

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BUTİLENMİŞ HİDROKSİ TOLUEN (BHT)'NİN KARACİĞER
DOKUSU GLUTATYON METABOLİZMASI İLE İLİŞKİLİ
ENZİMLER ÜZERİNE ETKİLERİ**

Hemşire Sinan MEAN
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Yeter DEĞER

VAN-2015

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BUTİLENMİŞ HİDROKSİ TOLUEN (BHT)'NİN KARACİĞER
DOKUSU GLUTATYON METABOLİZMASI İLE İLİŞKİLİ
ENZİMLER ÜZERİNE ETKİLERİ**

Hemşire Sinan MEAN
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Yeter DEĞER

VAN-2015

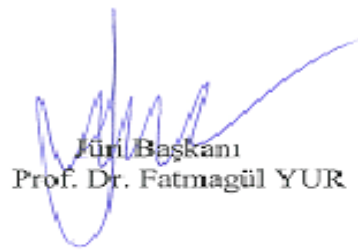
Bu araştırma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından 2014-SBE-YL137 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BUTİLENMİŞ HİDROKSİ TOLUEN (BHT)’NİN KARACİĞER
DOKUSU GLUTATYON METABOLİZMASI İLE İLİŞKİLİ
ENZİMLER ÜZERİNE ETKİLERİ**

Hemşire Sinan MEAN
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ


Üye
Prof. Dr. Yeter DEĞER


Jüri Başkanı
Prof. Dr. Fatmagül YUR


Üye
Prof. Dr. Ebubekir CEYLAN

TEZ KABUL TARİHİ

04/ 06 /2015

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında yol gösteren, tezin yapılmasında büyük katkıları olan ve desteğini esirgemeyen Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Yeter DEĞER'e, Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Fatmagül YUR'a, Anabilim Dalı'nın öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Nihat MERT'e, Prof. Dr. Semiha DEDE'ye ve Prof. Dr. Handan MERT'e, Histopatolojik çalışmalarında katkı ve desteğini esirgemeyen Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Serkan YILDIRIM'a, Yrd. Doç. Dr. Ali KARAKUŞ'a, Araştırma Görevlisi Sedat ÇETİN'e, beni her zaman destekleyen değerli aileme ve mali destek sağlayan Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığına teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
Teşekkür.....	III
İçindekiler.....	IV
Simgeler ve Kısaltmalar.....	VI
Tablolar Listesi.....	VIII
Şekiller Listesi.....	IX
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Karaciğer.....	3
2.1.1. Karaciğer anatomisi.....	3
2.1.2. Karaciğer fizyolojisi.....	4
2.1.3. Biyotransformasyon.....	4
2.1.3.1. Biyotransformasyonda görevli enzimler.....	5
2.1.3.2. Biyotransformasyon metabolizmasının evreleri.....	6
2.1.4. Karaciğer hasarının değerlendirilmesi.....	6
2.1.5. Karaciğer hasarındaki histopatolojik bulgular.....	6
2.2. Butillenmiş Hidroksi Toluen (BHT).....	7
2.2.1. Butillenmiş hidroksi tolue (BHT)'nin kullanım alanları.....	7
2.3. Antioksidanlar.....	8
2.3.1. Antioksidanların sınıflandırılması	8
2.4. Glutasyon (GSH)	9
2.4.1. Biyotransformasyon metabolizmasında GSH'nın rolü.....	10
2.5. Glutasyon Peroksidaz (GP _x : EC.1.11.1.9).....	11
2.6. Glutasyon Redüktaz (GR: EC.1.6.4.2).....	11
2.7. Glutasyon-S- Transferaz (GST: EC.2.5.1.8).....	12
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	13
3.1. Gereç	13
3.1.1. Hayvan materyali.....	13
3.1.2. Deneme gruplarının hazırlanması.....	13
3.1.3. Analizlerde kullanılan cihaz ve malzemeler.....	14

3.1.4. Analizlerde kullanılan kimyasal maddeler.....	14
3.2. Yöntem.....	15
3.2.1. Kan örneklerinin alınması ve analizi.....	15
3.2.2. Karaciğer doku örneklerinin alınması ve analizi.....	15
3.2.3. Karaciğer doku örneklerinin histopatolojik analizi.....	18
3.3. İstatistik Analiz.....	18
4. BULGULAR.....	19
4.1. Seruma ait biyokimyasal bulgular.....	19
4.2. Karaciğer dokusuna ait biyokimyasal bulgular.....	21
4.3. Karaciğer dokusuna ait histopatolojik bulgular.....	25
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	31
ÖZET.....	40
SUMMARY.....	41
KAYNAKLAR.....	42
ÖZGEÇMİŞ.....	49
EKLER.....	50

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALT	: Alanin aminotransferaz
AST	: Aspartat aminotransferaz
BHT	: Butillenmiş hidroksi toluen
BHT-QM	: BHT- kinon metit
CAT	: Katalaz
COOH	: Karboksilik asit
CYP450	: Sitokrom P450
DBPC	: 2,6-di-tert-bütil-p-cresol
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
FAD	: Flavın adenin dinükleotit
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FMO	: Flavın monooksijenaz
GP_x	: Glutasyon peroksidaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Redükte glutasyon
GSSG	: Okside glutasyon
GST	: Glutasyon S-transferaz
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HE	: Hematoksilen-Eozin
LDH	: Laktat dehidrogenaz
LOOH	: Lipit hidroperoksid
LPO	: Lipit peroksidasyonu

MDA	: Malondialdehit
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADP	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NADPH	: Nikotinamid adenin difosfat hidrojen
OH	: Hidroksil radikali
PBS	: Fosfat tamponu
ROS	: Reaktif oksijen radikali
SOD	: Süperoksit dismutaz
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
γ-GT	: γ -Glutamil transpeptidaz

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.	Antioksidanların sınıflandırılması.....	8
Tablo 2.	Kontrol ve deneme gruplarına ait serum ALT, AST ve LDH enzim aktiviteleri.....	19
Tablo 3.	Kontrol ve deneme gruplarına ait karaciğer dokusu, GSH seviyesi ve GPx, GST, GR enzim aktiviteleri.....	21

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	Fare karaciğerinin anatomik yapısı.....	3
Şekil 2.	Butillenmiş hidroksi tolüen (BHT)'nin kimyasal yapısı.....	7
Şekil 3.	Glutatyonun moleküler yapısı.....	9
Şekil 4.	Kontrol ve deneme gruplarına ait serum ALT enzim aktivitesi.....	20
Şekil 5.	Kontrol ve deneme gruplarına ait serum AST enzim aktivitesi.....	20
Şekil 6.	Kontrol ve deneme gruplarına ait serum LDH enzim aktivitesi....	21
Şekil 7.	Kontrol ve deneme gruplarına ait karaciğer dokusu GSH seviyesi...	22
Şekil 8.	Kontrol ve deneme gruplarına ait karaciğer dokusu GP _x enzim aktivitesi.....	23
Şekil 9.	Kontrol ve deneme gruplarına ait karaciğer dokusu GST enzim aktivitesi.....	23
Şekil 10.	Kontrol ve deneme gruplarına ait karaciğer dokusu GR enzim aktivitesi.....	24
Şekil 11.	Kontrol (A) ve I. Grup (B) rat karaciğeri makroskopik görünüm.....	25
Şekil 12.	II. Grup rat karaciğeri makroskopik görünüm.....	26
Şekil 13.	III. Grup rat karaciğeri makroskopik görünüm	26
Şekil 14.	IV. Grup rat karaciğeri makroskopik görünüm	27
Şekil 15.	Kontrol grup rat karaciğer dokusu histopatolojik yapısı.....	28
Şekil 16.	I. Grup rat karaciğer dokusu histopatolojik yapısı.....	29
Şekil 17.	II. Grup rat karaciğer dokusu histopatolojik yapısı	29
Şekil 18.	III. Grup rat karaciğer dokusu histopatolojik yapısı	30
Şekil 19.	IV. Grup rat karaciğer dokusu histopatolojik yapısı.....	30

1. GİRİŞ

Gıda katkı maddeleri işlem görmüş gıdaların raf ömürlerini uzatmak amacıyla kullanılan kimyasal maddelerdir. Bu maddelerin kullanımı ile besinlerde oluşabilecek mikrobiyal üremeler ve istenmeyen oksidasyon reaksiyonlarının oluşumları engellenmekte, böylece insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkiler ortadan kaldırılabilmektedir (Bakar, 2008).

Gıda katkı maddelerinin kullanımı insanlık tarihi kadar eskidir ve günümüzde kullanımları yaygınlaşmıştır. Hazır gıdalarda besin koruyucuların kullanımının gerekliliği birçok araştırmacı tarafından önerilmektedir (Baldwin ve ark., 1995; Srour, 1998; Omonigho ve Ikenebomeh, 2000). Ancak günümüzde hazır gıdaların kullanımlarının hızla artması, insanların kimyasal maddelere maruz kalma oranını yükseltmekte ve insanları bu kimyasalların muhtemel toksik etkileriyle karşı karşıya getirmektedir. Bu sebeple besin koruyucuların toksik etkileri ile ilgili araştırmalar önem kazandığı (Bakar, 2008), insanlar ve hayvanlarda yapılan çalışmalarda yan etkilere neden oldukları bildirilmektedir (Bohne ve ark., 2008).

BHT, fenolik yapısında bulunan hidroksit gruplarından hidrojen vermek suretiyle, başlangıçtaki serbest yağ asidi radikal oluşumunu engelleyerek oksidasyonu önlemektedir (Lanigan ve Yamarik, 2002).

Bilindiği gibi özellikle organizma tarafından oral yolla alınan birçok kimyasal madde, öncelikle karaciğerde, daha sonra da böbreklerde detoksifiye edilmektedir. Dışarıdan alınan kimyasal maddeler, barsakta emildikten sonra hızla karaciğerde tutulurlar ve safra yoluyla dışarı atılırlar. Karaciğer oldukça önemli bir enzimatik donanıma sahiptir. Bu sayede endojen ve eksojen bileşikler biyotransformasyona uğratmakta, daha sonra da bu maddeleri safra yoluyla dışarı atmaktadır. Birçok endojen ve eksojen maddenin karaciğerde biyotransformasyonu esnasında meydana gelen oksidasyon/redüksiyon reaksiyonları sonucunda serbest radikaller meydana gelmekte ve açığa çıkan bu radikaller antioksidan savunma sisteminin karşı koyabileceği düzeyin üzerine çıktığında, dokularda çeşitli tahribatlara yol açmaktadır. Bu tahribatlar arasında membran hasarları, DNA hasarları, enzim inaktivasyonları sayılabilir (Dökmeci, 2001; Atalay ve ark., 2004).

Normal fizyolojik koşullarda, organizma endojen veya ekzojen nedenlerle oluşan reaktif oksijen radikalleri (ROS) ve bunlara bağlı olarak gelişen oksidatif stres ile m¼cadele eden antioksidan savunma sistemine sahiptir. Özellikle karaciğerde glutatyon (GSH) ve glutatyon metabolizması ile ilişkili olan glutatyon peroksidaz (GP_x), glutatyon S-transferaz (GST), glutatyon red¼ktaz (GR) enzimleri bu sistemde önemli yer tutmaktadır (Baudrimont ve ark., 1997).

Sunulan bu çalışmada gıda katkı maddesi olarak kullanılan sentetik bir fenolik antioksidan olan BHT' nin farklı doz kullanımının, karaciğer dokusu GSH d¼zeyi, GST, GR ve GP_x enzim aktiviteleri ile histopatolojik etkileri karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

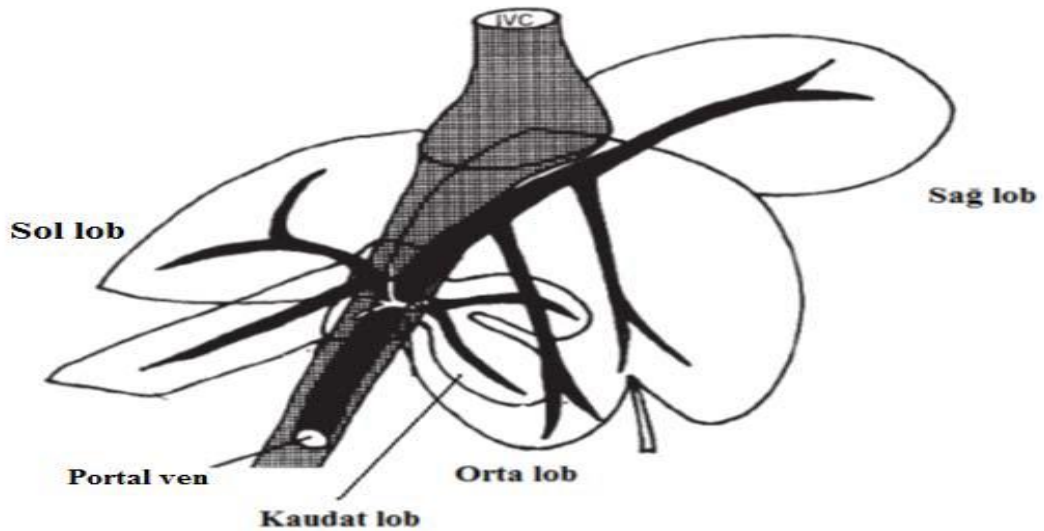
2.1. Karaciğer

2.1.1. Karaciğer anatomisi

Karaciğer, karın boşluğunda sağ üst tarafında, diyafram ile sağ alt kostaların altında yerleşmiştir. İç ve dış salgı yapar ve vücudun en büyük bezidir (Yurdakul ve ark., 2005).

Sıçan karaciğeri dört lobdan oluşur. Bu lobüllerin ortasında santral ven ve periferinde hepatik triadlar vardır. Hepatositler santral venden ışınsal olarak trabeküller oluşturacak şekilde sıralanırlar. Bu hepatosit sıraları arasında Kuppfer hücreleri içeren sinüzoidler vardır (Brzoska ve ark., 2003).

Bir karaciğer hücresi hepatosit olarak da adlandırılmaktadır. Hepatositler organizmadaki toksik etkileri ortadan kaldırdığı, kan moleküllerini ve glikojen sentezlediği için, sitoplazmalarında organel çeşidi ve sayısı fazladır. Bu hücrelerde endoplazmik retikulum, golgi kompleksi, lizozomlar, mitokondriler ve bazı hücrelerde olmak üzere çift çekirdek vardır (Aytekin ve Solakoğlu, 2006).



Şekil.1. Fare karaciğerinin anatomik yapısı (Kogure ve ark., 1999).

2.1.2. Karaciğer fizyolojisi

Karaciğer, metabolizmanın düzenlenmesi ve uyum içerisinde işlemesi için gerekli birçok yaşamsal fonksiyona sahiptir (Solomon, 1997; Karagül ve ark., 2000; Demirsoy ve ark., 2004).

1. Yeni alyuvarları yapar ve yaşlılarını ortadan kaldırır.
2. Plazma proteinlerinin oluşumunda görevlidir.
3. Safrayı üretir ve salgılar.
4. Karbonhidrat metabolizmasını düzenler.
5. Vitamin üretir ve depolar.
6. Protein metabolizmasını düzenler.
7. Yağ metabolizmasını düzenler.
8. Üre sentezini gerçekleştirir.
9. Pıhtılaşmada rol oynar.
10. Karaciğer hücreleri lenf ve antikorların büyük bir kısmının yapımını üstlenerek savunmaya katkıda bulunurlar
11. Karaciğer hücreleri ısı üreterek kana verirler ve vücut ısısının düzenlenmesine etki ederler.
12. Toksik maddeleri etkisiz hale getirir

2.1.3. Biyotransformasyon

Besinlerle alınan doğal bileşikler dışında kalan ve çeşitli yollarla vücuda giren kimyasal maddelere, ilaçlar dahil ksenobiyotikler denir. Bu ksenobiyotiklerin enzimlerin etkisiyle kimyasal değişikliğe uğramasına biyotransformasyon denir (Tunçok, 2003).

Organizmaların karşılaştığı yabancı kimyasal maddeler veya ilaçlar vücut için toksik maddeler olup, vücuda alındıktan sonra etki yerlerine dağılırlar ve çeşitli yollarla elimine edilmeye çalışılırlar. Bunların metabolize edildiği ana organ karaciğerdir (Özyazgan, 2002).

2.1.3.1. Biyotransformasyonda görevli enzimler

Biyotransformasyon enzimleri bütün vücuda dağılmıştır ve pek çok subseleler kompartmanda bulunurlar. Omurgalılarda karaciğer biyotransformasyon reaksiyonlarını katalizleyen enzimler için en zengin kaynaktır. Biyotransformasyon enzimleri başta karaciğerde hepatositlerde olmak üzere, böbrekte tubulus hücrelerinde, akciğerde klara hücrelerinde, ince barsakta mukoza hücrelerinde ve testislerde sertoli hücrelerinde bulunurlar. Aynı zamanada deri, akciğerler, burun mukozası, göz, pankreas, dalak, kalp, beyin, ovaryum, plasenta, plazma, eritrosit, trombosit, lenfosit ve aortada da bulunurlar (Anzenbacher ve Anzenbacherova, 2001; Guéguen ve ark. 2006).

Karaciğer ve diğer pek çok organda bulunan biyotransformasyon enzimleri büyük oranda endoplazmik retikulum ya da sitozolde lokalize olmuşlardır. Daha az oranda da mitokondri, çekirdek ve lizozomlarda bulunurlar. Sitozolik enzimler; alkol, aminler, ksantinleri okside eden enzimlerdir. Biyotransformasyon olayları %90 mikrozomal enzimlerle, %10 sitozolik enzimlerle olur (Lang ve Pelkonen, 1999; Rozman ve Klaasen, 2001). Mikrozomal monooksijenazların en önemli enzim sistemi sitokrom P450 enzim sistemidir (Anzenbacher ve Anzenbacherova, 2001; Guéguen ve ark., 2006)

Bir diğer monooksijenaz da flavin monooksijenaz (FMO) olup sitokrom P450'ye benzer. Karaciğer, böbrek ve akciğerlerin endoplazmik retikulumunda yerleşim gösterirler. Nitrojen, sülfür ve fosfor hetero atomlarını içeren ksenobiyotiklerin oksidasyonu ve bazı inorganik iyonların oksidasyonunu yürütürler (Cashman, 1995; Lawton ve ark., 1994; Rozman ve Klaasen, 2001; Ziegler, 1993).

2.1.3.2. Biyotransformasyon metabolizmasının evreleri

Biyotransformasyon metabolizması başlıca iki evrede gerçekleşir, birinci evrenin ana tepkimesi sitokrom P450 olarak da bilinen bir grup monooksijenaz tarafından kataliz edilen hidroksillenmedir. İkinci evrede hidroksillenmiş türler glukuronik asit, sülfat veya glutatyon gibi bir grup hidrofil bileşiklerle konjuge edilir. Bu

iki evre sonunda lipofil maddeler vücuttan atılabilecek suda çözünür bileşikler haline çevrilir (Vural, 2004).

2.1.4. Karaciğer hasarının değerlendirilmesi

Karaciğer fonksiyonlarını değerlendirmek için değişik yöntemler kullanılsa da, bugün için bunların en çok kabul gören ve en sık kullanılan AST (aspartat amino transferaz), ALT (alanin amino transferaz) ve LDH enzim aktivitesi (laktat dehidrogenaz) tayinidir (Günşar, 2003). ALT hepatositlerde sitoplazmada, çok azda mitokondride bulunur. Bu nedenle hepatositlerde oluşan herhangi bir hasara bağlı olarak serum ALT aktivitesi artar, aynı zamanda miyositer yaralanma sonucunda da artabilir. ALT aktivitesindeki artışa benzer şekilde, serum AST aktivitesi de hepatosit hasarı, kolestaz ve miyosit yaralanmalarına bağlı olarak geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz olarak artış gösterir. Her iki enzim karaciğerde yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu için, herhangi bir nedenle meydana gelen karaciğer hasarı genellikle serum ALT ve AST enzim aktivitelerindeki değişiklikler ile ilişkilidir (Nakagawa ve ark., 1984; Powell ve Connolly., 1991; Panicker ve ark., 2014). LDH vücutta, karaciğerinde içine alan bir çok dokuda bulunan sitoplazmik bir enzimdir. Hepatosellüler hasarda LDH artışı, ALT artışı ile birlikte (Navarro-Gonzalves ve ark., 1998; Bongers ve ark., 2003; Okar, 2011).

2.1.5. Karaciğer hasarındaki histopatolojik bulgular

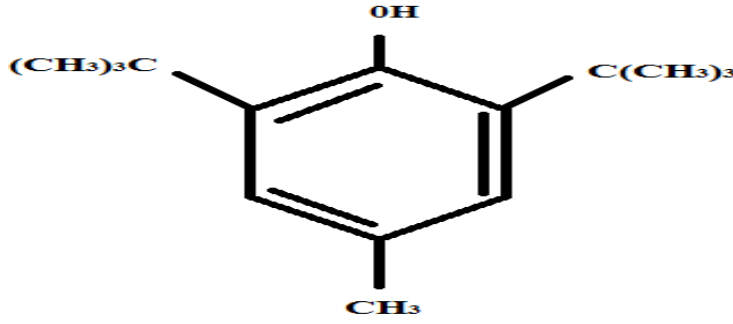
Karaciğer hasarlarının histolojik bulguları zehirlenme şiddetine, toksik maddenin türüne ve bu maddeye maruz kalma şekline bağlıdır. İlaçlar ve diğer kimyasal maddelerle meydana gelen karaciğer hasarları morfolojik geniş bir etki alanını kapsar ve karaciğer hastalıklarının hemen hemen tüm histolojik örnekleri gözlenebilir. Bu durumlar kolestaz, steatoz, hepatitler, dejenerasyon, nekroz, fibrozis, siroz, vasküler bozukluklar ve neoplazidir (Chisari ve Ferrari, 1995; Sturgill ve Lambert, 1997; Li ve Friedman 1999; Robbins ve ark., 2000; Tümçör ve ark., 2005; Kutlu, 2006; Üstüner, 2006; Fu ve ark., 2008; Domitrovic ve ark., 2009).

2.2. Butillenmiş Hidroksi Toluen (BHT)

Kimyasal olarak 2,6-di-tert-bütıl-p-cresol (DBPC) olarak adlandırılan BHT gıda antioksidanı olarak kullanılmaktadır. Bu antioksidan madde, fenolik yapısından dolayı fenolik hidroksit guruplarından hidrojen verip, başlangıçtaki serbest yağ asidi radikal oluşumunu engeller (Lanigan ve Yamarik, 2002).

BHT 1954 yılında gliserinler üzerinde etkili ve koruyucu bir antioksidan olduğunun belirlenmesi sonucunda, gıda olarak tüketilen yağlarda ve diğer bazı gıdalarda kullanılmaya başlanmıştır (Panicker ve ark., 2014).

BHT; yağlarda iyi çözünebilen, ancak suda çözünemeyen beyaz renkli ve kristal yapıda bir madde olup, 760 mmHg basınçta kaynama noktası 265 °C'dir (Yanishlieva ve Gordonnb, 2001).



Şekil 2. Butillenmiş hidroksi toluen (BHT)'nin kimyasal yapısı (Uğuzlar, 2009).

2.2.1. Butillenmiş hidroksi toluen (BHT)'nin kullanım alanları

BHT; katı ve sıvı yağ içeren gıdalarda ransiditeyi yavaşlatmakta; çeşitli tahıl ürünleri, sakız, patates cipsi gibi bitkisel kaynaklı yağlarda kullanılır ve bu ürünlerin havaya maruz kalmalarından kaynaklanabilecek renk, aroma veya tekstür değişimlerini önlemektedir. BHT ayrıca vitamin ve mineral katkı preparatlarında dolgu maddesi olarakta kullanılmaktadır (Çakmakçı ve Gökalp, 1992).

Birleşik Gıda Kodeksi/Gıda Katkı Maddeleri Exsperler Komitesi'nin (FAO/WHO) görüşüne göre, günlük alınabilir miktarı, vücut ağırlığı üzerinden 0.5 mg/kg olup, bu değer insan sağlığı açısından herhangi bir zarar yaratmamaktadır (Panicker ve ark., 2014).

BHT'nin yiyeceklerde, ilaçlarda ve kozmetik ürünlerinde zarar vermeyecek konsantrasyonlarda kullanıldığı ve toksik etkisinin sadece yüksek doz alımı ve uzun süreli alımı sonucunda meydana gelebileceği belirtilmiştir (Lanigan ve Yamarik, 2002).

2.3. Antioksidanlar

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu kontrol altında tutan, bunların oluşturabilecekleri hasarı önleyen ve radikallerin temizlenmesini arttıran maddelere “antioksidan savunma sistemleri” veya kısaca “antioksidanlar” denilmektedir. Bunlar, peroksidasyon zincir reaksiyonlarını engelleyerek ya da reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyon (LPO)’u inhibe etmektedirler. Gelişmiş yapıli hücrelerde pek çok antioksidan sistem bulunmaktadır (Stocker ve ark., 1987; Scandalios, 2002; Jensen, 2003).

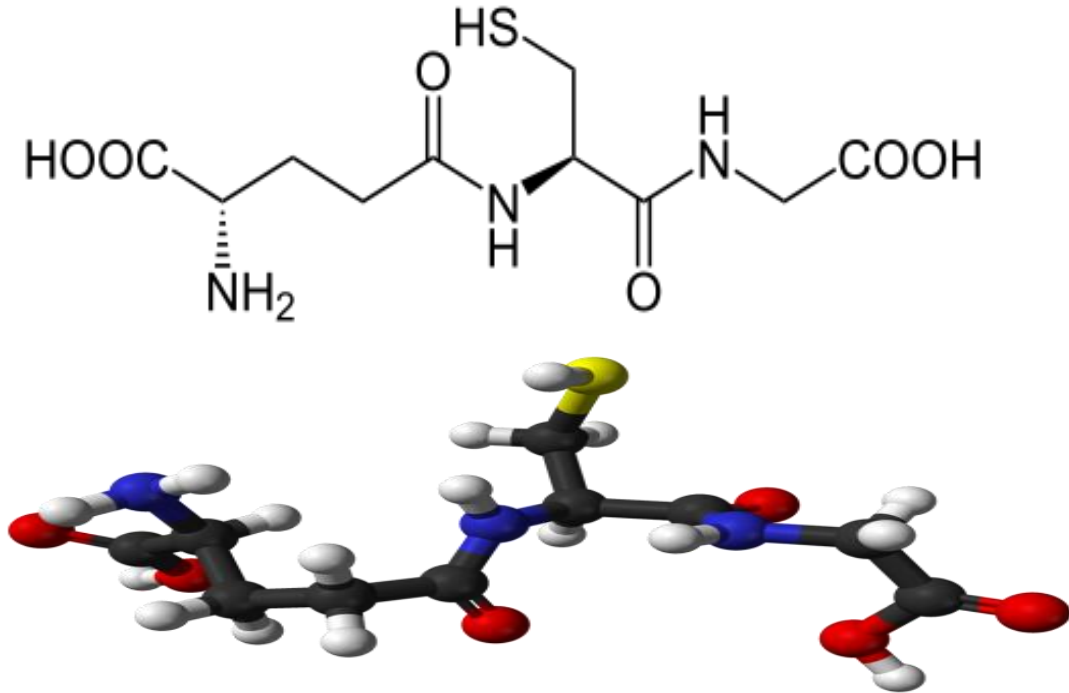
2.3.1 Antioksidanların sınıflandırılması

Tablo 1. Antioksidanların sınıflandırılması (Scandalios, 2002).

Enzimatik Olan Antioksidanlar	Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	
Glutasyon peroksidaz (GPx)	Glutasyon (GSH)	Melatonin
Glutasyon-S-transferaz (GST)	Flavonoidler	Seruloplazmin
Glutasyon redüktaz (GSSG-R)	Askorbat (Vit. C)	Transferin
Süperoksit dismutaz (SOD)	β -Karoten (Vit. A)	Ferritin
Peroksidaz (PLGPx)	α -Tokoferol (Vit. E)	Laktoferrin
Katalaz (CAT)	Ürat	Albumin
Fosfalipit hidroperoksit glutasyon	Biluribin	Lipoik asid

2.4. Glutasyon (GSH)

Glutasyon (L- γ -glutamil-L-sisteinil-glisin) ökaryotik hücrelerde en bol bulunan, düşük moleküler ağırlıklı bir tripeptiddir ve bir tiyol grubu taşımaktadır. Redükleyici ajan ve antioksidan olarak rol oynayan GSH'nın, farklı hücrel moleküllerin ve ksenobiyotiklerin metabolizmasında ve ROS'un temizlenmesinde önemli işlevleri vardır. Bunların yanında hücre döngüsünün düzenlenmesi ve mikrotübüler mekanizmalarda rol oynar; sisteinin fizyolojik depo formu olarak iş görür; Ca^{+2} homeostasisinin, tiyol-disülfid değişim tepkimeleri ile gen ekspresyonunun ve protein işlevlerinin düzenlenmesinde çalışır, mitokondriyal mekanizmalarda yer alır (Estrela ve ark., 2006).

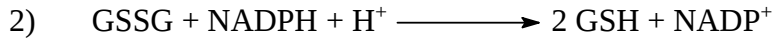
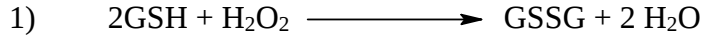


Şekil 3. Glutasyonun moleküler yapısı (Estrela ve ark., 2006)

Sistein rezidüsü nedeniyle GSH, ROS ve reaktif nitrojen türleri gibi elektrofilik maddeler tarafından non-enzimatik olarak okside glutasyon (GSSG)'a dönüştürülmektedir. Hücrelerden GSSG'nin hücre dışına salınması, hücre içinde net bir GSH kaybına neden olmaktadır. Hücredeki total GSH'ın yaklaşık %15'i proteinlere bağlı olarak bulunmaktadır ve hücrel GSH derişimi ksenobiyotik

detoksifikasyonunda, protein yetersizliğinde, oksidatif strese ve birçok patolojik durumda azalabilmektedir (Wu ve ark., 2004).

Reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonu sırasında iki tip tepkime meydana gelmektedir (Camera ve Picardo, 2002).



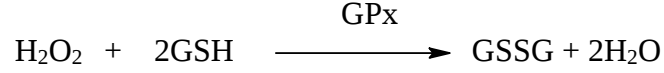
2.4.1. Biyotransformasyon metabolizmasında GSH'nın rolü

Glutasyon oksidatif streste rolünün yanında pestisidler ve diğer ksenobiyotiklerin metabolizmasında da önemli görevler yapmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 1999).

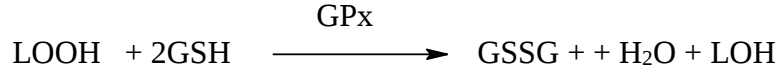
Doğal ve antropojenik kimyasalların büyük kısmı biyolojik olarak aktiftir ve canlılarda fizyolojik süreçlerde değişimlere neden olurlar. Bunların bir kısmı lipid membranlardan geçme yeteneğinde olan lipofilik bileşiklerdir ve canlılar bu bileşiklerin vücuttan daha kolay atılmasını sağlamak üzere, bunları elektrofilik metabolitlerine dönüştürmektedirler. Lipofilik kimyasalların polar metabolitlerine dönüştürülmesi iki metabolik fazda gerçekleşmektedir. Faz I tepkimelerinde moleküle bir oksijen transfer edilerek veya indirgenme ile -OH ve -COOH gibi işlevsel gruplar oluşturulmaktadır. Ana bileşikten daha hidrofilik olan bu metabolitler, faz II tepkimelerinde glukuronik asit, sülfat ve GSH gibi endojen substratlarla konjuge edilerek vücuttan atılımları kolaylaştırılmaktadır. Hücrelerin ksenobiyotik etkisinden korunmasında en önemli metabolik süreçlerden biri GSH konjugasyonudur. GSH içerdiği nükleofilik tiyol grubu ile elektrofilik bileşiklerin ve metabolitlerin detoksifikasyonunu sağlamaktadır. GSH'nın elektrofilik bileşiklerle tepkimesi kimyasal olarak gerçekleşebileceği gibi, GST tarafından da katalizlenmektedir ((Murray ve ark., 199 ; Paulson ve ark., 1986; Ioannides, 2002).

2.5. Glutasyon Peroksidaz (GPx: EC.1.11.1.9)

Glutasyon peroksidaz GSH'nın oksidasyonu yoluyla, H₂O₂ 'nin H₂O'ya indirgenmesini katalizleyen enzimdir.

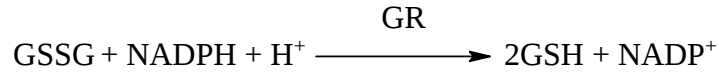


Enzim, hayvan dokularında yaygın olarak bulunmaktadır ve hidrojen donörü olarak GSH'ya spesifiktir. Bununla birlikte, H₂O₂'den başka diğer peroksitlere de etki etmektedir. Böylece, linolenik ve linoleik asit peroksidasyon ürünleri gibi yağ asidi hidroperoksitlerinin, düşük oranlarda kolesterol 7β-hidroperoksit ve bunun yanında in vitro çalışmalarda enzim aktivitesini ölçmek üzere sıklıkla kullanılan t-butil ve kümen hidroperoksitler gibi sentetik hidroperoksitlerin de, GSH-bağımlı indirgenmelerini katalizlemektedir. Her durumda peroksit grubu bir alkole indirgenmektedir (Basaga, 1990; Memişoğulları, 2005; Bayşu Sözbilir ve Bayşu, 2008).



2.6. Glutasyon Redüktaz (GR: EC.1.6.4.2)

Hücrelerde GSH/GSSG oranı yüksektir ve bu nedenle kimyasal olarak veya GPx tepkimeleriyle açığa çıkan GSSG'nin yeniden GSH'ya indirgenmesi için bir mekanizmanın bulunması koşulu vardır. Bu durum GR enzimi tarafından başarılmaktadır. GR, NADPH-bağımlı olarak GSSG'nin GSH'ye indirgenmesini katalizlemektedir (Griffith, 1999).

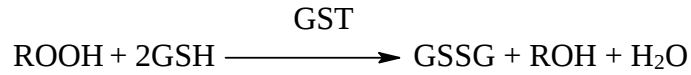


Bu tepkimede gereksinim duyulan NADPH için en önemli kaynak pentoz fosfat geçididir ve GR'nin NADPH'ı kullanarak NADPH/NADP⁺ oranını azaltması nedeniyle

pentoz fosfat döngüsünün hızla bu oranı koruması gerekmektedir (Halliwell ve Gutteridge, 2000). Oksidatif stres koşullarında glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (G-6-PD) enziminin inhibisyonu gibi, NADPH miktarını sınırlayan herhangi bir faktör hücre içerisinde GSSG birikimine neden olmaktadır. Bu olay nedeniyle sıklıkla gerçekleşen, GSSG'nin hücre dışına atılarak, hücrel GSH'nın kaybedilmesidir (Estrela ve ark., 2006). GSSG'nin bütün halinde hücre içerisine alınamaması nedeniyle ekstraselüler yıkımı gereklidir, oksidatif stres sırasında hücre dışına atılan GSSG, bu şekilde GSH'nın de novo sentezi için hücrenin gereksinimlerini arttırmaktadır (Griffith, 1999).

2.7. Glutatyon-S-Transferaz (GST: EC 2.5.1.8)

Glutatyon S-transferaz enzim ailesi çok sayıda, farklı bileşiklerin GSH ile konjugasyonunu sağlamaktadır. Bunun nedeni non-spesifik hidrofobik substrat bağlanma bölgesinin varlığı ve çok sayıda izoenzimin bulunmasıdır. Böylece GST karsinojenik bileşikler, çevresel kirleticileri, ilaçları ve diğer birçok bileşiği substrat olarak kullanmaktadır. GST, her biri, elektrofilik substrat için ve GSH için birer bağlanma bölgesi taşıyan iki protein alt birimine sahiptir (Cnubben ve ark., 2001).



Glutatyon S-transferaz karaciğerde biyotransformasyon metabolizmasının faz II evresinde ksenobiyotik metabolizmasında çok önemli bir rol oynamaktadır. Genelde GST'nin etkisi, sitokrom P450'nin katalizlediği tepkimeleri takip etmektedir. Bu enzimlerin ürünü olan elektrofilik merkezli metabolitler nükleofilik GSH ile konjugat oluşturmak üzere GST'nin katalizlediği tepkimelere girmektedirler. Bu tepkimeler sonunda GSH ile moleküler olarak işaretlenen bu ksenobiyotik konjugatları, hücreden uzaklaştırılmak üzere çoklu-ilaç direnç proteini gibi ilaç taşıyıcı proteinler aracılığıyla faz III metabolizmasına girerler. Hücre dışına atıldıktan sonra GSH-konjugatının γ -glutamil ve glisin rezidüleri, γ -GT etkisi ve aminopeptidaz M veya sisteinilglisin dipeptidaz yardımıyla uzaklaştırılır. Açığa çıkan sisteinil konjugatı, N-asetilasyon tepkimeleri sonunda ksenobiyotiğin idrardan atılma formu olan bir merkaptürik aside dönüştürülür (Sherratt ve Hayes, 2002).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Hayvan materyali

Araştırmada, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesinden temin edilen 2-3 aylık, yaklaşık 200-250 g ağırlığında 47 adet dişi Wistar albino rat kullanıldı. Çalışma Hayvan Deneyleri Etik Kurulunun 31.03. 2014 tarih ve 200 sayılı onayı doğrultusunda gerçekleştirildi (Ek 1).

Ratlar 28 günlük deneme süresince 12 saat karanlık/aydınlatma uygulanmış, sıcaklığı $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ olarak ayarlanmış odalardaki kafeslerde barındırıldı. Hayvanlara ticari rat yemi (pellet yem) ve içme suyu *ad libitum* verildi.

3.1.2. Deneme gruplarının hazırlanması

Çalışmada kullanılan ratlar kontrol ve dört deneme olmak üzere 5 gruba ayrıldı.

Kontrol Grubu (n=7): Çalışma süresi boyunca mısır özü yağı her gün ağızdan gavaj ile verildi.

I. Grup (n=10): 250 mg/kg BHT mısır özü yağında çözündürülerek, 4 haftalık çalışma süresi boyunca her gün ağızdan gavaj ile verildi.

II. Grup (n=10): 500 mg/kg BHT mısır özü yağında çözündürülerek, 4 haftalık çalışma süresi boyunca her gün ağızdan gavaj ile verildi.

III. Grup (n=10): 4 haftalık çalışma süresi boyunca mısır özü yağı verilen ratlara, çalışmanın son dört gününde 1000 mg/kg BHT mısır özü yağında çözündürülerek ağızdan gavaj ile verildi.

IV. Grup (n=10): 4 haftalık çalışma süresi boyunca mısır özü yağı verilen ratlara, çalışmanın son dört gününde 1500 mg/kg BHT mısır özü yağında çözündürülerek ağızdan gavaj ile verildi.

3.1.3. Analizlerde kullanılan cihaz ve malzemeler

Otoanalizör (Roche, 800).
Su banyosu (Nüve, BM 402)
Dijital pH metre (Inolab)
Jelli vakumlu tüp
Hassas terazi (Gee Avery)
Soğutmalı santrüfuj (Universal 320R)
Isıtıcı tabla (Nüve, HP 221)
Değişik hacimlerde otomatik pipet
ELISA cihazı (Zenyth, 200 rt)
Homojenizatör (IKA yellow line)

3.1.4. Analizlerde kullanılan kimyasal maddeler

Butillenmiş hidroksi toluen (Merck, China)
GSH kiti (Cayman, kat no:703002, USA)
GR kiti (Cayman, kat no:703202, USA)
GP_x kiti (Cayman, kat no:703102, USA)
GST kiti (Cayman, kat no:703302, USA)
Dinitro ditiodibenzoik asit (Merc, kat no: L 381991)
Asetik asit (Merck, kat no:1.00056.2500)
N-hekzan (Merck. 4368)
Absolut etanol (Merck. 0986)
Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA, Merck)
RIPA tamponu (CST, 9806)

3.2. Yöntem

3.2.1. Kan örneklerinin alınması ve analizi

Deneme süresinin sonunda ratlar 75 mg/kg ketamin (i.p) uygulamasından sonra dorso-ventral pozisyonda masa üzerine yatırıldı. Kalp doğrudan kanüle edilerek, kan örnekleri antikoagülanlı vakumlu tüplere alındı. Bu örnekler 3000 devirde +4°C’de 5 dakika santrifüj edildikten sonra serumları çıkarıldı. Çıkarılan bu serumlarda alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), laktat dehidrogenaz (LDH) enzim aktiviteleri otoanalizörde (Cobas Integra, 800) ticari kit (Roche/Hitachi) kullanılarak Van Bölge Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarında ölçüldü.

3.2.2. Karaciğer doku örneklerinin alınması ve analizi

Kan örneklerinin alınmasını takiben ratlar anestezi altında sakrifiye edilerek karaciğer dokuları çıkarılıp analiz yapıncaya kadar derin dondurucuda (-20 °C) saklandı. 0,3 gram karaciğer dokusu üzerine 3 ml soğuk fosfat tamponu (pH 7.4) ilave edilerek homojenize edildi. Homojenat 10000 rpm’de +4°C’de 15 dakika santrifüj edildi. Karaciğer doku örneklerinden elde edilen süpernatantlarda GSH düzeyi ve GPx, GR, GST enzim aktiviteleri ticari kit (Cayman Chemical Company, 2014) kullanılarak ELISA cihazında (Zenyth, 200 rt) Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya AD Laboratuvarında ölçüldü.

GSH düzeyi ölçümü:

1. Standart kuyucuklarına 50 µl standart eklendi.
2. Örnek kuyucuklarına 50 µl süpernatant konuldu.
3. Hazırlanan kokteylden 150 µl tüm kuyucuklara eklendi.
4. 412 nm’de absorbans okundu.

Hesaplama:

$$\text{GSH } (\mu\text{M}) = \frac{(\text{405-414 Absorbans}) - (\text{Y-kesişim})}{\text{Eğim}} \times 2 \times \text{sulandırma faktörü}$$

GPx enzim aktivite ölçümü:

1. Non-enzimatik kuyucuklar: 120 µl tampon ve 50 µl co-substrat üç kuyucuğa eklendi
2. Pozitif kontrol kuyucuklar: 100 µl tampon, 50 µl co-substrat ve 20 µl sulandırılmış GPx (kontrol) üç kuyucuğa eklendi.
3. Örnek kuyucuklar: 100 µl tampon, 50 µl co-substrat ve 20 µl süpernatant kuyucuğa eklendi.
4. Tüm kuyucuklara 20 µl kumen hidroperoksit hızlı bir şekilde eklendi.
5. 340 nm'de absorbans okundu.

Hesaplama:

$$\Delta A_{340}/\text{min.} = \frac{A_{340}(\text{zaman 2}) - A_{340}(\text{zaman 1})}{\text{zaman 2}(\text{min}) - \text{zaman 1}(\text{min})}$$

$$\text{GPx (nmol/min/ml)} = \frac{\Delta A_{340}/\text{min}}{0,00373 \text{ m}^{-1}} \times \frac{0,19 \text{ ml}}{0,02 \text{ ml}} \times \text{sulandırma faktörü}$$

GST enzim aktivite ölçümü:

1. Non-enzimatik kuyucuklar: 170 µl tampon ve 20 µl glutatyon üç kuyucuğa eklendi.
2. Pozitif kontrol kuyucuklar: 150 µl tampon, 20 µl glutatyon ve 20 µl sulandırılmış GST (kontrol) üç kuyucuğa eklendi.

3. Örnek kuyucuklar: 150 µl tampon, 20 µl glutatyon ve 20 µl süpernatant üç kuyucuğa eklendi.
4. Tüm kuyucuklara 10 µl 1-kloro 2,4 dinitro benzen solüsyonu hızlı bir şekilde eklendi.
5. 340 nm’de absorbans okundu.

Hesaplama:

$$\Delta A_{340}/\text{min.} = \frac{A_{340}(\text{zaman 2}) - A_{340}(\text{zaman 1})}{\text{zaman 2}(\text{min}) - \text{zaman 1}(\text{min})}$$

$$\text{GST (nmol/min/ml)} = \frac{\Delta A_{340}/\text{min}}{0,00373 \text{ m}^{-1}} \times \frac{0,19 \text{ ml}}{0,02 \text{ ml}} \times \text{sulandırma faktörü}$$

GR enzim aktivite ölçümü:

1. Non-enzimatik kuyucuklar: 120 µl tampon ve 20 µl GSSG üç kuyucuğa eklendi.
2. Pozitif kontrol kuyucuklar: 100 µl tampon, 20 µl GSSG ve 20 µl sulandırılmış GR (kontrol) üç kuyucuğa eklendi.
3. Örnek kuyucuklar: 100 µl tampon, 20 µl GSSG ve 20 µl süpernatant üç kuyucuğa eklendi.
4. Tüm kuyucuklara 50 µl NADPH’i hızlı bir şekilde eklendi.
5. 340 nm’de absorbans okundu.

Hesaplama:

$$\Delta A_{340}/\text{min.} = \frac{A_{340}(\text{zaman 2}) - A_{340}(\text{zaman 1})}{\text{zaman 2}(\text{min}) - \text{zaman 1}(\text{min})}$$

$$\text{GR (nmol/min/ml)} = \frac{\Delta A_{340}/\text{min}}{0,00373 \text{ m}^{-1}} \times \frac{0,19 \text{ ml}}{0,02 \text{ ml}} \times \text{sulandırma faktörü}$$

3.2.3. Karaciğer doku örneklerinin histopatolojik analizi

Histopatolojik değerlendirme amacıyla alınan karaciğer doku örnekleri %10'luk formalin solüsyonunda 48 saat tespit edildi, daha sonra çeşme suyunda 8 saat yıkandı. Rutin doku takibinde alkol (70°, 80°, 90°, 96 °ve 100°) ve ksilol serilerinden geçtikten sonra parafinde bloklanarak her bloktan 4 µm kalınlığında kesitler alınıp lam üzerinde preparatlar hazırlandı. Histopatolojik inceleme için hazırlanan preparatlar Hematoksilen-Eozin (HE) ile boyandı ve ışık mikroskobu ile incelenerek gerekli alanlar resimlendi (Luna, 1968; Taylor ve Cote, 1994).

Karaciğer dokularının histopatolojik değerlendirmesi Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Patoloji AD Laboratuvarında yapıldı.

3.3. İstatistik Analiz

Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile analiz edildi. Normal dağılım gösteren değişkenler için grupları karşılaştırmada tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) yapıldı. Analizlerde $p < 0,05$ anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi. Tüm analizler SPSS (20.0) paket programı kullanılarak yapıldı.

4. BULGULAR

Çalışmanın sonunda, kontrol ve deneme gruplarına ait serum ALT, AST ve LDH enzim aktiviteleri Tablo 2’de, karaciğer dokusu GSH düzeyi ve GPx, GST, GR enzim aktiviteleri Tablo 3’te verildi.

Çalışma sonunda, tüm gruplara ait karaciğer dokusu makroskopik bulgular Şekil 11-14 ve histopatolojik bulgular Şekil 15-19’ da verildi.

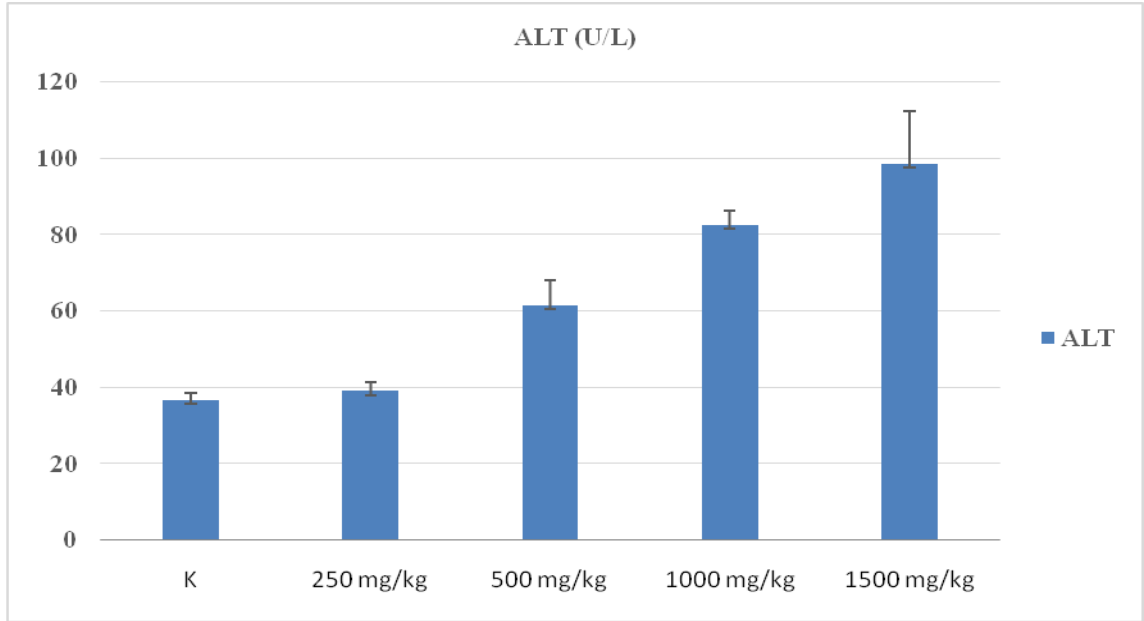
4.1. Seruma ait biyokimyasal bulgular

Tablo 2. Kontrol ve deneme gruplarına ait serum ALT, AST ve LDH enzim aktiviteleri

Grup lar	K	I. Grup	II. Grup	III. Grup	IV. Grup
	X ± S _x	X ± S _x	X ± S _x	X ± S _x	X ± S _x
ALT (U/L)	36.62 ± 2.10 ^a	39.12 ± 2.14 ^a	61.47 ± 6.70 ^{ab}	82.62 ± 3.77 ^{bc}	98.51 ± 13.84 ^c
AST (U/L)	126.18±13.79 ^a	160.55± 12.24 ^{ab}	176.95± 19.49 ^{ab}	218.20 ± 11.80 ^{ab}	306.24 ± 90.74 ^b
LDH (U/L)	1041.57±150.48 ^a	1156.57±185.79 ^{ab}	1212.28±107.87 ^{ab}	1221.00± 220.09 ^{ab}	2280.85 ± 543.78 ^b

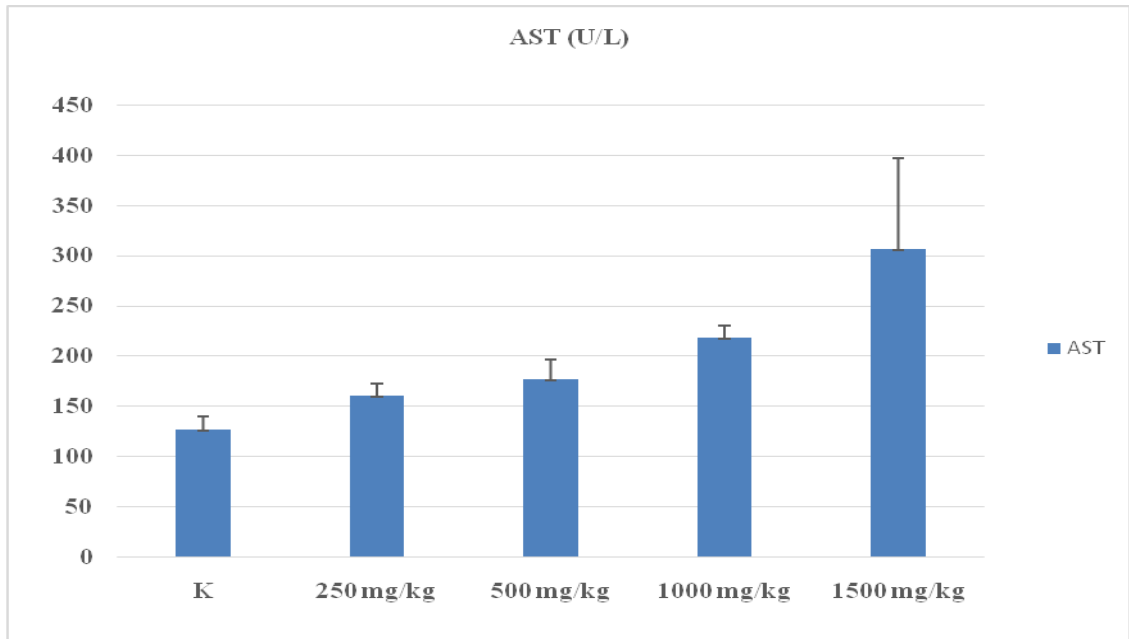
a, b, c: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arasındaki fark istatistik olarak önemlidir. *: p<0.05, **: p<0.001

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, BHT’nin farklı dozlarının uygulandığı deneme grupların hepsinde ALT enzim aktivitesinin yükseldiği, bu yükselişin III. ve IV. Grupta istatistik olarak önemli olduğu (sırasıyla, p<0.05, p<0.001), diğer gruplarda önemli olmadığı tespit edildi (p>0,05). Deneme grupları kendi arasında karşılaştırıldığında ALT enzim aktivitesi açısından IV. Grup ile I. ve II. Gruplar arasında, ve III. Grup ile I. Gruplar arasında istatistik olarak fark olduğu belirlendi (p<0.001).



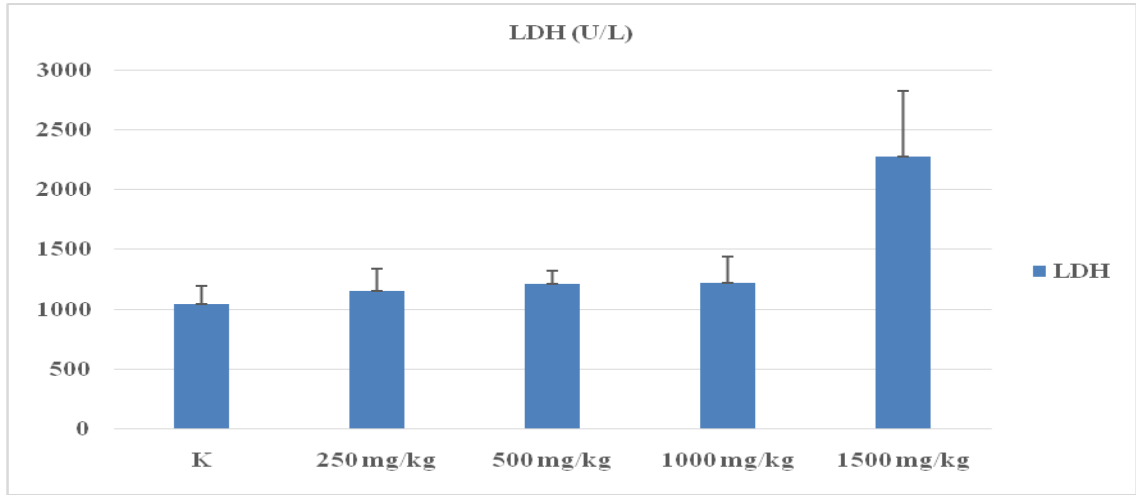
Şekil 4. Kontrol ve deneme gruplarına ait serum ALT enzim aktivitesi

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, BHT'nin farklı dozlarının uygulandığı deneme gruplarının hepsinde AST enzim aktivitesinin yükseldiği, bu yükselmenin sadece IV. Grupta istatistik olarak önem gösterdiği tespit edildi ($p < 0.05$). Deneme grupları kendi arasında karşılaştırıldığında, AST enzim aktivitesi açısından fark olmadığı belirlendi ($p > 0.05$).



Şekil 5. Kontrol ve deneme gruplarına ait serum AST enzim aktivitesi

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, BHT'nin farklı dozlarının uygulandığı deneme gruplarının hepsinde LDH enzim aktivitesinin yükseldiği, bu yükselmenin sadece IV. Grupta istatistik olarak önem gösterdiği tespit edildi ($p<0.05$). Deneme grupları kendi arasında karşılaştırıldığında, LDH enzim aktivitesi açısından fark olmadığı belirlendi ($p>0.05$).



Şekil 6. Kontrol ve deneme gruplarına ait serum LDH enzim aktivitesi

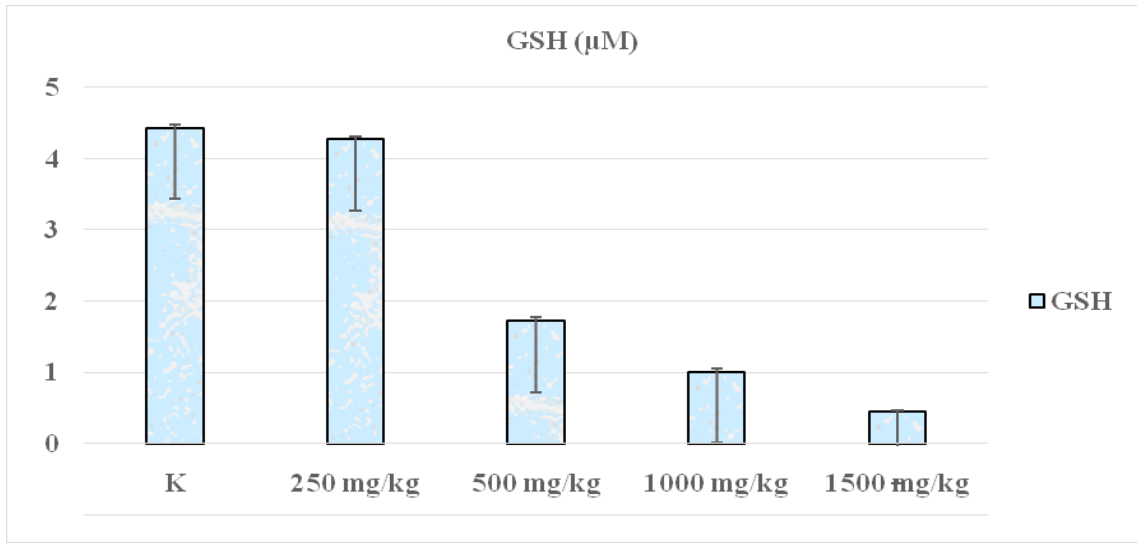
4.2. Karaciğer dokusuna ait biyokimyasal bulgular

Tablo 3. Kontrol ve deneme gruplarına ait karaciğer dokusu GSH seviyesi ve GP_x, GST, GR enzim aktiviteleri

Gruplar	K	I. Grup	II. Grup	III. Grup	IV. Grup
	X ± S _x	X ± S _x	X ± S _x	X ± S _x	X ± S _x
GSH(μM)	4.43 ± 0.04 ^a	4.27 ± 0.03 ^a	1.72 ± 0.06 ^b	1.01 ± 0.05 ^c	0.45 ± 0.01 ^d
GP _x (nmol/min/ml)	210.00±3.40 ^a	202.71 ± 1.86 ^{ab}	193.85 ± 2.14 ^b	159.28 ± 1.12 ^c	81.57 ± 2.47 ^d
GST(nmol/min/ml)	289.85±2.63 ^a	273.71 ± 6.78 ^{ab}	260.85 ± 6.13 ^b	197.57 ± 4.05 ^c	143.00 ± 6.06 ^d
GR (nmol/min/ml)	198.00±1.91 ^a	190.42 ± 2.51 ^a	178.14 ± 1.95 ^b	173.14 ± 1.69 ^b	130.71 ± 1.92 ^c

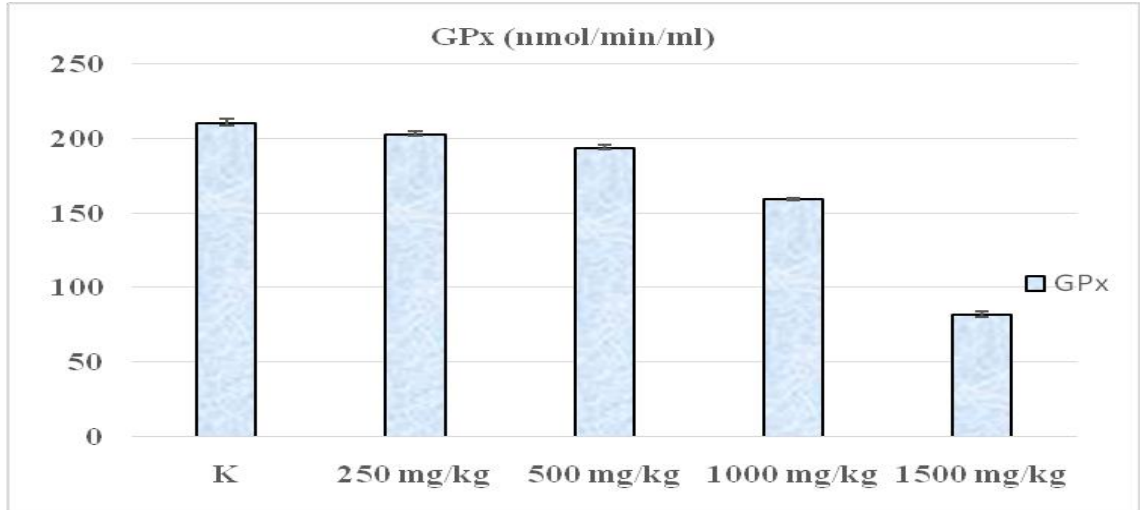
a, b, c, d: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arasındaki fark istatistik olarak önemlidir. ** $p<0.001$

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, BHT'nin farklı dozlarının uygulandığı deneme gruplarında, karaciğer dokusu GSH seviyesinin II., III. ve IV. Gruplarda istatistik olarak önem gösterecek şekilde azaldığı ($p<0.001$), I. Grup ile kontrol grubu arasında istatistik olarak fark olmadığı tespit edildi ($p>0,05$). Deneme grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında BHT'nin verilen dozlarının artmasına paralel olarak GSH seviyesinin azaldığı, bu azalmanın deneme grupları arasında istatistik olarak önem gösterdiği belirlendi ($p<0.001$).



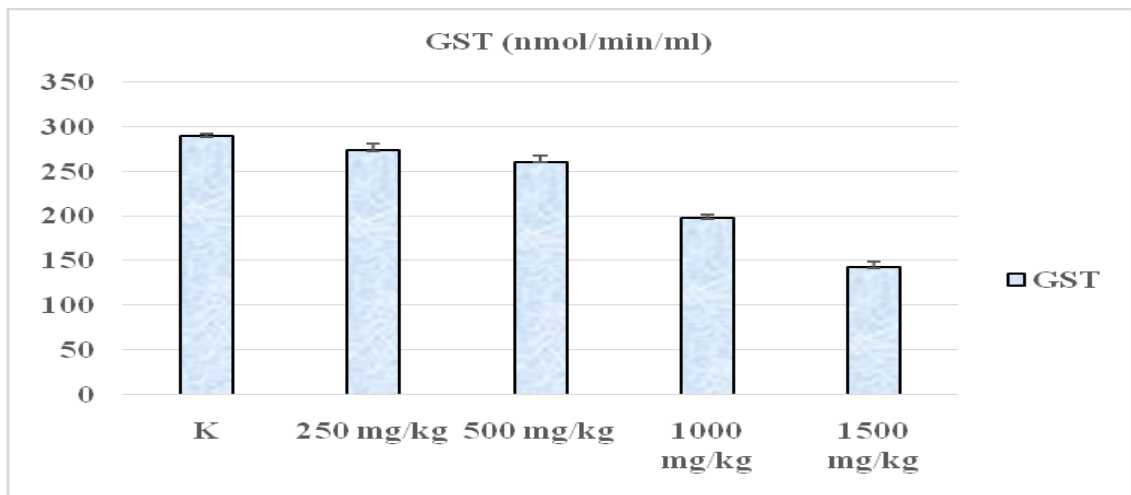
Şekil 7. Kontrol ve deneme gruplarına ait karaciğer dokusu GSH seviyesi

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, BHT'nin farklı dozlarının uygulandığı deneme gruplarında, karaciğer dokusu GP_x enzim aktivitesinin II., III. ve IV. Gruplarda istatistik olarak önem gösterecek şekilde azaldığı ($p<0.001$), I. Grup ile kontrol grubu arasında istatistik olarak fark olmadığı tespit edildi ($p>0,05$). Deneme grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, BHT'nin verilen dozlarının artmasına paralel olarak GP_x enzim aktivitesinin azaldığı bu azalmanın II., III. ve IV. Gruplar arasında istatistik olarak önem gösterdiği belirlendi ($p<0.001$). GP_x enzim aktivitesi açısından I. ve II. Gruplar arasında fark bulunamadı ($p>0,05$).



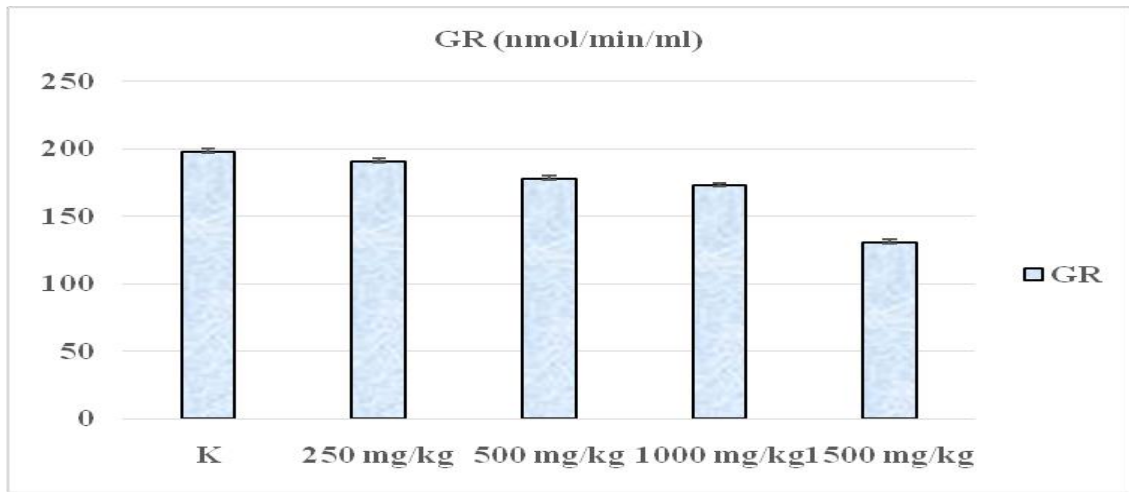
Şekil 8. Kontrol ve deneme gruplarına ait karaciğer dokusu GP_x enzim aktivitesi

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, BHT'nin farklı dozlarının uygulandığı deneme gruplarında, karaciğer dokusu GST enzim aktivitesinin II., III. ve IV. Gruplarda istatistik olarak önem gösterecek şekilde azaldığı ($p < 0.001$), I. Grup ile kontrol grubu arasında istatistik olarak fark olmadığı tespit edildi ($p > 0,05$). Deneme grupları kendi aralarında karşılatırıldığında, BHT'nin verilen dozlarının artmasına paralel olarak GST enzim aktivitesinin azaldığı bu azalmanın II., III. ve IV. Gruplar arasında istatistik olarak önem gösterdiği belirlendi ($p < 0.001$). GST enzim aktivitesi açısından I. ve II. Gruplar arasında fark bulunamadı ($p > 0,05$).



Şekil 9. Kontrol ve deneme gruplarına ait karaciğer dokusu GST enzim aktivitesi

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, BHT'nin farklı dozlarının uygulandığı deneme gruplarında, karaciğer dokusu GR enzim aktivitesinin II., III. ve IV. Gruplarda istatistik olarak önem gösterecek şekilde azaldığı ($p<0.001$), I. Grup ile kontrol grubu arasında istatistik olarak fark olmadığı tespit edildi ($p>0,05$). Deneme grupları kendi aralarında karşılatırıldığında BHT'nin verilen dozlarının artmasına paralelel olarak GP_x enzim aktivitesinin azaldığı, bu azalmanın II. ve III. Gruplar ile IV. ve I. Gruplar arasında istatistik olarak önem gösterdiği ($p<0.001$), II. ve III. Gruplar arasında önemli olmadığı ($p>0,05$), belirlendi.



Şekil 10. Kontrol ve deneme gruplarına ait karaciğer dokusu GR enzim aktivitesi

4.3. Karaciğer dokusuna ait histopatolojik Bulgular

Makroskopik bulgular:

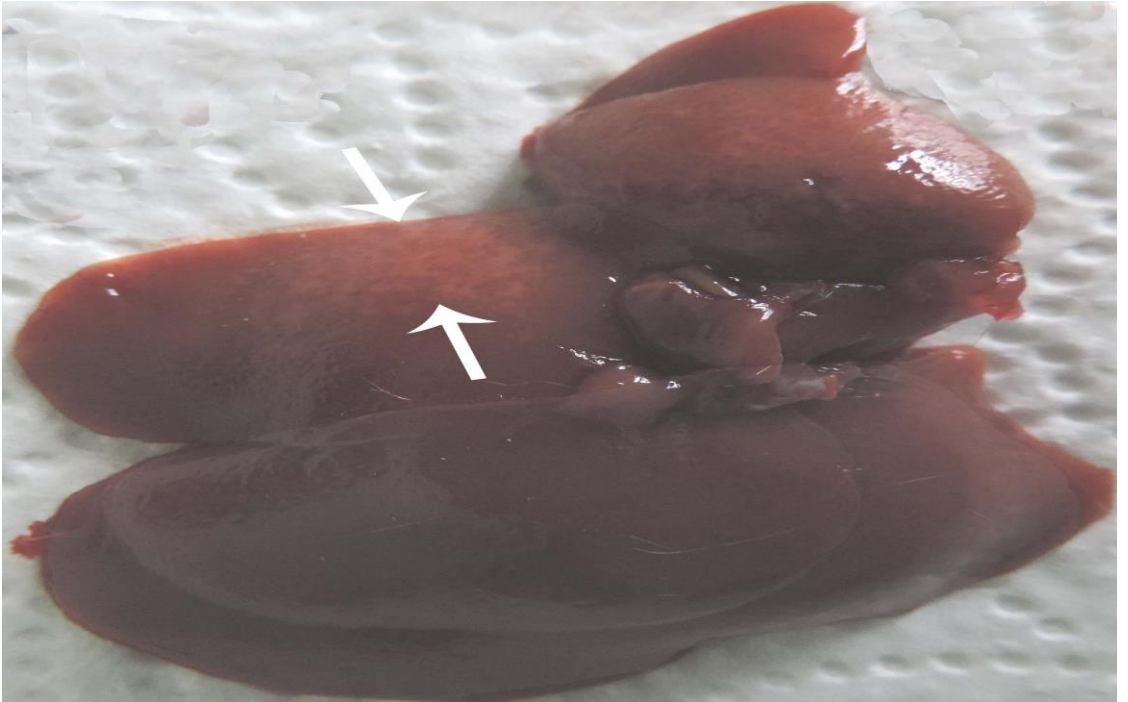
Gruplara ait karaciğer dokusu makroskopik olarak incelendiğinde, kontrol ve I. Grup ratların karaciğerleri, normal renk ve anatomik yapıda olduğu belirlendi (şekil 11 A-B). II. Grup ratların karaciğerlerinin konjesyone koyu kahverengi siyah renkte olduğu tesbit edildi (Şekil 12). III. ve IV. Grup ratların karaciğerlerinde ise yine konjesyone, makroskopik olarak fark edilebilen sarımtırak nekrotik odaklar olduğu bulundu (Şekil 13, 14).



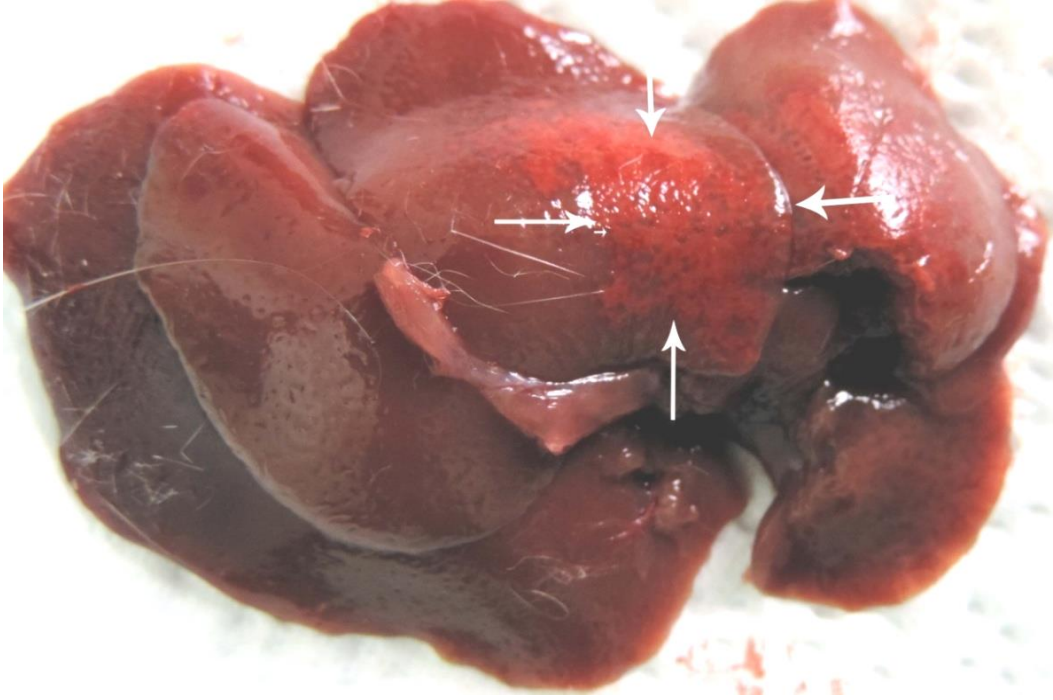
Şekil 11. kontrol (A) ve I.Grup (B) rat karaciğeri makroskopik görünüm: Normal renk ve anatomik yapıda.



Şekil 12. II. Grup rat karaciğeri makroskopik görünüm: Konjesyone koyu kahverengi siyah renkte.



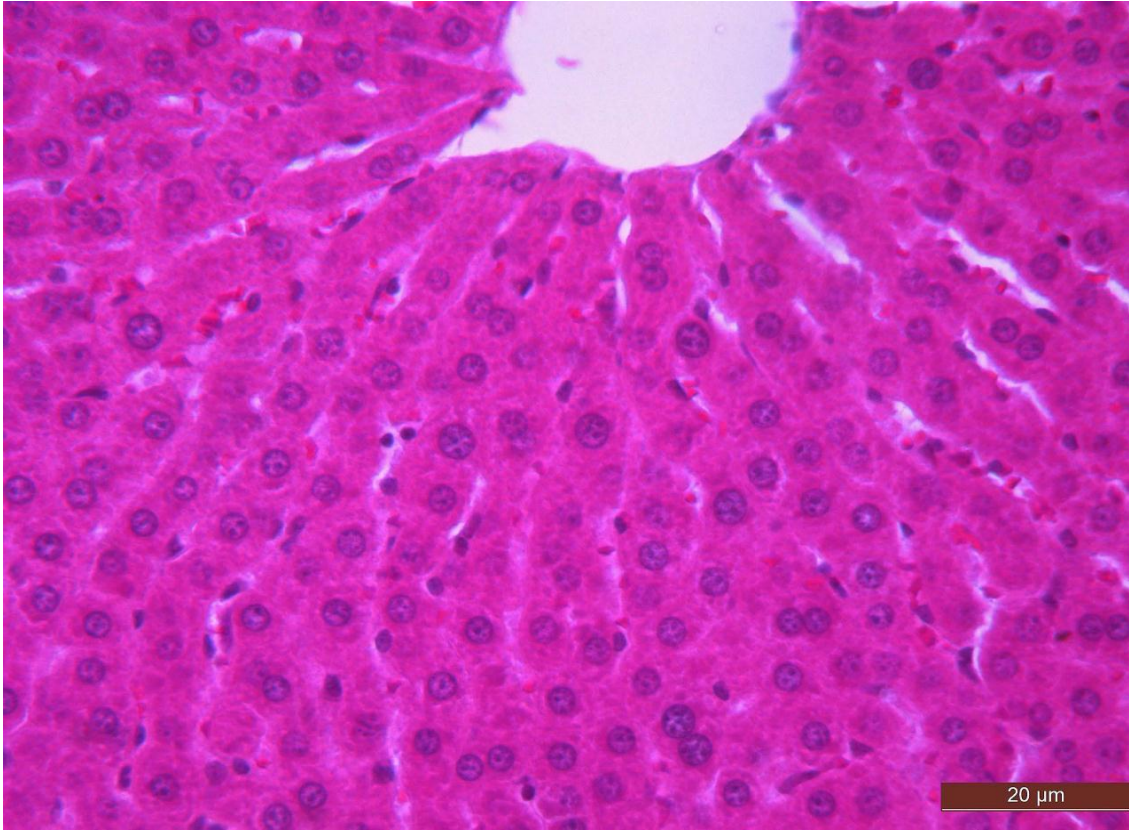
Şekil 13. III. Grup rat karaciğeri makroskopik görünüm: Sarımtırak nekrotik odaklar.



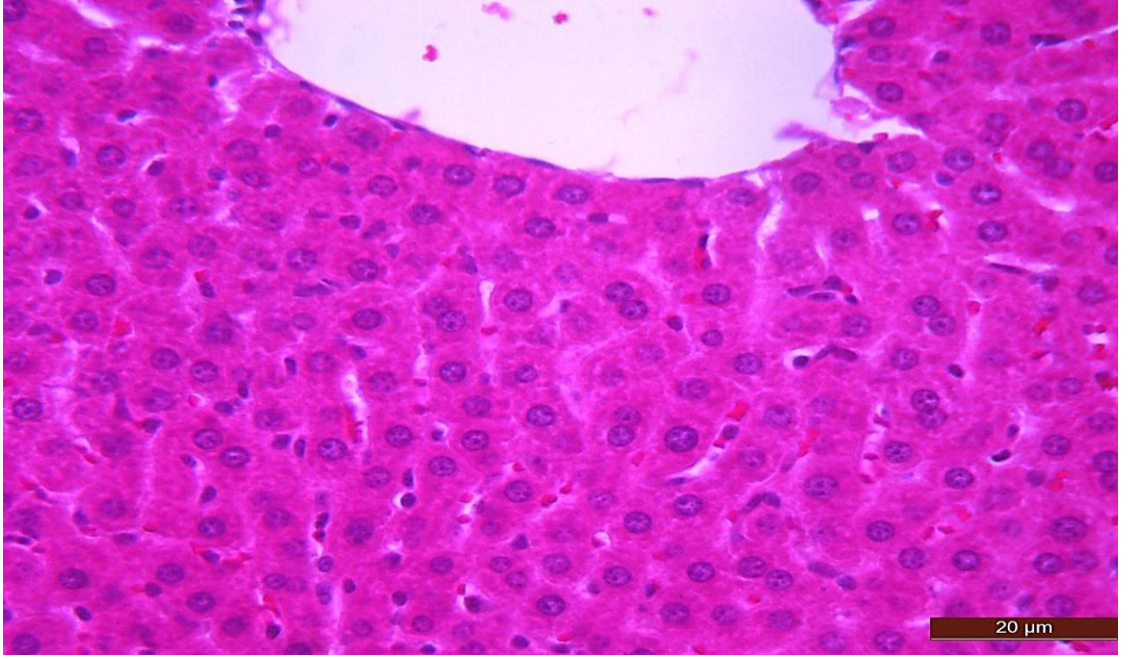
Şekil 14. IV. Grup rat karaciğeri makroskopik görünüm: Sarımtırak nekrotik odaklar.

Mikroskopik bulgular:

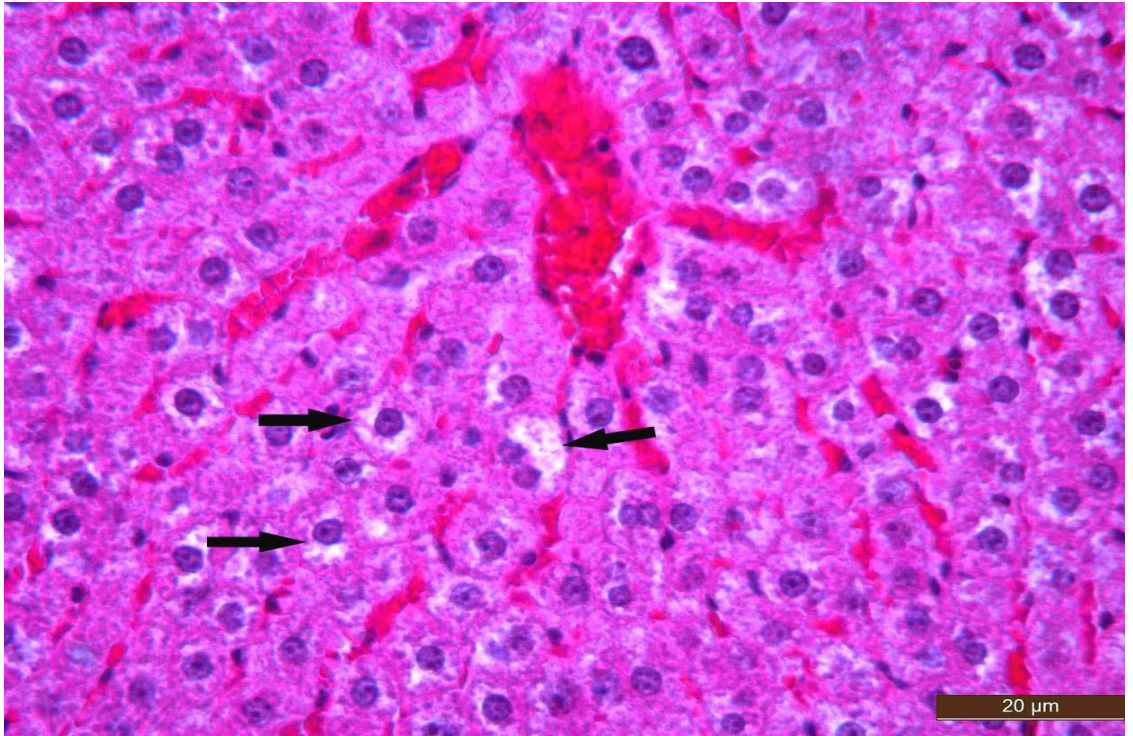
Gruplara ait karaciğer dokusu histopatolojik olarak incelendiğinde, kontrol ve I. Gruba ait ratların karaciğer dokularının normal histopatolojik yapıda olduğu tesbit edilirken (Şekil 15,16), II. Grup rat karaciğer dokularında hepatik konjesyon, sentral bölgedeki hepatositlerde hafif dejenerasyon belirlendi (Şekil 17). III. Gruba ait rat karaciğer dokularında konjesyon, özellikle sentral bölgede bulunan hepatositlerde de dejenerasyon, çok sayıda nekrotik alan, hemorajik odaklar belirlendi (Şekil 18). IV. Grup rat karaciğerinde ise sentral bölgede çok şiddetli nekrotik, hemorajik alanlar görülürken, bu nekrotik odakların etrafında ve portal bölgede lenfoplazmositer hücre infiltrasyonu tesbit edildi (Şekil 19).



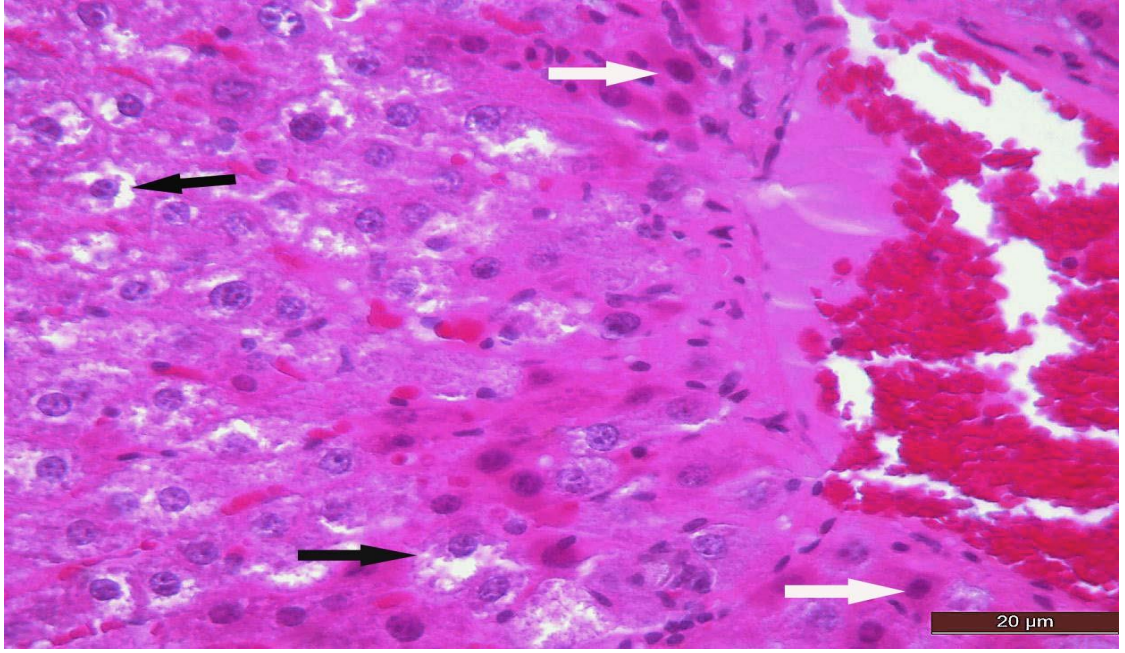
Şekil 15. Kontrol grup rat karaciğer dokusu histopatolojik yapısı (Hx E) Bar=20µm.



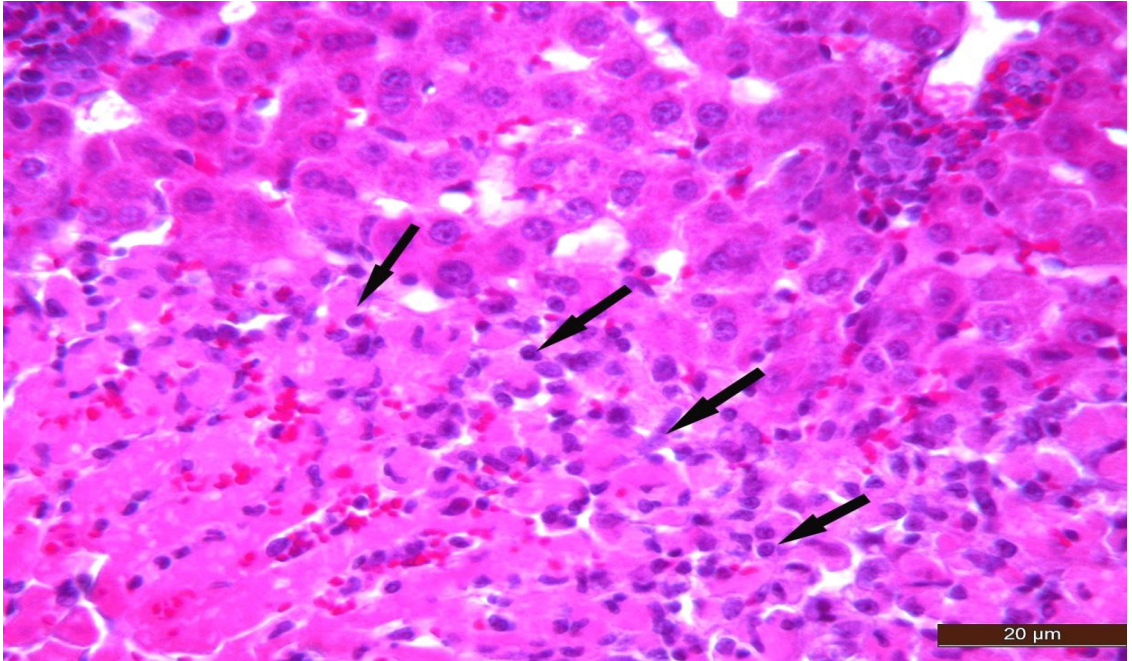
Şekil 16. I. Grup rat karaciğer dokusu histopatolojik yapısı (H&E) Bar=20µm. Karaciğer dokusu normal histopatolojik yapıda.



Şekil 17. II. Grup rat karaciğer dokusu histopatolojik yapısı (H&E) Bar=20µm. Karaciğer dokusunda hepatic konjesyon, hepatositlerde dejenerasyon.



Şekil 18. III. Grup rat karaciğer dokusu histopatolojik yapısı (Hx&E) Bar=20μm. Karaciğer dokusunda konjesyon, hepatositlerde dejenerasyon (siyah oklar) ve çok sayıda nekrotik alan, hemorajik odaklar (beyaz oklar).



Şekil 19. IV. Grup rat karaciğer dokusu histopatolojik yapısı (Hx&E) Bar=20μm Karaciğer dokusunda çok şiddetli nekrotik, hemorajik alanlar ve nekrotik odakların etrafında ve portal bölgede lenfoplazmositer hücre infiltrasyonu.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Organizmaların karşılaştığı yabancı kimyasal maddeler veya ilaçlar vücut için toksik maddeler olup, vücuda alındıktan sonra etki yerlerine dağılırlar ve çeşitli yollarla elimine edilmeye çalışılırlar. Bunların metabolize edildiği ana organ karaciğerdir (Aypak, 2009).

Hazır gıdaların raf ömürlerini uzatmak amacıyla kullanılan besin koruyucular da insanların hergün karşı karşıya kaldıkları kimyasal maddelerin başında gelmektedir. Bu nedenle, günümüzde besin koruyucuların muhtemel toksik etkilerinin araştırıldığı çalışmalar büyük önem kazanmaktadır. Daha önce yapılan araştırmalarda bazı besin koruyucuların canlılar üzerinde toksik etkilere neden olabileceği bildirilmiştir (Bakar, 2008).

BHT işlenmiş gıdalarda, kozmetik ve petrol ürünlerinde antioksidan olarak kullanılmasına rağmen, toksisitesi nedeniyle kullanımı sınırlıdır (Ip ve Ko, 1996). Bir insanın bu antioksidanı günlük 0.1 mg/kg olarak tükettiği tahmin edilmektedir. BHT'nin bu düzeyden 500 kat (50mg/kg/gün) fazla alınması ile zararlı etkiler oluşturmadığı, maymun ve kemirgenlerde daha yüksek doz (500 mg/kg/gün) alımının belli patolojik, enzim ve lipid değişikliğine neden olduğu bildirilmiştir (Branen, 1975).

Bununla birlikte, fenolik antioksidan olan butillenmiş hidroksi anisol (BHA) ve BHT' nin yasal olarak belirtilen seviyelerde gıdalarda kullanılmalarının kansere neden olmayacağı, aksine antikanserojen etki oluşturabileceği belirtilmiştir (Williams ve ark., 1999).

Toksik ajanların hepatoselüler reaksiyonlarında yada herhangi bir hepatotoksik yaralanmalarda serum AST ve ALT enzim aktiviteleri artar (Nakagawa ve ark., 1984; Powell ve Connolly, 1991; Paciker ve ark., 2014). Karaciğer hasarının olduğu tüm durumlarda AST ve ALT enzim aktivitesinde olduğu gibi, LDH enzim aktivitesinde de artma meydana gelir (Yabe ve ark., 2001; Günşar, 2003; Akarca, 2007).

BHT' nin 0,5 - 1.0 g/kg'lik akut dozlarının farelerde böbrekte ve karaciğerde bazı hasarlara, düşük dozlarda BHT ile subkronik besleme ve intraperitoneal

Çalışmaların ratlarda karaciğer ağırlığında artışa ve birkaç hepatik enzim aktivitesinde azalmaya neden olacağı belirtilmiştir (Lanigan ve Yamarik, 2002).

Daha önce yapılan kronik çalışmalarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, BHT'nin (250-500 mg/kg) kullanılmasının serum ALT ve AST enzim aktivitesini artırdığını, bu serum enzim aktivitesindeki artışın hepatik glutatyon seviyesindeki dikkat çekici azalma ile ilişkili olduğu, aynı zamanda BHT'nin toksik dozlarda (1000 mg/kg) kullanılmasında serum enzim aktivitesini artırdığı bildirilmiştir (Nakagawa, 1987).

BHT uygulanan ratlarda hepatüselüler hasarın bir indikatörü olan ALT aktivitesinde istatistiksel açıdan önemli bir artışın olduğu, yüksek doz BHT'nin ratlarda hemorajik ölümlere ve karaciğer hasarına neden olduğu bildirilmiştir (Ip ve Ko, 1996).

Devi ve ark. (2003), BHT (500 mg/kg / 3 gün) verilen grupta, serum protein seviyesinin, LDH, AST, ALT enzim aktivitelerinin arttığını, bununla birlikte serumda lipit peroksidaz (LPO) enzim aktivitesinin azaldığını tespit etmişlerdir.

Karaciğer hasarının safalarında hepatositlerin transport fonksiyonlarının bozulmasının, plazma membranlarında sızıntılara neden olarak serum ALT ve AST ezim aktivitelerini arttıracığını belirten Lin ve ark. (2007), kontrol grubuyla karşılaştırdıklarında, BHT' uygulanan grupta oksidatif stres ile birlikte serum AST ve ALT enzim aktivitelerinin arttığını tespit etmişlerdir.

Yapılan başka bir çalışmada, 200 ppm BHT'nin altı hafta oral uygulanması ile serum AST, ALT ve ALP enzim aktivitelerinin, uygulamanın başlamasından üç hafta sonra arttığı ve sonuna kadar devam ettiği, sonuç olarak da 200 ppm BHT'nin karaciğer fonksiyonları üzerine zararlı etkilere neden olduğu belirtilmiştir (El-Anany ve Ali, 2013). Farag ve ark. (2006), 200 mg/kg BHT içeren diyet ile beslenen ratların karaciğer enzim aktivitelerinde önemli bir artışın olduğunu tespit etmişlerdir.

BHT'nin farklı dozlarının (250, 500 ve 1000 mg/kg) 14 gün boyunca uygulandığı çalışmada, BHT'nin serum ALT, AST ve GGT enzim aktivitelerini önemli ölçüde arttırdığı, bu artışın doza bağımlı bir şekilde meydana geldiği, 1000 mg/kg uygulanan grupta maksimum seviyeye ulaştığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak bu

enzim aktivitelerindeki artışın BHT'nin hepatotoksik etkisiyle ilgili olabileceği tespit edilmiştir (Panicker ve ark., 2014).

Bazı araştırmalarda ise, farelerde serum transaminaz aktivitesi değerlendirildiğine, kronik BHT uygulamalarının hepatoksik etkilere neden olmadığı (Jaeschke ve Wendel, 1986), diyetle BHT katılan hayvanların serum ALT , AST ve LDH enzim aktivitelerinde istatistik olarak fark olmadığı belirtilmiştir (Klein ve ark., 2002).

Bu çalışmada, kontrol ve deneme gruplarında (I., II., III. ve IV. Grup) ALT (U/L) enzim aktivitesi sırasıyla, 36.62 ± 2.10 , 39.12 ± 2.14 , 61.47 ± 6.70 , 82.62 ± 3.77 , 98.51 ± 13.84 , AST (U/L) enzim aktivitesi 126.18 ± 13.79 , 160.55 ± 12.24 , 176.95 ± 19.49 , 218.20 ± 11.80 , 306.24 ± 90.74 ve LDH (U/L) enzim aktivitesi 1041.57 ± 150.48 , 1156.57 ± 185.79 , 1212.28 ± 107.87 , 1221.00 ± 220.09 , 2280.85 ± 543.78 olarak tespit edildi.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, deneme gruplarının hepsinde serum ALT, AST ve LDH enzim aktivitelerinin BHT'nin dozlarına bağlı olarak arttığı, bu artışta ALT enzim aktivitesinin III. ve IV. Grupta ($p<0.001$, $p<0.05$), AST ve LDH enzim aktivitesinin IV. Grupta istatistik olarak önem gösterdiği tespit edildi ($p<0.05$). Deneme grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, ALT enzim aktivitesi açısından IV. Grup ile I. ve II. Gruplar arasında, ve III. Grup ile I. Grup arasında istatistik olarak fark olduğu ($p<0.001$), AST ve LDH enzim aktivitesi açısından deneme grupları arasında fark olmadığı tespit edildi ($p>0,05$). Bu sonuçlara bakılarak, BHT'nin hepatositlerde hasar oluşturmaya bağlı olarak bu enzimlerin serum seviyelerindeki artışına neden olduğu söylenebilir.

Birçok endojen ve eksojen maddenin karaciğerde biyotransformasyonu esnasında meydana gelen oksidasyon/redüksiyon reaksiyonları sonucunda serbest radikaller meydana gelmekte ve açığa çıkan bu radikaller antioksidan savunma sisteminin karşı koyabileceği düzeyin üzerine çıktığında dokularda çeşitli tahribatlara neden olmaktadır. Bu tahribatlar arasında membran hasarları, DNA hasarları, enzim inaktivasyonları sayılabilir (Dökmeci, 2001; Atalay ve ark., 2004).

Oksidasyon redüksiyon tepkimeleri arasındaki denge hücrenin redoks durumunu yansıtmaktadır. Aerobik metabolizma sırasında sürekli olarak ROS oluşması nedeniyle, GSH redoks sistemi hücrenin varlığını devam ettirmesi açısından oldukça önemlidir (Jefferies ve ark., 2003).

Glutasyon redoks sistemi, GSH, GR, GPx ve NADPH'dan oluşmaktadır (Jokanovic, 2001). Kimyasal olarak başlatılan hücrel toksisite, sitozolik GSH'nın kaybı ve daha sonra mitokondriyal GSH seviyesindeki azalmayla ilişkilendirilmektedir. Mitokondride GSH ile ilişkili protein tiyollerinin azalması hücre canlılığı için kritik olduğundan, kimyasal kaynaklı hepatik zarara karşı korunmak için mitokondriyal GSH redoks durumunun devam ettirilmesi oldukça önemlidir (Ip ve Ko, 1996).

GPx ve GR enzimlerinin katalizlediği tepkimelerde GSH tüketilmemekte, fakat bir döngüye sokulmaktadır. Bunun aksine, GST enziminin katalizlediği tepkimelerle GSH S- konjugatlarının oluşumuyla ve bunların hücre dışına atılmasıyla intraselüler GSH miktarı azalmaktadır (Camera ve Picardo, 2002).

Hazır gıdaların raf ömürlerini uzatmak için kullanılan BHT'nin karaciğerde biyotransformasyon metabolizması birkaç aşamada meydana gelmektedir. BHT öncelikle karaciğer mikrozomlarında monooksijenazlar tarafından hidroksillenir, daha sonra sülfat ve glukuronik asit konjugatlarına dönüştürülerek idrar ve dışkı ile atılır (Panicker ve ark., 2014).

BHT'nin bir ara metaboliti olan BHT-kinon metit (BHT-QM) ratlarda karaciğerde ve akciğerde sitokrom P450 tarafından metabolize edilir. Fazla miktarda oluşan BHT-QM nükleik asitlere ve proteinlere kovalent olarak bağlanır, bunun sonucunda akut hepatotoksite ve pnemotoksite meydana gelir. Normal şartlarda BHT-QM glutasyon tarafından konjuge ve detoksifiye edilir. BHT-QM'nin fazla üretimi oksidatif stresi artırabilir ve GSH 'yı tüketebilir (Witschi ve ark., 1989; Devi ve ark., 2003).

Mizutani ve ark. (1987), BHT'nin hepatotoksik etkisinin zamana ve doza bağlı olduğunu, 800 mg/kg doz BHT'nin karaciğer hasarı oluşturduğuna dair kanıt

olmadığını, BHT-QM'nin farelerde GSH seviyesini düşürerek karaciğer hasarını oluşturduğunu belirtmişlerdir.

BHT'nin diyetlere katılmasının (% 0.75, % 0.5) iki farklı kemirgen türünde (fare ve rat) etkilerinin karşılaştırıldığı çalışmada, BHT'nin ratlarda epoksit hidrolaz aktivitesini ve iki kemirgen türünde de glukuronit konjugasyon sistemindeki enzim aktivitelerini arttırdığı tespit edilmiştir. BHT ile tedavide, asitte çözünür tiyol seviyelerinin sadece farede arttığı, ratta değişmediği bulunmuştur. GR enzim aktivitesinin sadece BHT uygulanan ratlarda, ayrıca GST enzim aktivitesinin her iki kemirgen türünde arttığı bulunmuştur (Cha ve Heine., 1982).

Ip ve Ko (1996), yaptıkları çalışmada, kontrol grubu ile karşılaştırdıklarında, yalnız BHT'nin 3 mg/ kg/ 3 gün kullanılmasının hem karaciğer mitokondriyal GSH hem de GSSG seviyelerini azalttığını, GSH /GSSG oranına etki etmediğini, bununla birlikte mitokondriyal enzim aktivitelerini artırdığını tespit etmişlerdir.

BHT'nin farklı oranlarda (% 0.05, % 0.5) diyetle ilave edilmesinin karaciğerde SOD enzim aktivitesini etkilemediği, bununla birlikte GPx enzim aktivitesini önemli oranda arttırdığı, ayrıca diğer gruplar ile karşılaştırıldığında, BHT'nin diyetle % 0.5 ilavesinin belirgin şekilde GST enzim aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir. BHT ile beslenmeye karşılık olarak GPx enzim aktivitesinin artmasının, farelerin organlarında aktif oksijenlerin uzaklaştırılmasında yardımcı olabileceği, bununla birlikte BHT'nin yüksek doz uygulanması ile lipid peroksidasyonun artırma olasılığının göz önünde bulundurulması gerektiği vurgulanmıştır (Jang ve ark., 1999).

Devi ve ark. (2003), 500 mg/kg/ 3 gün BHT uygulanmasının, karaciğer dokusu GSH seviyesini azalttığını tespit etmişlerdir.

Yapılan çalışmalarda, hindilerin diyetine 10 gün boyunca 4000 ve 1000 ppm (Klein ve ark., 2003), ve 20 gün boyunca 4000 ppm (Coulombe ve ark., 2005), BHT katılmasının hepatik GST enzim aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir.

Lin ve ark. (2007), BHT'yi 1000 mg/kg boyunca uyguladıkları grupta, MDA seviyesinin sadece akciğer dokusunda artarken, karaciğer ve böbrekte değişmediği, bununla birlikte her üç dokuda SOD, CAT ve GPx enzim aktivitesinin azaldığını, bu

sonuçların BHT'nin karaciğer, böbrek ve akciğerde antioksidan sistemler üzerinde olumsuz etkilere neden olmasından kaynaklanmış olabileceğini belirtmişlerdir.

BHT'nin 500 mg/kg 3 gün boyunca oral uygulamasının, karaciğer dokusunda GSH seviyesini ve GST, GR enzim aktivitelerini artırdığı, BHT'nin bir metaboliti olan BHT - alkol'ün bu parametrelerin seviyesini yada aktivitesini arttırdığı, fakat bu etkinin BHT'den daha zayıf olduğunu tespit etmişlerdir. Bununla birlikte kullanılan dozlarda BHT yada BHT- alkol'ün GPx enzim aktivitesi üzerine etki etmediğini bildirmişlerdir (Nakagawa ve ark., 1981).

Nakagawa ve ark. (1984), yaptıkları başka bir çalışmada BHT'nin (500 - 1000 mg / kg) oral uygulanmasının serum transaminaz aktivitesi, hepatik glutatyon miktarı ve lipid peroksit arasındaki ilişkisini araştırmışlar, GSH seviyesinin hızla azaldığını, bu azalmanın BHT uygulamasından 6 saat sonra minimum seviyeye ulaştığını, bu düşüşün uygulanan BHT'nin dozu ile orantılı olduğunu ve GSH seviyesindeki düzelmenin yüksek doz kullanılan ratlarda, düşük doz kullanılanlardan daha uzun süre aldığını bulmuşlardır. BHT uygulamasından 12 saat sonra GST aktivitesinin etkilenmediğini, fakat daha sonra zamanla artarak GSH seviyesindeki artışa eşlik ettiğini belirtilmişlerdir. Çalışmanın sonunda yüksek doz BHT'nin hepatik hasara neden olduğunu ve bununla karaciğerde lipid peroksidasyonundan ziyade, GSH seviyesindeki uzun süren azalmayla ilişkili olduğu sonucuna varmışlardır.

Rat diyetine BHT'nin (% 0.4 w/w) ilave edilmesinin karaciğer dokusunda GST enzim aktivitesini 3 kat artırırken, GPx enzim aktivitesinde değişikliğe neden olmadığı tespit edilmiştir (Awasthi ve ark., 1983).

Furukawa ve ark. (1984), BHT' nin 18 hafta boyunca 300 - 6000 ppm diyetlere katılmasının rat karaciğer dokusu gama-glutamil transferaz (GGT) aktivitesinin doza bağlı olarak arttırdığını, GST enzim aktivitesinin 3000 veya 6000 ppm dozunda BHT kullanılmasıyla karaciğer dokusunda arttığını tespit etmişlerdir.

Karaciğer dokusunda, BHT 'nin 100-1000 mg/kg doz kullanılmasının GST enzim aktivitesini arttırırken, BHT'nin düşük doz kullanımının (10 mg/kg) GST enzim aktivitesini değiştirmedeği belirtilmiştir. BHT 'nn farklı dozlarının (1-100 mg/kg)

uygulanmasının 5. ve 10. günler arasında GSH seviyesini değiştirmediği, 100 mg / kg BHT nin tek doz kullanılması ile karaciğer dokusu GSH seviyesindeki azalmanın ilk uygulamadan sonra 5. günde kontrol seviyelerinin üzerinde bir yükselme tarafından takip edildiğini tespit edilmiştir. Sonuç olarak farelerde çeşitli organlarda GSH konjugasyon sisteminin uyarılma eşiğinin BHT için 100 mg/kg denk yada daha yüksek olduğu, BHT'nin kronik uygulanmasının elde edilen sonuçları değiştiremediği, artan hepatik GSH seviyesinin, GSH'nın baştaki azalmasının etkisi olarak sentezinin aktive edilmesinin sonucunda meydana gelebileceği belirtilmiştir (Jaeschke ve Wendel, 1986).

Başka bir çalışmada, beş gün boyunca 1000 mg/kg BHT verilmesinin erkek farelerde, karaciğerde GSH seviyesini % 50-100 oranında arttırdiği, bununla birlikte GST enzim aktivitesini etkilemediği tespit edilmiştir (Jaeschke ve Wendel, 1985).

Sunulan çalışmada, kontrol ve deneme gruplarında (I., II., III. ve IV.Grup) sırasıyla GSH (μM) seviyesi, 4.43 ± 0.04 , 4.27 ± 0.03 , 1.72 ± 0.06 , 1.01 ± 0.05 , 0.45 ± 0.01 , GP_x (nmol/min/ml) enzim aktivitesi, 210.00 ± 3.40 , 202.71 ± 1.86 , 193.85 ± 2.14 , 159.28 ± 1.12 , 81.57 ± 2.47 , GST (nmol/min/ml) enzim aktivitesi, 289.85 ± 2.63 , 273.71 ± 6.78 , 260.85 ± 6.13 , 197.57 ± 4.05 , 143.00 ± 6.06 ve GR (nmol/min/ml) enzim aktivitesi, 198.00 ± 1.91 , 190.42 ± 2.51 , 178.14 ± 1.95 , 173.14 ± 1.69 , 130.71 ± 1.92 olarak tespit edildi.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, BHT'nin farklı dozlarının uygulandığı II., III. ve IV. Gruplarda karaciğer dokusu GSH seviyesinin ve GP_x, GST, GR enzim aktivitelerinin istatistik açısından önem gösterecek şekilde azaldiğı ($p < 0.001$), I. Grup ile kontrol grubu arasında bakılan parametreler açısından fark olmadiğı tespit edildi ($p > 0.05$). Deneme grupları kendi arasında karşılaştırıldığında, BHT'nin verilen dozlarının artmasına paralel olarak, karaciğer dokusu GSH seviyesinin ve GP_x, GST, GR enzim aktivitelerinin azaldiğı, bu azalmanın GSH seviyesi açısından I., II., III. ve IV.Gruplar arasında istatistik olarak önemli olduğu ($p < 0.001$), GP_x, GST enzim aktiviteleri açısından I. ve II. Gruplar ile III. ve IV.Gruplar arasında istatistik olarak önemli olduğu ($p < 0.001$), I. ve II. Gruplar arasında önem olmadiğı ($p > 0.05$), GR enzim aktivitesi açısından II. ve III Gruplar ile I. ve IV.Gruplar arasında istatistik olarak önemli olduğu ($p < 0.001$), II. ve III Gruplar arasında önem göstermediği belirlendi ($p > 0.05$).

BHT'nin yüksek dozlarının ratlarda hemorajik yıkım ve karaciğer hasarsına neden olduğu bildirilmiştir (Nakagawa ve ark., 1981). Ip ve Ko, (1996) farelerde BHT kullanımının hepatoselüler hasar oluşturduğunu belirtmişlerdir.

BHT'nin 0.5 ve 1,0 mg/kg akut dozlarının ratlarda bazı böbrek ve hepatik hasara neden olduğu belirtilmiştir (Lanigan ve Yamarik, 2002).

BHT (4000 ppm) uygulanmasının 10. gününde karaciğerde hepatik hidropik dejenerasyon görülmeye başlandığı, tedavinin 40. gününe kadar aynı şiddette kaldığı, BHT uygulanmasının 10 gün sonra kesilip, normal kontrol diyetine geçilmesiyle hidropik dejenerasyon belirtilerinin azaldığı, 30. günde tamamen yok olduğu tespit edilmiştir (Klein ve ark., 2003).

El-Anany ve Ali. (2013), altı hafta 200 ppm BHT uyguladıkları sıçanların karaciğer dokusunda vakuoler dejenerasyon ve bulanık şişkinlikleri içine alan hepatoselüler dejenerasyon ile karakterize, belirgin patolojik değişikliklerin oluştuğunu bildirmişlerdir.

BHT'nin 28 gün boyunca 0, 25, 250 veya 500 mg /kg/gün kullanılan çalışmada, yüksek dozlarda karaciğerde ilerleyen periportal hepatosit nekrozis ve doza bağlı olarak hepatomegali oluştuğu, 4 gün boyunca 1000-1250 mg/kg kullanılması ile 48 saat içinde sentriyolobüler nekrozis meydana geldiği, 25 mg/kg BHT uygulanması ile karaciğer hasarının oluşmadığı belirtilmiştir (Powell ve ark.,1986).

Bir başka araştırma tarafından, BHT ile beslemenin herhangi bir histolojik değişiklik meydana getirmeksizin karaciğerde genel bir hiperplaziye neden olduğu bildirilmiştir (Jang ve ark., 1999).

BHT'nin doz ve tedavi süresine bağlı olarak karaciğerde sentrilobuler veya periportal hücreler zarar verme yeteneğine sahip olmasına rağmen, 500 mg/kg oral doz kullanımının karaciğerde nekroza neden olmadığı tespit edilmiştir (Powell ve Connolly, 1991).

Lin ve ark. (2007), ise çalışmalarında, kontrol grup ile karşılaştırdıklarında, BHT (1000 mg/kg) uygulanan ratların karaciğer dokusunda histopatolojik olarak herhangi bir değişikliğin olmadığını tespit etmişlerdir.

Sunulan çalışmada karaciğerin makroskobik incelemesinde, kontrol grup ile karşılaştırıldığında 250-500 mg/kg BHT uygulanan ratların karaciğerinin normal anatomik renk ve yapıda olduğu, 1000-1500 mg/kg BHT uygulanan ratların karaciğerinde sarımtırak nekrotik odakların olduğu tespit edildi.

Karaciğer dokusunun Hematoksilen-Eozin (HE) ile boyanıp, histopatolojik olarak mikroskobik incelenmesinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında I. Grubun karaciğer dokusunun normal histopatolojik yapıda olduğu tesbit edilirken, II. Grupta hepatik konjesyon ve sentral bölgedeki hepatositlerde hafif dejenerasyon, III. Grupta konjesyon, özellikle sentral bölgede bulunan hepatositlerde de dejenerasyon, çok sayıda nekrotik alan ve hemorajik odaklar, IV. Grupta sentral bölgede çok şiddetli nekrotik, hemorajik alanlar, bu nekrotik odakların etrafında ve portal bölgede lenfoplazmositer hücre infiltrasyonu tesbit edildi.

Sonuç olarak, serum ve karaciğer dokusu bakılan biyokimyasal parametreler açısından değerlendirildiğinde, BHT'nin artan dozuna bağlı olarak detoksifikasyonu sonucu oluşan ara metabolitlerinin oksidatif stresi artırarak GSH seviyesini ve GSH metabolizması ile ilişkili enzimlerin aktivitelerini azalttığı ve bunun karaciğer dokusunda histopatolojik değişikliklere neden olduğu söylenebilir.

ÖZET

Mean S, Butillenmiş hidroksi tolüen (BHT)'nin karaciğer dokusu glutatyon metabolizması ile ilişkili enzimler üzerine etkileri. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Van 2015. Bu çalışma, farklı doz butillenmiş hidroksi tolüen (BHT)'nin rat karaciğer dokusunda glutatyon seviyesi ve glutatyon ile ilişkili enzim aktiviteleri üzerine etkilerini tespit etmek amacıyla planlandı. 250-300 g ağırlığında 47 adet dişi Wistar albino rat beş gruba ayrıldı. Kontrol (n=7, K), I. Grup (n=10, 250 mg/kg BHT), II. Grup (n=10, 500 mg/kg BHT), III. Grup (n=10, 1000 mg/kg BHT) ve IV. Grup (n=10, 1500 mg/kg BHT). BHT, I. ve II. Grupdaki ratlara 28 gün, III. ve IV. Gruptaki ratlara son 4 gün oral olarak uygulandı. Serum örneklerinde ALT, AST ve LDH enzim aktiviteleri otoanalizörde, karaciğer dokusunda GSH seviyesi ve GPx, GST, GR enzim aktiviteleri ELISA da ticari kit kullanılarak ölçüldü. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman, serum örneklerinde III. ve IV. Gruplarda (sırasıyla $p<0.05$, $p<0.001$) ALT enzim aktivitesinin, IV. Grupta ($p<0.05$) AST ve LDH enzim aktivitelerinin istatistik olarak önem gösterecek düzeyde arttığı, karaciğer dokusunda II. III. ve IV. Gruplarda GSH düzeyinin, GPx, GST ve GR enzim aktivitelerinin istatistik olarak önem gösterecek ($p<0.001$) şekilde düştüğü tespit edildi. Ayrıca bu düşüşün deneme grupları arasında da anlamlı olduğu belirlendi ($p<0.001$). Mikroskopik incelemeler sonucunda, doz ve süresine bağlı olarak BHT uygulamasının II. III. IV. Grup rat karaciğer dokusunda histopatolojik değişiklikler oluşturduğu görüldü. Bu çalışma BHT'nin etkisi sonucu karaciğer dokusu glutatyon seviyesi ve glutatyon ile ilişkili enzim aktivitelerindeki azalmaların karaciğer hasarına neden olabileceğini göstermektedir.

Anahtar sözcükler: Butillenmiş hidroksi tolüen, Glutatyon, Karaciğer, Metabolizma

SUMMARY

Mean S, The effects of butylated hydroxy toluene (BHT) on enzymes associated with liver tissue glutathione metabolism. YuzuncuYil University, Institute of Health Sciences, Department of Biochemistry, MSc Thesis, Van, 2015. This study was planned in order to determine the effects of butylated hydroxy toluene (BHT) at different doses on of the enzyme activities associated with glutathione metabolism and glutathione level in rat liver tissue. 47 female Wistar albino rats weighing 250-300 g were divided into five groups including Control (n=7, K), Group I (n=10, 250 mg/kg BHT), Group II (n=10, 500 mg/kg BHT), Group III (n=10, 1000 mg/kg BHT) and Group IV (n=10, 1500 mg/kg BHT). BHT was applied orally to the rats in Group I and II for 28 days and in the last 4 days in Group III and IV. ALT, AST and LDH enzyme activities in serum samples by autoanalyser, GSH levels and GPx, GST, GR enzyme activities in liver tissue by ELISA were measured using with commercial kit. It was found that when compared with the control group, in serum samples increased at a statistically significant rate ALT enzyme activities in Groups III. and IV. ($p<0.05$, $p<0.001$, respectively), and AST and LDH enzyme activities in Group IV. ($p<0.05$), in the liver tissue decreased at a statistically significant rate GSH level, GPx, GST and GR enzyme activities in Groups II, III and IV ($p<0.001$). Also it was determined that this decline was significant among experiment groups ($p<0.001$). As a result of microscopic examination, it was found that BHT application depending on the dose and its duration created histopathological changes in rat liver tissue in Groups II., III. and IV. The results of this study indicate that the decrease in enzyme activities related to glutathione metabolism and glutathione level as a result of BHT effect can cause liver damage.

Keywords: Butylated hydroxy toluene, Glutathione, Liver, Metabolism

KAYNAKLAR

- Akarca US (2007). Karaciğer fonksiyon testi yüksekliğine tanısal yaklaşım, 9. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi, 147- 149.
- Anzenbacher P, Anzenbacherová E (2001). Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58, 5-6, 737-747.
- Atalay M, Oksala NK, Laaksonen DE, Khanna S, Nakao C, Lappalainen J, Roy S, Hänninen O, Sen CK (2004). Exercise training modulates heat shock protein response in diabetic rats, *Journal Applied Physiol*, 97, 605- 611
- Awasthi YC, Partridge CA, Dao DD (1983). Effect of butylated hydroxytoluene on glutathione S-transferase and glutathione peroxidase activities in rat liver, *Biochemistry Pharmacol*, 1, 32, 7, 1197-200.
- Aypak SÜ (2009). Zenobiyotiklerin metabolizması, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20, 2, 75-78.
- Aytekin Y, Solakoğlu S (2006). Temel Histoloji, Nobel Tıp Kitap Evleri, İstanbul.
- Bakar E (2008). Besin Koruyucuların sıçan dokularında sialik asit düzeyleri ve membran glikozaminoglikanları üzerine etkileri, Tırakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Doktora Tezi AD
- Baldwin EA, Nisperos-Carriedo MO, Baker RA (1995). Use of edible coatings to preserve quality of lightly (and slightly) processed products, *Critical Reviews Food Science Nutrition*, 35, 6, 509 - 524.
- Basaga HS (1990). Biochemical aspects of free radicals, *Biochemistry and Cell Biology*, 68, 989-98.
- Baudrimont I, Ahouandjivo R, Creppy EE (1997). Prevention of lipid peroxidation induced by ochratoxin A in vero cells in culture by several agents, *Chemicology-Biological Interactions*, 104, 29-40.
- Bayşu Sözbilir N, Bayşu N (2008). Biyokimya. Güneş Tıp Kitapevleri, 1. Baskı. Ankara.
- Bohne VJB, Lundebye A, Hamre K (2008). Accumulation and depuration of the synthetic antioxidant ethoxyquin in the muscle of *Atlantic salmon* (*Salmo salar* L.), *Food and Chemical Toxicology*, 46, 1834–1843.
- Bongers RS, Hoefnagel MH, Starrenburg MJ, Siemerink MA, Arends JG, Hugenholtz J, Kleerebezem M (2003). IS981- mediated adaptive evolution recovers lactate production by ldhB transcription activation in a lactate dehydrogenase-deficient strain of *Lactococcus lactis*, *Journal Bacteriol* 185, 4499–4507.

Branen AL (1975). Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene, *Journal of American Chemical Oil Society*, 52-59.

Brzoska MM, Moniuszko-Jakoniuk J, Pilat- Marcinlaewicz B, Sawicki B (2003). Liver and kidney function and histology in rats exposed to cadmium and ethanol, *Alcohol*, 38, 1, 2-10.

Camera E, Picardo M (2002). Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes, *Journal of Chromatography*, 781, 181-206.

Cashman JR (1995). Structural and catalytic properties of the mammalian flavin containing monooxygenase, *Chemical Research in Toxicology*, 8, 165-181.

Cha YN, Heine HS (1982). Comparative effects of dietary administration of 2(3)-ferf-butyl-4- hydroxyanisole and 3,5-di-ferf-butyl-4-hydroxytoluene on several hepatic enzyme activities in mice and rats, *Cancer Research*, 42, 2609-2615.

Chisari FV, Ferrari C (1995). Hepatitis B virus immunopathogenesis, *Annual Review of Immunology*, 13, 29-60.

Cnubben NH, Rietjens IM, Wortelboer H, Van Zanden J, Van Bladeren PJ (2001). The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environ Toxicology Pharmacology*, 10, 141- 152.

Coulombe RA, Guarisco JA, Klein PJ, Hall JO (2005). Chemoprevention of aflatoxicosis in poultry by dietary butylated hydroxytoluene, *Animal Feed Science and Technology*, 121, 217- 225.

Çakmakçı S, Gökalp HY (1992). Gıdalarda kısaca oksidasyon; antioksidantlar ve gıda sanayiinde kullanımları, *Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi*. 23, 2, 174-192.

Demirsoy A, Türkan İ, Gündüz E (2004). Genel Biyoloji, Cilt II. Palme Yayıncılık, s., Ankara, 886-887.

Devi RS, Shoba N, Vijai MK, Sabitha K E, Shyamala Devi CS (2003). Effect of a polyherbal formulation, Ambrex, on butylated hydroxy toluene (BHT) induced toxicity in rats, *Indian Journal of Experimental Biology*, 41, 1290-1294.

Domitrovic R, Jakovac H, Tomac J, Sain I (2009). Liver fibrosis in mice induced by carbon tetrachloride and its reversion by luteolin, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 241, 311-321.

Dökmeci, İ (2001). Toksikoloji Zehirlenmede Tanı ve Tedavi, Nobel Tıp Kitapevleri İstanbul, 127- 134.

El-Anany A, Ali R (2013) Biochemical and histopathological effects of administration various levels of Pomposia (*Syzygiumcumini*) fruitjuice as naturalantioxidant on rathealth, *Journal Food Sciences Technol*, 50 (3), 487-495.

Estrela JM, Ortega A, Obrador E (2006). Glutathione in cancer biology and therapy, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 43, 143-181.

Farag RS, Mohamoud EA, Basuny AM (2007). Use crude olive leaf juice as a natural antioxidant for the stability of sunflower oil during heating, *International Journal of Food Technology*, 42, 107–111

Fu Y, Zheng S, Lin J, Ryerse J, Chen A (2008). Curcumin protects the rat liver from CCl₄ caused injury and fibrogenesis by attenuating oxidative stress and suppressing inflammation, *Molecular Pharmacology*, 73, 399-409.

Furukawa K, Maeura Y, Furukawa NT, Williams GM (1984). Induction by butylated hydroxytoluene of rat liver gamma-glutamyl transpeptidase activity in comparison to expression in carcinogen-induced altered lesions, *Chemistry Biology Interacts*, 48, 1, 43-58.

Grifiith OW (1999). Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis, *Free Radical Biology and Medicine*, 27, 922-935.

Guéguen Y, Mouzat K, Ferrari L (2006). Cytochromes P450: Xenobiotic metabolism, regulation and clinical importance, *Annales Biology Clinique*, 64, 6, 535-548.

Günşar F (2003). Karaciğer enzim profilindeki değişikliklerde yaklaşımlar, *Güncel Gastroenteroloji*, 7, 3, 192-203.

Halliwell B, Gutteridge JMC (1999). Free Radical in Biology and Medicine, Third ed, *Oxford University Press*, Oxford, 160-165.

Ioannides C (2002). Xenobiotic metabolism: An overview (C. Ioannides, Editor), *Enzyme Systems That Metabolise Drugs and Other Xenobiotics*, John Wiley and Sons, Ltd. West Sussex, UK, sayfa 1-32.

Ip SP, Ko KM (1996). The crucial antioxidant action of schisandrin B in protecting against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice: A comparative study with butylated hydroxytoluene, *Biochemical Pharmacology*, 52, 11, 1687-1693.

Jaeschke H, Wendel A (1985). Manipulation of mouse organ glutathione contents I: Enhancement by oral administration of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene, *Toxicology*, 36, 1, 77-85.

Jaeschke H, Wendel A (1986). Manipulation of mouse organ glutathione contents. II: Time and dose-dependent induction of the glutathione conjugation system by phenolic antioxidants, *Toxicology*, 39, 1, 59-70.

- Jang IS , Chae KR, Kang TS, Kim YK, Kim CK , Hwang JH, Hwang DY, Choi CB, Jung KK, Cho JS (1999). Effects of long-term vitamin E and butylated hydroxytoluene supplemented diets on murine Intestinal and hepatic antioxidant enzyme activities, *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 12, 6, 932-938.
- Jefferies H, Coster J, Khalil A, Bot J, Mccauley R.D, Hall JC (2003). Glutathione, *Australian New Zealand Journal of Surgery*, 73, 517-522.
- Jensen SJK (2003). Oxidative stress and free radicals, *Journal of Molecular Structure*, 387-392.
- Jokanovic M (2001). Biotransformation of organophosphorous compounds, *Toxicology*, 166, 139-160.
- Karagül H, Altıntaş A, Fidancı UR, Sel T (2000). Klinik Biyokimya, Medisan Yayınları, 45, Ankara.
- Klein PJ, Van Vleet TR, Hall JO, Coulombe RA Jr (2002). Dietary butylated hydroxytoluene protects against aflatoxicosis in turkeys, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 182, 11-19.
- Klein PJ, Van Vleet TR, Hall JO, Coulombe RA Jr (2003). Effects of dietary butylated hydroxytoluene on aflatoxin B1-relevant metabolic enzymes in turkeys, *Food Chemistry Toxicology*. 41, 5, 671-678.
- Kogure K, Ishizaki M, Nemoto M, Kuwano H, Makwchi M (1999). A comparative study of the anatomy of rat and human livers, *Journal Hepatobiliary Pancreat Surg*, 6, 171-175.
- Kutlu T (2006). Neonatal kolestaz tanımı ve etyopatogenezi, *Güncel Pediatri*, 4, 1, 119-121.
- Lang M, Pelkonen O (1999). Metabolism of xenobiotics and chemical carcinogenesis. *IARC Scientific Publications*, 148, 13-22
- Lanigan RS, Yamarik TA (2002). Final report on the safety assessment of BHT(1), *International Journal of Toxicology*, 21, 19-94.
- Lawton MP, Cashman JR, Cresteil T (1994). A nomenclature for the mammalian flavin containing monooxygenase gene family based on amino acid sequence identities, *Archives Biochemistry Biophysics*, 308, 254-257.
- Li D, Friedman SL (1999). Liver fibrogenesis and the role of stellate cells: New insights and prospects for therapy, *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 14, 618-633.
- Lin HM, Yen FL, Ng LT, Lin CC (2007). Protective effects of Ligustrum lucidum fruit extract on acute butylated hydroxytoluene-induced oxidative stress in rats, *Journal Ethnopharmacology*. 111, 1, 129-136.

Luna L (1968). Manual of Histologic Staining Methods; of the Armed forces Institute of Patology.

Memişoğulları R (2005). Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi, *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 3, 30–39.

Mizutani T, Nomura H, Nakanishi K, Fujita S (1987). Hepatotoxicity of butylated hydroxytoluene and its analogs in mice depleted of hepatic glutathione, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 87, 166-176.

Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW (1996). Harper'ın Biyokimyası, Barış Kitabevi, İstanbul.

Nakagawa Y (1987). Effects of buthionine sulfoximine and cysteine on the hepatotoxicity of butylated hydroxytoluene in rats, *Toxicology Lett*, 37, 251-256.

Nakagawa Y, Hiraga K, Suga T (1981). Effects of butylated hydroxytoluene (BHT) on the level of glutathione and the activity of glutathione-S-transferase in rat liver, *Journal Pharmacobiodyn*, 4, 10, 823-826.

Nakagawa Y, Tayama K, Nakao T, Hiraga K (1984). On the mechanism of butylated hydroxytoluene- induced hepatic toxicity in rats. *Biochemistry Pharmacol*, 33, 2669-2674.

Navarro-Gonzalves JA, Garcia-Benayas C, Arenas J (1998). Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids, *Clinical Chemistry*, 44, 679-681.

Okar MB (2011). Ratlarda deneysel hepatik rezeksiyon modelinde *Silybium marianum*'un karaciğer rejenerasyon ve anjiogenezis üzerine etkileri, Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara.

Omonigho S, Ikenebomeh M (2000). Effects of different preservative treatments on the chemical changes of pounded white yam (*Dioscorea roundata*) in storage at 28± 2 degrees C. *Food Chemistry*, 68, 2, 56.

Özyazgan Sibel (2002). Toksikokinetik, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri,

Panicker VP, George S, Dhanush Krishna B (2014). Toxicity study of butylated hydroxyl toluene (BHT) in rats, *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8, 758-763.

Paulson GD, Caldwell J, Hutson DH, Menn JJ (1986). Xenobiotic Conjugation Chemistry, *American Chemical Society*, Washington DC.

Powell CJ, Connelly JC, Jones SM, Grasso P, Bridges JW (1986). Hepatic responses to the administration of high doses of BHT to the rat: their relevance to hepatocarcinogenicity, *Food Chemistry Toxicology*, 24, 10-11, 1131-1143.

Powell CJ, Connolly AK (1991). The site specificity and sensitivity of the rat liver to butylated hydroxytoluene-induced damage, *Toxicol Applied Pharmacol*, 108, 67-70.

Robbins SL, Cotran RS, Kumar V (2000). Basic Pathology. 6th Ed, W.B, Saunders Company, Philadelphia, 516-519.

Rozman KK, Klaassen CD (2001). Absorption, distribution, and excretion of toxicants. In: Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons Klaassen CD (Ed), The McGraw-Hill companies, New York.

Scandalios JG (2002). The rise of ROS, *Trends in Biochemical Sciences*, 27, 483-486.

Sherratt PJ, Hayes JD (2002). Glutathione S-transferases (C. Ionnides, Editor), Enzyme Systems That Metabolise Drugs and Other Xenobiotics, John Wiley and Sons, Ltd., West Sussex, UK, sayfa 319-352.

Solomon EP (1997). İnsan Anatomisi ve Fizyolojisine Giriş. Birol Kitabevi, İstanbul.

Srouf R (1998). Benzoic Acid and Derivatives. In: Srouf R, ed, *Aromatic Intermediates and Derivatives*. 1- 17.

Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF (1987). Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance, *Science*, 235, 4792, 1043-1046.

Sturgill MG, Lambert GH (1997). Xenobiotic-induced hepatotoxicity: mechanisms of liver injury and methods of monitoring hepatic function, *Clinical Chemistry*, 43, 8, 1512-1526.

Taylor CR, Cote AJ (1994). Immunomicroscopy: A diagnostic tool for the Surgical Pathologist, 2nd Ed, Saunders Company, Philadelphia, USA.

Tunçok Y (2003). Toksikoloji Tanımı ve Tarihçesi, Toksikoloji Özel Sayısı, Ksenobiyotiklerin Emilim, Dağılım ve Eliminasyonları, 1, 1, 1-5.

Tümgör G, Arıkan Ç, Aydoğdu, S (2005). Çocukluk çağıının tanısal problemlili kolestatik hastalığı: ilerleyici ailevi intrahepatik kolestaz, *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 48, 355-360.

Uğuzlar H (2009). Antalya'da yetişen *Araceae arum* 'un antioksidan aktivitesi ve toplam fenolik madde tayini, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.

Üstüner MC (2006). Karaciğerde tümör oluşmasına neden olan dietilnitrozamin ve 2-asetilaminofloran uygulanmış sıçanlarda demetoksiviridin ve 1- α -hidroksi demetoksiviridin'in etkileri, ESOGÜ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.

Vural N (2004). Toksikoloji, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 42-84.

Williams GM, Iatropoulos MJ, Whysner J (1999). Safety assessment of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene as antioxidant food additives, *Food Chemistry Toxicology*, 37, 1027-1038.

Witschi H, Malkinson AM, Thompson JA (1989). Metabolism and pulmonary toxicity of butylated hydroxytoluene (BHT), *Pharmacology and Therapeutics*, 42, 89-113

Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND (2004). Glutathione metabolism and its implications for health, *Journal of Nutrition*, 134, 489-492.

Yabe Y, Kobayashi N, Nishihashi T, Takahashi R, Nishikawa M, Takakura Y, Hashida M (2001). Prevention of neutrofil-mediated hepatic ischemia-reperfusion injury by Superoxide dismutase and Catalase derivatives, *Journal Pharmacology Expimental*, 298, 894- 899.

Yanishlieva N, Gordonnb M (2001). Antioxidants in Food, *Chemical Rubber Company pres*, USA.

Yurdakul U, Uçankuş NL, Ömeroğlu S, Hatipoğlu MT (2005). Değişik yağ gruplarındaki sıçan karaciğer dokusunda bağ dokusu liflerinin dağılımı, *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 3, 15-20.

Yüksel, N (1999). Sitokrom P450 enzim sistemi ve ilaç etkileşimleri. 35.Ulusal Psikiyatri Kongresi-Trabzon.

Ziegler DM (1993). Recent studies on the structure and function of multisubstrate flavin containing monooxygenases, *Annual Review Pharmacology Toxicology*, 33, 179-199.

ÖZGEÇMİŞ

Van'ın Özalp ilçesinde 1989 yılında doğdu. İlk öğrenimi Özalp ilçesinde ve orta öğrenimi Van'da tamamladı. 2012 yılında Siirt Üniversitesi Hemşirelik Bölümü'nden mezun oldu. 2013 yılında Van Bölge Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne hemşire olarak atandı. 2013 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Öğrenimi görmeye hak kazandı.

EKLER

Ek-1: YYU Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Araştırma Başvuru Onay Belgesi

**T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU**

ARAŞTIRMA BAŞVURU ONAY BELGESİ

Araştırmanın Adı	Butillenmiş hidroksi tolüen (BHT) uygulamalarının karaciğer dokusu glutatyon metabolizması ile ilişkili enzimler üzerine etkisi
Araştırmanın Yürütücüsü	Prof. Dr. Yeter DEĞER
Yardımcı Araştırmacılar	Yük. Lis. Öğr. Sinan MEAN
Kurumu	Veteriner Fakültesi
Araştırmanın Tahmini Süresi	8 Ay
Kullanılacak Hayvan Türü ve Sayısı	Sıçan 47 Adet
Destekleyecek Kuruluş (lar)	
Başvuru Tarihi	24.03.2014

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2014/04-... Tarih:26.03.2014 Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi öğretim üyesi/elemanı Prof. Dr. Yeter DEĞER sorumluluğunda yürütülmesi planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma projesi gerekçe, amaç ve yöntemler dikkate alınarak ilgi başvuru belgeleri incelendi. Çalışmanın etik açıdan uygun olduğuna, Yüksek Lisans projesinin aşağıdaki hususlar dikkate alınarak yürütülmesine ve proje yürütücüsüne iletilmesine oy birliği /oy çokluğu ile karar verildi. 1) Projede herhangi bir değişiklik gerektiğinde kurulumuzdan onay alınması. 2) Projede çalışacağı bildirilen araştırmacılar değişikliği olduğunda kurulumuzdan onay alınması. 3) Deney hayvanları üzerinde yapılacak girişimin başlangıç ve bitiş tarihlerinin bildirilmesi. 4) Çalışma süresinde tamamlanamaz ise ek süre talebinde bulunulması. 5) Çalışma tamamlandığında sonuç raporunun gönderilmesi.
------------------------	--

ETİK KURUL ÜYELERİ	
BASKAN Prof. Dr. İdris TÜREL	BASKAN YARDIMCISI Prof. Dr. Hasan ÜLKER
ÜYELER Prof. Dr. Duran BOLAT	Doç. Dr. Sinan MEAN
Doç. Dr. Fatma İLHAN	Doç. Dr. Sıddık KESKİN
Doç. Dr. Barış Atalay USLU	Yrd. Doç. Dr. M. Fatih GARÇA
Yrd. Doç. Dr. Atilla DÜRMÜŞ	Yrd. Doç. Dr. Birkan Taha ÖZKAN
Zir. Müh. Kenan YILDIRIMOĞLU	Vet. Dr. Yıldırım BAŞBUĞAN
Orhan SOFUOĞLU (Sivil Üye)	

*Bu form YÜHADYEK tarafından doldurulacaktır.

Ek-2: YYU Hayvan Deneyleri Etik Kurulu Araştırma Kesin Sonuç Onay Belgesi



**T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
ARAŞTIRMA KESİN SONUÇ ONAY BELGESİ**

**YUZUNCUYILUNIVERSITY (TURKEY)
ANIMAL RESEARCHES LOCAL ETHIC COMMITTEE
RESEARCH FINAL REPORT APPROVAL CERTIFICATE**

Araştırmanın Adı	Butillenmiş hidroksi toluen (BHT)'nin karaciğer dokusu glutatyon metabolizması ile ilişkili enzimler üzerine etkisi.
Title of the Research	The effect of butylated hydroxy toluene (BHT) on the enzymes associated with glutathione metabolism in liver tissues.
Araştırmacı(lar) Investigator(s)	Yürütücü / Chief investigator : Prof. Dr. Yeter DEĞER Yardımcı Araştırmacı(lar) / Co-investigator(s): Sinan MEAN
Araştırmanın Başlama Tarihi / Research Starting Date: 03-06-2014	
Araştırmanın Bitiş Tarihi / Research Completion Date: 02-08-2015	
Proje Süresi / Total Time of Project: 14 ay/14 month	
Proje No / Project Number: 2014-SBE-YL137	
Araştırmayı Destekleyen Kuruluş (varsa) / Funding institution(s) (if available): YYÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı/ YYU Office of Scientific Research Projects	
Destek Şekli ve Miktarı / Type and amount of funding: 9,000.00 TL	
Karar: Yukarıda bilgileri verilen araştırma projesinin kesin sonuç raporu Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 30/04/2015 tarih ve 33 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.	
Decision: Final report of the research project detailed above was approved by YuzuncuYilUniversity Animal Researches Local Ethic Committee in the session held on 30/04 /2015 (decision number 33).	
Başkan / Chair Prof. Dr. Semiha DEDE	
ÜYELER	
Prof. Dr. Duran BOLAT	Prof. Dr. Sıddık KESKİN
Doç. Dr. Fatma İLHAN	Doç. Dr. Fazıl ŞEN
Doç. Dr. Atilla DURMUŞ	Doç. Dr. M. Fatih GARÇA
Doç. Dr. Barış Atalay USLU	Zir. Müh. Kenan YILDIRIMOĞLU
Vet. Hek. Yrd. Doç. Dr. Yıldırım BAŞBUĞAN	