tarafından katalizlenen oksidasyonlar çeşitli şekillerde oluşur. Bunlar aromatik halka ve yan zincir oksidasyonu, dealkilasyon, desülfürasyon, sülfoksit oluşumu, N-oksidasyon, epoksidasyon ve dehalojenizasyon şeklinde sıralanabilir. Bu reaksiyon sırasında moleküler oksijenin

atomlarından birisi substrata aktarılırken, diğeri ise suya indirgenir; bu nedenle sitokrom P<sub>450</sub> enzimlerine monooksijenazlar da denilmektedir ( 33,98).



Memelilerde sitokrom P<sub>450</sub>, endoplazmik retikulumda son elektron alıcısı olarak görev yapar. Sitokrom P<sub>450</sub> proteinlerinde oksijenin bağlandığı prostetik grup bir demir atomu içeren protoporfirin IX'dur (hem). Sitokrom P<sub>450</sub> ile katalizlenen reaksiyonlarda hem demirinin indirgenmesi, oksijen molekülünün bağlanması ve bir oksijen atomunun uzaklaştırılması için iki elektron kullanılmaktadır. Bu iki elektronun vericisi NADPH'dir, fakat tek bir prostetik grubu olan sitokrom P<sub>450</sub> bir kerede bu elektronların sadece birisini alabilir. Bu durumda, NADPH'dan iki elektronu birden alabilen, fakat bu elektronları sitokrom P<sub>450</sub>'ye birer birer verebilme kapasitesine sahip bir aracı protein gerekmektedir. Bu transfer, bir flavoprotein olan NADPH-sitokrom P<sub>450</sub> redüktaz enzimi tarafından gerçekleştirilir. N-terminaline yakın bulunan hidrofobik gruplar nedeniyle enzim endoplazmik retikuluma iyice gömülmüştür. Enzimin yapısındaki FAD, NADPH'den gelen elektronların giriş noktası, FMN ise çıkış noktası olarak görev yapar. Enzim NADPH'dan aldığı iki elektronu sitokrom P<sub>450</sub>'ye vermeden önce bu iki flavin molekülünde depolayabilir (Şekil 5) (33,98).



**Şekil 5.** Endoplazmik retikulumda (ER), sitokrom P<sub>450</sub> sisteminin (CYP) elemanları

Bu enzimler tüm canlılarda bulunur ve yaklaşık 150 izoformdan oluşur. Sitokrom P<sub>450</sub> izoformları ve bunları kodlayan genler ile ilgili bilgilerimiz giderek artmaktadır. İnsan genomunda sitokrom P<sub>450</sub> enzimlerinin en az 18 ailesi ve 43 alt ailesinin kodlandığı gösterilmiştir. Aynı aileye ait sitokrom P<sub>450</sub> proteinler %40'tan, aynı alt aileye ait sitokrom P<sub>450</sub> proteinler %55'den fazla yapısal homolojiye sahiptir. Yapısal homolojiye dayanan sınıflandırmaya göre sitokrom P<sub>450</sub> ailesi, CYP harfleri ile simgelenmektedir. Bu harflerden sonra izoformun ait olduğu aileyi gösteren sayı gelir. Bu sayıdan sonra alt aileyi gösteren bir büyük harf bulunmaktadır. Büyük harften sonra gelen sayı ise izoforma özgüdür. Örneğin CYP2E1, ikinci ailede E alt ailesine ait birinci izoformu simgelemektedir (33,98).

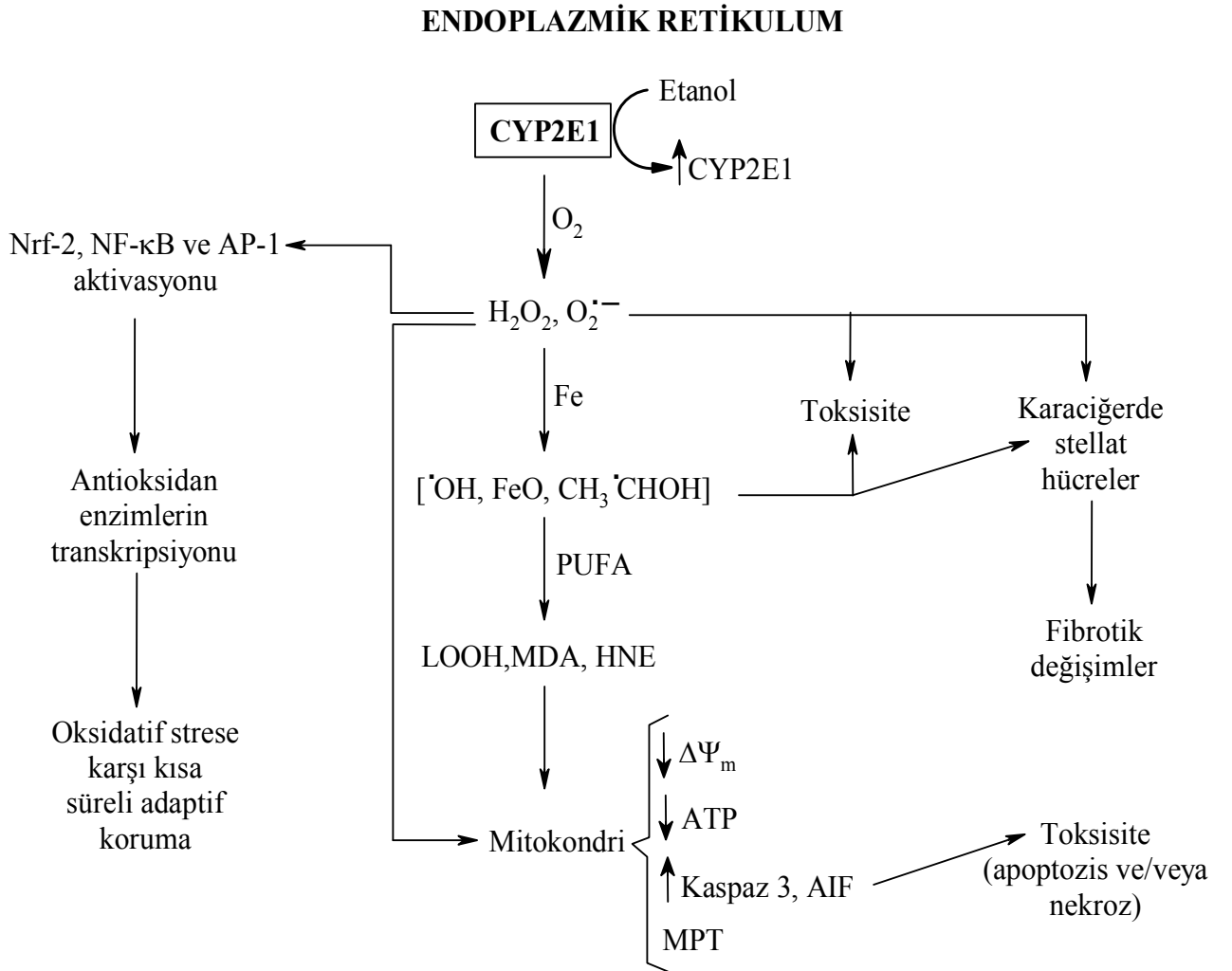
Alkolün karaciğerdeki oksidasyonu sırasında oluşan serbest radikaller prooksidan olarak etki yapmakta ve hücrede oksidatif bir baskı meydana getirmektedirler. Etanol etkisiyle karaciğerde radikal oluşumuna katkıda bulunan reaksiyonlar CYP2E1, aldehit oksidaz ve ksantin oksidaz, mikrozomal NADPH-oksidaz ve etanolden özellikle mikrozomal fraksiyonda etoksi (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-O<sup>•</sup>) ve hidroksietil (CH<sub>3</sub>CH-OH) radikalleri oluşumu olarak tanımlanmaktadır (2,3,4,22,57). Bu reaksiyonlar içinde özellikle CYP2E1 önem kazanmaktadır (22,51,57,101).

Yüksek alkol konsantrasyonlarında ve kronik koşulda CYP2E1 indüklenmekte, katalitik etkinliği sonucu hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ve süperoksit radikali oluşturmaktadır. CYP2E1 aynı zamanda NADPH oksidaz aktivitesi göstermekte ve etanolden direkt olarak etoksi ve hidroksietil radikallerinin oluşumunda da etkili olmaktadır (22,51,57,101). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve süperoksit radikali etanol etkisiyle artan demirin varlığında hidroksil, feril ve hidroksietil radikali gibi güçlü oksidanların oluşumuna neden olur. CYP2E1 ile bağlantılı bu oksidatif stresi karşılamak için, bazı transkripsiyon faktörlerinin etkisiyle antioksidan enzimlerin sentezleri artar ve bir adaptif koruma sağlanmaya çalışılır. Bu koruma mekanizmaları yetersiz kaldığında hücreler CYP2E1 tarafından üretilen radikallere maruz kalır. Bu radikaller lipid peroksidasyonunu uyararak aldehit karakterinde çeşitli zararlı ürünlerin oluşumuna ve zar yapısının bozulmasına neden olur. Ayrıca protein oksidasyonuna, DNA hasarına ve enzimlerde inaktivasyona yol açar (22,101).

Hücrenin mitokondri fraksiyonu radikal hasarına çok duyarlıdır. Mitokondri membran potansiyelinde ( $\Delta\Psi_m$ ) azalma ve mitokondri membran geçirgenliğinde (MPT) artış çeşitli proapoptotik faktörlerin serbestleşmesine ve sonuçta apoptozise neden olur. ATP düzeylerindeki azalma da nekrotik olayları uyacaktır. Öte yandan CYP2E1'in indüksiyonuyla oluşturulan hidrojen peroksit, LOOH ve aldehit karakterli bileşikler diffüz

olabildiklerinden “stellat” hücreler olarak adlandırılan parankim dışı karaciğer hücrelerini etkileyerek fibrotik değişimleri de uyabilir (Şekil 6) (22,101).

Gerçekten, alkol etkisiyle organizmada prooksidan-antioksidan denge prooksidasyon yönünde değişmekte (2,5,6,57,65,93), kullanılan alkolün dozuna ve süresine bağımlı olarak karaciğerde apoptozis, yağlanma, hepatit ve siroz gibi farklı patolojik tablolar gelişmektedir (2,22,57). Yapılan in vitro (40,46,54,63) ve in vivo (39,44,53,64) çalışmalar alkolün çeşitli dokularda apoptozisi uyardığını ve bu uyarıda serbest radikal oluşumundaki artışa bağlı olarak gelişen mitokondri hasarının çok önemli bir rol oynadığını göstermiştir (4,14,35, 40,45,64)



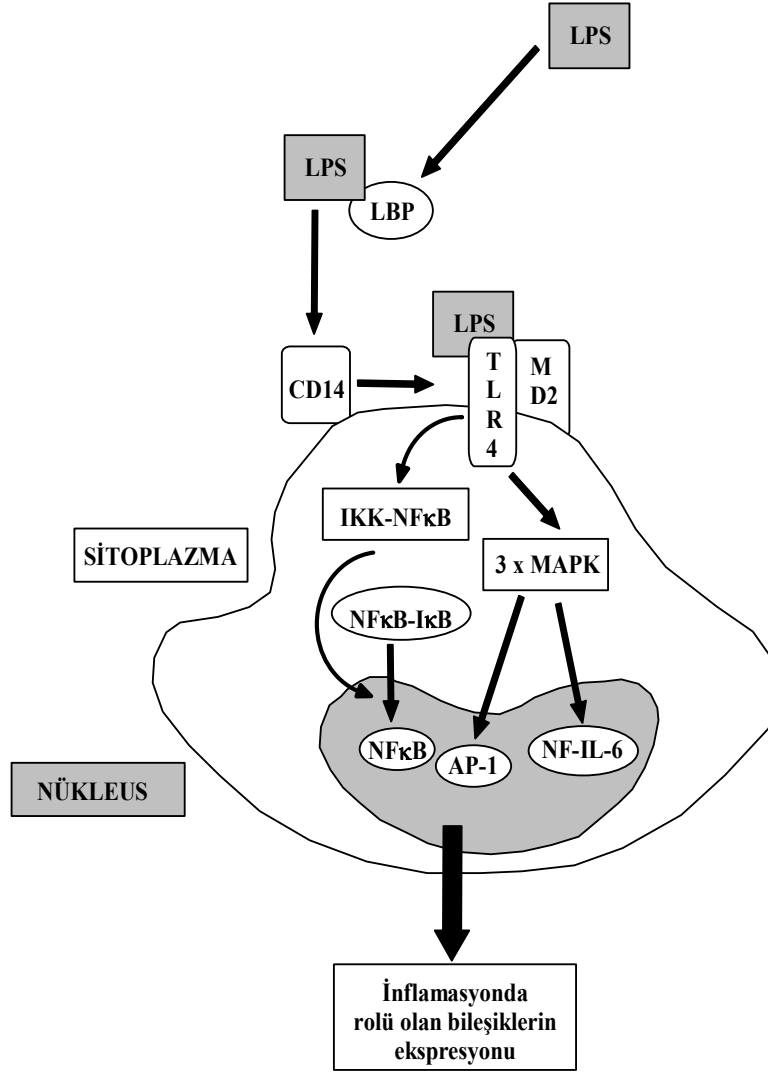
**Şekil 6.** Alkolik karaciğer hasarında CYP2E1 indüksiyonunun rolü.

## 2.4. ALKOLİK KARACİĞER HASARI VE ENDOTOKSEMİ

Bakteri kaynaklı lipopolisakkaridler (LPS; Endotoksin), birçok dokuda morfolojik ve fizyolojik değişikliklere neden olmaktadır. Yüksek konsantrasyonları insanlarda ve hayvanlarda çoklu organ hasarı (Multiorgan Failure: MOF) ile sonuçlanan septik şok oluşturmaktadır. Sepsis yüksek mortaliteye neden olan önemli bir klinik problemidir (27,34).

LPS, gram negatif bakterilerin hücre dışı membranının temel yapısal ve fonksiyonel bileşenidir. LPS dışta polisakkarit yapısında O antijeni, çekirdek bölgesi ve lipid A olarak isimlendirilen 3 bölgeden oluşur. LPS'nin toksik etkilerinden sorumlu olan kısım lipid A bölgesidir (27). LPS, öncelikle plazmada bir akut faz proteini olan LBP (LPS-binding protein)'ye bağlanır. Bağlı LPS daha sonra monosit, nötrofiller ve makrofajların yüzeyindeki CD 14 reseptörlerine aktarılır ve onun aracılığıyla MD-2 adlı bir proteinle kompleks oluşturan TLR4 (Toll-like reseptör 4) ile etkileşir. LPS, TLR4 ve MD-2'den oluşan bu kompleks hücre içindeki bazı sinyal yollarını aktifler. Bunlar IKK-NFκB [IκB kinaz( IKK)-nükleer faktör κB] ve 3 MAPK (mitogen activated protein kinase) yollarıdır. Bu yollar NFκB, AP-1 (activator protein 1) ve NF-IL-6 (nuclear factor-interleukin 6) gibi transkripsiyon faktörlerini fosforilemekte ve aktive etmektedir. Böylece hızlı bir gen indüksiyonu olmakta ve sitokinler, kemokinler, lipid mediatörler, indüklenebilir nitrik oksit sentaz (NOS), enzimler ve adezyon molekülleri gibi inflamasyonda rol alan bileşiklerin ekspresyonunu sağlamaktadır (Şekil 7) (13,29,34,60,84,97).

Endotoksine (lipopolisakkarit; LPS) bağlı karaciğer hasarının mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, serbest oksijen radikallerinin etkin bir rol oynadığı ileri sürülmektedir (34,60,78,79,84,97). Normal koşullarda LPS karaciğerde özellikle Kupffer hücrelerinde etkisizleştirilmektedir (27,34). LPS düzeyleri arttığı zaman, Kupffer hücreleri ve endotel hücrelerindeki bu etkisizleştirme işlemi yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle karaciğer parankim hücreleri, LPS etkisiyle oluşan serbest radikaller, lipid peroksidleri ve sitokinler gibi çeşitli bileşiklerin zararlı etkilerine maruz kalmaktadırlar (34,60,78,79,84,97).



**Şekil 7.** Endotoksemiye bağlı hücre hasarının gelişiminde rol oynayan faktörler.

Endotoksemi sırasında en önemli radikal kaynakları nötrofil ve makrofajlarda NADPH aktivasyonu ve hepatositlerde gelişen iskemiye bağlı ksantin oksidaz aktivasyonudur (36,60,85,97). Her iki kaynak süperoksit radikali oluşumunda artışa neden olmaktadır. Ayrıca, LPS makrofajlarda indüklenebilir nitrik oksit sintaz (iNOS) aktivasyonu yolu ile nitrik oksit (NO) oluşumunu da arttırmaktadır (13,25,78,97). NO'nun süperoksit radikali ile etkileşimi sonucu oluşan peroksinitrit ise, nitrozatif stresi uyarak karaciğer hasarında etkili olmaktadır (13,25,78,97). Gerçekten insanlarda ve deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda endotoksemide oksidatif ve nitrozatif stresin arttığı, antioksidan sistemde değişiklikler olduğu bulunmuştur (7,10,15,25,85,32,92). Oksidatif ve nitrozatif stres ile sitokinlerin, LPS'nin dokularda uyardığı apoptotik ve nekrotik olayların oluşumunda etkin bir rol oynadığı bildirilmiştir (34,78,79,97). Gerçekten, LPS'nin

karaciğer (43,59,81,105), dalak (15), beyin (17) ve akciğer (20) gibi dokularda apoptotik ve nekrotik değişikliklere neden olduğu ve oluşan hücre hasarının kullanılan LPS dozuna, tipine ve zamana bağlı olarak farklılıklar gösterdiği bulunmuştur (7,10,15,43,59,92).

Öte yandan, endotokseminin alkolik karaciğer hasarının oluşumunda önemli bir faktör olduğu ileri sürülmektedir (88,89,99). Kronik etanol uygulanan sıçanlara endotoksin verildiğinde karaciğer hasarının arttığı bulunmuştur (19,24,67). Etanolün barsak florasındaki endotoksinlere karşı geçirgenliği arttırdığı ve dolayısıyla portal dolaşıma daha fazla endotoksin geçtiği bildirilmiştir (23,76). Kupffer hücreleri antibiyotik tedavisi veya gadolinium klorür uygulaması ile inhibe edildiğinde (1) veya endotoksin için immünizasyon yapıldığında (71) alkole bağlı karaciğer hasarının azaltılabildiği bulunmuştur. Bu sonuçlar endotoksinler tarafından Kupffer hücre aktivasyonunun da alkolik karaciğer hasarında etkin bir rol oynadığını göstermektedir (88,89,99).

## **2.5. DIŞI VE ERKEK SIÇANLARDA ALKOLE DUYARLILIK**

Gerek insanlarda ve gerekse deney hayvanlarında yapılan çalışmalar dişi ve erkeklerin alkole duyarlılıklarının farklı olduğunu göstermiştir (28,41,88,89). Dişi sıçanlarda erkeklere oranla etanol verilmekle daha hızlı ve daha yoğun karaciğer hasarı oluşmaktadır (87,89). Alkole duyarlılık açısından iki cins arasında bu farklılığın nedenleri bilinmemektedir (89). Dişi sıçanlarda hormonal etkilerin yanısıra (42), etanol metabolizmasının daha hızlı olması (28,42,87), karaciğerde daha yoğun hipermetabolik durum yaratması (42,89), karaciğerde fagositoz kapasitesinin düşük olması (83) gibi çeşitli faktörler etkili olmaktadır. Ayrıca alkol verilen dişi sıçanlarda endotoksin düzeyleri erkek sıçanlardan daha yüksek bulunmuştur (41). Buna göre, dişilerde alkole bağlı karaciğer hasarının daha yoğun olmasında endotokseminin yarattığı Kupffer hücre aktivasyonundaki farklılıkların etkili olabileceği düşünülmektedir (88,89,99).

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda ortalama ağırlıkları 180-200 gram olan Wistar türü dişi ve erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp ve Araştırma Enstitüsü'nden sağlandı. Dişi ve erkek sıçanlar 4'er gruba ayrıldı:

1. **Kontrol grubu:** Sıçanlar normal yem ile beslendiler.
2. **Pirazol grubu:** 200mg/kg dozunda pirazol 24 saat arayla 2 kez periton içi uygulandı.
3. **LPS grubu:** 10mg/kg dozunda periton içi uygulandı.
4. **.Pirazol+LPS grubu:** 200mg/kg dozunda 24 saat arayla 2 kez pirazol uygulanan sıçanlarda 3. gün 10mg/kg dozunda LPS verildi.

Son uygulamalardan 6 saat sonra eter anestezisi altında tüm hayvanların kalplerinden kan alındı ve karaciğerleri hızla çıkarıldı.

#### SERUMDA YAPILAN İNCELEMELER

**1. Serumda alanin transaminaz (ALT) ve aspartat transaminaz (AST) aktivitelerinin ölçülmesi (8):** Plazmada ALT ve AST aktiviteleri ROCHE otoanalizöründe enzimatik yöntemlerle ölçüldü.

#### KARACİĞERDE YAPILAN İNCELEMELER

Sıçanların karaciğer dokusunda lipid peroksidleri, GSH, vitamin E ve vitamin C düzeyleri ile SOD, GSH-Px, GST aktiviteleri ölçüldü. Ayrıca apoptozis göstergeleri ve histopatolojik incelemeler yapıldı.

MDA, GSH, vitamin E ve vitamin C düzeyleri dokuların 0.15 M KCl'de hazırlanan %10'luk (w/v) doku homojenatlarında tayin edildi. DK düzeylerinin tayini için % 10'luk doku homojenatlarından hazırlanan lipid ekstraktları kullanıldı. SOD, GSH-Px, GST aktiviteleri ise bu homojenatlardan kademeli santrifüj yapılarak elde edilen postmitokondri fraksiyonunda belirlendi.

## A. LİPİT PEROKSİDASYONUNUN İNCELENMESİ

**1) Doku homojenatlarının hazırlanması ve postmitokondri fraksiyonlarının eldesi :**

**İşlem:** Karaciğer dokuları tartıldı ve Potter-Elvehjem doku homojenizatöründe soğuk 0.15 M KCl çözeltisi ile homojenize edilerek %10'luk homojenatları (w/v) hazırlandı.

Postmitokondri fraksiyonu eldesi için, doku homojenatları öncelikle 4°C ayarlanmış soğuk santrifüjde 600 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Daha sonra süpernatant alınarak ependorf santrifüjünde 10000 x g'de 20 dakika santrifüj edildi, süpernatant alındı ve -80°C'de derin dondurucuda saklandı.

**2) Doku lipit ekstraktlarının hazırlanması (26):**

**İşlem:** %10'luk doku homojenatlarından 0.25 ml alındı ve üzerine 3.75 ml kloroform:metanol (2:1) karışımı eklendi. İyi karıştırıldı, 1 saat ara sıra karıştırılarak beklendi. Daha sonra süzülerek son hacimler 4 ml'ye tamamlandı ve kapaklı tüplerde deneyler yapılncaya kadar -20° C'de saklandı.

**3) Malondialdehit (MDA) düzeylerinin ölçülmesi (72):**

Lipit peroksidasyonunun son ürünlerinden olan MDA'nın TBA ile oluşturduğu kompleks spektrofotometrik olarak ölçüldü.

**İşlem:** % 10'luk doku homojenatlarından 0.2 ml alındı. Üzerine 0.2 ml %8.1'lik sodyum dodesil sülfat, 1.5 ml %20'lik asetik asit, 1.5 ml %0.8'lik tiyobarbitürik asit ve 0.6 ml distile su eklendi. Bu karışım kaynar su banyosunda 1 saat tutuldu. Soğutulduktan sonra üzerine 1 ml distile su ve 5 ml butanol/piridin (15:1) karışımı eklendi, karıştırıldı ve organik faz santrifüj edilerek ayrıldı. Homojenat içermeyen ayıraç körüne karşı absorbanslar 532 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu.

**Ayıraçlar:**

- ❖ % 8.1'lik sodyum dodesil sülfat
- ❖ % 20'lik asetik asit (10 N NaOH ile pH 3.5'e ayarlandı)
- ❖ % 0.8'lik tiyobarbitürik asit (TBA)
- ❖ Butanol/piridin (15:1)
- ❖ 1,1,3,3-tetraepoksipropen (TEP) standardı (22 mg TEP tartıldı, 10 ml'ye distile su ile tamamlandı ve 1000 kez sulandırıldı (10nmol/ml).

**Hesap:** Standart olarak 1,1,3,3-tetraetoksipropen kullanıldı. Sonuçlar nmol/g doku olarak tanımlandı.

#### 4) Dien konjugat düzeylerinin ölçümü (12):

**İşlem:** Lipit ekstraktlarından 1ml alındı, azot gazı altında uçuruldu. Kuru kalıntı 2 ml sikloheksana alındı. Spektrofotometrede 233 nm’de sikloheksan körüne karşı absorbanslar okundu.

**Hesap:** DK düzeyleri 233 nm’de ekstinksiyon katsayısı olan  $2.52 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  sayısından yararlanılarak hesaplandı. Sonuçlar  $\mu\text{mol/g}$  doku olarak tanımlandı.

### B. ANTİOKSİDAN SİSTEMİN İNCELENMESİ

#### 1) Glutasyon (GSH) düzeylerinin ölçülmesi (11):

GSH düzeyleri, Elman ayırıcı (5,5’- ditiobis-2 nitro benzoik asit) kullanılarak tayin edildi. Bu ayırıcın dokulardaki serbest sülfidril (-SH) grupları tarafından indirgenmesi sonucunda, 1 mol SH grubu başına 1 mol 2-nitro-5 tiyobenzoik (TNB) asit oluşmaktadır. Sarı renkli bu ürün spektrofotometrik olarak 412 nm’de absorbans vermektedir.

**İşlem:** Dokuların 0.15 M KCl’deki %10’luk homojenatlarından karaciğer için 0.5 ml alındı. Hacimler 0.15M KCl ile 2 ml’ye tamamlandı. Daha sonra 3 ml proteinsizleştirme çözeltisi eklendi ve bu karışım 3000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. 0.5 ml supernatan alınarak üzerine 2 ml 0.3 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ve 0.5 ml Ellman ayırıcı ilave edildi. Oluşan renk 412 nm’de ayıraç körüne karşı okundu.

#### Ayıraçlar:

- ❖ Proteinsizleştirme çözeltisi: 1.67 g glasiyal metafosforik asit, 200 mg Na-EDTA ve 30 g NaCl 100 ml distile suda çözüldü.
- ❖ 0.3 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ : 42.6 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1000 ml distile suda çözüldü.
- ❖ Ellman Renk Ayırıcı: 4 mg 5.5’-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) 10 ml % 1’lik sodyum sitrat çözeltisinde çözüldü.
- ❖ GSH standardı: (0.1 mg/ml)

**Hesap:** GSH düzeyleri ekstinksiyon katsayısı  $13.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  ve standart kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar  $\mu\text{mol GSH/g}$  doku olarak tanımlandı.

#### 6) Vitamin E düzeylerinin ölçülmesi (21):

Doku homojenatlarından ekstre edilen vitamin E,  $\text{Fe}^{+3}$  (ferrik iyon)’u  $\text{Fe}^{+2}$  (ferro iyon)’a çevirir. Bu da bathofenantrolin ile pembe renkli bir kompleks oluşturur.

**İşlem:** Doku homojenatlarından 3 ml alındı. Üzerine 1 ml absolü etanol ve 0.5 ml % 25’lik askorbik asit eklendi. Bu karışım 70° C’de 5 dakika tutuldu. Sonra üzerine 1 ml

10 N KOH eklendi, karıştırıldı ve bu karışım 70° C’de 30 dakika tutuldu. Soğutulduktan sonra, üzerine 4 ml hekzan eklendi, karıştırıldı ve organik faz santrifüj edilerek ayrıldı. Organik fazdan 3 ml alınarak azot altında uçuruldu. Kuru kalıntı 1 ml absolü etanole alındı (Deney). Kör için 1 ml absolü alkol, standartlar için ise 1 ml 5 ve 10 µg/ml alfa-tokoferol içeren standartlar alındı. Tüm tüplere, hızla 0.2 ml % 0.2’lik bathofenantrolin, 0.4 ml 0.05 mM’lik Fe Cl<sub>3</sub> eklendi ve tam 1 dakika sonra 0.4 ml 0.05 mM’lik ortofosforik asit konuldu, iyice karıştırıldı ve ayıraç körüne karşı absorbanslar 536 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu.

#### **Ayıraçlar:**

- ❖ % 0.2’lik bathofenantrolin: 20 mg bathofenantrolin 10 ml absolü alkolde çözüldü.
- ❖ 0.05 mM FeCl<sub>3</sub> (absolü alkolde): 2.7 mg FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O veya 1.62 mg anhidr FeCl<sub>3</sub> 20 ml absolü alkolde çözüldü.
- ❖ 0.05 mM ortofosforik asit (absolü alkolde): 0.02 ml ortofosforik asit alındı ve 29.4 ml’ye absolü alkol ile tamamlandı. Bundan 1 ml alınıp 20 ml’ye tekrar absolü alkolle tamamlandı.
- ❖ %25’lik askorbik asit (distile suda)
- ❖ 10 N KOH (distile suda)
- ❖ Absolü alkol
- ❖ Hekzan
- ❖ Vitamin E standardı: 1 mg /ml olacak şekilde alfa-tokoferol tartılarak absolü alkolde çözüldü, daha sonra bu stok standart 100 ve 200 kez sulandırılarak 10 ve 5µg/ml E vitamini içeren çalışma standartları hazırlandı.

**Hesap:** Standart olarak DL-alfa-tokoferol kullanıldı. Sonuçlar, nmol/g karaciğer dokusu olarak tanımlandı.

#### **7) Vitamin C düzeylerinin ölçülmesi (73):**

Homojenattaki askorbik asit, bakırın (Cu<sup>+2</sup>) etkisi ile dehidroaskorbik asit ve diketoglukonik aside oksitlenir. Bu oksidasyon ürünleri 2,4-dinitrofenilhidrazinle bis 2,4-dinitrofenilhidrazon oluşturur. Daha sonra bu bileşik de sülfirik asitle 520 nm’de okunan ürün verir (total askorbik asit = askorbik asit + dehidroaskorbik asit). Ayrıca bakır içermeyen 2,4-dinitrofenil hidrazin/tiyoüre ayırıcı ile ortamdaki dehidroaskorbik asit düzeyleri ölçülür. Total askorbik asit ile dehidroaskorbik asit arasındaki fark askorbik asit düzeylerini verir.

**İşlem:** 2 ml %10'luk homojenatlara 2 ml %10'luk triklorasetik asit (TCA) ilave edildi. 3500 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Total askorbik asit tayini için üst fazdan 1 ml tüpe alındı ve üzerine 0.1 ml 2,4-dinitrofenil hidrazin / tiyoüre / bakır ayıracı konuldu. Kör deney için 1 ml %5 TCA, standard için ise %5'lik TCA'da hazırlanmış standartlardan (20 µg askorbik asit/ml ve 10 µg askorbik asit/ml) 0.5 ml alındı. Bütün tüpler 3 saat 37° C'de inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde tüpler soğutuldu ve hızla 0.75 ml %65'lik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ilave edilerek reaksiyon durduruldu. 30 dakika oda ısısında bekledikten sonra 520 nm'de absorbanslar okundu.

**Ayırıcılar:**

- ❖ %10'luk Trikloraasetik asit (TCA)
- ❖ 2,4-dinitrofenil hidrazin/tiyoüre/bakır ayıracı: 400 mg tiyoüre, 50 mg CuSO<sub>4</sub>. 5H<sub>2</sub>O, 3 g 2,4-dinitrofenil hidrazin 9 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'de çözülerek aynı çözücü ile 100 ml'ye tamamlandı.
- ❖ 2,4-dinitrofenil hidrazin/tiyoüre ayıracı: 400 mg tiyoüre ve 3 g 2,4-dinitrofenil hidrazin 9 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'de çözülerek aynı çözücü ile 100 ml'e tamamlandı.
- ❖ %65'lik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- ❖ Askorbik asit standardı: 2 mg/ml olacak şekilde % 5'lik trikloraasetik asitte hazırlandı ve 20 µg/ml ve 10 µg/ml olacak şekilde %5'lik trikloraasetik asit ile sulandırılarak çalışma standartları hazırlandı.

**8) Superoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin ölçülmesi (68):**

SOD aktivitesi, riboflavin ile duyarlandırılmış o-dianisidinin fotooksidasyon hızını artırma yeteneği olarak ölçülür. Riboflavinin floresans ışığı etkisiyle oluşturduğu süperoksit radikali, ortamdaki SOD'un etkisiyle hidrojen peroksit'e dönüşür. Hidrojen peroksit ise o-dianisidin ile reaksiyona girerek renkli ürün oluşturur. SOD aktivitesi ne kadar çok ise renkli ürün oluşumu o kadar fazla olur. Oluşan renkli ürün 460 nm'de spektrofotometrik olarak saptanır.

**İşlem:** Kör, standart ve deney tüplerine sırası ile 2.6 ml 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH:7.8), 0.1 ml o-dianisidin ilave edilir. Kör tüpüne 0.1 ml distile su; standard tüpüne 0.1 ml standart; deney tüpüne 0.05- 0.1 ml postmitokondri fraksiyonu (karaciğer 0.05 ml) eklendi ve her tüpe 30 saniye ara ile 0.2 ml riboflavin kondu, karıştırıldı ve 460 nm'deki absorbans değerleri okundu. Tüpler 20W floresans lamba içeren 37° C'ye ayarlanmış özel bir kutuya yerleştirildi ve tam 8 dakika süre ile floresans ışığa maruz

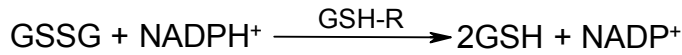
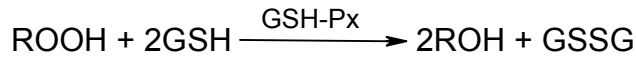
bırakıldı. Sürenin bitiminde tüplerin absorbansı tekrar 460 nm’de okundu ve iki absorbans arasındaki fark alındı. Ayrıca deney körü ve standart için de aynı işlemler yapıldı.

**Ayırıcılar:**

- ❖ 0.1 mM EDTA içeren 50 mM Potasyum fosfat tamponu (pH 7.8)
- ❖ 0.2 mM riboflavin: 7.3 mg riboflavin 100 ml 10 mM potasyum fosfat tamponunda (pH 7.5)’ de çözündü.
- ❖ 6 mM o-dianisidin: 19 mg o-dianisidin 10 ml distile suda çözündü.
- ❖ SOD (100 IU/ml) standardı: Sigma firmasından sağlanan SOD standardı 100 IU/ml olacak şekilde soğuk distile su ile sulandırıldı. Daha sonra bu ana standarttan 0.1 ve 0.05 ml alınarak deney ortamında 10 ve 5 IU SOD standardının bulunması sağlandı.

**9) Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesinin ölçülmesi (56):**

GSH-Px aktivite tayini iki reaksiyon ile gerçekleşir. Birinci reaksiyonda  $H_2O_2$  veya organik hidroperoksitler (ROOH) GSH-Px etkisi ile indirgenirken, ortamdaki GSH oksitlenmiş GSH’a (GSSG) dönüşür. İkinci reaksiyonda GSSG, GSH- redüktaz (GSH-R) etkisi ile tekrar GSH’a , NADPH ise  $NADP^{+}$ ’ye oksitlenmektedir. Bu dönüşüm 340 nm’de absorbansda azalma olarak izlenir, çünkü NADPH 340 nm’de bir absorbans verdiği halde,  $NADP^{+}$  bu dalga boyunda absorbans vermemektedir.



**İşlem:** GSH-Px aktivitesi, 1 ml’lik hacimde son konsantrasyonlar 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0), 1 mM EDTA, 1 mM sodyum azid, 0.2 mM NADPH, 1 mM GSH, 0.5 IU/ml glutasyon redüktaz, 1.2 mM kumen hidroperoksit, ve değişik oranlarda sulandırılmış post mitokondri fraksiyonu içerecek şekilde hazırlanmış ortamda tayin edildi. Bu amaçla karaciğer post mitokondri fraksiyonu 50 kez sulandırıldı ve ortama 0.05 ml konuldu. Küvetler 37°C’ye ayarlanmış termostatlı spektrofotometreye yerleştirildi ve 1’er dakika arayla spektrofotometrede 340nm’de absorbans değişimi izlendi. Ayrıca post mitokondri fraksiyonu içermeyen ortamda da reaksiyon izlenerek enzimatik olmayan değişim kayıt edildi (kör deney).

**Hesap:** Sonuçlar NADPH’in ekstinksiyon katsayısı olan  $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ’den yararlanılarak hesaplandı sonuçlar nmol NADPH/mg protein/dakika olarak belirtildi.

### **10) Glutasyon transferaz (GST) aktivitesinin ölçülmesi (37):**

GST aktivitesinin tayini, GSH ve 1-klor-2,4-dinitro-benzenin (CDNB) konjugasyonu sonucu oluşan ürünün, 340 nm'de spektrofotometrik olarak saptanması esasına dayanır.

**İşlem:** GST aktivitesi 3 ml'lik hacimde son konsantrasyonlar 1 mM CDNB, 1mM GSH ve 100 mM potasyum fosfat tamponu ( pH 6.5) içerecek şekilde ayarlanmış ortamda tayin edildi. Bunun için, karaciğer post mitokondri fraksiyonu 50 kez sulandırılıp 0.2 ml alındı, üzerine 1.5 ml 0.2 M sodyum fosfat tamponu (pH 6.5), 0.05 ml 60 mM glutasyon çözeltisi, 0.05 ml 60 mM CDNB çözeltisi eklendi ve toplam hacim distile su ile 3 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 3 dakika süre ile 25<sup>0</sup> C'de 340 nm'de karışımın absorbansı izlendi ve dakikadaki absorbans artışı saptandı. Aynı işlemler enzimatik olmayan konjugasyonu saptamak üzere, post mitokondri fraksiyonu içermeyen inkübasyon karışımında da tekrarlandı.

#### **Ayırıcılar:**

- ❖ 0.2 M potasyum fosfat tamponu ( pH 6.5)
- ❖ 60 mM glutasyon (GSH)
- ❖ 60 mM 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB): Absolü etanolde hazırlandı.

**Hesap:** GSH ve CDNB'nin konjugasyonu sonucu oluşan ürün için saptanmış olan ekstinksiyon katsayısı  $9.6 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  kullanıldı. Enzim etkisiyle olan konjugasyon sonucundan, spontan konjugasyon değerleri çıkarıldı ve sonuçlar nmol ürün/mg protein/dakika olarak belirtildi.

### **11) Protein tayini (82):**

Doku homojenatlarında ve postmitokondri fraksiyonlarında protein miktarı Bicinchoninic asid metodu ile belirlendi.

**İşlem:** 200 µl protein renklendirici ayırıcı üzerine 50 kez sulandırılmış karaciğer post mitokondri fraksiyonlarından 10 µl ilave edildi. Karıştırıldıktan sonra 37<sup>0</sup> C'de 30 dakika beklendi. Oda ısısında soğutuldu ve oluşan rengin absorbansı 562 nm'de ELİSA'da okundu.

#### **Ayırıcılar:**

- ❖ Bişikonik asit (Bicinchoninic acid solution=Sigma B 9643)
- ❖ %4 CuSO<sub>4</sub>
- ❖ Protein renklendirme ayırıcı:10 ml bişikonik asit çözeltisi üzerine 0.2 ml %4 Cu SO<sub>4</sub> ekleyerek hazırlandı.

## C. APOPTOZİSİN İNCELENMESİ

Apoptozisin varlığı Bcl-2 / Bax protein ekspresyonları ve TUNEL yöntemi (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) ile saptandı.

### 1) Bcl-2 ve Bax protein ekspresyonlarının incelenmesi:

**a) İmmünohistokimyasal yöntem:** Tüm örnekler % 10'luk tamponlanmış formalinde fikse edildi. Rutin doku incelemesi yapılan örneklerden hazırlanan parafin bloklardan 5-7 µm kalınlığında kesitler deparafinize edildi. Daha sonra antijen retrieval uygulandı. Ultra V blok prosedürünü takiben yapılan peroksiblok mikrodalga inkübasyonundan sonra primer Bax Ab-4 Rabbit poliklonal RB-1197-P1 ve Bcl-2 alpha Ab-1 (100/D5) MS-123-R7 antikorları uygulandı. Bu süreci takiben biotinlenmiş sekonder antikorlar (goat anti-rabbit IgG-HRP Sc-2030, Lot D1504; Santa Cruz, streptavidin peroksidaz ve kromojen substrat sırasıyla tatbik edildi. Nükleer boyama hematoxilen ile yapıldı.

**b) Western Blot yöntemi (55):** Dokular 10 mM Tris HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, % 1 Nonidet P-40, % 1 sodyumdeoksikolat, %0.1 SDS, 1 mM PMSF, 5 mM EDTA ve proteaz inhibitörleri (aprotinin, leupeptin, pepstatin A, her biri 1 µg/ml) içeren homojenizasyon tamponunda homojenize edilerek % 20'lik homojenat elde edildi. Homojenatlar 600xg'de 15 dk. +4°C'de santrifüj edildikten sonra süpernatantlar alınarak, 13000xg'de santrifüj edildi. Süpernatantlar alınarak BCA (Bicinchoninic acid) yöntemi ile protein tayini yapıldı. %12'lik SDS (Sodyum dodesilsülfat)-poliakrilamid jeller hazırlandı ve süpernatantlar sulandırıldıktan sonra Laemmli tamponu ile karıştırılarak 60 µg protein/well olacak şekilde yüklendi. 100 voltta (30 mA) yaklaşık 1.5 saat elektroforez yapıldıktan sonra jeller çıkarılarak PVDF membrana proteinler transfer edildi. PVDF membran %5 non fat dry milk içeren TBS tamponu ile gece boyunca bloke edildikten sonra membranlar anti-Bcl<sub>2</sub> veya anti-Bax (ayrı ayrı) mouse monoclonal antikorlarıyla 1 saat oda ısısında inkübe edildi (Santa cruz Biotechnology 1:1000 dilüsyon). Membranlar yıkandıktan sonra anti-mouse sekonder antikorlu (HRP-conjugated Ig G) 45 dk. inkübe edildi (1:2000 dilüsyon). İnkübasyon sonunda membranlar 5x10 dk. TBS-T ile yıkandı. Daha sonra ECL kiti ile ışınlatıldı ve röntgen filmini işaretlemesi için 1, 2, 3 ve 5 dk. bekletildi. Oluşan bantlar görüntülenerek bilgisayar sistemine aktarıldıktan sonra miktar tayini yapıldı (Vilber-Lourmart Biotechnology).

**2) Kaspaz 3 (Caspase 3) aktivitesinin ölçülmesi (18):** Dokular 10 mM HEPES, pH 7.4, 2 mM EDTA, % 0.1 CHAPS, 5mM dithiothreitol, 1 mM PMSF ve proteaz inhibitörleri (aprotinin, leupeptin, pepstatin A, her biri 10 µg/ml) içeren homojenizasyon tamponunda homojenize edildi. Homojenatlar 16000xg'de 10 dk. +4°C'de santrifüj edildikten sonra süpernatantlar alınarak, kolorimetrik kaspaz-3 assay kit ile kaspaz-3 aktivitesi ölçüldü (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Enzim aktivitesi, dakikada 1 mg proteinden serbestleşen p-nitroanilin miktarı olarak verildi.

**3) In Situ Uç İşaretleme Tekniği (TUNEL) (47):** Apoptotik hücrelerin DNA'ları 180-200 baz çiftlik parçalara ayrılırlar. Kırılan DNA parçalarının 3'-OH uçları TdT (Terminal deoksinükleotidil Transferaz) enzimi kullanılarak digoxigenin işaretli dUTP ile in situ olarak işaretlenir. Anti-digoxigenin antikoru/peroksidaz konjugatının bağlanmasından sonra diaminobenzidin (DAB) kromojeni ile boyanır ve apoptotik hücreler görünür hale getirilir. Bu amaçla Apoptag® Peroxidase In situ Apoptosis Detection Kit kullanıldı (S7101, Chemicon,CA).

Karaciğer örnekleri % 10'luk tamponlanmış formalin çözeltisine alındıktan sonra parafin bloklar haline getirildi. Bu bloklardan 5 mikron kalınlığında alınan kesitler TUNEL yöntemi için daha önceden poli-L-Lizin (PLL) sürülmüş lamalar üzerine yerleştirildikten sonra etüvde 37 °C'de 1 gece bekletildi. Parafin doku kesitleri sırasıyla xylene, absöü etanol ve etanol ile üçer kez yıkanarak deparafinize edildi. Daha sonra proteinaz K (20 µg/mL) ile proteinler parçalandı. Ortama TdT (Terminal deoksinükleotidil Transferaz) enzimi ve digoxigenin-işaretli dUTP içeren solüsyon eklendi. 37 °C'lik etüvde nemli ortamda 1 saat bekletildikten sonra kesitlere anti-digoxigenin-peroksidaz konjugatı damlatılarak oda ısısında 30 dk inkübe edildi. Üzerine DAB substrat solüsyonu eklenerek boyama yapıldı. Işık mikroskobunda 400 büyütmede apoptotik hücre sayımı yapıldı.

## **D. HİSTOPATOLOJİK İNCELEMELER**

Histopatolojik inceleme için % 0.9 NaCl ile yıkanan karaciğer örnekleri % 10'luk tamponlanmış formalin çözeltisinde saklandı ve HE boyası ile boyandı.

## **İSTATİSTİK İNCELEMELER**

Sonuçlar ortalama  $\pm$  SD olarak verildi ve istatistik değerlendirmeler için Kruskal-Wallis (post hoc Mann-Whitney U) testi kullanıldı.

## 4. BULGULAR

Çalışmamızda pirazol, LPS, pirazol+LPS uygulanan dişi ve erkek sıçanlarda serumda ALT ve AST aktiviteleri ile karaciğerde prooksidan-antioksidan denge ve apoptozis incelendi. Ayrıca histopatolojik incelemeler yapıldı.

### SERUMDA ELDE EDİLEN BULGULAR

a) Pirazol uygulanan dişi ve erkek sıçanlarda serum ALT ve AST aktivitelerinde bir değişiklik olmadığı halde, LPS ve pirazol+LPS uygulanan dişi ve erkek sıçanlarda ALT ve AST aktivitelerinde anlamlı artışlar bulundu. LPS uygulanan dişi sıçanlarda ALT ve AST aktiviteleri sırasıyla 2.8 ve 2.4 kat, erkek sıçanlarda 2.6 ve 2.1 kat artış gösterdi. Pirazol+LPS uygulanan dişi sıçanlarda ALT ve AST aktiviteleri sırasıyla 7.3 kat ve 4.9 kat, erkek sıçanlarda 5.5 kat ve 3.9 kat artış gösterdi (Tablo 4 ve Şekil 8).

b) Pirazol+LPS uygulanan sıçanlarla tek başına LPS uygulanan sıçanlarda elde edilen bulgular karşılaştırıldığında, dişi sıçanlarda serum ALT aktivitesinde 2.6 katlık , AST aktivitesinde 2.1 katlık anlamlı artış bulundu. Erkek sıçanlarda ise bu anlamlı artışlar 2.1 ve 1.9 kat olarak hesaplandı.

### KARACİĞERDE PROOKSİDAN-ANTIOKSİDAN DENGE İLE İLGİLİ BULGULAR

a) Pirazol uygulanan dişi ve erkek sıçanlarda karaciğerde MDA ve DK düzeylerinde bir değişiklik olmadı. LPS uygulanan dişi sıçanlarda karaciğerde MDA ve DK düzeylerinde sırasıyla %22.7 ve %28.9 oranlarında, erkek sıçanlarda ise %29.6 ve %23.1 oranlarında artış saptandı. Pirazol+LPS uygulanan dişi sıçanlarda MDA ve DK düzeylerindeki artışlar sırasıyla %66.2 ve %59.7, erkek sıçanlarda ise %72.3 ve %60.5 oranlarındaydı. Pirazol+LPS grubu LPS grubuyla karşılaştırıldığında, karaciğer MDA ve DK düzeylerinde dişi sıçanlarda %35.4 ve %23.9, erkek sıçanlarda ise %32.9 ve %30.4 oranlarında anlamlı artışlar bulundu (Tablo 5 ve Şekil 9).

b) Pirazol, LPS ve pirazol+LPS uygulanan dişi ve erkek sıçanlarda karaciğerde GSH, E vitamini ve C vitamini düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı değişiklik saptanmadı (Tablo 6 ve Şekil 10).

c) Pirazol ve LPS uygulaması, dişi ve erkek sıçanlarda karaciğerde SOD, GSH-Px ve GST aktivitelerinde bir değişiklik yaratmadı. Pirazol+LPS uygulanan dişi sıçanlarda karaciğer SOD ve GSH-Px aktiviteleri sırasıyla %23.8 ve %29.6, erkek sıçanlarda %30.2 ve %25.9 oranlarında azalma gösterdi. Karaciğer GST aktivitesinde ise pirazol+LPS uygulanan dişi ve erkek sıçanlarda bir değişiklik saptanmadı. Pirazol+LPS grubu, LPS grubu ile karşılaştırıldığında, karaciğer SOD aktivitesinin dişi sıçanlarda %29.8, erkek sıçanlarda ise %31.2 oranlarında, GSH-Px aktivitesinin ise dişi sıçanlarda %34.2, erkek sıçanlarda %30.9 oranlarında anlamlı azalmalar gösterdiği bulundu (Tablo 7 ve Şekil 11).

## KARACİĞERDE APOPTOZİS İLE İLGİLİ BULGULAR

Apoptozisin göstergesi olarak karaciğerde Western Blot ve immünohistokimyasal yöntemle Bax ve Bcl-2 ekspresyonları, kaspaz-3 aktivitesi ve TUNEL yöntemi kullanıldı.

### 1) Bax ve Bcl-2 ekspresyonları (Western Blot):

LPS ve pirazol+LPS grubundaki dişi ve erkek sıçanlarda karaciğerde Bax ve Bcl-2 ekspresyonlarının arttığı, iki grup arasında anlamlı bir farklılık olmadığı saptandı. Pirazol uygulaması ise dişi ve erkek sıçanlarda Bax ve Bcl-2 ekspresyonlarını etkilemedi (Tablo 8, Şekil 12).

### 2) Bax ve Bcl-2 ekspresyonları (İmmünohistokimyasal yöntem)

a) LPS ve pirazol+LPS grubundaki dişi ve erkek sıçanlarda karaciğerde Bax ekspresyonunun çok sayıda hücrede güçlü ve yaygın pozitif olduğu ve bu iki grup arasında bir farklılık olmadığı saptandı. Kontrol ve pirazol grubunda ise daha az sayıdaki hücrede fokal alanlarda pozitiflik görüldü. Bax ekspresyonu yönünden dişi ve erkek sıçanlar arasında bir farklılık bulunmadı (Resim 1).

b) LPS ve pirazol+LPS grubundaki dişi ve erkek sıçanlarda karaciğerde yaygın ve güçlü pozitif Bcl-2 boyanması saptandı. Bununla birlikte, her iki grupta da Bcl-2 ekspresyonunun aynı şiddette olduğu gözlemlendi. Ayrıca dişi ve erkek sıçanlar arasında Bcl-2 ekspresyonu yönünden bir farklılık olmadığı bulundu. Kontrol ve pirazol gruplarında ise boyanma daha az sayıda pozitiflik göstermekle birlikte boyanma yoğunluğunun güçlü olduğu saptandı (Resim 2).

Buna göre, Western Blot ve immünohistokimyasal yöntemle, LPS uygulamasının dişi ve erkek sıçanlarda karaciğerde Bax ve Bcl-2 ekspresyonlarını arttırdığı, CYP2E1 indüksiyonu ile LPS'ye bağlı Bax ve Bcl-2 ekspresyonlarında daha ileri bir değişikliğin oluşmadığı görüldü. Ayrıca dişi ve erkek sıçanlarda karaciğerde Bax ve Bcl-2 ekspresyonlarının LPS ve pirazol+LPS uygulamalarından aynı şekilde etkilendiği bulundu.

### 3) Kaspaz-3 aktivitesi

Dişi ve erkek sıçanlarda karaciğerde kaspaz-3 aktivitesi kontrol ve pirazol grubunda bir değişiklik göstermedi. LPS uygulamasından sonra dişi sıçanlarda 4.3, erkek sıçanlarda ise 4.6 kat artış bulundu. Dişi sıçanlarda pirazol+LPS uygulamasından sonra kaspaz-3 aktivitesi 6.8 kat, erkek sıçanlarda ise 4.8 kat arttı. Pirazol+LPS grubu, LPS grubu ile karşılaştırıldığında dişi sıçanlarda kaspaz-3 aktivitesinin %57.3 oranında anlamlı artış gösterdiği, buna karşılık erkek sıçanlarda anlamlı bir değişiklik göstermediği saptandı (Tablo 8 ve Şekil 13).

### 4) TUNEL Yöntemi

400 büyütme 10 büyük alanda apoptotik hücre sayımı yapıldı ve ortalamalar alındı. Kontrol grubundaki dişi ve erkek sıçanlarda hiç boyanma görülmedi. Pirazol ve LPS gruplarındaki dişi ve erkek sıçanlarda ortalama 1 hücrede, pirazol+LPS grubunda ise ortalama 4 ve 5 hücrede pozitiflik saptandı.

Buna göre, LPS uygulamasından önce CYP2E1 indüksiyonu yapıldığında dişi ve erkek sıçanlarda karaciğerde apoptotik hücre ölümünün belirgin bir biçimde arttığı, iki cins arasında bu yönden bir farklılık olmadığı görülmektedir (Resim 3).

## KARACİĞERDE HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

- a) Kontrol grubundaki dişi ve erkek sıçanlarda karaciğer dokusu doğal yapıdaydı.
- b) Pirazol grubundaki dişi ve erkek sıçanlarda karaciğer parankimi doğal yapıda görüldü. Portal ve santral alanlarda hafif derecede lenfosit infiltrasyonu saptandı.
- c) LPS grubundaki dişi ve erkek sıçanlarda karaciğer parankiminde az sayıda vakuoller içeren hepatositler, portal ve santral alanlarda hafif derecede lenfosit ve polimorf nüveli lökosit infiltrasyonu görüldü.
- d) Pirazol+LPS grubundaki dişi ve erkek sıçanlarda karaciğer parankiminde vakuoller içeren hepatositler ve bazı alanlarda nekrotik parankimal hücreler görüldü. Portal ve santral alanlardaki sinüzoidler içinde yoğun polimorf nüveli lökosit infiltrasyonu görüldü. Karaciğerin tüm alanlarında sinüzoidlerde ve damarlarda yer yer yoğun şiddette hiperemi saptandı. (Resim 4).

Buna göre tek başına LPS uygulamasının dişi ve erkek sıçanlarda karaciğerde ılımlı derecede bir inflamasyona, pirazol+LPS uygulamasının ise yoğun inflamatuvar ve nekrotik değişimlere yol açtığı, dişi ve erkek sıçanlar arasında bu histolojik görünüm açısından bir farklılık olmadığı görülmektedir.

**Tablo 4.** Pirazol, LPS, pirazol+LPS uygulanan dişi ve erkek sıçanlarda serumda alanin transaminaz (ALT) ve aspartat transaminaz (AST) aktiviteleri (Ortalama  $\pm$  SD)

| SERUM                        | Kontrol<br>(n=6)              | Pirazol<br>(n=6)              | LPS<br>(n=8)                  | Pirazol + LPS<br>(n=8)         |
|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| <b><i>DİŞİ SIÇANLAR</i></b>  |                               |                               |                               |                                |
| ALT (U/L )                   | 51.3 $\pm$ 13.1 <sup>a</sup>  | 53.3 $\pm$ 11.7 <sup>a</sup>  | 145.1 $\pm$ 37.4 <sup>b</sup> | 374.6 $\pm$ 121.0 <sup>c</sup> |
| AST (U/L )                   | 121.5 $\pm$ 20.8 <sup>a</sup> | 121.7 $\pm$ 23.6 <sup>a</sup> | 288.0 $\pm$ 56.5 <sup>b</sup> | 600.6 $\pm$ 178.6 <sup>c</sup> |
| <b><i>ERKEK SIÇANLAR</i></b> |                               |                               |                               |                                |
| ALT (U/L )                   | 45.0 $\pm$ 14.5 <sup>a</sup>  | 45.0 $\pm$ 10.0 <sup>a</sup>  | 115.9 $\pm$ 24.2 <sup>b</sup> | 249.0 $\pm$ 94.5 <sup>c</sup>  |
| AST (U/L )                   | 118.0 $\pm$ 22.6 <sup>a</sup> | 118.3 $\pm$ 19.4 <sup>a</sup> | 244.1 $\pm$ 81.3 <sup>b</sup> | 460.1 $\pm$ 186.8 <sup>c</sup> |

Gruplar arasında yapılan istatistik değerdendirmelerde farklı harfler anlamlı ilişkiyi göstermektedir (p < 0.05; Kruskal-Wallis; post-hoc Mann-Whitney U).

**Tablo 5.** Pirazol, LPS, pirazol+LPS uygulanan dişi ve erkek sıçanlarda karaciğerde malondialdehit (MDA) ve dien konjugat (DK) düzeyleri (Ortalama  $\pm$  SD)

| KARACİĞER                    | Kontrol<br>(n=6)              | Pirazol<br>(n=6)              | LPS<br>(n=8)                  | Pirazol + LPS<br>(n=8)        |
|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| <b><i>DİŞİ SIÇANLAR</i></b>  |                               |                               |                               |                               |
| MDA (nmol/g doku)            | 183.0 $\pm$ 23.4 <sup>a</sup> | 180.8 $\pm$ 17.7 <sup>a</sup> | 224.6 $\pm$ 43.7 <sup>b</sup> | 304.2 $\pm$ 41.1 <sup>c</sup> |
| DK (μmol/g doku)             | 2.11 $\pm$ 0.58 <sup>a</sup>  | 2.13 $\pm$ 0.56 <sup>a</sup>  | 2.72 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>  | 3.37 $\pm$ 0.47 <sup>c</sup>  |
| <b><i>ERKEK SIÇANLAR</i></b> |                               |                               |                               |                               |
| MDA (nmol/g doku)            | 179.5 $\pm$ 22.9 <sup>a</sup> | 177.5 $\pm$ 25.4 <sup>a</sup> | 232.8 $\pm$ 31.0 <sup>b</sup> | 309.4 $\pm$ 44.5 <sup>c</sup> |
| DK (μmol/g doku)             | 1.95 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>  | 1.93 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>  | 2.40 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>  | 3.13 $\pm$ 0.36 <sup>c</sup>  |

Gruplar arasında yapılan istatistik değerdendirmelerde farklı harfler anlamlı ilişkiyi göstermektedir (p < 0.05; Kruskal-Wallis; post-hoc Mann-Whitney U).

**Tablo 6.** Pirazol, LPS, pirazol+LPS uygulanan dişi ve erkek sıçanlarda karaciğerde glutatyon (GSH), E vitamini ve C vitamini düzeyleri (Ortalama  $\pm$  SD)

| KARACİĞER                                         | Kontrol<br>(n=6)             | Pirazol<br>(n=6)             | LPS<br>(n=8)                 | Pirazol + LPS<br>(n=8)       |
|---------------------------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| <i><b>DİŞİ SIÇANLAR</b></i>                       |                              |                              |                              |                              |
| <b>GSH (<math>\mu\text{mol/g doku}</math>)</b>    | 4.50 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup> | 4.56 $\pm$ 0.48 <sup>a</sup> | 3.78 $\pm$ 0.69 <sup>a</sup> | 4.08 $\pm$ 0.83 <sup>a</sup> |
| <b>E Vit. (nmol/g doku)</b>                       | 79.0 $\pm$ 12.9 <sup>a</sup> | 75.3 $\pm$ 18.9 <sup>a</sup> | 75.5 $\pm$ 13.6 <sup>a</sup> | 71.3 $\pm$ 8.22 <sup>a</sup> |
| <b>C Vit. (<math>\mu\text{mol/g doku}</math>)</b> | 1.35 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup> | 1.38 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup> | 1.25 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup> | 1.39 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup> |
| <i><b>ERKEK SIÇANLAR</b></i>                      |                              |                              |                              |                              |
| <b>GSH (<math>\mu\text{mol/g doku}</math>)</b>    | 4.76 $\pm$ 0.56 <sup>a</sup> | 4.86 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup> | 4.20 $\pm$ 1.02 <sup>a</sup> | 3.60 $\pm$ 0.97 <sup>a</sup> |
| <b>E Vit. (nmol/g doku)</b>                       | 47.5 $\pm$ 10.2 <sup>a</sup> | 47.5 $\pm$ 10.4 <sup>a</sup> | 50.7 $\pm$ 11.2 <sup>a</sup> | 51.3 $\pm$ 8.80 <sup>a</sup> |
| <b>C Vit. (<math>\mu\text{mol/g doku}</math>)</b> | 1.23 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup> | 1.45 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup> | 1.35 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup> | 1.36 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup> |

Gruplar arasında yapılan istatistik değerdirmelerde farklı harfler anlamlı ilişkiyi göstermektedir (p < 0.05; Kruskal-Wallis; post-hoc Mann-Whitney U).

**Tablo 7.** Pirazol, LPS, pirazol+LPS uygulanan dişi ve erkek sıçanlarda karaciğerde süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon transferaz (GST) aktiviteleri (Ortalama  $\pm$  SD)

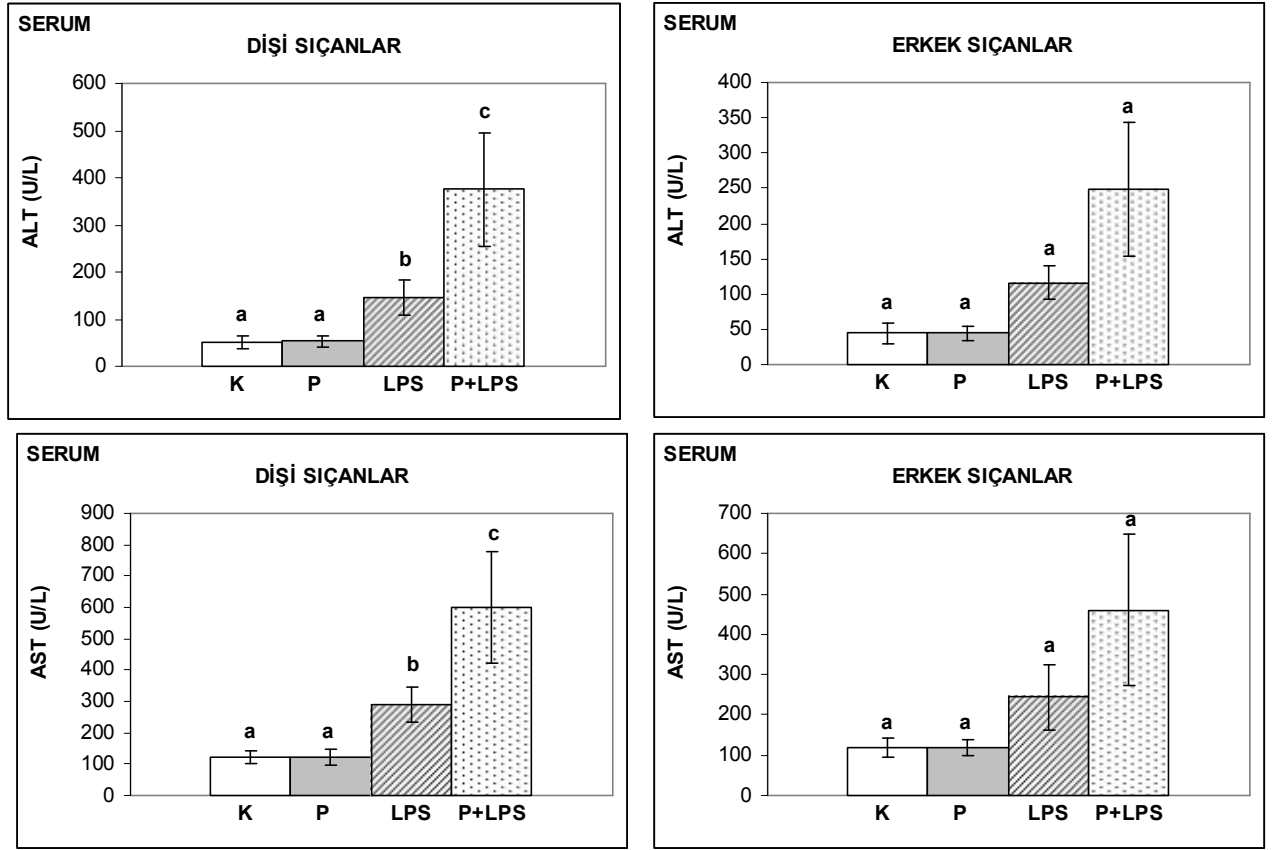
| KARACİĞER                               | Kontrol<br>(n=6)               | Pirazol<br>(n=6)               | LPS<br>(n=8)                   | Pirazol + LPS<br>(n=8)         |
|-----------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| <i><b>DİŞİ SIÇANLAR</b></i>             |                                |                                |                                |                                |
| <b>SOD<br/>(U/mg protein)</b>           | 30.6 $\pm$ 3.08 <sup>a</sup>   | 31.0 $\pm$ 3.74 <sup>a</sup>   | 33.2 $\pm$ 3.99 <sup>a</sup>   | 23.3 $\pm$ 5.55 <sup>c</sup>   |
| <b>GSH-Px<br/>(nmol/dak/mg protein)</b> | 912.3 $\pm$ 145.3 <sup>a</sup> | 893.3 $\pm$ 144.7 <sup>a</sup> | 975.7 $\pm$ 194.9 <sup>a</sup> | 641.8 $\pm$ 79.7 <sup>c</sup>  |
| <b>GST<br/>(nmol/dak/mg protein)</b>    | 538.7 $\pm$ 54.4 <sup>a</sup>  | 543.3 $\pm$ 69.5 <sup>a</sup>  | 500.0 $\pm$ 69.1 <sup>a</sup>  | 556.5 $\pm$ 109.1 <sup>a</sup> |
| <i><b>ERKEK SIÇANLAR</b></i>            |                                |                                |                                |                                |
| <b>SOD (U/mg protein)</b>               | 30.4 $\pm$ 3.84 <sup>a</sup>   | 30.3 $\pm$ 5.32 <sup>a</sup>   | 30.8 $\pm$ 5.25 <sup>a</sup>   | 21.2 $\pm$ 5.46 <sup>c</sup>   |
| <b>GSH-Px<br/>(nmol/dak/mg protein)</b> | 826.1 $\pm$ 111.7 <sup>a</sup> | 820.0 $\pm$ 120.5 <sup>a</sup> | 884.5 $\pm$ 69.4 <sup>a</sup>  | 611.4 $\pm$ 31.6 <sup>c</sup>  |
| <b>GST<br/>(nmol/dak/mg protein)</b>    | 482.0 $\pm$ 36.8 <sup>a</sup>  | 500.0 $\pm$ 64.5 <sup>a</sup>  | 472.5 $\pm$ 57.2 <sup>a</sup>  | 503.6 $\pm$ 46.9 <sup>a</sup>  |

Gruplar arasında yapılan istatistik değerdirmelerde farklı harfler anlamlı ilişkiyi göstermektedir (p < 0.05; Kruskal-Wallis; post-hoc Mann-Whitney U).

**Tablo 8.** Pirazol, LPS, pirazol+LPS uygulanan dişi ve erkek sıçanlarda karaciğerde Bax, Bcl-2 ekspresyonları ve kaspaz-3 aktivitesi (Ortalama  $\pm$  SD)

| <b>KARACİĞER</b>                              | <b>Kontrol<br/>(n=6)</b>     | <b>Pirazol<br/>(n=6)</b>      | <b>LPS<br/>(n=8)</b>          | <b>Pirazol + LPS<br/>(n=8)</b> |
|-----------------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| <b><i>DIşi SIÇANLAR</i></b>                   |                              |                               |                               |                                |
| <b>Bax</b><br>(rölatif dansitometrik ünite)   | 100.0 $\pm$ 5.0 <sup>a</sup> | 108.8 $\pm$ 6.3 <sup>a</sup>  | 130.0 $\pm$ 10.0 <sup>b</sup> | 160.0 $\pm$ 18.0 <sup>b</sup>  |
| <b>Bcl-2</b><br>(rölatif dansitometrik ünite) | 100.0 $\pm$ 5.0 <sup>a</sup> | 106.6 $\pm$ 5.8 <sup>a</sup>  | 125.0 $\pm$ 5.0 <sup>b</sup>  | 213.3 $\pm$ 30.5 <sup>b</sup>  |
| <b>KASPAZ – 3</b><br>(nmol/saat/mg protein)   | 0.49 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup> | 0.52 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>  | 2.13 $\pm$ 0.35 <sup>b</sup>  | 3.35 $\pm$ 0.46 <sup>c</sup>   |
| <b><i>ERKEK SIÇANLAR</i></b>                  |                              |                               |                               |                                |
| <b>Bax</b><br>(rölatif dansitometrik ünite)   | 100.0 $\pm$ 5.0 <sup>a</sup> | 105.0 $\pm$ 9.12 <sup>a</sup> | 135.0 $\pm$ 4.1 <sup>b</sup>  | 156.6 $\pm$ 15.3 <sup>b</sup>  |
| <b>Bcl-2</b><br>(rölatif dansitometrik ünite) | 100.0 $\pm$ 5.0 <sup>a</sup> | 110.0 $\pm$ 8.7 <sup>a</sup>  | 130.0 $\pm$ 10.0 <sup>b</sup> | 186.6 $\pm$ 15.3 <sup>b</sup>  |
| <b>KASPAZ – 3</b><br>(nmol/saat/mg protein)   | 0.50 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup> | 0.53 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>  | 2.29 $\pm$ 0.73 <sup>b</sup>  | 2.42 $\pm$ 0.34 <sup>b</sup>   |

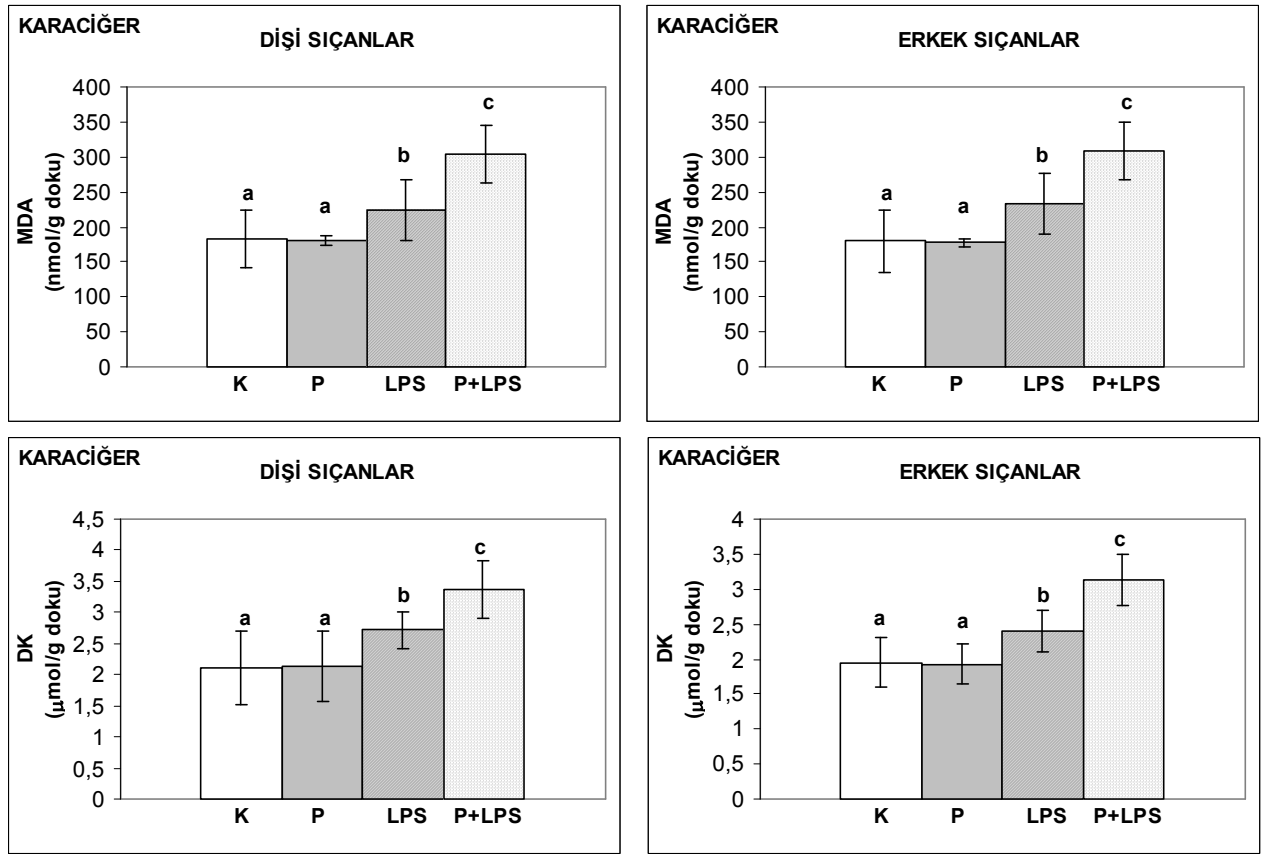
Gruplar arasında yapılan istatistik değerlendirmelerde farklı harfler anlamlı ilişkiyi göstermektedir (p < 0.05; Kruskal-Wallis; post-hoc Mann-Whitney U



**Şekil 8.** Pirazol, LPS, pirazol+LPS uygulanan dişi ve erkek sıçanlarda serumda alanin transaminaz (ALT) ve aspartat transaminaz (AST) aktiviteleri (Ortalama  $\pm$  SD)

Kontrol (K; n=6); pirazol (P; n=6); lipopolisakkarit (LPS; n=8); pirazol+lipopolisakkarit (P+LPS; n=8).

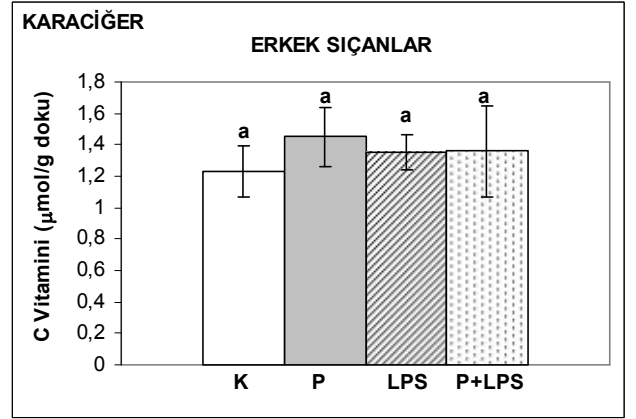
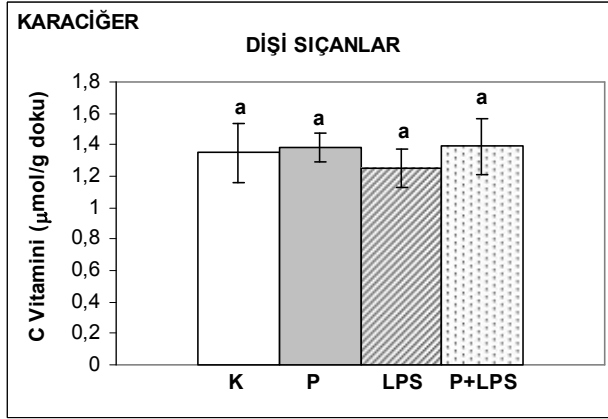
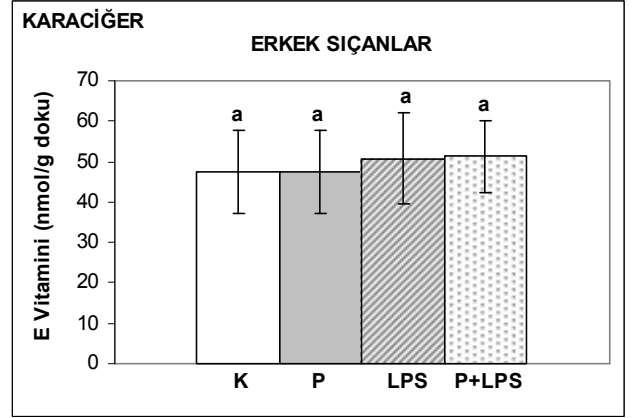
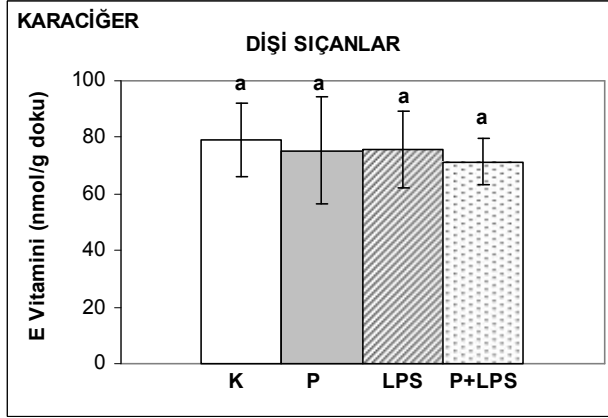
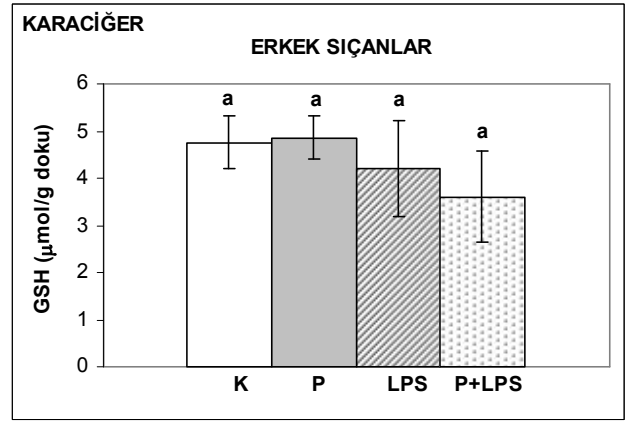
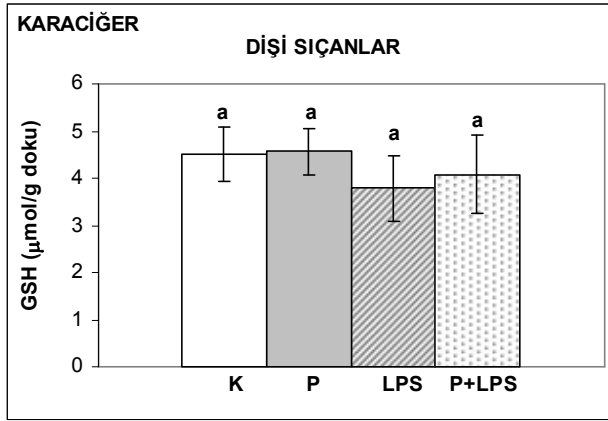
İstatistik değerlendirmeler gruplar arasında yapıldı ve farklı harfler istatistik olarak anlamlı,  $p < 0.05$  (Kruskal-Wallis; post-hoc Mann-Whitney U).



**Şekil 9.** Pirazol, LPS, pirazol+LPS uygulanan dişi ve erkek sıçanlarda karaciğerde malondialdehit (MDA) ve dien konjugat (DK) düzeyleri (Ortalama  $\pm$  SD)

Kontrol (K; n=6); pirazol (P; n=6); lipopolisakkarit (LPS; n=8); pirazol+lipopolisakkarit (P+LPS; n=8).

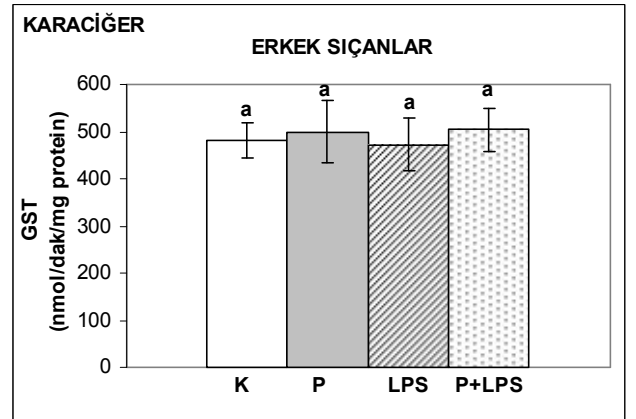
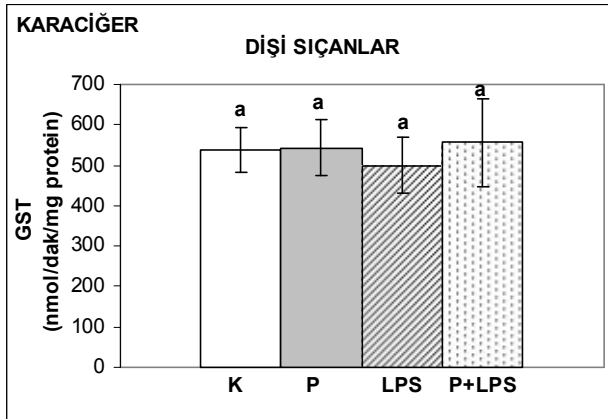
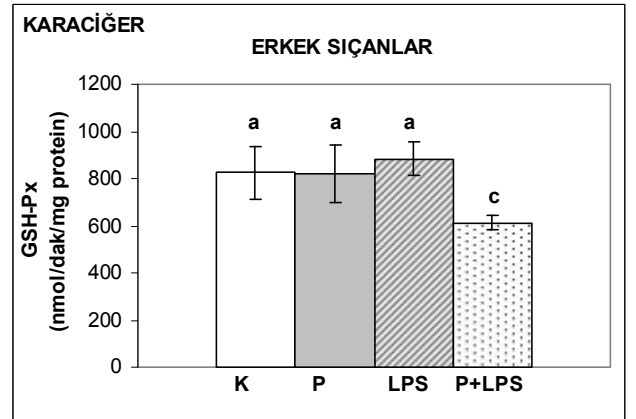
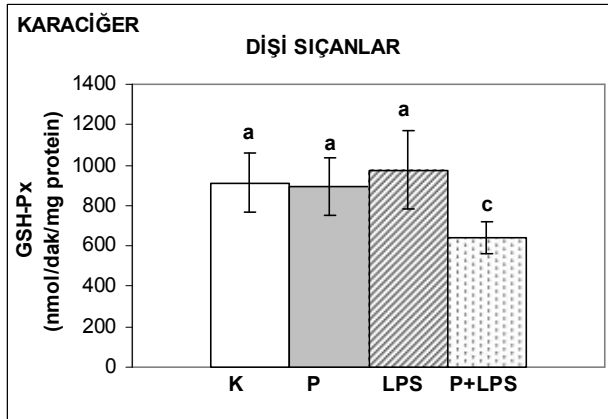
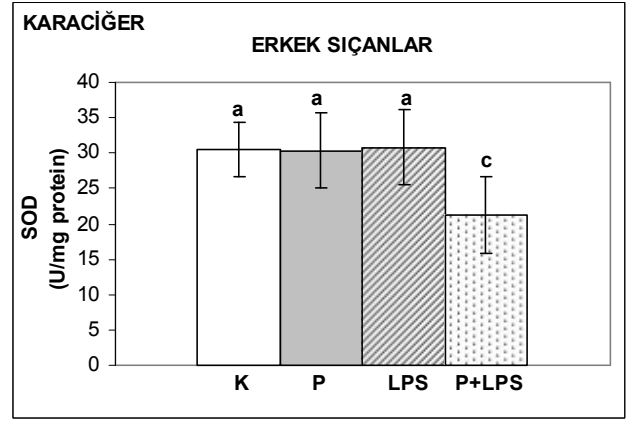
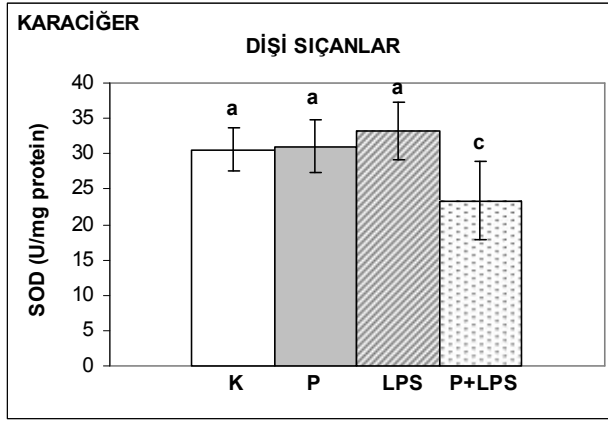
İstatistik değerlendirmeler gruplar arasında yapıldı ve farklı harfler istatistik olarak anlamlı,  $p < 0.05$  (Kruskal-Wallis; post-hoc Mann-Whitney U).



**Şekil 10.** Pirazol, LPS, pirazol+LPS uygulanan dişi ve erkek sıçanlarda karaciğerde glutatyon (GSH), E vitamini ve C vitamini düzeyleri (Ortalama  $\pm$  SD)

Kontrol (K; n=6); pirazol (P; n=6); lipopolisakkarit (LPS; n=8); pirazol+lipopolisakkarit (P+LPS; n=8).

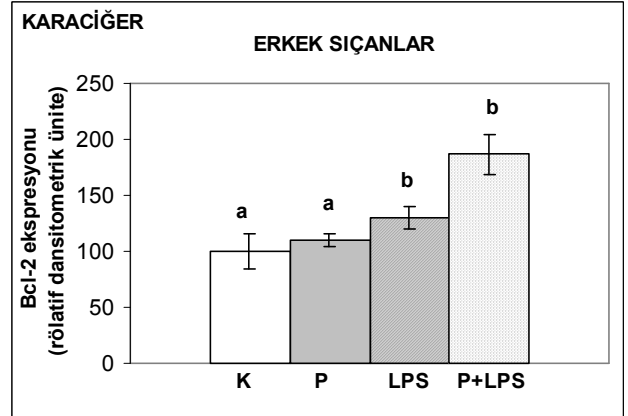
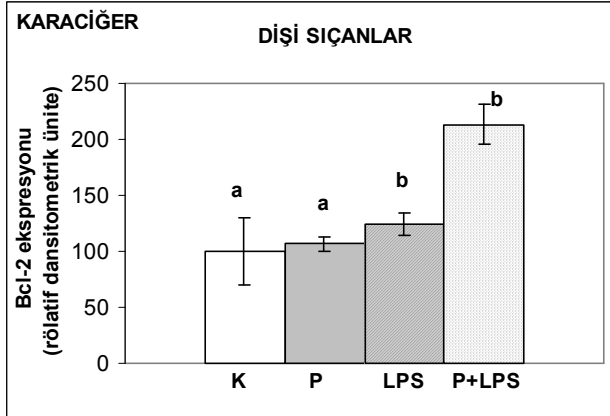
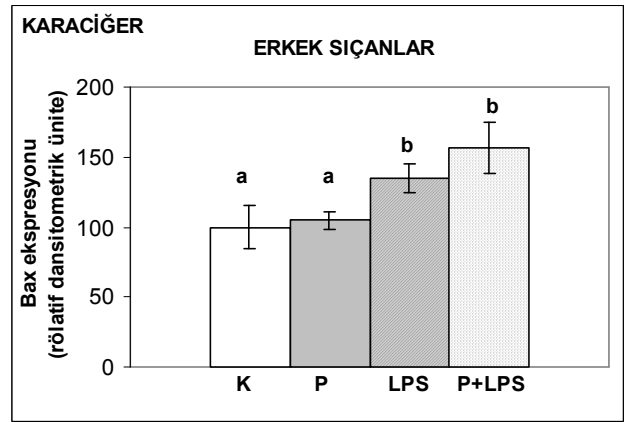
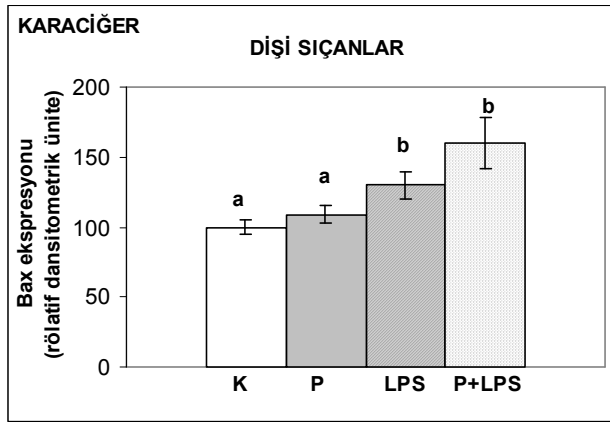
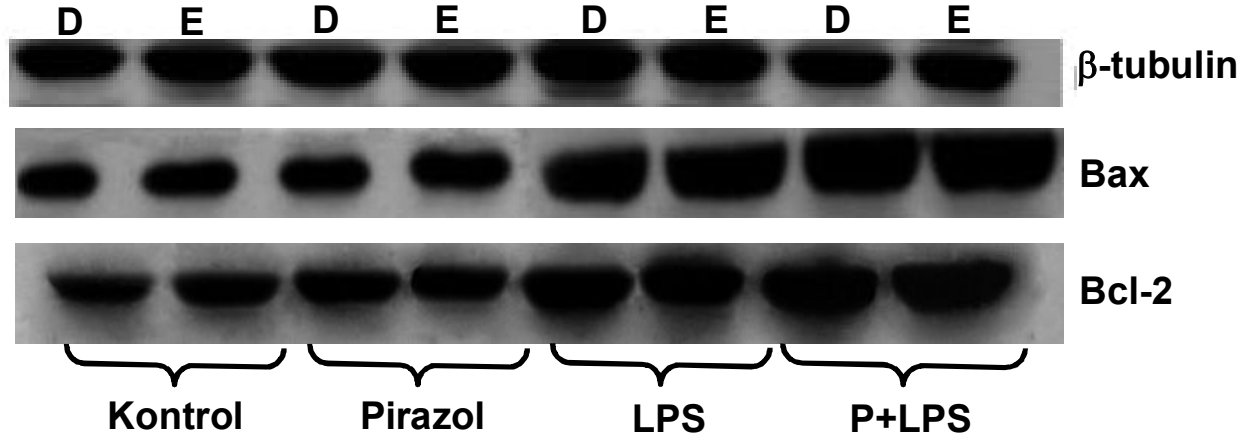
İstatistik değerlendirmeler gruplar arasında yapıldı ve farklı harfler istatistik olarak anlamlı,  $p < 0.05$  (Kruskal-Wallis; post-hoc Mann-Whitney U).



**Şekil 11.** Pirazol, LPS, pirazol+LPS uygulanan dişi ve erkek sıçanlarda karaciğerde süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon transferaz (GST) aktiviteleri (Ortalama  $\pm$  SD)

Kontrol (K; n=6); pirazol (P; n=6); lipopolisakkarit (LPS; n=8); pirazol+lipopolisakkarit (P+LPS; n=8).

İstatistik değerlendirmeler gruplar arasında yapıldı ve farklı harfler istatistik olarak anlamlı,  $p < 0.05$  (Kruskal-Wallis; post-hoc Mann-Whitney U).

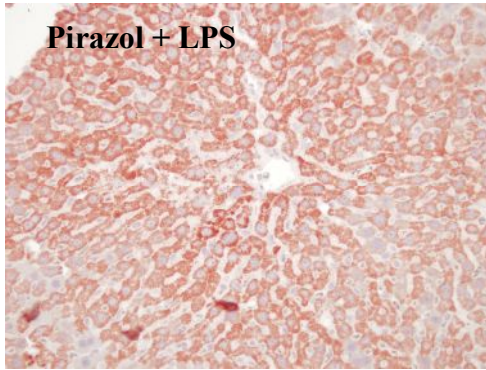
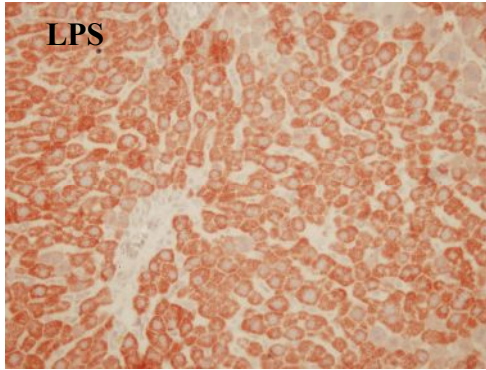
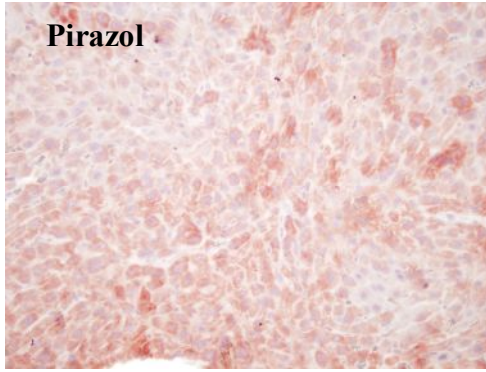
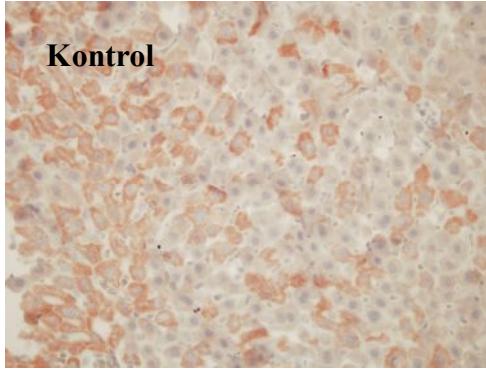


**Şekil 12.** Pirazol, LPS, pirazol+LPS uygulanan dişi ve erkek sıçanlarda karaciğerde Western Blot Bax ve Bcl-2 ekspresyonları (gruplardaki ilk bantlar dişi sıçanlara, ikinciler ise erkek sıçanlara aittir) ve rölatif dansitometrik üniteler (Ortalama  $\pm$  SD)

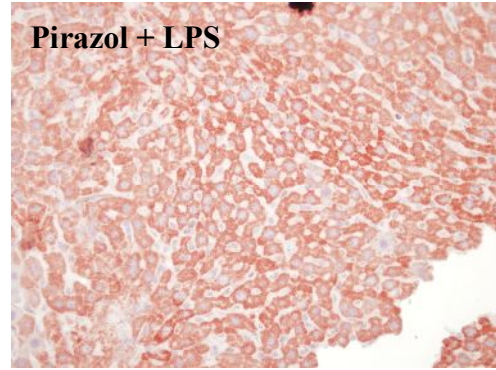
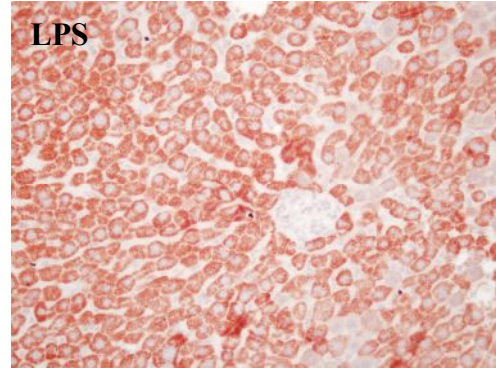
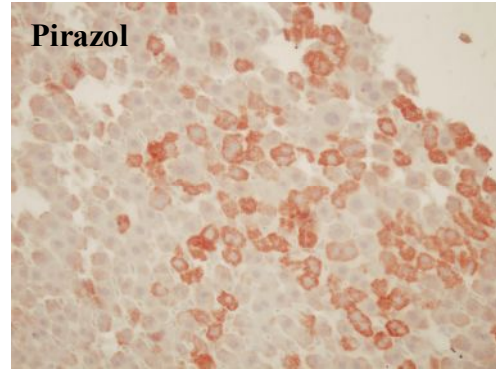
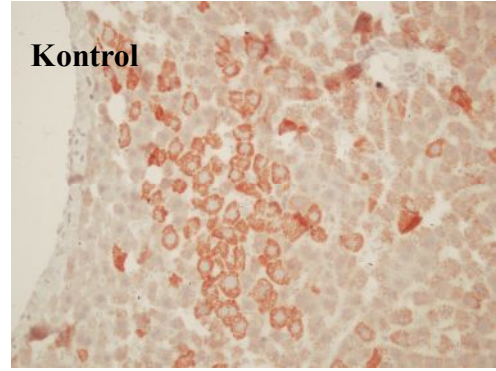
Kontrol (K; n=4); pirazol (P; n=4); lipopolisakkarit (LPS; n=4); pirazol+lipopolisakkarit (P+LPS; n=4).

İstatistik değerlendirmeler gruplar arasında yapıldı ve farklı harfler istatistik olarak anlamlı,  $p < 0.05$  (Kruskal-Wallis; post-hoc Mann-Whitney U).

**DİŞİ SIÇANLAR / Bax**

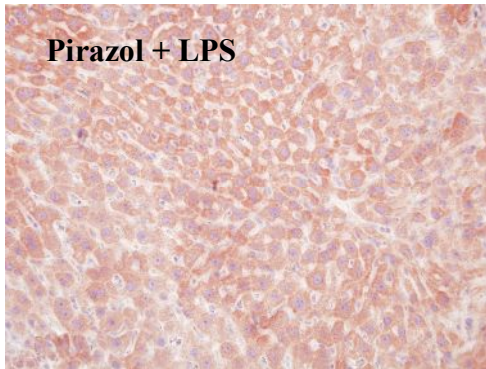
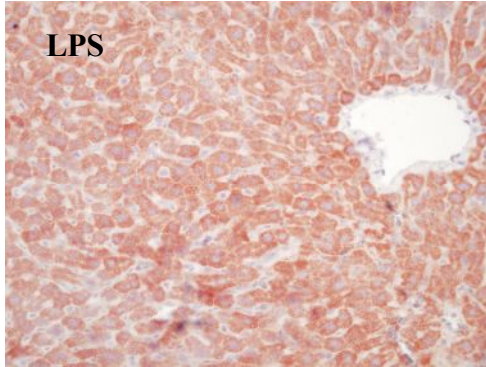
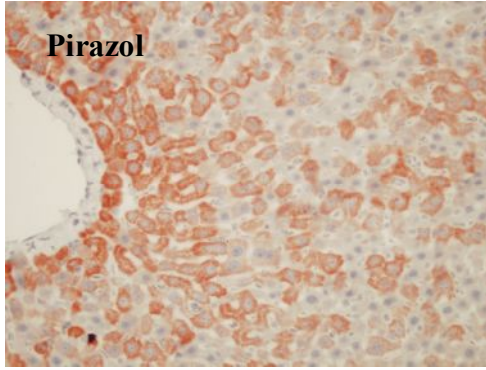
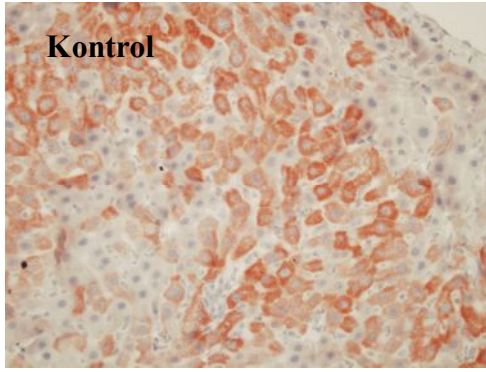


**ERKEK SIÇANLAR / Bax**

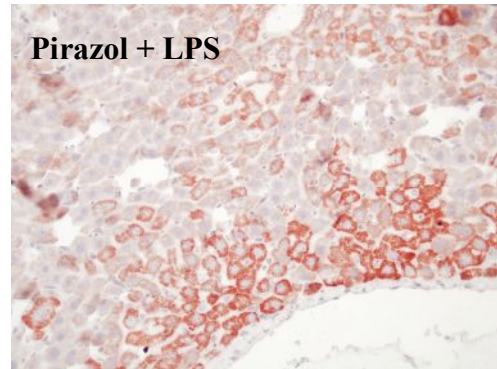
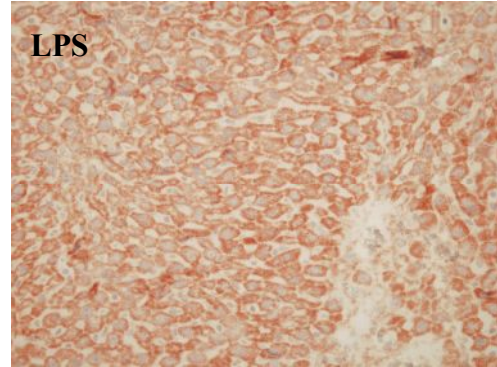
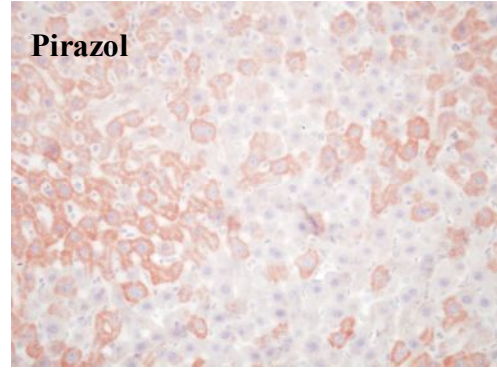
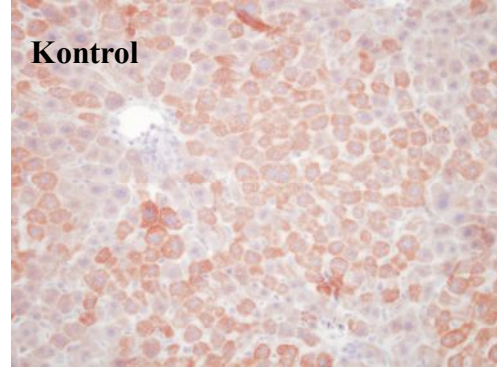


**Resim 1.** Pirazol, lipopolisakkarit (LPS), pirazol + LPS uygulanan dişi ve erkek sıçanlarda karaciğerde Bax (+) boyanma gösteren hepatositler.

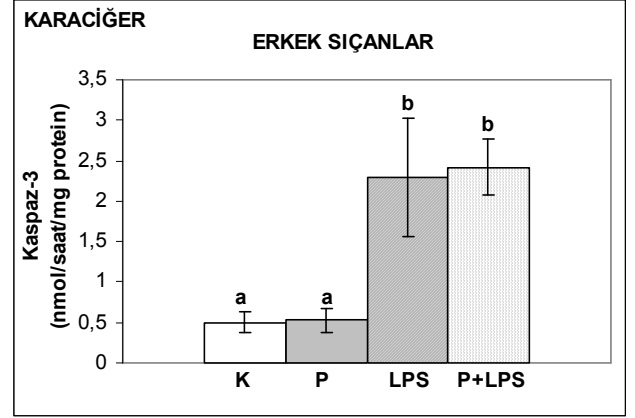
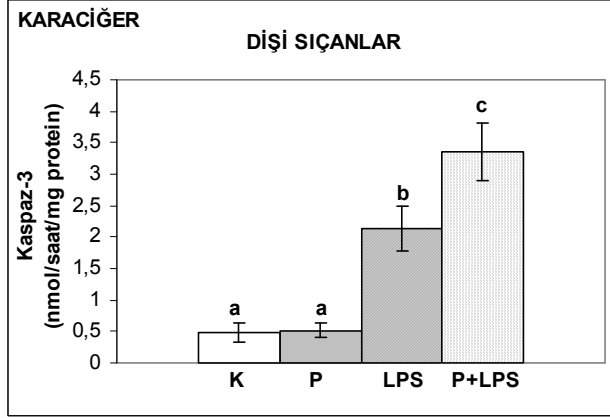
## DİŞİ SIÇANLAR/ Bcl-2



## ERKEK SIÇANLAR/ Bcl-2



**Resim 2.** Pirazol, lipopolisakkarit (LPS), pirazol + LPS uygulanan dişi ve erkek sıçanlarda karaciğerde Bcl-2 (+) boyanma gösteren hepatositler.

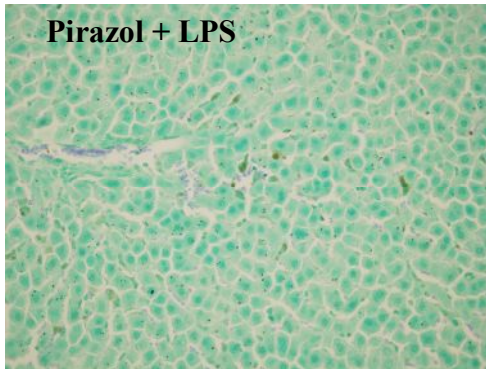
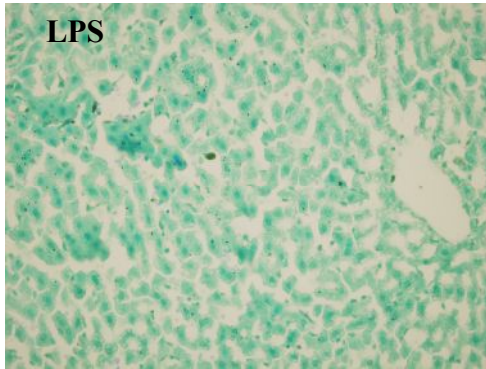
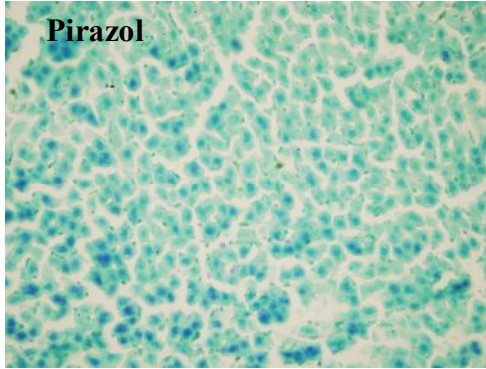
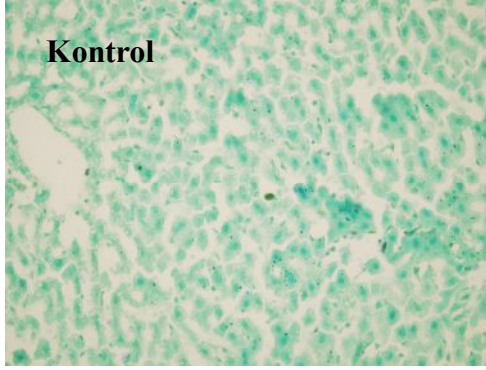


**Şekil 13.** Pirazol, LPS, pirazol+LPS uygulanan dişi ve erkek sıçanlarda karaciğerde kaspaz-3 aktiviteleri (Ortalama  $\pm$  SD)

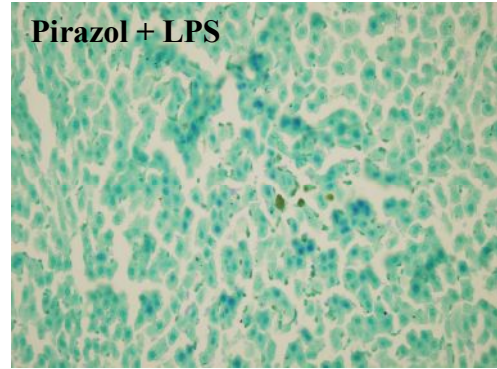
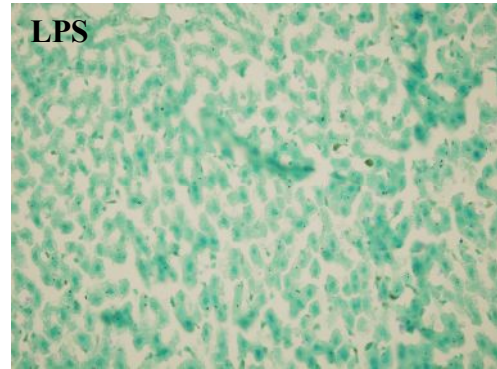
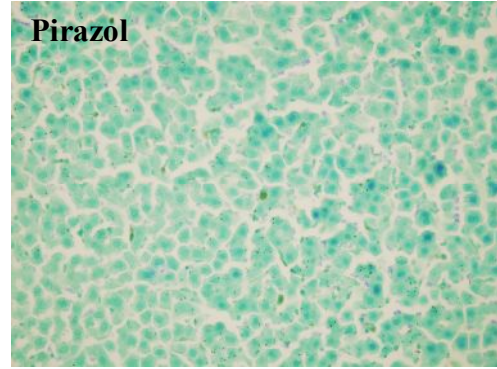
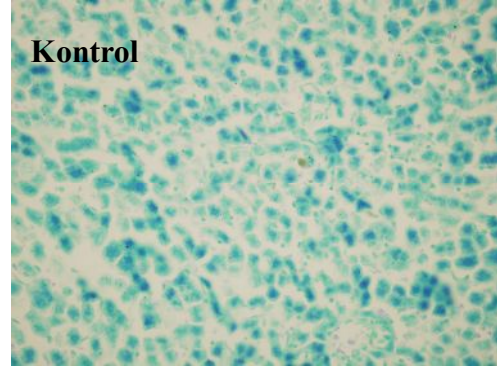
Kontrol (K; n=6); pirazol (P; n=6); lipopolisakkarit (LPS; n=8); pirazol+lipopolisakkarit (P+LPS; n=8).

İstatistik değerlendirmeler gruplar arasında yapıldı ve farklı harfler istatistik olarak anlamlı,  $p < 0.05$  (Kruskal-Wallis; post-hoc Mann-Whitney U).

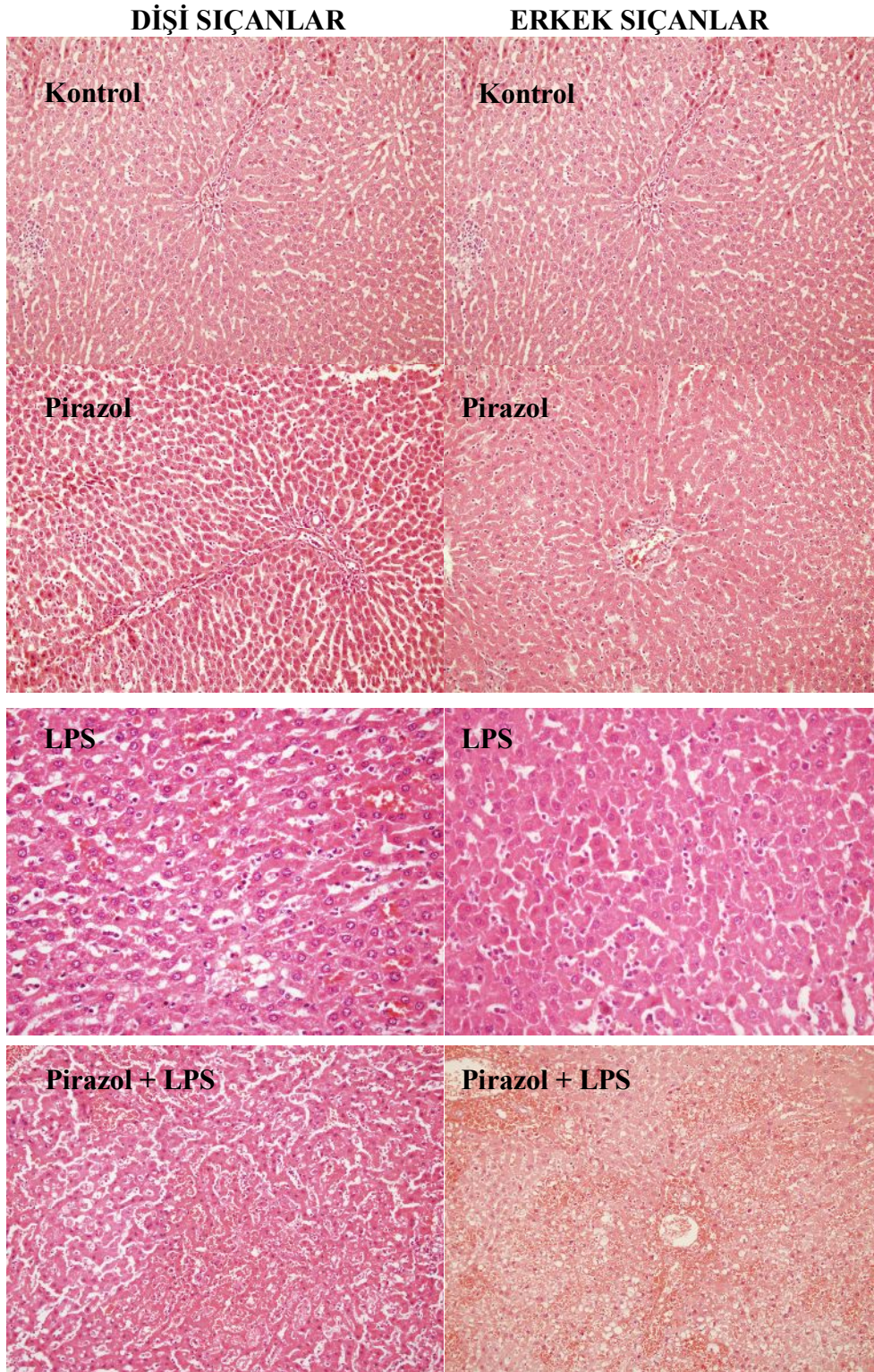
### DİŞİ SIÇANLAR /TUNEL



### ERKEK SIÇANLAR/TUNEL



**Resim 3.** Pirazol, lipopolisakkarit (LPS), pirazol + LPS uygulanan dişi ve erkek sıçanlarda karaciğerde TUNEL (+) boyanma gösteren hepatositler.



**Resim 4.** Pirazol, lipopolisakkarit (LPS), pirazol + LPS uygulanan dişi ve erkek sıçanlarda karaciğerde histopatolojik görünüm (H&E x200).

## 5. TARTIŞMA

Sitokrom P<sub>450</sub> enzim ailesinin bir üyesi olan CYP2E1 sistemi, etanol dışında çeşitli kimyasal bileşikler tarafından da indüklenmektedir (48,52). Pirazol, CYP2E1 sisteminin güçlü bir aktivatörü olup, CYP2E1 sistemini indüklemek ve dolayısıyla bu enzim etkisiyle oluşan radikallerin yarattığı toksik etkileri incelemek için kullanılmaktadır (30,48,58,59,100,106). Bu nedenle, pirazol ile CYP2E1 indüksiyonu , alkole bağlı karaciğer hastalıklarının patogenezini araştırmak ve CYP2E1'in rolünü belirlemek için son yıllarda kullanılmaktadır (30,58,59,100,106). 2-3 gün süre ile 150-200 mg/kg dozunda pirazol uygulanan sıçanlarda CYP2E1 aktivitesinin 2-4 kat artış gösterdiği bulunmuştur (58,59). Bu nedenle, çalışmamızda sıçanlarda CYP2E1 sistemini indüklemek için pirazol kullanılmıştır.

Çalışmamızda endotoksemi oluşturmak amacıyla 10 mg/kg dozunda LPS (serotip 055:B5) sıçanlara periton içi uygulandı ve uygulamadan 6 saat sonra incelemeler yapıldı. LPS'nin karaciğerde oluşturduğu bozuklukların kullanılan LPS dozuna, tipine, inceleme zamanına ve türlere göre değişkenlik gösterdiği bilinmektedir (7,10,15,43,59,92). Daha önce yapılan çalışmalar kullanılan LPS dozunun ve incelemelerin yapıldığı zaman diliminin karaciğerde oksidatif ve nitrozatif stresin gelişmesi, apoptotik ve nekrotik değişimlerin incelenmesi için uygun olduğunu göstermiştir (7,59,92).

CYP2E1 enzim sisteminin özellikle karaciğerde bulunması, endotoksinlerin zehirsizleştirme işleminin bu organda yapılması gibi nedenler karaciğerde kolayca hasar gelişimine neden olabilmektedir (33,78,84,86). Gerçekten, CYP2E1 indüksiyonu (33,52,86) ve endotoksemi (7,13,27,78,84) organizmada özellikle karaciğeri etkilemektedir. CYP2E1'in aktivasyonu (22,31,48,101) ve endotoksemi (88,89,99) alkolik karaciğer hasarının oluşumunda bağımsız iki risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Gerek CYP2E1 indüksiyonu (22,31,48,58,59,101), gerekse endotoksemi (58,59,88,89,99) karaciğerde superoksit, peroksinitrit ve hidroksil radikali gibi zararlı radikallerin oluşumunu arttırmakta, oksidatif ve nitrozatif strese yol açmakta, apoptotik ve nekrotik hücre ölümüne neden olmaktadır. Bazı araştırmacılar CYP2E1 indüksiyonu ve endotokseminin birlikte olduğu durumun sinerjik bir etki yaratabileceğini ve alkolik karaciğer hasarının incelenmesi için uygun bir deneysel yöntem olabileceğini ileri sürmüşlerdir (58,59).

Sıçan, fare gibi deney hayvanlarında alkolik karaciğer hastalığı oluşturmak çok güçtür. İçme suyunda veya gavajla alkol vererek sıçanlarda sadece steatozis oluşturulabilir ve genellikle tavsiye edilen bir yöntem değildir. Bu nedenle, Lieber-De Carli diyeti olarak tanımlanan ve günlük kalorisinin %36'sı gibi önemli bir miktarının etanolden sağlandığı sıvı diyetlerin oral veya intragastrik olarak kullanıldığı modeller kullanılmaktadır (57). Bu diyetin sağlanmasındaki güçlük ve daha kısa sürede sonuç alabilmek amacıyla, çalışmamızda deney hayvanlarına alkol vermek yerine, alkol metabolizmasında temel rol oynayan CYP2E1 enzimini indüklemeyi tercih ettik. Daha sonra, bu sıçanlara LPS uygulayarak, CYP2E1 sistemi indüklenen sıçanlarda, karaciğerdeki apoptotik ve nekrotik oluşumları ve oksidatif stresi incelemek istedik.

Öte yandan, dişi ve erkeklerin alkolik karaciğer hastalığı oluşumuna duyarlılıklarının farklı olduğu bildirilmiştir (28,41,88,89). Dişilerde alkole bağlı karaciğer hasarının daha kısa sürede geliştiği ve oluşan lezyonların daha ciddi olduğu bulunmuştur (87,89). Dişi ve erkeklerin alkole duyarlılığındaki bu farklılığın nedenleri bilinmemektedir. Alkol verilen dişi sıçanlarda endotoksin düzeyleri daha yüksek bulunmuş ve kan endotoksin düzeyleri ile karaciğerdeki patolojik lezyonlar arasında bir korelasyon saptanmıştır (41,89). Bu nedenle, alkolik karaciğer hasarının dişilerde daha şiddetli olmasının endotoksemiye bağlı gelişen Kupffer hücre aktivasyonundaki farklılıktan kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (88,89,99). Bununla birlikte, kronik alkol uygulanan dişi ve erkek sıçanlarda karaciğerde steatozis, inflamasyon ve nekroz oluşumu ve oksidatif stresin değerlendirildiği bir çalışmada, iki cins arasında alkole bağlı olarak gelişen karaciğer lezyonları ve oksidatif stres yönünden bir farklılık bulunmamıştır (77). Ayrıca, etanolün karaciğerde CYP2E1 enzim sistemini dişi ve erkek sıçanlarda aynı şiddette indüklediği de saptanmıştır (77).

Bu bilgilerin ışığında, CYP2E1 sistemi indüklenen dişi ve erkek sıçanlarda karaciğer hastalığına duyarlılıkta bir farklılık olup olmadığı ve bu duyarlılıkta endotokseminin rolünü araştırmak istedik. Böylece, dolaylı yoldan dişi ve erkek sıçanların alkolik karaciğer hastalığına duyarlılıklarını ve endotokseminin etkisini belirlemek istedik. Bu amaçla dişi ve erkek sıçanlara 2 gün süreyle (200 mg/kg, i.p) pirazol injeksiyonu yapıldı ve daha sonra tek doz LPS (10 mg/kg; i.p) uygulandı ve 6 saat sonra incelemeler yapıldı. Apoptozisi belirlemek için, Bax ve Bcl-2 ekspresyonları, kaspaz-3 aktivitesi ve in situ uç işaretleme tekniği (TUNEL), nekrozu belirlemek için serumda transaminaz aktiviteleri ölçümü ve histopatolojik incelemelere başvuruldu. Ayrıca karaciğerde lipid peroksit düzeyleri ve antioksidan sistem elemanları araştırılarak, prooksidan-antioksidan

dengedeki değişimlerin karaciğer hasarındaki katkıları belirlenmek istendi. Çalışmamızda lipit peroksidasyonunu belirlemek için iki farklı yöntem kullanıldı. DK, lipit peroksidasyonunun ara ürünlerinden biri, MDA ise son ürünlerinden biridir. MDA düzeylerinin tayini lipit peroksidasyonunu göstermek için en sık kullanılan yöntemdir. Ancak bu yöntemin pH, ısı, ısıtma zamanı gibi bazı faktörlerden etkilenmesi ve bazı interferanslar göstermesi nedeniyle, dien konjugatı veya protein karbonil grupları tayini gibi bir diğer yöntemle desteklenmesinin uygun olacağı bildirilmektedir (38, 93, 121).

Bazı araştırıcılar etanolün karaciğerde apoptotik hücre ölümünü tetiklediğini bildirmişlerdir (40,44,45,46,54,63,64). In vivo (44,64) ve in vitro (40,46,54,63) koşulda yapılan bu çalışmalar alkolik karaciğer hasarının gelişiminde apoptozisin etkin bir rolü olabileceğini göstermektedir. Aynı şekilde, endotoksemik koşullarda da apoptozisin uyarıldığı ve bu durumun LPS'ye bağlı karaciğer hasarının oluşumunda etkili olabileceği ileri sürülmektedir (43,59,81,105). Alkolik sıçanlara LPS verildiğinde karaciğerde apoptozisin arttığı, alkolün genellikle intrinsik yolla, LPS'nin ise ekstrinsik yolu uyararak sinerjik bir etki ile apoptozisi arttırdığı bildirilmiştir (19). Aynı şekilde, LPS'nin alkole bağlı hepatik lezyonları da şiddetlendirdiği gösterilmiştir (24,67).

CYP2E1 enziminde aktivasyon ve endoksemiye birarada oluşturarak yaptığımız çalışmamızda , serum ALT ve AST aktiviteilerinin dişi sıçanlarda 7.3 ve 4.9 kat, erkek sıçanlarda 5.5 ve 3.9 kat artış gösterdiği bulundu. Karaciğer histolojik olarak incelendiğinde LPS uygulanan dişi ve erkek sıçanlarda karaciğerde sadece ılımlı bir inflamasyon geliştiği, pirazol+LPS grubunda ise yoğun bir inflamasyonun yanısıra yer yer nekroz geliştiği saptanmıştır. Bu bulgular serumda ALT ve AST aktivitelerinde saptadığımız artışlar ile uyurşmaktadır. Ancak pirazol+LPS grubundaki dişi sıçanlarda enzim aktiviteilerindeki artışlar daha fazla olmasına rağmen, karaciğerde histolojik incelemede dişi ve erkek sıçanlar arasında belirgin bir farklılık görülmemiştir.

Apoptotik süreçle ilgili olarak karaciğerde Bax ve Bcl-2 ekspresyonları, kaspaz-3 aktivitesi ve TUNEL yöntemi kullanıldı. Bax/Bcl-2 oranındaki artış bir dokuda apoptozise eğilimin arttığını göstermektedir. Western Blot ve immünohistokimyasal boyama tekniği ile karaciğerde Bax ve Bcl-2 ekspresyonlarının LPS grubundaki ve pirazol+LPS grubundaki sıçanlarda artış gösterdiği, ancak bu iki grup arasında belirgin bir farklılık olmadığı gözlendi. LPS ve pirazol+LPS gruplarındaki dişi ve erkek sıçanlar arasında da Bax ve Bcl-2 ekspresyonları yönünden bir farklılık bulunamadı. Dişi ve erkek sıçanlarda karaciğerde kaspaz-3 aktivitesinin de LPS ve pirazol+LPS uygulamalarından sonra arttığı bulundu. Pirazol+LPS grubundaki sıçanlar LPS grubuyla karşılaştırıldığında, dişilerde

karaciğer kaspaz-3 aktivitesinde daha ileri bir artış görülmesine karşılık, erkeklerde anlamlı bir farklılık bulunamadı. TUNEL yöntemiyle yapılan apoptotik hücre sayımında dişi ve erkek sıçanlarda pirazol+LPS grubunda LPS grubuna oranla apoptotik hücrelerin belirgin bir artış gösterdiği bulundu. Bu sonuçlara göre tek başına LPS uygulamasının karaciğerde apoptozisi arttırdığı, pirazol ile CYP2E1 indüksiyonu yapıldığında apoptozisin daha belirgin olduğu, bu apoptotik sürecin dişi ve erkek sıçanlarda belirgin bir farklılık göstermediği ileri sürülebilir.

Çalışmamızda tek başına LPS uygulamasının ve pirazolle CYP2E1 indüksiyonu yapılan sıçanlara LPS uygulamasının oluşturduğu apoptotik ve nekrotik değişimlerde oksidatif stresin rolünü belirlemek amacıyla karaciğerde prooksidan-antioksidan denge de incelendi. 10 mg/kg LPS uygulamasından 6 saat sonra yapılan incelemelerde karaciğerde MDA ve DK düzeylerinin arttığı, antioksidan sistem elemanlarında ise bir değişiklik olmadığı bulundu. Buna karşılık pirazol+LPS grubunda ise MDA ve DK düzeylerinde daha ileri artışlar saptandı. GSH, E vitamini ve C vitamini düzeyleri değişmemesine rağmen SOD ve GSH-Px aktivitelerinde bir azalma gözlemlendi. Bu sonuçlar, CYP2E1 indüksiyonu yapılan sıçanlarda LPS'nin prooksidan-antioksidan dengeyi daha belirgin bir biçimde etkilediğini, dişi ve erkek sıçanlar arasında bu yönden bir farklılık olmadığını göstermektedir.

Buna göre, CYP2E1 sistemi indüklenen sıçanlarda, LPS uygulamasının karaciğerde apoptozisi arttırdığı, inflamatuvar ve nekrotik oluşumlara neden olduğu, prooksidan-antioksidan dengede değişimlere yol açtığı , ancak dişi ve erkek sıçanlar arasında bu yönden bir farklılık oluşmadığı gözükmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

1. Adachi Y, Bradford BU, Gao W, Bojes HK, Thurman RG. Inactivation of Kupffer cells prevents early alcohol-induced liver injury. *Hepatology* 1994; 20: 453-460.
2. Albano E. Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *Proc Nutr Soc* 2006; 65: 1-13.
3. Arteel GE. Oxidants and antioxidants in alcohol-induced liver disease. *Gastroenterol* 2003; 124: 778-790.
4. Bailey SM. A review of the role of reactive oxygen and nitrogen species in alcohol-induced mitochondrial dysfunction. *Free Radical Res* 2003; 37: 585-596.
5. Balkan J, Kanbağlı Ö, Aykaç-Toker G, Uysal M. Taurin treatment reduces hepatic lipids and oxidative stress in chronically ethanol treated rats. *Biol Pharm Bull* 2002; 25: 1231-1233.
6. Balkan J, Öztezcan S, Küçük M, Çevikbaş U, Koçak-Toker N, Uysal M. The effect of betaine treatment on triglyceride levels and oxidative stress in the liver of ethanol-treated guinea pigs. *Exp Toxicol Pathol* 2004; 55:505-509.
7. Balkan J, Parıldar FH, Doğru-Abbasoğlu S, Aykaç-Toker G, Uysal M. The effect of taurine or betaine pretreatment on hepatotoxicity and prooxidant status induced by polysaccharide treatment in the liver of rats. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17: 917-921.
8. Bauer JD. *Clinical Laboratory Methods* St Louis, C.V. Mosby Company, 1982.
9. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996; 271 (5 Pt 1): C1424-1437.
10. Ben-Shaul V, Lomnitski L, Nyska A, Carbonatto M, Peano S, Zurovsky Y, Bergman M, Eldridge SR, Grossman S. Effect of natural antioxidants and apocynin on LPS-induced endotoxemia in rabbit. *Human Exp Toxicol* 2000; 19: 604-614.
11. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963; 61: 882-888.
12. Buege JA, Aust JD. Microsomal lipid peroxidation. *Method Enzymol* 1978; 52: 302-310.
13. Cadenas S, Cadenas AM. Fighting the stranger-antioxidant protection against endotoxin toxicity. *Toxicology* 2002; 180: 45-63.

14. Cahill A, Cunningham CC, Adachi M, Ishii H, Bailey SM, Fromenty B, Davies A. Effects of alcohol and oxidative stress on liver pathology: The role of mitochondrion. *Alcohol Clin Exp Res* 2002; 26: 907-915.
15. Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Naji L, Fernandez-Santos JM, Martin-Lacave-Ines, Guerrero JM, Calvo JR. Beneficial pleiotropic actions of melatonin in an experimental model of septic shock in mice: regulation of pro-/anti-inflammatory cytokine network, protection against oxidative damage and anti-apoptotic effects. *J Pineal Res* 2005; 39: 400-408.
16. Caro AA, Cederbaum AI. Oxidative stress, toxicology and pharmacology of CYP2E1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004; 44: 7-42.
17. Chan SHH, Wu KLH, Wang LL, Chan JYH. Nitric oxide and superoxide-dependent mitochondrial signaling in endotoxin-induced apoptosis in the rostral ventrolateral medulla of rats. *Free Rad Biol Med* 2005; 39: 603-618.
18. Chang WK, Yang KD, Chuang H, Jan JT, Shaio MF. Glutamine protects activated human T cells from apoptosis by up-regulating glutathione and Bcl levels. *Clin Immunol* 2002; 104: 151-160.
19. Deaciuc IV, D'Souza NB, Burikhanov R, Nasser MS, Voskresensky IV, De Villiers WJS, McClain CJ. Alcohol, but not lipopolysaccharide-induced liver apoptosis involves changes in intracellular compartmentalization of apoptotic regulators. *Alcohol Clin Exp Res* 2004; 28: 160-172.
20. Demiralay R, Gürsan N, Erdem H. Regulation of sepsis-induced apoptosis of pulmonary cells by posttreatment of erdosteine and N-acetylcysteine. *Toxicology* 2006; 228: 151-161.
21. Desai DI. Vitamin E analysis methods for animal tissues. *Method Enzymol* 1984; 105: 138-147.
22. Dey A, Cederbaum AI. Alcohol and oxidative liver injury. *Hepatology* 2006; 43: 63-74.
23. Enomoto N, Ikejima K, Yamashina S, Hirose M, Shimizu H, Kitamura T, Takei Y, Sato N, Thurman RG. Kupffer cell sensitization by alcohol involves increased permeability to gut-derived endotoxin. *Alcohol Clin Exp Res* 2001; 25 (suppl 6): S51-S54.
24. Enomoto N, Schemmer P, Ikejima K, Takei Y, Sato N, Brenner DA, Thurman RG. Long-term alcohol exposure changes sensitivity of rat Kupffer cells to lipopolysaccharide. *Alcohol Clin Exp Res* 2001; 25: 1360-1367.

25. Feihl F, Waeber B, Liaudet L. Is nitric oxide overproduction the target of choice for the management of septic shock? *Pharmacol Ther* 2001; 91: 179-213.
26. Folch J, Lees M, Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; 226: 497-509.
27. Fox ES, Selwyn A, Broitman, Thomas P. Bacterial endotoxins and the liver. *Lab Invest* 1990; 63: 733-741.
28. Gemma S, Vichi S, Testai E. Individual susceptibility and alcohol affects: biochemical and genetic aspects. *Ann Ist Super Sanita* 2006; 42: 8-16.
29. Gloire G, Poels SL, Piette J. NF- $\kappa$ B activation by reactive oxygen species: Fifteen years later. *Biochem Pharmacol* 2006; 72: 1493-1505.
30. Gong P, Cederbaum AI. Nrf2 is increased by CYP2E1 in rodent liver and HepG2 cells and protects against oxidative stress caused by CYP2E1. *Hepatology* 2006; 43: 144-153.
31. Gonzalez FJ. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. *Mutat Res* 2005; 569: 101-110.
32. Görg B, Wettstein M, Metzger S, Schliess F, Haussinger D. Lipopolysaccharide-induced tyrosine nitration and inactivation of hepatic glutamine synthetase in the rat. *Hepatology* 2005; 41: 1065-1073.
33. Gregus Z, Klaassen CD. Mechanisms of toxicity. Casaret and Doull's Toxicology, Ed: CD Klassen, McGraw-Hill Med Publ, New York, Sixth Edition, 2001, p. 35-81.
34. Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* 2001; 13: 85-94.
35. Guicciardi ME, Gores GJ. Apoptosis: A mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut* 2005; 54: 1024-1033.
36. Gujral JS, Hinson JA, Farhood A, Jaeschke H. NADPH oxidase-derived oxidant stress is critical for neutrophil cytotoxicity during endotoxemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: 243-252.
37. Habig WH, Jacoby WB. 1981. Assays for differentiation of glutathione s-transferases. *Method Enzymol* 1981; 77: 398-405.
38. Halliwell B, Gutteridge JM. Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford, Oxford University Press, 1999.

39. Han JY, Joo Y, Kim YS, Lee YK, Kim HJ, Cho GJ, Choi WS, Kang SS. Ethanol induces cell death by activating caspase-3 in the rat cerebral cortex. *Mol Cells* 2005; 20: 189-195.
40. Higuchi H, Adachi M, Miura S, Gores GJ, Ishii H. The mitochondrial permeability transition contributes to acute ethanol-induced apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology* 2001; 34: 320-328.
41. Iimuro Y, Frankenberg MV, Arteel GE, Bradford BU, Wall CA, Thurman RG. Female rats exhibit greater susceptibility to early alcohol-induced liver injury than males. *Am J Physiol* 1997; 272: G1186-G1194.
42. Ikejima K, Enomoto N, Iimuro Y, Ikejima A, Fang D, Xu J, Forman DT, Brenner DA, Thurman RG. Estrogen increases sensitivity of hepatic Kupffer cells to endotoxin. *Am J Physiol* 1998; 274 : G669-676.
43. Jeschke MG, Rensing H, Klein D, Schubert T, Mautes AEM, Bolder U, Croner RS. Insulin prevents liver damage and preserves liver function in lipopolysaccharide-induced endotoxemic rats. *J Hepatol* 2005; 42: 870-879.
44. Ji C, Kaplowitz N. Hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and alcoholic liver injury. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1699-1708.
45. Kass GEN. Mitochondrial involvement in drug-induced hepatic injury. *Chem-Biol Int* 2006; 163: 145-159.
46. Kaviarasan S, Ramamurty N, Gunasekaran P, Varalakshmi E, Anuradha CV. Fenugreek (*trigonella foenum graecum*) seed extract prevents ethanol-induced toxicity and apoptosis in Chang liver cells. *Alcohol Alcohol* 2006; 41: 267-273.
47. Kawase Y, Genzou T, Hayakawa K, Koda M, Maruyama R, Kanoh M, Kunishima A, Arai M, Minatoguchi S, Ohkusa T, Matsuzaki M, Fujiwara T, Fujiwara H. Abundant apoptosis in nutmeg liver of cardiomyopathic hamsters. *Pathol Res Pract* 2002; 198: 291-298.
48. Kessova I, Cederbaum AI. CYP2E1: Biochemistry, toxicology, regulation and function in ethanol-induced liver injury. *Curr Mol Med* 2003; 3: 509-518.
49. Kim R. Unknotting the roles of Bcl-2 and Bcl-xL in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 333: 336-343.
50. Knight JA. Diseases related to oxygen-derived free radicals. *Ann Clin Lab Sci* 1995; 25: 111-121.

51. Kono H, Rusyn I, Yin M, Gabele E, Yamashina S, Dikalova A, Kadiiska MB, Connor HD, Mason RP, Segal BH, Bradford BU, Holland SM, Thurman RG. NADPH oxidase-derived free radicals are key oxidants in alcohol-induced liver disease. *J Clin Invest* 2000; 106: 867-872.
52. Koop DR. Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1. *FASEB J* 1992; 6: 724-730.
53. Kumral A, Tugyan K, Gönenç S, Genç K, Genç Ş, Sönmez Ü, Yılmaz O, Duman N, Uysal N, Özkan H. Protective effects of erythropoietin against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and oxidative stress in the developing C57BL/6 mouse brain. *Develop Brain Res* 2005; 160: 146-156.
54. Kurose I, Higuchi H, Miura S, Saito H, Watanabe N, Hokari R, Hirokawa M, Takaishi M, Zeki S, Nakamura T, Ebinuma H, Kato S, Ishii H. Oxidative stress-mediated apoptosis of hepatocyte exposed to acute ethanol intoxication. *Hepatology* 1997; 25: 368-378.
55. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* 1970; 227: 680-685.
56. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 71: 952-958.
57. Lieber CS. Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol* 2004; 34: 9-19.
58. Lu Y, Cederbaum AI. Enhancement by pyrazole of lipopolysaccharide-induced liver injury in mice: Role of cytochrome P450 2E1 and 2A5. *Hepatology* 2006; 44: 263-274.
59. Lu Y, Wang X, Cederbaum AI. Lipopolysaccharide-induced liver injury in rats treated with the CYP2E1 inducer pyrazole. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289: G308-G319.
60. Macdonald J, Galley F, Webster NR. Oxidative stress and gene expression in sepsis. *Br J Anaesth* 2003; 90: 221-232.
61. Malhi H, Gores GJ, Lemasters J. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology* 2006; 43: 31-44.
62. McCarty MF. Inhibition of CYP2E1 with natural agents may be a feasible strategy for minimizing the hepatotoxicity of ethanol. *Med Hypotheses* 2001; 56: 8-11

63. McVicker BL, Tuma DJ, Kubik JL, Tuma PL, Casey CA. Ethanol-induced apoptosis in polarized hepatic cells possibly through regulation of the Fas pathway. *Alcohol Clin Exp Res* 2006; 30: 1906-1915.
64. Minana JB, Gomez-Cambronero L, Lloret A, Pallardo FV, Del Olmo J, Escudero A, Rodrigo JM, Pellin A, Vina JR, Vina J, Sastre J. Mitochondrial oxidative stress and CD95 ligand: A dual mechanism for hepatocyte apoptosis in chronic alcoholism. *Hepatology* 2002; 35: 1205-1214.
65. Molina PE, Hoek JB, Nelson S, Guidot DM, Lang CH, Wands JR, Crawford JM. Mechanisms alcohol-induced tissue injury. *Alcohol Clin Exp Res* 2003; 27: 563-575.
66. Molina PE, McClain J, Valla D, Guidot D, Diehl AM, Lang CH, Neuman M. Molecular pathology and clinical aspects of alcohol induced tissue injury. *Alcohol Clin Exp Res* 2002; 26: 120-128.
67. Murohisa G, Kobayashi Y, Kawasaki T, Nakamura S, Nakamura H. Involvement of platelet-activating factor in hepatic apoptosis and necrosis in chronic ethanol-fed rats given endotoxin. *Liver* 2002; 22: 394-403.
68. Mylorie AA, Collins H, Umbles C, Kyle J. Erythrocyte superoxide dismutase activity and other parameters of copper status in rats ingesting lead acetate. *Toxicol Appl Pharmacol* 1986; 82: 512-520.
69. Nakazawa H, Fukuyama N, Takizawa S, Tsuji C, Yoshitake M, Ishida H. Nitrotyrosine formation and its role in various pathological conditions. *Free Rad Res Commun* 2000; 33: 771-784.
70. Nakazawa H, Genka C, Fujishima M. Pathological aspects of active oxygens/free radicals. *Jpn J Physiol* 1996; 46: 15-32.
71. Nishimura G, Nakahara K, Misawa N, Muranaka M, Uchida K, Kuroda H, Murakami N. Immunization against intestinal bacterial endotoxin prevents alcoholic fatty liver in rats. *J Vet Med Sci* 2001; 63: 275-280.
72. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95 : 351-358.
73. Omaye ST, Turnbull JD, Sauberlich HE. Selected methods for the determination of ascorbic acid in animal cells, tissues and fluids. *Method Enzymol* 1979; 62: 3-8.
74. Pacher P, Schulz R, Liaudet L, Szabo C. Nitrosative stress and pharmacological modulation of heart failure. *Trends Pharmacol Sci* 2005; 26: 302-310.

75. Quiroz SC, Bucio L, Souza V, Hernandez E, Gonzalez E, Gomez-Quiros L, Kershenobich D, Vargas-Vorackova F, Gutierrez-Ruiz MC. Effect of endotoxin pretreatment on hepatic stellate cell response to ethanol and acetaldehyde. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 1267-1273.
76. Rao RK, Seth A, Sheth P. Recent advances in alcoholic liver disease. Role of intestinal permeability and endotoxemia in alcoholic liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: G881-884.
77. Ronis MJJ, Korourian S, Yoon S, Ingelman-Sundberg M, Albano E, Lindros KO, Badger TM. Lack of sexual dimorphism in alcohol-induced liver damage (ALD) in rats treated chronically with ethanol-containing low carbohydrate diets: The role of ethanol metabolism and endotoxin. *Life Sci* 2004; 75: 469-483.
78. Sakaguchi S, Furusawa S. Oxidative stress and septic shock: metabolic aspects of oxygen-derived free radicals generated in the liver during endotoxemia. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006; 47: 167-177.
79. Salvemini D, Cuzzocrea S. Oxidative stress in septic shock and disseminated intravascular coagulation. *Free Rad Biol Med* 2002; 33: 1173-1185.
80. Schattenberg JM, Galle PR, Schuchmann M. Apoptosis in liver disease. *Liver Int* 2006; 26: 904-911.
81. Shimizu S, Yamada Y, Okuno M, Ohnishi H, Osawa Y, Mitsuru M, Moriwaki H. Liver injury induced by lipopolysaccharide is mediated by TNFR-1 but not by TNFR-2 or Fas in mice. *Hepatol Res* 2005; 31: 136-142.
82. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150: 76-85.
83. Spitzer, JA, Zhang P. Gender differences in neutrophil function and cytokine-induced neutrophil chemoattractant generation in endotoxic rats. *Inflammation* 1996; 20: 485-498.
84. Su GL. Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of Kupffer cell activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: 256-265.
85. Takeyama N, Shoji Y, Ohashi K, Tanaka T. Role of reactive oxygen intermediates in lipopolysaccharide-mediated hepatic injury in the rat. *J Surg Res* 1996; 60: 258-262.
86. Tanaka E, Terada M, Misawa S. Cytochrome P450 2E1: Its clinical and toxicological role. *J Clin Pharm Ther* 2000; 25: 165-175.

87. Thomasson HR. Gender differences in alcohol metabolism: Physiological responses to ethanol. In: Recent Developments in Alcoholism: Alcoholism and Women. Edited by M.Galanter, NewYork, Plenum Press, 1995, p. 163-179.
88. Thurman RG, Bradford BU, Limuro Y, Knecht KT, Connor HD, Adachi Y, Wall C, Arteel GE, Raleigh JA, Forman DT, Mason RP. Role of Kupffer cells, endotoxin and free radicals in hepatotoxicity due to prolonged alcohol consumption: Studies in female and male rats. J Nutr 1997; 127: 903S-906S.
89. Thurman RG. Mechanisms of hepatic toxicity. II. Alcoholic liver injury involves activation of Kupffer cells by endotoxin. Am J Physiol 1998; 275: G605-G611.
90. Trump BF, Berezesky IK, Chang SH, Phelps PC. The pathways of cell death: Oncosis, apoptosis, and necrosis. Toxicol Pathol 1997; 25: 82-88.
91. Tsukamoto H, Lu SC. Current concepts in the pathogenesis of alcoholic liver injury. FASEB J 2001; 15: 1335-1349.
92. Uedono Y, Takeyama N, Yamagami K, Tanaka T. Lipopolysaccharide-mediated hepatic glutathione depletion and progressive mitochondrial damage in mice: Protective effect of glutathione monoethyl ester. J Surg Res 1997; 70: 49-54.
93. Uysal M, Özdemirler G, Kutalp G and Öz H. Mitochondrial and microsomal lipid peroxidation in rat liver after acute acetaldehyde and ethanol intoxication. J Appl Toxicol 1989; 9: 155-158.
94. Uysal M. Serbest radikaller ve oksidatif stres. Biyokimya, Editörler F. Gürdöl ve E. Ademoğlu. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2006, s 829-835.
95. Uysal M. Serbest radikaller, lipid peroksitleri ve organizmada prooksidan-antioksidan dengeyi etkileyen koşullar. Klinik Gelişim 1998; 11: 336-341.
96. Van Empel VPM, Bertrand ATA, Hofstra L, Crijns HJ, Doevendans PA, Windt LJD . Myocyte apoptosis in heart failure. Cardiovasc Res 2005; 67: 21-29.
97. Victor VM, Rocha M, Fuente MDL. Immune cells :free radicals and antioxidants in sepsis. Int J Immunopharmacol 2004; 4: 327-347.
98. Vural P. Ksenobiyotiklerin metabolizması. Biyokimya, Editörler F. Gürdöl ve E. Ademoğlu. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2006, s 817-828.
99. Wheeler MD, Kono H, Yin M, Nakagami M, Uesugi T, Arteel GE, Gabele E, Rusyn I, Yamashina S, Froh M, Adachi Y, Iimuro Y, Bradford BU, Smutney OM, Connor HD, Mason RP, Goyert SM, Peters JM, Gonzalez FJ, Smulski RJ, Thurman RG. The role of Kupffer cell oxidant production in early ethanol-induced liver disease. Free Rad Biol Med 2001; 31: 1544-1549.

100. Wu D, Cederbaum AI. Ethanol and arachidonic acid produce toxicity in hepatocytes from pyrazole-treated rats with high levels of CYP2E1. *Mol Cell Biochem* 2000; 204: 157-167.
101. Wu D, Cederbaum AI. Oxidative stress mediated toxicity exerted by ethanol-inducible CYP2E1. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 207: 70-76.
102. Yalçın AS. Antioksidanlar. *Klinik Gelişim* 1998; 11: 342-346.
103. Yee SB, Ganey PE, Roth RA. The role of Kupffer cells and TNF- $\alpha$  in monocrotaline and bacterial lipopolysaccharide-induced liver injury. *Toxicol Sci* 2002; 71: 124-132.
104. Yu BP. Cellular defences against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994; 74: 139-162.
105. Zhong J, Deaciuc IV, Burikhanov R, De Villiers WJS. Lipopolysaccharide-induced liver apoptosis is increased in interleukin-10 knockout mice. *Biochem Biophys Acta* 2006; 1762: 468-477.
106. Zhuge J, Cederbaum AI. Increased toxicity by transforming growth factor-beta 1 in liver cells overexpressing CYP2E1. *Free Rad Biol Med* 2006; 41: 1100-1112.

## **ÖZGEÇMİŞ**

1978 yılında Almanya’da doğdum. İlköğrenimimi Nazilli Beşeylül İlkokulu’nda, orta öğrenimimi Mehmet Akif Ersoy Ortaokulu’nda ve lise öğrenimimi Nazilli Lisesi’nde tamamladım.

2001 yılında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi’nden mezun oldum. 2002 yılından beri İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında uzmanlık eğitimimi sürdürmekteyim.

Evliyim.

**Bilge Depboylu**