



T.C.

ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA METANOL İLE İNDÜKLENEN
OKSİDATİF KARACİĞER HASARINA ADENOZİN
TRİFOSFATIN ETKİSİ**

Yunus KOÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ERZİNCAN
2020**

T.C.
ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA METANOL İLE İNDÜKLENEN
OKSİDATİF KARACİĞER HASARINA ADENOZİN
TRİFOSFATIN ETKİSİ**

Yunus KOÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Taha Abdulkadir ÇOBAN

**ERZİNCAN
2020**

Bu tez Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü tarafından TYL-2019-618 proje numarası ile desteklenmiştir

TEZ KABUL SAYFASI



TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak yazılan bu tezde bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin barındırdığı yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını beyan ederim.

Yunus KOÇ

İÇİNDEKİLER

SAYFA NO

TEZ KABUL SAYFASI	iii
TEZ BEYANI.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
TEŞEKKÜR	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	viii
TABLolar DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Araştırmanın Amacı	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Metanol	2
2.1.1. Metanol Etki Mekanizması.....	3
2.1.2. Metanol Zehirlenmesi.....	4
2.2. Karaciğer	7
2.2.1. Karaciğer Anatomisi ve Fizyolojisi.....	7
2.2.2. Karaciğer Histolojisi.....	9
2.2.3. Karaciğerin Fonksiyonu	10
2.2.3.1. ALT	12
2.2.3.2. AST.....	13
2.2.4. Karaciğer Hasarı	14
2.2.4.1. Alkolik Karaciğer Yağlanması	14
2.2.4.2 Alkolik Hepatit	15
2.2.4.3 Alkolik Siroz	16
2.3. Serbest Radikaller	17
2.3.1. MDA.....	19
2.4. Antioksidan Savunma Sistemleri	20

2.4.1. GSH	22
2.4.1.1. Glutasyon Biyosentezi	24
2.5. Adenozin Trifosfat (ATP)	25
2.5.1. ATP Sentezi	25
2.5.2. ATP' nin kaynakları, salınması ve parçalanması	26
3. MATERYAL ve YÖNTEM	30
3.1. Kullanılan Cihaz ve Kimyasal Maddeler	30
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	30
3.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar	30
3.2. Deneysel İşlemler	31
3.2.1. Deney Hayvanları	31
3.2.2. Deney Prosedürü	31
3.2.2.1. Deney gruplarının Oluşturulması ve Deneyin Uygulanması	31
3.2.2.2. Doku ve Kan Örneklerinin Alınması	32
3.3. Biyokimyasal Analizler	32
3.3.1. Serum ALT Analizi	32
3.3.2. Serum AST Analizi	32
3.3.3. Doku MDA Analizi	32
3.3.4. Doku GSH Analizi	34
3.4. Histopatolojik inceleme	35
3.5. İstatistiksel analiz	36
4. BULGULAR	36
4.1. Biyokimyasal Analiz Sonuçları	36
4.1.1. Serum ALT Analiz Sonuçları	38
4.1.2. Serum AST Analiz Sonuçları	39
4.1.3. Doku MDA Analiz Sonuçları	39
4.1.4. Doku GSH Analiz Sonuçları	40
4.2. Histopatoloji Bulguları	41
5. TARTIŞMA	46
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	53
KAYNAKLAR	55

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde ve tezi hazırlamam sürecinde bana her konuda yardımcı olan beceri ve deneyimlerini büyük bir özveri ile aktaran, katkılarını esirgemeyen Sayın Hocam Prof. Dr. Abdulkadir ÇOBAN 'a, en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca yardımlarını esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalında bulunan değerli hocalarım Doç. Dr. Cuma MERTOĞLU, Dr. Öğretim Üyesi Mehmet AKTAŞ ve Dr. Öğretim Üyesi Nezahat KURT'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Deneysel süreçte katkılarını esirgemeyen sayın Prof.Dr. Halis SÜLEYMAN, Prof.Dr. Murat ÇANKAYA ve Dr. Öğretim Üyesi Mehmet KUZUCU'a, Histopatolojik değerlendirmelerindeki katkılarından dolayı Dr. Öğretim Üyesi Gülce Naz YAZICI 'a teşekkür ederim.

Hiçbir zaman desteğini benden esirgemeyen eşim M. Hilal KOÇ'a ve aileme sonsuz sevgilerimle.

Yapılan bu çalışmayı TYL-2019-618 proje numarası ile destekleyen Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri (BAP) Komisyon Ofisine teşekkürlerimi sunarım.

Yunus KOÇ

SİMGELER ve KISALTMALAR

ALT: Alanin Aminotransferaz

AST: Aspartat Aminotransferaz

ALP: Alkalen Fosfataz

GGT: Gama Gultamil Transferaz

tGSH: Total Glutasyon

GSSG: Yükseltilmiş Glutasyon

GST: Glutasyon S-Transferaz

GDP: Guanozin Difosfat

AMP: Adenozin Monofosfat

GGT: Glutamil Transferaz

ADP: Adenozin Difosfat

ATP: Adenozin Trifosfat

GTP: Guanozin Trifosfat

RNS: Reaktif Nitrojen Species

K: Potasyum

Ca: Kalsiyum

Na: Sodyum

O₂^{·-}: Süper Oksit Radikali

OH[·]: Hidroksil Radikali

H₂O₂: Hidrojen Peroksidi

NO[·]: Nitrik oksit

NO₂[·]: Nitrit

NO₃: Nitrat

MDA: Malondialdehit

SOD: Superoksit Dismutaz

GPx: Glutatyon Peroksidaz

GRx: Glutatyon Redüktaz

SOR: Serbest Oksijen Radikalleri

LPO: Lipit peroksidasyonu

FAD: Flavin Adenin Difosfat

CAT: Katalaz

TCA: Trikarboksilik Asit Siklüsü

ADH: Alkol Dehidrogenaz

ALDH: Asetaldehit Dehidrogenaz

MDH: Malat Dehidrogenaz

LDH: Laktat Dehidrogenaz

NADP: Nikotinamid Adenindinükleotid Fosfat

VNUT: Vezikület Nükleotid Transporter

SLC: Solüt Taşıyıcı

TABLolar DİZİNİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan alet ve ekipmanlar	30
Tablo 4.1. ALT, AST ve AST/ALT değerleri.....	37
Tablo 4.2. Serum ALT analiz sonuçları	39
Tablo 4.3. Serum AST analiz sonuçları	39
Tablo 4.4. Doku MDA analiz sonuçları	40
Tablo 4.5. Doku GSH analiz sonuçları	41



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. Metanolün metabolizması	4
Şekil 2.2. Karaciğer anatomisi.....	8
Şekil 2.3. Karaciğerin anatomik segmentasyonu.....	9
Şekil 2.4. Karaciğerin histolojik yapısı	10
Şekil 2.5. Lipid Peroksidasyonunun Zincir Reaksiyonları	20
Şekil 2.6. Selenyum-GPx Enziminin Katalitik Döngüsü	21
Şekil 2.7. Glutatyonun yapısı	23
Şekil 2.8. Kemiozmotik Teori - mitokondride elektronların matriksten zarlar arası boşluğa geçişi ve zarlar arası bölgede proton birikimi.....	27
Şekil 2.9. ATP' nin salınım, parçalanma ve resepsiyon mekanizmaları.....	29
Şekil 4.1. Serum ALT, AST veAST/ALT değerlerinin şematik gösterimi	38
Şekil 4.3. MDA analiz sonuçları	40
Şekil 4.4. Doku GSH analiz sonuçları	41
Şekil 4.5. Sağlıklı gruptaki karaciğer dokusunda hematoksilin-eozin boyama; ➔: hepatosit, ➤ Kupffer hücre, ★ : kan damarı, x200.....	42
Şekil 4.6. Metotreksat + metanol grubunda karaciğer dokusunda hemaksilin-eozin boyama; ➔: dejenere hepatosit ➤ : Kupffer hücre, ★ : genişlemiş ve tıkanmış kan damarı, x200.	43
Şekil 4.7. Metotreksat + metanol grubunda karaciğer dokusunda hemaksilin-eozin boyama; ➔: dejenere hepatosit, ➤ : Kupffer hücre, PMNC: polimorfonükleer hücre, ★ : dilate kan damarı, x400.	44
Şekil 4.8. Metotreksat + metanol + ATP grubunda karaciğer dokusunda hematoksilin-eozin boyama; ➔: hepatosit, ➤ : Kupffer hücre, PMNC: az miktarda polimorfonükleer hücre, ★: kan damarı, x200.	45

ÖZET

Sıçanlarda Metanol ile İndüklenen Oksidatif Karaciğer Hasarına Adenozin Trifosfatın Etkisi

Giriş ve Amaç: Metanol (metil alkol), renksiz, uçucu ve metabolitleri toksik olan bir alkol türüdür. Ülkemizde, yıllar boyunca metanol zehirlenmesinin belirli bir düzeyde gözlendiği bulunmuştur. Metanolün körlükten ölüme kadar ciddi klinik sonuçları vardır. Metanol zehirlenmesinde birincil toksik faktör metabolik asidozudur. Birçok çalışmada, metanol oksidatif hasara bağlı hepatotoksisite oluşturduğu kanıtlanmıştır. Adenosin trifosfatın (ATP) iskemik doku üzerinde yapılan çalışmalarda oksidatif hasarı azaltmak için etkili olduğu görülmeye rağmen, metanol kaynaklı hepatotoksisitedeki oksidatif hasar üzerindeki etkisi hakkında bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, ATP'nin sıçanlarda metanol ile oluşturulan karaciğer hasarına karşı koruyucu etkinliğini araştırmaktır.

Materyal ve Metot: Çalışmamızda, toplam 18 adet 235-245 g aralığında Wistar albino cinsi erkek sıçanlar rastgele 3 gruba ayrıldı. Sıçanlar, sağlıklı grup (SG), metotreksat+metanol grubu (MTM) ve metotreksat+metanol+ATP (MMA) gruplarına ayrıldı. Sağlıklı gruba herhangi bir işlem yapılmadı. Metotreksatın, 0,3 mg / kg dozda gavaj ile MTM ve MMA grubuna 7 gün oral yoldan verilmesinden sonra, MTM ve MMA gruplarına 3 g / kg dozda ve aynı yoldan %20 metanol verildi. Metanol verilmesinden 4 saat sonra intraperitoneal yoldan 4 mg/kg dozda ATP enjekte edildi. ATP enjeksiyonunun dan 8 saat sonra hayvanlardan alınan kan örneklerinde serum ALT ve AST ölçümü, karaciğer doku örneklerinde ise MDA ve GSH analizleri ve histopatolojik incelemeler yapıldı.

Bulgular: ALT, AST değerleri ve AST / ALT oranı, en düşük SG da gözlenirken, MTM grubunda diğer iki gruba nazaran anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü ve MMA grubunda ise MTM grubundan daha düşük olduğu tesbit edildi. MDA, en düşük SG'da ve en yüksek MTM grubunda ölçüldü. MMA grubunda ise MTM grubundan daha düşük olduğu tesbit edildi. GSH ise en yüksek sağlıklı grupta bulunurken MTM grubunda ise MMA grubuna nazaran daha yüksek bulundu. Dokular histopatolojik olarak değerlendirildiğinde; MTM grubunda Hepatosit dejenarasyon, kupffer hücre artışı, PMNL infiltrasyonu ve damarlarda konjesyon gözlenirken, MMA grubunda ise dejeneratif etkilerin belirgin olarak azaldığı tespit edildi.

Sonuç: Elde edilen bu bulgular ışığında ATP'nin, metanol ile oluşturulan karaciğer hasarına karşı koruyucu etkisinin olduğunu, ancak klinikte bu endikasyonlarda uygulanabilirlik açısından daha çok çalışma yapılması gerektiği kanaatindeyiz.

Anahtar Sözcükler: AST, ALT, GSH, MDA, ATP, Metanol

ABSTRACT

Effect of Adenosine Triphosphate on Methanol Induced Oxidative Liver Injury in Rats

Introduction and Aim: Methanol (methyl alcohol) is a colorless, volatile and toxic type of alcohol. In our country, it has been found that methanol poisoning has been observed at a certain level over the years. Methanol has serious clinical consequences from blindness to death. The primary toxic factor in methanol poisoning is metabolic acidosis. In many studies, methanol has been proven to cause hepatotoxicity due to oxidative damage. Although adenosine triphosphate (ATP) has been shown to be effective in reducing oxidative damage in studies on ischemic tissue, there is no study on the effect of methanol-induced hepatotoxicity on oxidative damage. In this study, to investigate the protective effect of ATP against liver damage caused by methanol in rats.

Material and Method: In our study, a total of 18 Wistar albino male rats in the range of 235-245 g were randomly divided into 3 groups. Rats were divided into healthy group (SG), methotrexate + methanol Group (MTM) and methotrexate + methanol + ATP (MMA) groups. No action was taken on the healthy group. After the methotrexate was given orally to the MTM and MMA group for 7 days with a gavage of 0.3 mg / kg, 20% methanol was given to the MTM and MMA groups at a dose of 3 g / kg and in the same route. 4 hours after methanol administration, 4 mg / kg dose of ATP was injected in the intraperitoneal route. Serum ALT and AST measurement in blood samples taken from animals 8 hours after ATP injection, MDA and GSH analyzes and histopathological examinations were performed on liver tissue samples.

Results: While ALT, AST values and AST / ALT ratio were observed at the lowest SG, it was found to be significantly higher in the MTM group compared to the other two groups, and it was found to be lower than the MTM group in the MMA group. MDA was measured at the lowest SG and the highest MTM group. In the MMA group, it was found to be lower than the MTM group. GSH was found in the highest healthy group, while it was higher in the MTM group than the MMA group. When the tissues are evaluated histopathologically; While hepatocyte degeneration, kupffer cell increase, PMNL infiltration and congestion in vessels were observed in the MTM group, degenerative effects were significantly reduced in the MMA group.

Conclusion: In the light of these findings, we believe that ATP has a protective effect against liver damage caused by methanol, but more studies should be done in terms of applicability in these indications in the clinic.

Key Words: AST, ALT, GSH, MDA, ATP, Methanol

1. GİRİŞ

1.1. Araştırmanın Amacı

Metanol, endüstriyel üretimde kullanılan renksiz, kokusuz, toksik bir alkol türüdür (1). Günümüzde metanol zehirlenmesi genellikle sahte içki kullanımları veya intiharlarda görülür (2). Metanol görme bozuklukları, serebral enfarktüs ve ölüme neden olabilir. Metanolün deneysel olarak karaciğer dokusunda ciddi oksidatif hasara neden olduğu gösterilmiştir (3). Metanolün vücuttaki alkol-dehidrojenaz tarafından toksik olan formaldehit ve formik aside metabolize olduğu birçok çalışmadan bilinmektedir (4). Formik asit, mitokondriyal solunum zincirindeki sitokrom oksidazı inhibe ederek serbest oksijen radikallerinde (SOR) ve hücre ölümünde artışa neden olur. Dokudaki SOR artışı, lipid peroksidasyonu ve malondialdehit (MDA) gibi toksik ürünlerin oluşumuna yol açar (5). Metanol zehirlenmesi hücrelerde hipoksi oluşturmaktadır (6). Dokuya gelen kan akımının kesilmesi veya azalması ile hücresel oksidatif fosforilasyon ve hücrede adenosin 5'-trifosfat ve fosfokreatin gibi yüksek enerjili fosfat sentezi azalır. Bu olay, hücrede enerji depolarının boşalmasına ve hücre membranında bulunan Na^+, K^+ -ATP az pompasının inhibisyonuna yol açar. ATP az pompa inhibisyonu, hücre içinden Na^+ ve Ca^{2+} iyonlarının hücre dışına geçişini durdurur ve intraselüler Na^+ ve Ca^{2+} iyon konsantrasyonları artar (7). Glutatyonun (GSH) biyosentezi, γ -glutamil sisteinil sentetaz ve glutatyon sentetazın katalizlediği reaksiyon sonucunda ATP'ye bağımlı olarak gerçekleşir. Kumbasar ve arkadaşları ATP'nin iskemili dokuda oksidan oluşumunu azalttığını ve iskemik hasarı önlediğini ortaya koymuşlardır (8).

ALT enzimi karaciğerde diğer dokulara oranla daha fazla miktarda bulunması

karaciğer hasarlarında önemli bir belirteç olarak kullanılmaktadır (9,10). AST enzimi genellikle yumuşak dokularda daha fazla bulunması nedeni ile (kalp kası, iskelet kasları ve karaciğerde yüksek oranda; böbreklerde ve eritrositler daha az) serumda yüksek oranda tespiti edilmesi yumuşak doku hasarının bir göstergesi olarak kabul edilebilir (11).

Bu çalışmada, metanol'e bağlı hepatotoksisitede oluşan oksidatif hasarı, hem serum AST, ALT düzeylerine ve karaciğer MDA, GSH düzeylerine bakarak hem de karaciğer doku örneklerinde patolojik bulguları inceleyerek belirlemek, sıçanlarda oksidatif stres ile açıklanan alkolik akut karaciğer hasarına, ATP'nin koruyucu etkinliğini araştırmak amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Metanol

Metanol, rengi ve kokusu olmayan oda ısısında sıvı olarak bulunan bir maddedir. 1930 yılına kadar odundan üretildiği için odun alkolü olarak da isimlendirilir (12). Günümüzde sentetik olarak karbonmonoksidin katalitik redüksiyonu ile elde üretilmektedir (13). Metanol çözücü ve miyar özelliğine sahip kimya endüstrisinde de sıklıkla kullanılan bir maddedir (14, 15). Kronik alkoliklerin içerisinde alkol bulunan her şeyi içme istekleri olması sebebiyle metanol içeren ürünleride içebilir ya da kişiler normalde metanol içermemesi gereken alkollü içecekleri yasal olmayan yollarla metanol kullanarak hazırlayıp piyasaya sürmeleri sonucu zehirlenmelere sebep olurlar. Akut metanol zehirlenmesi epidemik ya da sporadik olarak görülebilir ve zehirlenmelerin geneli ölümle sonuçlanır (16, 17).

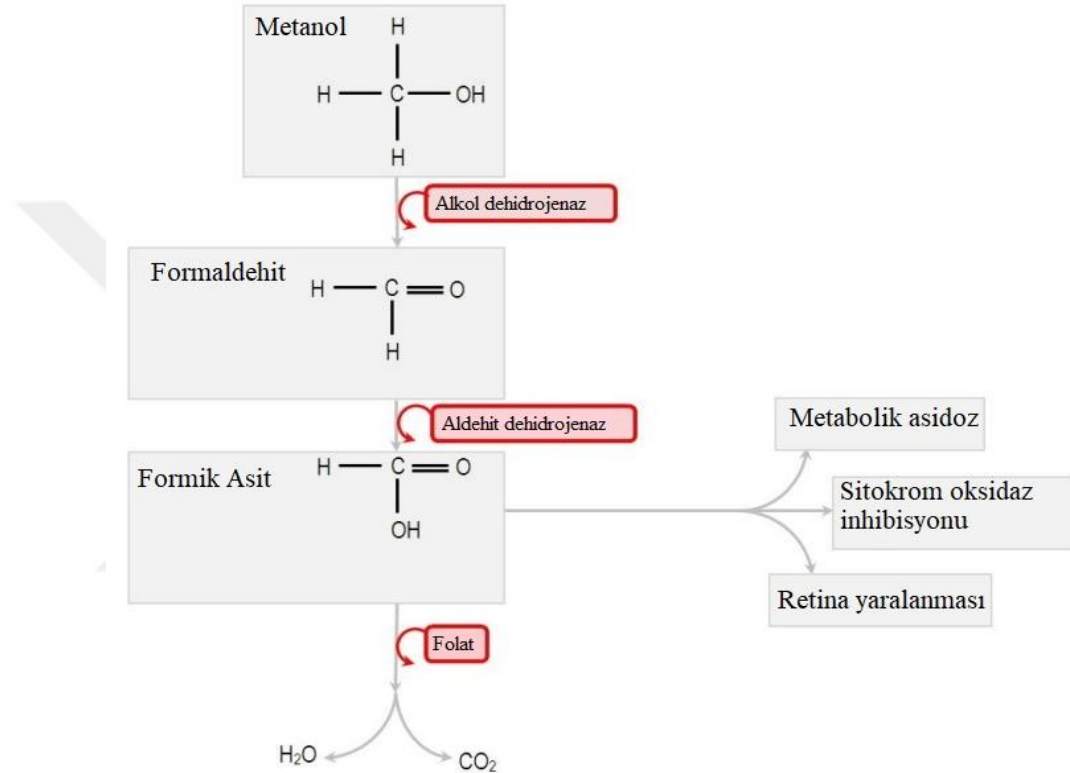
Normalde metanol kendisi zehirli değildir, metanolün toksik özelliği metabolitleri olan formaldehit ve formik asit aracılığıyla oluşur (12, 18). Oral yoldan alındığında etil alkol gibi gastrointestinal sistemden hızlıca emilir (12, 15). Plazmada pik konsantrasyon düzeyine 30-60 dakika içinde ulaşmasına rağmen, metanol alınmasından sonra yakınmaların olmadığı sessiz bir dönem vardır. Bu dönem methanol alımını takiben 40 dakika ile 72 saat arasında değişir. Metanolün formaldehite ağır ağır metabolizasyonu nedeniyle bu semptomsuz dönem görülür (19, 20). Semptomsuz dönem sonunda tipik olarak baş ağrısı, baş dönmesi, görme bozuklukları ve konfüzyon ortaya çıkar. Daha ileri zehirlenmelerde beyin ödemi ve buna bağlı olarak koma ve konvülsiyon görülür (12, 21).

2.1.1. Metanol Etki Mekanizması

Metanol, ağızdan alımda, etil alkol gibi gastrointestinal sistemden hızla emilir (22). Yıkımı nitelik olarak etil alkole benzer ancak etil alkolden çok yavaştır. Midede gıda varlığı ya da yokluğuna göre değişmek üzere, kandaki düzeyi ağızdan alımı takiben ortalama 30-60 dakika sonra en üst düzeye ulaşır (23). Gıda ile beraber alınması emilimi yavaşlatır. Oldukça homojen bir şekilde dokulara dağılır, 0,6 L/kg dağılım hacmine sahiptir. (22).

Metanol'ün yıkımı karaciğerde NAD/NADH katalizörlüğünde alkol dehidrogenaz enzimi etkisiyle formaldehide okside olmasıdır (24). Metanolün metaboliti olan formaldehit metanolden 33 kat daha zehirlidir. Formaldehitin yarılanma ömrü 1-2 dk gibi çok kısa bir süre olduğu için metanolden 6 kat daha fazla toksik olan formik aside dönüşümünde çok kısa bir sürede gerçekleşmiş olur. Formik asitin vücuttan uzaklaştırılması folata bağlı enzimlerin yardımıyla CO₂ ve H₂O'ya

dönüştürülerek gerçekleştirilir. Metanolün karaciğerdeki yıkımı dışında %12'si böbreklerden idrar ile %3-5'i akciğerlerden solunum yoluyla atılır. Metanolün hafif zehirlenmelerde yarılanma ömrü 14-20 saat, tedavi edilmeyen şiddetli zehirlenmelerde 24-30 saattir, etanol tedavisi yapılması ile 30-35 saate uzatılabilirken diyaliz ile ise 2,5 saate düşürülebilir (14, 25).



Şekil 2.1. Metanolün metabolizması

2.1.2. Metanol Zehirlenmesi

Metanol'ün metabolitleri olan formaldehit ve formik asit oldukça reaktiftirler, doku proteinlerine kolaylıkla bağlanıp sitokrom oksidaz sistemini inhibe eder oksidatif mekanizmayı etkilerler (26, 27). Önceleri metanolün toksisitesinden daha çok formaldehitin toksisitesi sorumlu tutulmuştur (28). Günümüzde ise göz bulgularından ve metabolik asidozdan esas olarak formik asidin sorumlu olduğu gösterilmişse de, metanol kullanmış 26 karaciğerde yapılan çalışmada NAD/NADH oranlarının

düşmesi ile birlikte laktik asit oluşması ve asidoza katkıda bulunması etken olarak öne sürülmüştür.

Metabolik asidozun şiddeti formik asit düzeyi ile doğru orantılı olup, göz bulgularını ve mortaliteninde metabolik asidoz derecesiyle doğru orantı gösterdiği saptanmıştır (29).

Metanolün insanlardaki ölümcül dozu net olarak bilinmemekte, ancak öldürücü olan doz sınırlarının oldukça geniş olduğu bilinmektedir. Genel olarak kabul gören en az ölümcül doz 1-2 ml/kg, 50-100 ml ya da 80 mg/dL'dir. Ancak %40'lık metanolden ağızdan sadece 15 ml alınması (ya da 6 g saf metanol) ile de ölüm bildirilmiştir. Diğer yandan %40'lık metanolden 500-600 ml gibi yüksek oranda alınmasıyla bile ölüm ya da körlüğe yol açmadığı olgularda yayınlanmıştır. Körlükle sonuçlanmış bildirilen en az toksik doz 4 ml'dir (30, 31).

Metanol almadan önce etanol alınması ya da ikisinin birlikte alınması toksisiteyi oluşturan metanol dozunu etkilediği gibi folat eksikliğinin de toksisiteyi oluşturan metanol dozunu etkilediği görüşü vardır. İnsanlarda minimum toksik doz sınırının genişliğini bu gibi durumlar ile açıklamak mümkündür (32). Ülkemizde yapılan çalışmalarda da metanol'ün ölümü meydana getiren doz sınırı 50-600 mg/dl, 50-500 mg/dl, 50-755 mg/dl, 42-755 mg/dl ve 50- 500 mg/dl gibi oldukça geniş bulunmuştur. Olguların %80-90 gibi büyük bir bölümünü erkek ve en fazla 30-40 yaşları arasındadır (18).

Akut zehirlenmelerde yaklaşık olarak 24 saat (40 dakikadan 72 saat'e kadar uzayabilir.) süre ile hiçbir semptomun görülmediği sessiz bir periyod vardır (33, 34). Metanolün formaldehite yavaş metabolizasyonu sebebiyle bu semptomsuz dönem görülmektedir. Belirgin metabolikasidoz ve tipik görme bozuklukları bu dönem

sonunda gelişir ve tedavi edilmediği takdirde ölümle sonuçlanır.

Metabolik asidoz metanol zehirlenmesinde primer toksik faktördür. Sarhoşluk bu tip zehirlenmelerde önemli bir semptom değildir. Metanol zehirlenmelerinde hedef organ retinadır (14). Metanolün yüksek dozları geri dönüşümü olabilen ya da kalıcı olarak körlüğe yol açabilir. Oküler toksisiteden formik asidin sorumlu olduğu düşünülür, optik sinirde sitokrom oksidazı inhibe ederek aksoplazma akımını bozmaktadır. Göz semptomları arasında görme bulanıklığı, gözde ağrı, fotofobi, görüş alanında daralma, kar yağdı manzarası sayılabilir. Genellikle yapılan göz muayenelerinde, pupillada genişleme ile birlikte ışık reaksiyonu ve akomodasyonda azalma veya kayıp görülür. Tedavisi yapılmamış zehirlenme vakalarında fundoskopik bakıda, optik diskte hiperemi ya da belirgin ödem ve pupilla kör noktada genişleme görülebilir. Ölümden önce özellikle körlük ortaya çıkmaktadır.

Çok yaygın olmayan karın ağrısı, bulantı, kusma, halsizlik gibi semptomlar da görülebilir. Mideye doğrudan iritan etkili olan metanol hemorajik gastrite sebep olabilir. Bazı vakalarda görülen serum amilaz yüksekliği, karın ağrısına sebep olan pankreatit de olabilir. Bu durum otopsi çalışmalarında gösterilen pankreatit olgularıyla doğrulanmıştır. Belirgin asidoz olan olgularda Kussmaul solunum ile birlikte hiper ventilasyon görülebilir. Halsizlik, yorgunluk hissi başağrısı, görülebilen diğer genel semptomlardır. Merkezi sinir sistemi depresyonu kısmen ikinci planda kalmaktadır. Nörolojik semptomlar geniş spektrumludur (22, 32).

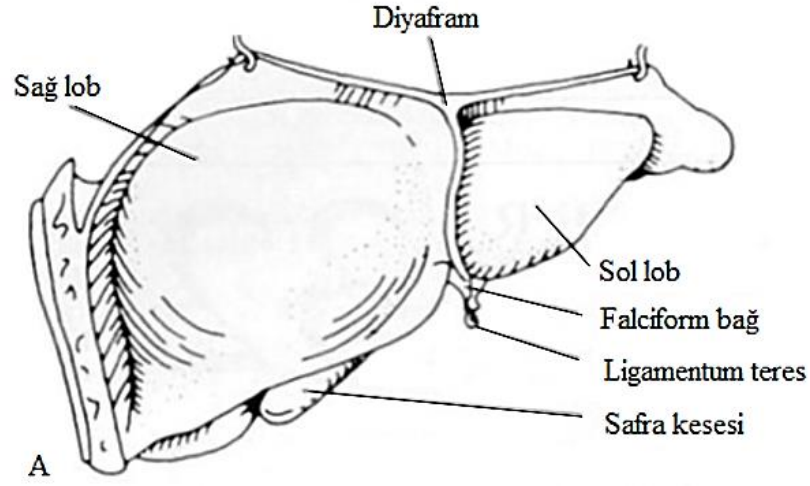
Konvülziyonlar, ayakların yerden kesilmesi hissinden komaya kadar değişebilir. Hipotansiyon, miyokard depresyonu ve bradikardi gibi semptomlar zehirlenmenin şiddetinin işaretleridir. İntrakranyal kanamayla ilgili olarak ense sertleşme ve meningeal belirtilerde görülebilir (22, 32).

2.2. Karaciğer

2.2.1. Karaciğer Anatomisi ve Fizyolojisi

Karaciğer, karın boşluğunun üst bölümünde bulunan, vücudun salgı yapan en deriden sonra en büyük organıdır. İki ana loptan oluşan ve yaygın bir damar ağına sahip organdır. Sağ lop sol loba oranla daha büyüktür. Hepatik hücrelerden oluşmaktadır. Karaciğere, hepatic arter ve hepatic portal ven girer, hepaticven safra kanalına çıkar (35).

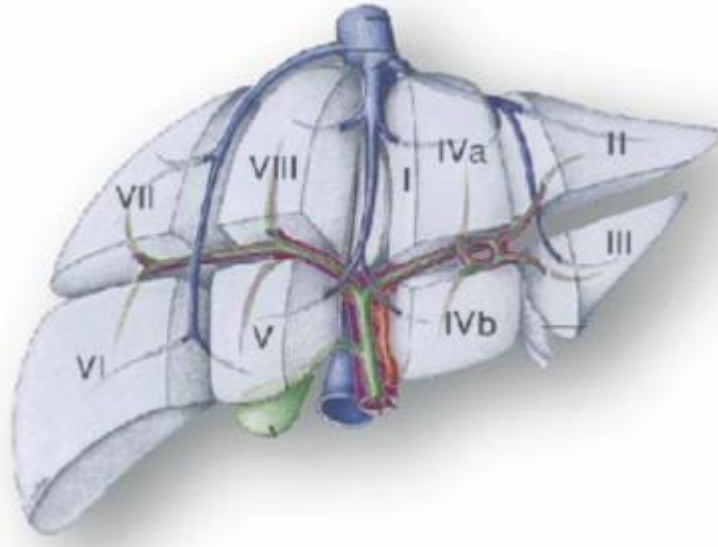
Karaciğer, yerleşim olarak sağ tarafta bulunur dört ile altıncı interkostal aralıktan uzanarak midklaviküler hat boyunca kostal arka kadar devam eder. Inferiorunda duodenum, sağ böbrek, sağ sürrenal bez, transvers kolon, bulunur medialde ise mide ve özofagus ile komşuluk eder. Üst tarafında ise diafragma bulunur. Karaciğer vücudun deriden sonraki insanların en büyük organıdır ve 1400-1600 gram ağırlığa sahiptir. Yeni doğan bebeklerin yetişkinlerden farklı olarak vücutlarına oranla daha büyüktür. Glisson kapsülü diafragmaya yapışıktır ve iki yaprağa ayrılarak karaciğeri örtmektedir, bu iki yaprak anteriorkoronar ligament ve posterior koronar ligamentler olarak adlandırılır. Anterior koronar ligament ve posterior koronar ligamentli sağda ve solda triangüler ligamentleri oluşturur ve falsiform ligament bu ligamentlerin önde birleşmesiyle meydana gelir. Oblitere sol umbilikalvenin oluşturduğu ligamentum teres hepatisin alt kısmında bulunur (Şekil 2.2). Karaciğer, ön karın duvarına ve diafragmaya falsiform ligament, lig. Tereshepatis ve koronar ligamentler ile bağlanır. Koledok, hepatic arter ve vena porta hepatoduodenal ligament içinde bulunur (36).



Şekil 2.2. Karaciğer anatomisi (37).

Safra kesesi dorsal yüzde yer alır. Karaciğer falciform ligament ile sağ ve sol lob olarak ikiye ayrılır. Sağ lob daha büyüktür.

Alt yüzde bulunan kuadrat lob, sol tarafında umbilikal fissür, sağ tarafında safra kesesi yatağı ve arka portaltriadın çevrelediği dikdörtgen bölümdür. Kaudat lobun yeri ise inferior vena kava'nın karaciğer üzerindeki impresyonu ile solda falciform ligamentin posterior uzantısı arasındadır (Şekil 2.3). Karaciğer sekiz segmente ayrılmıştır segmentlere ayrılırken anatomi, cerrahi portal pediküllerin dağılımı ve bunların hepatik venler ile olan ilişkisi, arteriyel anatomi ve safra yolları göz önüne alınmıştır (38).



Şekil 2.3. Karaciğerin anatomik segmentasyonu (38)

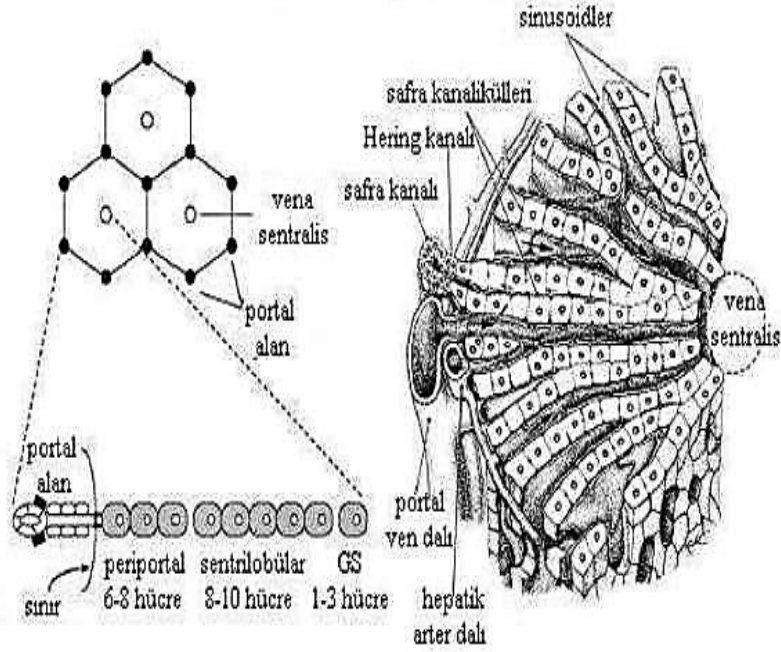
Sol lobu I, II, III, IV. segmentler oluşturur. Sağ lobu V, VI, VII, VIII. segmentler oluşturur. IV. segmenti II. ve III. Segmentlerden ayıran Lig. Falciforme ve Lig. Teres'dir. (38).

2.2.2. Karaciğer Histolojisi

Karaciğer dokusunu üç ana hücre grubu oluşturmaktadır. Bunlar kupffer hücreleri, biliyer epitel hücreler ve hepatositlerdir. Karaciğer 50.000-100.000 arasında değişen anatomik ünitelerden oluşur. Her bir lobül santral ven etrafında silindirik olarak sıralanmış hepatositlerden oluşur. Lobülün etrafında dört ile beş portal yol yer almaktadır. Portal yollarda portal venüller, hepatik arteriyoller, safra kanalcıkları, lenfatikler ve sinirler vardır (Şekil 2.4).

Karaciğer lenfi, hepatositler ile sinüzoidlerin endotel tabakası arasındaki disse aralığı denilen kısımda oluşur. Disse aralığına yerleşmiş yıldızlı hücreler yağ depolayıcı hücrelerdir. Endotel tabakası hücreleri arasında bulunan kupffer

hücrelerinin aktif fagositoz görevi bulunur (39).



Şekil 2.4. Karaciğerin histolojik yapısı (40)

2.2.3. Karaciğerin Fonksiyonu

Karaciğerin fonksiyonları; kan dolaşımı, karbonhidrat metabolizması, dışa atış ile ilgili fonksiyonları, yağ metabolizmasındaki etkinliği, protein metabolizması, hematolojik ve diğer fonksiyonlar olmak üzere 7 grupta toplanabilir (41).

1. Kan dolaşımı ile ilgili fonksiyonları; kanın depo edilmesi, kanın portal dolaşımdan sistemik dolaşıma geçmesi, retikulo endotel sistem ile bağışıklık mekanizmasının oluşması, toksik maddelerin arınması ile ilgilidir.

2. Dışa atışla ilgili fonksiyonları; safra oluşumu, bilirubin türevleri gibi ürünlerin safra içine geçişi ve safranın barsak içine boşaltılması safra tuzları, kolesterol, ağır metaller, alkalin fosfataz gibi bazı maddelerin safra ile birlikte, dışarı atılmasını içerir.

3. Karbonhidrat metabolizmasındaki fonksiyonları; glikojenin yapımı ve

depolanması fruktozun ve galaktoz glikoza dönüştürülmesi, aminoasitlerin glikoza dönüştürülmesi (glükoneogenesis), glikojenden glikoz oluşumu (glükogenoliz), karbonhidrat metabolizmasındaki birçok önemli kimyasal bileşiklerin yapımı ve kan glikoz seviyesinin düzenlenmesi ile ilgilidir.

4. Protein metabolizmasında; aminoasitlerin deaminasyonunu (enerji için proteinlerin azot gruplarının ayrılması), yağlardan lipoproteinleri oluşturmak için gerekli lipotropik faktörün sağlanmasını, plazma proteinlerinin üretimi, üre yapımını (NH_3 -üre), birçok aminoasidin birbirine veya diğer öğelere dönüştürülmesi (aminasyon, transaminasyon, esansiyel olmayan aminoasitlerin ve pirimidin, pürin gibi moleküllerin sentezi) sağlar.

5. Yağ metabolizmasında; yağların taşınabilir hale gelmesinde (lipoproteinlerin yapımı), yağ asitlerinin asetoasetik aside oksidasyonu ile asetil COA'ya dönüştürülmesi ve böylece krebs çemberinden enerji sağlanmasında, fosfolipit ve kolesterol yapımında, safra tuzlarının yapımında, proteinlerin ve karbonhidrat yağa çevrilmesinde fonksiyonları vardır.

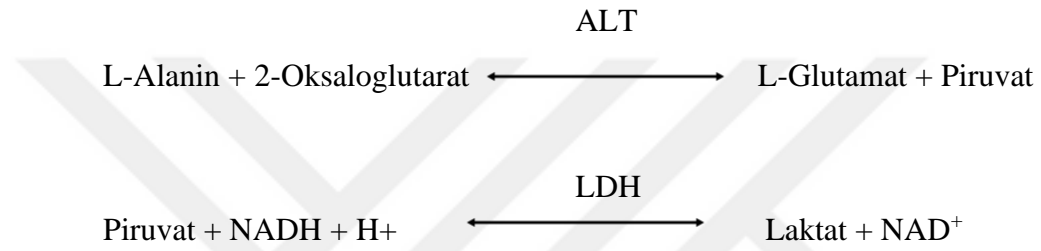
6. Hematolojik fonksiyonları; embriyoda ve yetişkinlerde kan yapımı, heparinin, fibrinojen, globulin, protrombin, üretimi, demirin ferritin olarak depolanması ve eritrosit yıkımı ile ilgilidir.

7. Bunların dışında, vitamin depolar (A, D, B12 ve diğer B vitaminleri, K vitamini), karotenden A vitaminini üretimini sağlar. Toksik maddeleri (çeşitli ilaçlar gibi) kan dolaşımından çıkararak detoksifikasyon yapar, barsaktan vena-porta yolu ile emilerek kana karışan amonyağın ortamdan uzaklaştırılmasını ve steroid hormonların vücut dışına atılmasını sağlar (42).

2.2.3.1. ALT

Alanin aminotransferaz, (ALT) veya eski terminolojide bir diğer adıyla eski serum glutamik pirüvik asit transaminazdır (SGPT). Bu enzimin glukoz ve protein metabolizmasında önemli rolü vardır. Karaciğer ve böbreklerde bulunmaktadır, ancak karaciğerde daha yüksek miktarda bulunmaktadır.

ALT, alanin ve alfa ketoglutarattan glutamik asit ve piruvatın sentezlendiği geri dönüşümlü transaminasyon reaksiyonunu katalizler (43).

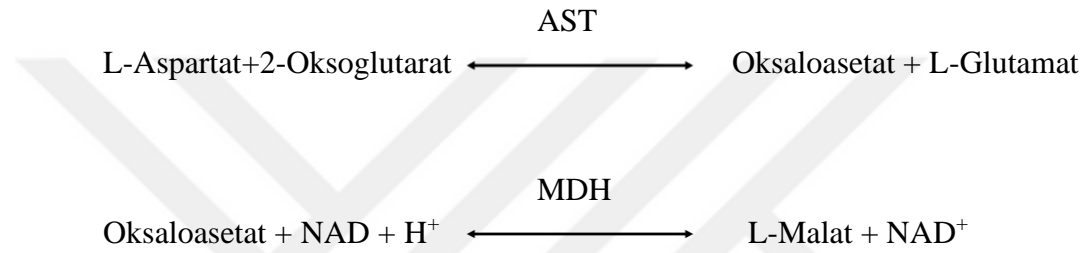


ALT'nin iki izoenzim mevcuttur bunlar ALT1 VE ALT2 olup ALT aktivitesinde ALT1'in aktivitesi ALT2' ye göre daha fazla olduğu düşünülmektedir. ALT1 sitoplazmik yerleşimli protein olup ALT2 ise mitokondriyal yerleşimli proteindir (44).

ALT'nin karaciğerde diğer dokulara oranla daha fazla miktarda bulunması ALT enziminin karaciğer hastalıklarında önemli belirteç olarak kullanılmasının nedenidir. Karaciğer hasarı, kan serumunda ALT seviyesinin yükselmesine sebep olmaktadır (9, 10). Herhangi bir tip karaciğer hücrelerindeki hasar serum ALT miktarını orta derecede yükseltebilir. ALT seviyesinde 300 IU/L ye kadar yükselmesi nonspesifik olarak kabul edilirken, 500 IU/L'den daha fazla olan belirgin yükseklikler ise daha çok iskemik karaciğer hastalığı, viral hepatit, toksik karaciğer hastalığı gibi hastalıklarda görülmektedir (45).

2.2.3.2. AST

Aspartat aminotransferaz (serum glutamik oksal asetiktransaminaz) (AST), eski terminoloji de (SGOT); karaciğer, böbrek, miyokard, iskelet kası, pankreas, beyin, akciğer, eritrosit ve lökositlerde bulunan bir enzimdir. AST, aspartik asitin alfa amino grubunu alfa ketoglutarata aktararak oksaloasetik asit ve glutamik asit oluşumuna neden olmaktadır. Bu reaksiyon için gerekli kofaktör ise B6 vitamininin aktif metaboliti olan piridoksal-5-fosfattır (46).



AST'nin hepatositlerde, %80'i mitokondri ve %20'si sitozolde bulunurken ALT'nin ise yalnızca sitozolde bulunmaktadır. Ağır karaciğer hasarlarında hem sitozol hem de mitokondrideki enzimler seruma geçerken, hafif karaciğer hasarında ise yalnızca sitozoldeki enzimler seruma geçer. Akut olaylarda ALT artışı AST artışından fazla olurken kronikleşmesi durumunda, AST artışı ALT artışından daha fazla olur. Sirozda ise AST artışı ALT'den daha fazladır (47).

Yumuşak dokularda AST'nin genellikle daha fazla bulunması nedeni ile (kalp kası, iskelet kasları ve karaciğerde yüksek oranda; böbreklerde ve eritrositler daha az) serumda yüksek oranda tespiti edilmesi yumuşak doku hasarının bir göstergesi olarak kabul edilebilir (11).

2.2.4. Karaciğer Hasarı

2.2.4.1. Alkolik Karaciğer Yağlanması

Alkole bağlı oluşan karaciğer hasarının birinci aşamasıdır, en sık rastlanan ve geri dönüşü olan karaciğer hasarı mevcuttur. Alkoliklerin büyük bir çoğunluğunda yağlı karaciğer mevcuttur. Aşırı miktarda alkol alımı sonrası saatler içinde bile gelişebilir. Alkol alımı sonucu oluşan karaciğer yağlanmalarında genellikle makro veziküler yağlanma görülür. Kliniği genellikle hiçbir semtom göstermeden seyreden en yaygın bulgu hepatomegalidir (%90). Laboratuvar analizlerinde hafif ALT, AST, GGT, alkalin fosfataz (ALP) yüksekliği görülebilir. Klinik seyri iyi olup alkol kullanımının bırakılmasından sonra kendiliğinden düzelme gözlenir. Transaminazlar normal veya hafif yüksek olabilir. Karaciğer fiziki muayenede yağlanmaya bağlı büyümüştür. Biyopside karaciğer hücrelerinde yağ birikmesi dışında bir bulgu yoktur. Eğer karaciğerde yağlanmayla beraber iltihabi hücreler de mevcutsa o zaman “steatohepatit” gelişmiş demektir.

Alkole bağlı gelişen yağlı karaciğer hastalığı genellikle iyi huylu ve alkol tüketimi bırakılınca geri dönüşümlü bir durumdur. Alkol alımı, karaciğerde steatozdan siroza varan çeşitli histopatolojik değişikliklere sebep olabilir. Alkolik hepatit, Steatoz bazen siroz geri dönüşümlü olabilir. Alkolik yağlı karaciğerde tanı, nadiren klinik olarak konulabilir. Çünkü hastaların çoğunda semptom görülmez ve medikal ilgi aramaz. Sadece hafif gergin hepatomegali görülebilir. Karaciğer testleri genellikle normal sonuç verir veya hafif şekilde yükselme olur, sarılık genelinde bulunmaz. Yağlı karaciğer, basit bir içki alımı sonrası gelişebilir ve hepatite ilerlemesi önceden belirlenemez (48, 49).

2.2.4.2 Alkolik Hepatit

Karaciğerin, alkolün toksik etkisiyle iltihaplanmasıdır ve alkole bağlı oluşan karaciğer hasarının ikinci evresidir. Alkoliklerin tamamı hayatları boyunca en az bir kez bu hastalığı geçirirler. Alkolik hepatitte semptom ve bulguları kişiden kişiye farklılık gösterir. Bir yanda semptom göstermeyen, sadece tesadüfî olarak yapılan testlerde karaciğer enzimlerinde anormallik görülen ve alkol alımı kesilince tamamen geri dönüşümlü olan bir durum, diğer yanda ateş, bulantı, karın ağrısı, kusma gibi belirtilerle ciddi karaciğer hasarı veya karaciğer yetmezliği tablosuyla karşımıza çıkabilir. Bu nedenle acil servise ya da polikliniğe bulantı, kusma, ateş, karın ağrısı şikâyetleriyle gelen hastalarda, alkol alımı öyküde mutlaka sorgulanmalıdır. Bu hastalardan %20 ila %50'si alkolik hepatit atağına bağlı olarak hayatını kaybeder. Hayatını kaybetmeyenler ise 6 aya kadar tamamen iyileşirler. Ancak yaşamları boyunca muhakkak alkolden uzak durmaları gerekmektedir.

Alkolik hepatiti olan hastalarda, geri dönüşümü olmayan karaciğer sirozu gelişmiş olabileceği unutulmamalıdır. Bu nedenle karaciğer biyopsisi yapılması siroza gidişatı görmek bakımında son derece önemlidir. Alkolik siroz, alkole devam eden alkolik hepatitli hastalarda hastalıklarının başlangıcından itibaren 10 yıl içinde gelişir. Alkolik hepatitin tanısı hem klinik hem patolojik kriterlerle yapılır. Tanıda klinik ve laboratuvar bulguları yeterli olmakla birlikte karaciğer biyopsisi ile de tanı konulabilmektedir.

Hastanın tıbbi öyküsü dikkate alındığında özellikle alkol alımının miktarı ve süresi, potansiyel olarak hepatotoksik ilaç kullanımı, hepatit B veya C için muhtemel risk faktörlerinin varlığı ve hastanın fizik muayenesi daha önce var olan karaciğer hastalığı hakkındaki bilgi verir. Alkolik karaciğer hastalığının bütün tiplerinde

laboratuvar bulgularına ek olarak, alkolik hepatit, tipik olarak gama glutamiltransferaz (GGT), serum alkalenfosfataz (ALP) seviyelerinde artış ve hiper bilirubinemi ile ilişkilidir. Transaminaz konsantrasyonları normale geldikten sonra bile bu değişiklikler haftalarca devam edebilir. Alkolik hepatitin karakteristik bulguları; sarılık, ateş, hepatomegali ve iştahsızlıktır. Ateş orta derecededir (38.3°C'den düşük) ve diğer sebepler [pnömoni, spontan bakteriyel peritonit (SBP), üriner sistem enfeksiyonu vb.) olmadığına emin olana kadar sadece alkolik hepatite bağlanamaz. Sıklıkla karaciğerin yağlanması ve hücre hasarından dolayı, hepatositlerin nonsteatotik şişmesinin kombine etkilerinden hepatomegali oluşur (50).

2.2.4.3 Alkolik Siroz

Alkolik karaciğer hastalıklarının son noktası sirozdur. Yaklaşık olarak alkoliklerin %15'inde gelişir. Alkole bağlı yağlı karaciğer yağlanması bulunan birçok hasta alkolü alımını bırakmasına rağmen siroz gelişmeyebileceği gibi, ilk doktor muayenesinde siroz tanısı konan kronik alkolik hastalar da mevcuttur. Karaciğer hasarının belirmesinde, enzimatik sistemlerin aktivitesinin kişiden kişiye farklılıklar göstermesi sebebiyle alkolün değişen etkileri ve bunun sonucunda oluşan toksik metabolitler ile açıklanabilir. Alkolik sirozlu hastalarda sinüzoidler çevresinde ve terminal hepatik ven çevresinde (perivenüler fibrozis) kollajen birikimi tipiktir. Bu durum alkolik siroz dışında çok seyrek görülür.

Parankimde gelişen rejenerasyonun süre alkol alınması sonucu baskılanır ve sonuç olarak rejeneratif nodüller fazla büyümeyenler (mikro nodüler siroz). Alkol yoksunluğunda ise makro nodüler görünüm oluşur. Alkolik sirozun özellikleri, sirozun diğer sebeplerinde görülenlere büyük ölçüde benzemekle birlikte etkilenmiş hastalarda

alkolik hepatitin özellikleri de görülebilir.

Hepatomegali, telenjiektazi, ikter, periferik vazodilatasyon (şarapçı yüzü), delirium tremens, denge ve oryantasyon bozukluğu gözlenirken özellikle sirozlu hastalarda dupuytren kontraktürü, parotid bezinde büyüme ve feminizasyon bulguları (jinekomasti vs.) daha ön planda görülen bulgulardır. Alkolik siroz görülen hastalarda alkolik hepatitteki AST/ ALT değişimi saptanamayabilir ve tanıda bu ayrıma dikkat edilmelidir. Hematolojik anormallikler, sarılık, GGT artışı ve kronik karaciğer hastalığının klasik bulguları ile birlikte görülebilir (49).

2.3. Serbest Radikaller

Radikal (veya serbest radikal), biyolojik sistemlerde elektron kabul eden veya dış orbitallerinde paylaşılmamış elektron içeren moleküller diye adlandırılır (51, 52). Dış orbitallerinde bir veya daha fazla paylaşılmamış elektronun bulunduran herhangi bir atom veya molekülün reaktivitesini artırır. Oksidan, serbest radikallerin aktif oksijen türevlerine denir. Oksidanlar hedef moleküllerden elektron alma yeteneklerine sahiptirler oksidanları bu yetenekleri ile hedef molekülün yapısını ve fonksiyonlarını değiştirir, DNA, ribonükleik asit (RNA) gibi genetik materyali, değişik enzimatik olayları ve hücre zarını etkileyerek hücre hasarlarına sebep olduğu bilinmektedir (53). İntrasellüler normal metabolizma sonucu oluşan ve ekstrasellüler olarak ise iyonize radyasyon, UV radyasyon veya kısaca ksenobiyotik etkiler sonucunda hücreler sürekli olarak serbest radikal türlerinin maruziyeti altındadır. Serbest Oksijen Radikalleri (SOR) oksijenden oluşan serbest radikallere denir. Başlıca, süper oksit radikali (O_2^-), hidroksil radikali ($OH\cdot$) hidrojen peroksidi (H_2O_2)'yi bulundurur. Reaktif Nitrojen Species (RNS) ise nitrojenden oluşan serbest radikallere denir (54). Nitrik oksit ($NO\cdot$),

nitrit (NO_2^-) ve nitratı (NO_3^-)'ı başlıca RNS türleri arasında sayabiliriz. DNA, lipid ve proteinleri SOR ve RNS'nin hücre içi oksidatif modifikasyon yapacağı hedefler arasında sayabiliriz (56). Bunun yanı sıra bu modifikasyonların sırası ise; oksitlenecek molekülün bağıl yeteneği, SOR'nin üretim yeri ve metal iyonlarının varlığı gibi birkaç faktöre de bağlıdır. SOR ve diğer serbest radikallere karşı hücrelerde birçok savunma sistemi vardır. Bu savunma sistemlerinden en basiti düşük molekül ağırlıklı antioksidan moleküllerdir (vitamin E ve vitamin C gibi). Kendi kendine reaktif hale gelmiş az reaktif radikaller olan bu moleküller hücrel biyomoleküllere karşı zararı önlerler (54, 55).

Daha kompleks yaklaşımları içeren Glutasyon Peroksidaz (GPx), Süperoksit Dismutaz (SOD), Katalaz (CAT) gibi enzimler ise SOR'nin miktarını yavaş bir şekilde sınırlandırır. Oksijen, biyolojik sistemlerin en büyük radikal kaynağıdır. Orbitallerinde iki eşleşmemiş elektrona sahip olması oksijenin diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girmesini, radikal olmayan maddelerle ise daha yavaş reaksiyona girmesini sağlar. Oksijen atomunun orbitallerindeki elektronların diziliminin farklı olması ile de peroksit, süperoksit ve singlet oksijen gibi radikallerin oluşumuna neden olur. Ayrıca oksijenin kendisi, hidrojen peroksit, süperoksit, hidroksil radikalleri ve geçiş metal iyonları serbest oksijen radikali oluşumunun anahtar maddeleri arasında yer almaktadır. Aerobik (Oksijenli) solunum yapan canlılar dışarıdan aldıkları besin maddelerinden enerji üretmek için oksijen kullanırlar. Dolayısıyla serbest radikallerin en fazla olduğu canlılar aerobik solunum yapan canlı grubudur. Bu yüzden serbest radikallerin etkilerine aerobik solunum yapan canlılar daha fazla maruz kalırlar (56, 57).

2.3.1. MDA

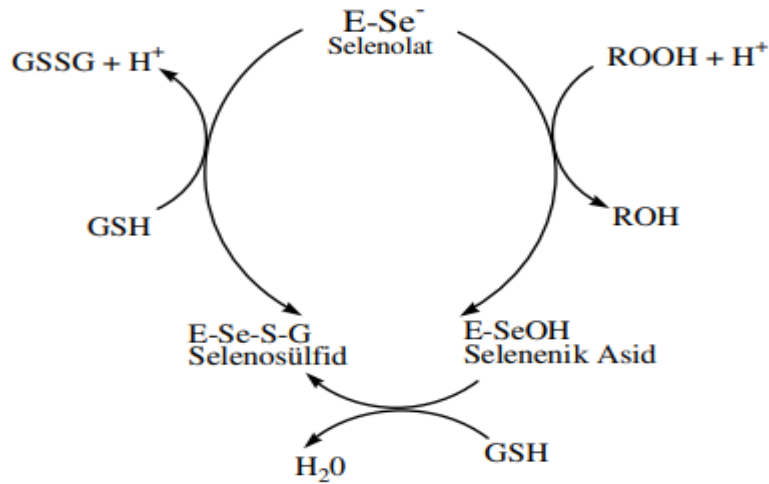
Normal metabolizma sonucu ya da patolojik olaylar sonucu ortaya çıkan serbest radikaller, hücre ve dokularda birçok ziyana yol açmaktadır. Serbest oksijen radikalleri, lipid, protein ve nükleik asit gibi biyomolekülleri etkileyerek oksidatif hasara yol açar; bu biyomoleküllerin oksidatif ürünlerine yönelik testler oksidatif stresin gösterilmesinde kullanılmaktadır (58).

Doymamış lipidlerin peroksidasyonu sırasında oluşan ilk stabil ürünler hidroperoksitlerdir (59). Aldehitler (Malondialdehit, 4-HNE), hidrokarbon gazları (etan, pentan) ve lipid hidro peroksitlerinde kompozisyonu gibi sekonder peroksidasyon ürünlerinin kompleks bir karışımını oluşturur (60, 61). Hücre membranlarının geçirgenliğini arttıran malondialdehitin (MDA), membranların iyon alışverişine etki ederek hücre içi iyon dengesini bozduğu, DNA'nın yapısında kırılmalara, enzim aktivitelerinin bozulmasına ve baz değişimlerine neden olduğu bildirilmektedir (61). Ayrıca MDA düzeylerindeki artışın antioksidan aktiviteyi azalttığı ve serbest radikal üretimini arttırdığı, bunun sonucunda serbest radikaller ile antioksidanlar arasındaki dengenin bozulmasına neden olduğu endotel disfonksiyonu ve neticesinde ateroskleroza neden olabileceği bilinmektedir (62).

Hücre membran yağ asitleri üzerine etki ederek lipit peroksidasyonu (LPO) serbest oksijen radikalleri tarafından başlatılır. Lipit peroksidasyonu (LPO), radikallerin poli-doymamış yağ asitleri ile oksidasyonu sonucu başlayan oto katalitik zincir reaksiyonları, birçok organizmada hasarlara neden olur. Lipid peroksidasyonu (LPO) sonucunda ortaya çıkan aldehitlerden en iyi bilineni MDA'dir. MDA, membran komponentlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağlanmasına neden olarak, membrana bağlı enzimleri ve membran reseptörlerini etkisiz hale getirmek suretiyle

birçok hücrede yer alan L-glutamat, glisin ve L-sisteinden oluşan tripeptiddir. GSH antioksidan etkisini GPx (Glutasyon peroksidaz) enzimi katalizörlüğünde H_2O_2 ve organik peroksitlerle reaksiyona girerek gösterir ve H_2O_2 'yi hücrelerden uzaklaştırır. GPx enzimi aktif bölgesinde selenyum içeren bir enzimdir. GSH, organik oksitleri veya hidrojen peroksiti kimyasal olarak zehirsizleştirir ve hücreleri SOR hasarından korur (67, 68). GPx, hücrelerde oluşan hidroperoksitlerin uzaklaştırılmasında görevli bir diğer antioksidan enzimdir. İntraselüler mesafede lipitleri peroksidasyondan koruyan en önemli enzim GPx'dur (69).

Okside glutasyon (GSSG), hidroperoksitlerin redükte olmasıyla meydana gelir. Tekrar GSH'a dönüşümü GR-x'in katalizlediği reaksiyon ile olur. GPx ve GR-x sitozolde yüksek konsantrasyon da bulunur. GPx hücredeki dağılımı, GR-x'a bağımlıdır (70).



Şekil 2.6. Selenyum-GPx Enziminin Katalitik Döngüsü (71).

Glutasyonu sisteinin sülfür atomu üzerinden çeşitli elektrofillere aktaran proteinler GST'lerdir (72). Antioksidan aktiviteye sahip GST'lerin bu özelliklerinin

yanı sıra çok önemli biyokimyasal fonksiyonları da vardır. Yabancı maddeleri katalitik olarak, glutatyondaki sisteine ait –SH grubu ile bağlayarak, elektrofilik bölgelerini nötralize etmesiyle oluşan ürünün daha fazla suda çözünebilir hale gelmesini sağlarlar. GST'ler başta lineolat hidroperoksit ve araşidonikleri olmak üzere, LPO'ya karşı gösterdikleri selenyumdan bağımsız GSH peroksidaz aktivitesi ile savunma mekanizması oluştururlar (73).

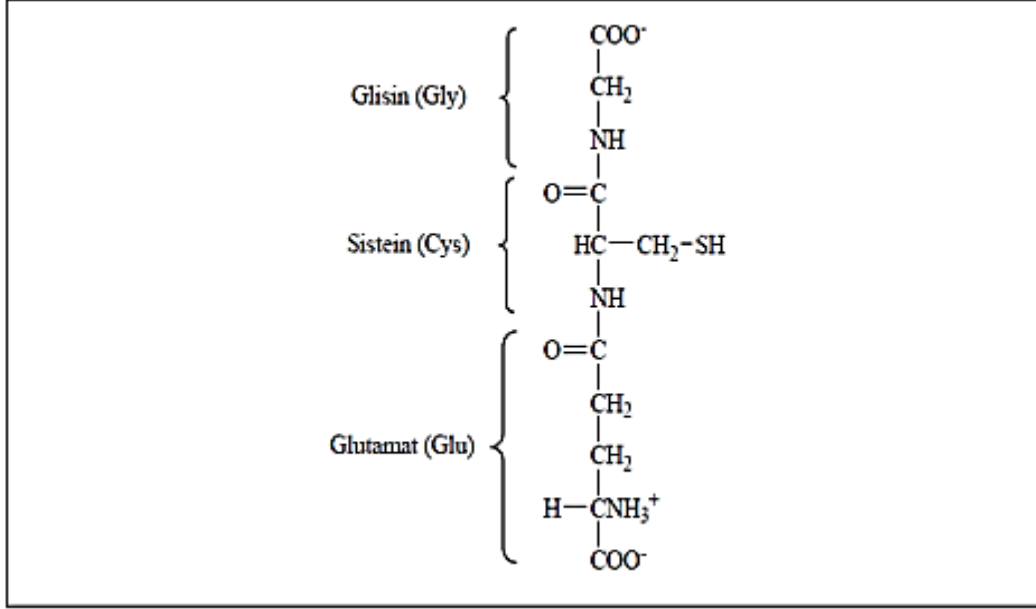
Yükseltgenmiş glutasyonu (GSSG), indirgenmiş (GSH) hale çeviren enzim GRx'dir. Bu indirgenme işlemi sırasında NADPH'dan elektronlar gelir. NADPH'dan gelen elektronlar okside glutatyonun disülfid bağına doğrudan transfer edilmezler. NADPH'dan gelen elektronlar önce flavinadenindifosfat (FAD)'a transfer edilirler. Daha sonra iki sistein arasında bulunan disülfid köprüsüne transfer edilmek suretiyle okside glutatyonun aktarılır. GRx'ın GSSG'yi GSH'ye dönüştürmesi için gereken NADPH'ı alyuvarlardaki pentoz fosfat yolu sağlar (67).

Literetürlerde uterus hasarı ve infertilite, gastroözofageal reflü, renal fibrozis, kardiyovasküler ve birçok doku ve organ hasarında oksidan antioksidan dengenin oksidanların lehine değiştiği rapor edilmektedir. Bu nedenle, antioksidan tedavi önerilmektedir antioksidan tedavi ile oksidan üretiminin artmasına bağlı doku hasarının önlenmesi amaçlanmaktadır. Antioksidanlar hasar öncesi radikal oluşumunu önler ve oluşmuş oksidatif hasarı onararak, çeşitli reaktif ara ürünleri nötralize eder ve okside biyomoleküllerin indirgenmesini sağlarlar (74).

2.4.1. GSH

Glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan düşük molekül ağırlıklı fakat fonksiyonu büyük bir tripeptid olan glutatyon, hayvanlar, bitkiler ve

mikroorganizmaların hücre sitozolünde bulunan en bol bulunan intrasellüler tiyoldür (75).



Şekil 2.7. Glutatyonun yapısı (76).

Hücredeki glutatyonun üç büyük fonksiyonu vardır:

- 1-) Bir antioksidan olarak serbest radikal temizleyicisi,
- 2-) Detoksifikasyon sırasında GSH-S transferazlar için kofaktör olarak,
- 3-) Substrat olarak glutamini GSH'dan diğer aminoasitlere transfer eden gama glutamil transpeptidazlar için kullanılır.

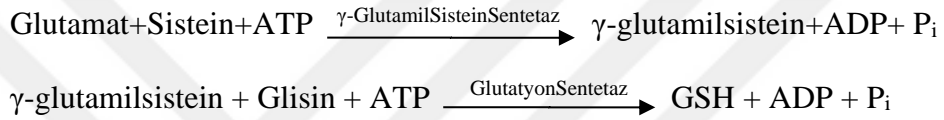
Hücrenin okside-redüksiyon dengesinde önemli bir rol oynayan glutatyon, hücredeki toksik metabolitleri hücreden uzaklaştırır ayrıca indirgenmiş formu ile hücrelerdeki sülfidril grubunun devamlılığını sağlar (77).

Karaciğer sitozolünde bulunan GSH'n döngüsü hızlı olduğu için yarı ömrü 2-4 saattir, mitokondride ise yarı ömrü yaklaşık 30 saat gibi daha uzun bir süredir. Ksenobiyotiklerin detoksifiye edildiği en önemli organ karaciğerdir ve glutatyonun

sağlıklı karaciğer hücrelerindeki en yüksek konsantrasyonu yaklaşık olarak 20 milimolar'dır. GSH içeriği karaciğerin; testis ve böbreklerden yaklaşık iki kat, akciğerlerden ise üç kat daha fazladır (78).

2.4.1.1. Glutasyon Biyosentezi

Glutasyonun biyosentezi, γ -glutamil sisteinil sentetaz ve glutasyon sentetazın katalizlediği reaksiyon sonucunda iki adımda ATP'ye bağımlı olarak gerçekleşir (79).



İlk adım L-glutamat ile L-sistein, γ -Glutamil sisteinil sentetaz tarafından birleşmesidir. γ -glutamil sistein sentetaz, reaksiyonu katalizeleyen ve glutasyon sentezini sınırlandırabilen bir enzimdir (80). γ -glutamil sisteinin glisin ile birleşmeside ikinci adımdır. GSH homeostazisinin sağlanabilmesi için enzimin sentezlenmesi ve aktivitesi kritik bir öneme sahiptir. Bunun yanı sıra GSH sentezinin fazla olduğu durumlarda, γ -glutamil siklotransferaz enzimiyle 5-oxoprolin'e dönüştürülür ve 5-oxoprolinin artışına bağlı olarak metabolik asidozis oluşur. (81).

GSH sentezinin hücre içinde gerçekleştirilebilmesi için, GSH'ın hücre dışında degradasyona uğratılarak oluşan ürünlerin hücre içine alınması gerekmektedir. Bu işlemlerde membrana bağlı enzimlerden biri olan γ -glutamil transpeptidaz enzimi gerçekleştirilmektedir (79).

2.5. Adenozin Trifosfat (ATP)

Tüm memeli hücrelerinde hücrenel metabolizma için gerekli olan kimyasal enerjinin kullanılabilir temel formu Adenozin Trifosfat (ATP)'dir. ATP hücre içinde bir enerji kaynağı olmanın yanı sıra, kinazlar tarafından sinyal transdüksiyon yollarında ve substrat olarak da adenilatsiklaz enzimi tarafından hücre içi ikinci haberci olan dögüsel adenozin monofosfat (cAMP)'ın sentezinde kullanılır. Hücre içinde çok sayıda biyokimyasal reaksiyon için enerji kaynağı olarak ATP kullanılır. ATP hücrede hızlı ve sürekli bir şekilde yenilenir veya depolanır.

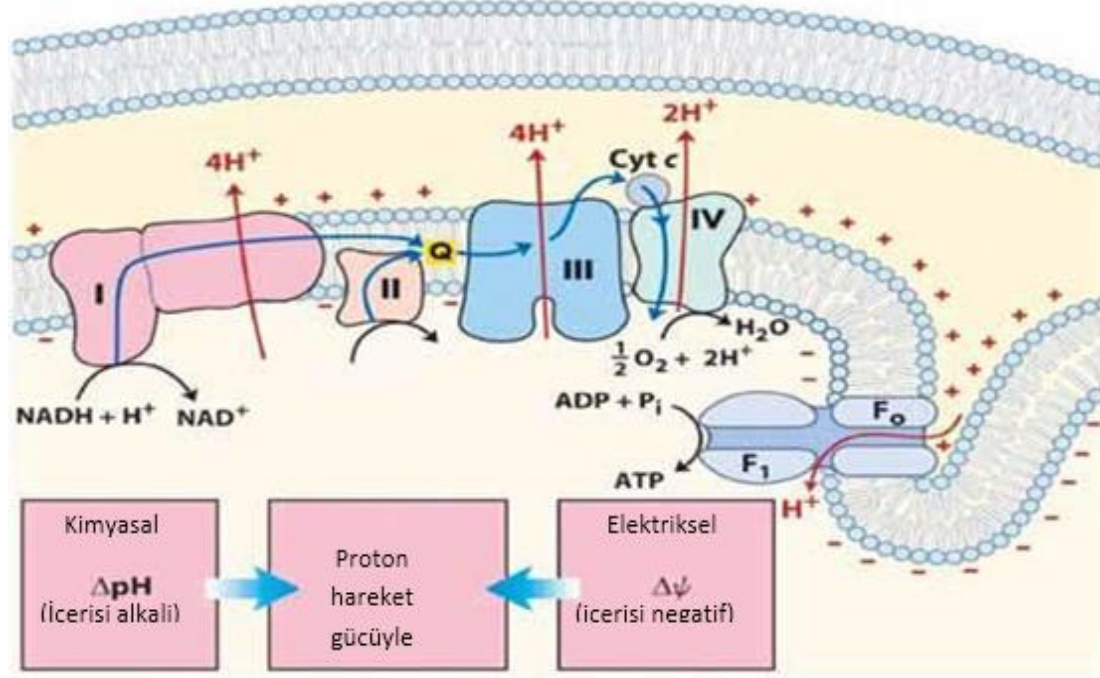
ATP, mitokondride oksidatif fosforilasyonla sitozolde ise çoğunlukla glikozdan glikoliz ile üretilmektedir (82).

2.5.1. ATP Sentezi

Redükte moleküllerin (NADH^+H^+ ve FADH_2) elektronları oksijene transfer olurken meydana gelen enerji dışarıya verildiğinden eksergonik özellikle reaksiyonlardır. Mitokondri iç membranı boyunca lokalize olan ve ATP sentaz enzim kompleksi tarafından bu reaksiyonlarda açığa çıkan enerji kullanılarak, ATP sentezi gerçekleştirilmektedir.

ATP sentezi konusunda farklı teoriler olmasına rağmen en çok kabul gören, kemiozmotik teoridir. Bu teoride solunum zincirine giren redükte moleküllerin okside olması sonucu mitokondri iç membranında H^+ (proton) iyonları artar ve artan protonların membranlar arası boşluğa pompalanmasıyla iki taraf arasında elektro-kimyasal potansiyel farkı meydana gelir. Bu esnada mitokondri iç membranına bulunan F₀-F₁ ATP sentaz enzim sistemi devreye girer ve enzimin F₀ faktörü proton kanalı oluşturur. F₀, protonların membranlar arası boşluktan matrikse dönüşünde

görev yapmaktadır. ADP ve Pi kullanarak ATP sentezini F1 birimi gerçekleştirmektedir (83).



Şekil 2.8. Kemiozmotik Teori - mitokondride elektronların matriksten zarlar arası boşluğa geçişi ve zarlar arası bölgede proton birikimi (84).

2.5.2. ATP' nin kaynakları, salınması ve parçalanması

Hücre, ihtiyacına göre intrasellüler ATP deposunu devamlı dolu tutmak veya hızlı bir şekilde yenilemek için ATP sentezinde kompleks mekanizmalar kullanır. Sitoplazmada yaklaşık olarak 5 mmol/lit (5–10 mM) ATP bulunur. ATP'nin salınımı üç şekilde olmaktadır. (85). Hücre iskemi, stres, osmotik şişme, inflamasyon, nekroz, apoptozis gibi sebepler ile hasara uğraması sonucu hasarlı hücreden pasif olarak ATP sızması meydana gelir (86). Kanal aracılı salınım. (87). Veziküler salınım. Nöronların sekretuar veziküllerinde, ekzokrin bezlerde (adrenal medullanın kromaffin granüllerinde, pankreatik β -hücrelerinin insülin içeren granüllerinde ve mast hücrelerinin sekretuar granüllerinde) ve plateletlerin serotonerjik granüllerinde

sitoplazmadan daha yüksek ATP konsantrasyonları (100 mmol/l'te kadar) mevcuttur (88).

ATP ve diğer nükleotitler depolanmak üzere sekretuar ve sinaptik veziküller içine alınır (89). ATP'nin sinirlerden ekzositotik veziküler salınımı olduğu yönünde açık kanıtlar vardır ve veziküller nükleotit konsantrasyonu 1000 mM'a kadar çıkabildiği iddia edilmektedir (90).

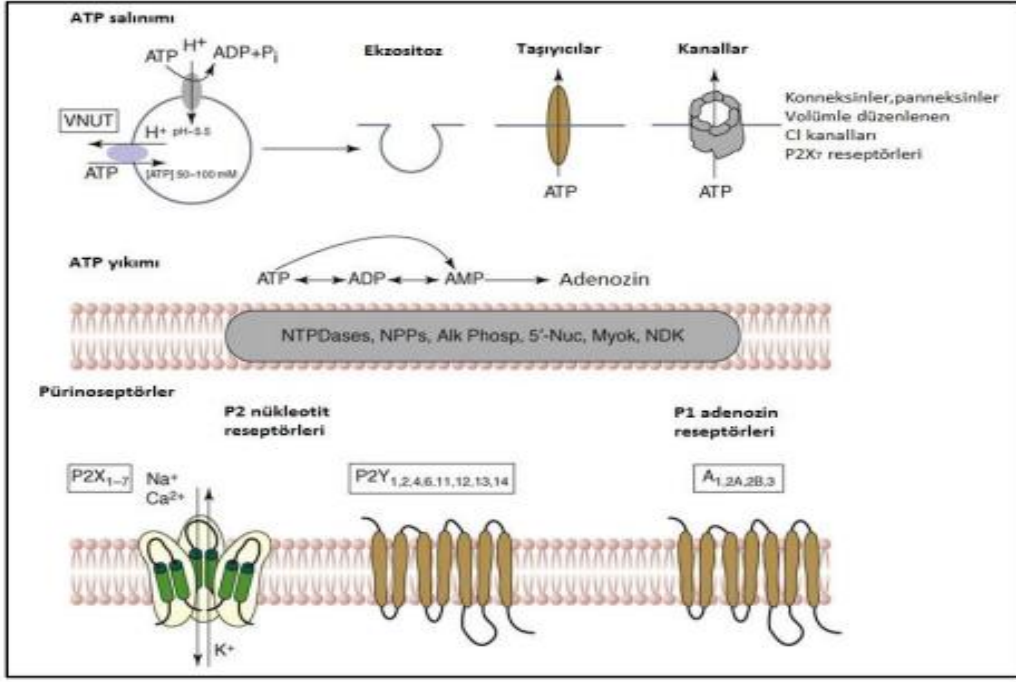
Son zamanlarda ortaya konulduğu gibi, ATP'nin sinaptik veziküller içinde birikmesine klor bağımlı veziküler nükleotit transporter (VNUT) tarafından aracılık edilmektedir ve bu taşıyıcı, veziküler glutamat taşıyıcılarının da ait olduğu solüt taşıyıcı (SLC) anyon taşıyıcı ailesi içinde yer almaktadır (89). VNUT tercihen ATP, GTP (guanozin trifosfat) ve ADP (Adenozin difosfat) 'i tanır ve ATP tarafından inhibe edilir (90). Bu taşıyıcı beyinde yüksek derecede eksprese olur ve immün histokimya ile kromaffin granüllerde ve astrositlerin alt popülasyonlarındaki yerleri belirlenebilir. Farklı konsantrasyonlarda olmasına ve diğer nörotransmitterler ile birlikte depo edilebilmesine ve birlikte salınabilmesine (GABA, NA veya glutamat) rağmen ATP her sinaptik ve sekretuar vezikülde vardır. Bazı nöral sonlanmalar sadece ATP'nin bulunduğu veziküller içerebilirler. Ancak, çeşitli fizyolojik nükleotit reseptör agonistlerinin (ATP, ADP, UDP, UTP), şekerler venikotinamid adenindinükleotitin (NAD^+) genel mekanizmalar ile salınıp salınmadığı açık bir şekilde tanımlanmış değildir.

Purinoseptörlere etki eden ATP'nin ana kaynağının ölen ya da hasarlanan hücreler olduğu sanılırdı fakat şimdi, birçok hücreden mekanik strese, hipoksiye, inflamasyona ve bazı agonistlere fizyolojik ya da patofizyolojik cevap olarak salındığı bilinmektedir (90). Endotelial ve ürotelial hücrelerden, osteoblastlardan,

astrositlerden, mast ve kromaffin hücrelerinden ekzositotik salınımı olduğuna dair zoraki kanıtlar vardır, fakat ATP-bağlı kaset taşıyıcıları, konneksinemi kanallar, plazmalemmal voltaj-bağımlı anyon kanalları yoluyla salındığı da önerilmektedir.

ATP' nin ekzositotik nöral veziküler salınımı için güçlü kanıtlar vardır ve son çalışmalar da ATP' nin astrositlerden veziküler salınımını desteklemektedir (89). P2X7 reseptörlerine ek olarak ATP-bağlı kaset taşıyıcıları, konneksin veya panneksin yarım kanalları, plazmalemmal voltaj bağımlı anyon kanalları, nükleotit salınımının ek mekanizmaları olarak kanıtlanmıştır.

Yarım kanalların iskemi ile tetiklenmiş nöral ATP salınımı ile ilişkili olduğu ve tat tomurcuklarında ATP aracılı intersellüler iletişimin olduğu vurgulanmıştır. UTP' nin ve UDP şekerlerinin salınım mekanizmaları daha az bilinmektedir fakat P2Y14 reseptör agonisti UDP glikozunun salınımın düzenlenmesine dair kanıtlar elde edilmiştir. Salınımdan sonra ATP ve diğer nükleotitler ektonükleotidazlar tarafından hızlı bir enzimatik yıkıma maruz kalmaktadır. Nöronlardan ve non-nöronal hücrelerden salınan ATP'nin ektonükleotidazlar tarafından yıkıldığı şimdi çok iyi bilinmektedir ve bu önemlidir çünkü ATP metabolitleri çeşitli purinerjik reseptörler için fizyolojik ligandlar olarak işlev görürler (89). Bu ektonükleotidazlar içinde ekto-nükleozit trifosfat difosfohidrolazlar (ENTPDaz) içinde yer alan NTPDaz 1, 2, 3 ve 8 ekstrasellüler; ekto-nükleotid pirofosfataz'ın üç alt tipi, alkalın fosfatazlar, ekto 5'-nükleotidaz ve ektonükleotid difosfokinazları (E-NDPK) içeren birkaç enzim ailesi yer almaktadır (90). NTPDaz-1 ATP' yi direk adenosin monofosfat (AMP)' a hidroliz ederken UTP' yi UDP' ye hidroliz eder; aksine NTPDaz-2 ise ATP' yi ADP' ye ve 5'-nükleotidaz hidrolazlar AMP'yi adenosine hidroliz ederler.



Şekil 2.9. ATP' nin salınım, parçalanma ve resepsiyon mekanizmaları. (89)

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihaz ve Kimyasal Maddeler

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneyde kullanılan thiopental sodium IE Ulagay-Türkiye'den, ATP Zdorove Narodu -Ukrayna'dan, Metanolise Binali Yıldırım Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarından temin edildi.

3.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan alet ve ekipmanlar.

Cihazlar	Modeli ve Firması
Eliza Okuyucu	Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek, USA
Mikroplate Yıkayıcı	Stat Fax 2600 Microplate Washer, USA
Santrifüj (Soğutmalı)	Hettich Zentrifugen 320R, Germany
pH Metre	SCHOTT Instruments Lab 850, Germany
Doku Homojenizatörü	Tissue Lyser II Qiagen, Germany
Hassas Terazı	Shimadzu ATX224, USA
Etüv	Memmert WNB 7-45, Germany
Vorteks	IKA- MS 3 basic, USA
Buzdolabı (-86°C)	Nuaire NU-9483E, USA
Otomatik Multikanal Pipet	Eppendorf Research Pro (20-300µ)
Pipet Seti	Eppendorf Research Plus
GSH Eliza Kiti	Sino Gene Clon Biotech Rat GSH ELISA (SG-20391)
MDA Eliza Kiti	Bioassay Tecnology Laboratory Rat MDA ELISA (E0156Ra)

3.2. Deneysel İşlemler

3.2.1. Deney Hayvanları

Çalışmamızda kullanılan hayvanlar, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edildi. Deney, ağırlıkları 280-295 gram arasında değişen toplam 18 adet albino Wistar türü erkek sıçanlar üzerinde gerçekleştirildi. Hayvanlar deneyden önce normal oda sıcaklığında (22⁰C) barındırıldı ve beslendi. Çalışmalarımızın tüm aşamaları Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 249 nolu kararı ile etik kuruluna uygun olduğu onaylanmıştır.

3.2.2. Deney Prosedürü

3.2.2.1. Deney gruplarının Oluşturulması ve Deneyin Uygulanması

Çalışmada, 3 deney grubu oluşturuldu. Her bir grupta 6 adet olmak üzere toplam 18 adet sıçan kullanıldı.

Grup-1: Sağlıklı grup (SG)

Distile su intraperitoneal (ip) yoldan enjekte edildi.

Grup-2: Metotreksat + Methanol Grubu (MTM)

Metotreksat 0.3 mg/kg dozda oral yoldan gavaj ile 7 gün boyunca uygulandı. Bu süre sonunda hayvanlara %20'lik metanol 3 g/kg dozda aynı yoldan aynı yöntemle verildi.

Grup-3: Metotreksat + Methanol + ATP grubu (MMA)

Metotreksat 0.3 mg/kg dozda oral yoldan gavaj ile 7 gün boyunca uygulandı. Bu süre sonunda hayvanlara %20'lik metanol 3 g/kg dozda aynı yoldan aynı yöntemle verildi ve Metanol verildikten dört saat sonra 4 mg/kg dozda ATP i.p. yoldan enjekte edildi.

3.2.2.2. Doku ve Kan Örneklerinin Alınması

ATP verildikten 8 saat sonra hayvanlar yüksek doz (50 mg/kg) tiopental sodyum anestezisi ile ötenazi yapılarak karaciğer dokularından örnekler alındı. Hayvanlar ötenazi yapılmadan önce kuyruk venlerinden kan örnekleri alındı. Alınan kan örnekleri 4000 rpm de 15 dk +4 °C'de santifüj edilerek plazmaları ayrıldı. Serum ALT ve AST aktivite anlazleri yapıłana kadar -80 °C'de saklandı. Dokuda MDA ve tGSH analizleri için alınan karaciğer dokuları sıvı azot içinde homojenize edilerek -80 °C'de çalışma gününe kadar muhafaza edildi. Karaciğer doku kesitleri %10 formaldehit solüsyonu içerisinde histopatolojik analizler yapılıncaıa kadar bulunduruldu.

3.3. Biyokimyasal Analizler

3.3.1. Serum ALT Analizi

ALT ölçümleri Beckman Coulter AU 2700 otoanalizöründe, Beckman Coulter test kitleleri kullanılarak fotometrik metot ile ölçüldü.

3.3.2. Serum AST Analizi

AST ölçümleri Beckman Coulter AU 2700 otoanalizöründe, Beckman Coulter test kitleleri kullanılarak fotometrik metot ile ölçüldü.

3.3.3. Doku MDA Analizi

Çalışma öncesi karaciğer dokuları önce homojenize edilerek fosfat tamponunda çözdürüldü. Karaciğer dokularında MDA ölçümü Bioassay Technology

Laboratory Rat MDA ELISA (E0156Ra) ticari kiti kullanılarak yapıldı. Deney protokolü kit föyüne göre aşağıda belirtildiği gibi uygulandı.

Standart hazırlanması:

Tüm reaktifler kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi. Seyreltme yapmadan önce standart hafifçe çalkalanarak 15 dakika bekletildi. Standart çözeltileri aşağıdaki gibi hazırlandı. Boş tüp sıfır standart olarak kabul edildi. (0 ng / L).

Bütün tüplere 50µl standart seyreltici eklendi

Standart No.5(480ng / L):100µl standart (720ng / L) eklendi

Standart No.4(320ng / L): 100µl Standart No.5 eklendi

Standart No.3(160ng / L):50µl Standart No.4 eklendi

Standart No.2(80ng / L):50µl Standart No.3 eklendi

Standart No.1(40ng / L):50µl Standart No.2 eklendi

Deneyin uygulanması

Adım 1: Tüm reaktifler, standart solüsyonlar ve örnekler talimatlara uygun olarak hazırlandı ve deney, oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

Adım 2: Standartın kuyucuklara 50 µl standart eklendi.

Adım 3: Numune kuyucuklarına 40 µl numune eklendi ve daha sonra yine numune kuyucuklarına 10 µl anti-MDA antikoru eklendi, sonra numune kuyucuklarına ve standart kuyucuklara 50 µl streptavidin-HRP eklendi (boş kontrol kuyusu hariç). İyice karıştırılarak. Platenin üzeri sızdırmaz bir jelatin ile kapatıldı. 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi.

Adım 4: Sızdırmaz jelatin çıkarılarak plate yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı. Yıkama işlemi her yıkamada 30 saniye ila 1 dakika arasında en az 0.35 ml yıkama tamponu kuyucuklarda bekletilecek şekilde gerçekleştirildi. Plate kâğıt havlu ile kurulandı.

Adım 5: Her kuyucuğa 50 µl substrat solüsyonu A ilave edildi ve daha sonra 50 µl substrat solüsyonu B eklendi ve platenin üzeri yeni bir sızdırmaz bir jelatin ile kapatıldı karanlıkta 37 °C'de 10 dakika inkübe edildi.

Adım 6: İnkübasyonu süresi sonunda 50 µl Stop Solüsyonu eklenerek 10 dakika içinde 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropilaka okuyucu kullanarak her kuyucuğun optik yoğunluğu (OD değeri) belirlendi.

3.3.4. Doku GSH Analizi

Karaciğer dokularında GSH ölçümü Sino Gene Clon Biotech Rat GSH ELISA (SG-20391) ticari kiti kullanılarak yapıldı. Deney protokolü kit föyüne göre aşağıda belirtildiği gibi uygulandı.

Standart Hazırlama

Tüm reaktifler kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi. Seyreltme yapmadan önce standart hafifçe çalkalanarak 15 dakika bekletildi. 6.4 nmol / ml standart stok çözeltisi oluşturmak için 120 µl standart (12.8 nmol / ml) 120 µl standart seyreltici ile sulandırıldı. 3.2 nmol / ml, 1.6 nmol / ml, 0.8 nmol / ml ve 0.4 nmol / ml standart çözeltileri aşağıdaki gibi hazırlandı. Standart seyreltici sıfır standart olarak kabul edildi. (0 nmol / ml).

Standart No.5(6.4 nmol/ml):120 µl Orijinal Standart+120 µl Standart Seyreltici eklendi

Standart No.4(3.2 nmol/ml):120 µl Standart No.5+120 µl Standart Seyreltici eklendi

Standart No.3(1.6 nmol/ml):120 µl Standart No.4+120 µl Standart Seyreltici eklendi

Standart No.2(0.8 nmol/ml):120 µl Standart No.3+120 µl Standart Seyreltici eklendi

Standart No.1(0.4 nmol/ml):120 µl Standart No.2+120 µl Standart Seyreltici eklendi

Deneyin uygulanması

Adım 1: Tüm reaktifler, standart solüsyonlar ve örnekler talimatlara uygun olarak hazırlandı ve deney oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

Adım 2: Standart kuyucuklara 50 µl standart eklendi.

Adım 3: Numune kuyucuklarına 40 µl sample dilüent eklenerek seyreltildi ve üzerine 10 µl numune eklendi

Adım 4: Platenin üzeri sızdırmaz bir jelatin ile kapatılarak 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi.

Adım 5: Sızdırmaz jelatin çıkarılarak plate yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı ve plate kâğıt havlu ile kurulandı

Adım 6: HRP-Konjugat reaktifi boş kuyucuk hariç her kuyucuğa 50 µl pipetlendi

Adım 7: Platenin üzeri sızdırmaz bir jelatin ile kapatılarak 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi.

Adım 8: Sızdırmaz jelatin çıkarılarak plate yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı ve plate kâğıt havlu ile kurulandı

Adım 9: Her bir kuyucuğa Kromojen Solüsyon A ve Kromojen Solüsyonu B den 50 µl pipetlenerek, 37 °C'de 15 dakika ışık karanlıkta inkübe edildi.

Adım 10: Her kuyucuğa 50 µl Stop Solüsyonu pipetlenerek 15 dakika içinde 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropłaka okuyucu kullanarak her kuyucuğun optik yoğunluğu (OD değeri) belirlendi.

3.4. Histopatolojik inceleme

Tüm doku numuneleri ilk olarak ışık mikroskobu değerlendirmesi için %10 formaldehit çözeltisinde tanımlanmıştır. Tanımlama işleminin ardından, doku numuneleri 24 saat boyunca kasetlerde musluk suyu altında yıkandı. Daha sonra

numuneler, dokular içindeki suyu uzaklaştırmak için geleneksel kalitede alkolle (%70, %80, %90 ve %100) işleme tabi tutuldu. Dokular daha sonra ksilolden geçirildi ve parafine gömüldü. Parafin bloklarından dört ila beş mikronluk kısımlar kesildi ve hematoksilin-eozin boyama uygulandı. Fotoğrafları Olympus DP2-SAL yazılım programı (Olympus® Inc. Tokyo, Japonya) değerlendirmesinin ardından çekildi. Çalışma gruplarının histopatolojik değerlendirmesi histolog tarafından gerçekleştirildi.

3.5. İstatistiksel analiz

Sonuçlar “ortalama \pm standart sapma” değeri olarak ifade edildi. Gruplar arası karşılaştırma için Tek yönlü ANOVA kullanılmıştır. ANOVA'dan sonra Tukey'in testi post-hoc test olarak kullanıldı. İstatistiksel analiz IBM SPSS 22 paket programı kullanılarak yapıldı. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı, $p < 0.001$ ise çok anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

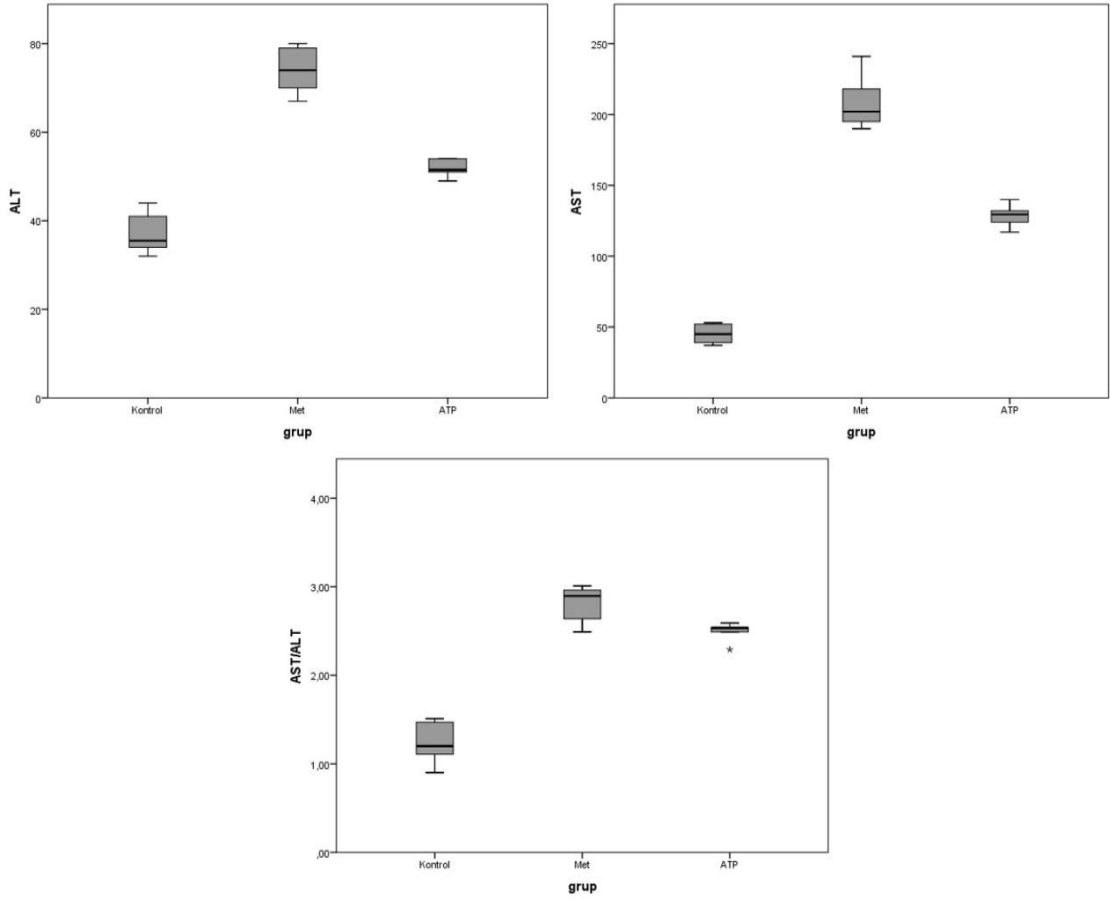
4.1. Biyokimyasal Analiz Sonuçları

Tablo 4,1'de görüldüğü gibi ALT enzimlerinin SG, MTM ve MMA gruplarının ortalama değerleri sırası ile $37,0 \pm 4,6$ (IU/L), $74,0 \pm 5,0$ (IU/L) ve $51,8 \pm 1,9$ (IU/L) olarak bulunmuştur. MTM grubunun ALT enzim seviyesi aşırı yüksek bulunmuş, MMA grubunun ALT enzim seviyesi ise MTM grubundan daha düşük bulunmuştur. SG-MTM, MTM - MMA ve SG - MMA çiftleri arasındaki ilişki ($P < 0.001$) bulunmuştur. AST enzimlerinin SG, MTM ve MMA gruplarının ortalama değerleri sırası ile $45,2 \pm 7,3$ (IU/L), $208,0 \pm 19,0$ (IU/L) ve $1,23 \pm 0,23$ (IU/L) tespit edilmiştir. MTM

grubunun AST enzim seviyesi aşırı yüksek bulunmuş, MMA grubunun AST enzim seviyesi ise MTM grubundan daha düşük bulunmuştur. SG - MTM, MTM - MMA ve SG - MMA çiftleri arasındaki ilişki ($P<0.001$) bulunmuştur. AST/ALT enzimlerinin SG, MTM ve MMA gruplarının ortalama değerleri $1,23\pm0,23$, $2,81\pm0,21$ ve $2,49\pm0,11$ olarak bulunmuştur. SG-MTM ve SG-MMA çiftleri arasındaki ilişki ($P<0.001$) bulunurken MTM-MMA çiftleri arasında ilişki ($P<0.031$) olarak bulunmuştur.

Tablo 4.1. ALT, AST ve AST/ALT değerleri

		Ortalama±S.S.	Medyan(min-maks.)	Karşılaştırılan grup	P
ALT	SFG	37,0±4,6(IU/L)	35,5(32-44)(IU/L)	SG – MTM	<0,001
	MTM	74,0±5,0(IU/L)	74,0(67-80)(IU/L)	MTM -MMA	<0,001
	MMA	51,8±1,9(IU/L)	51,5(49-54)(IU/L)	SG -MMA	<0,001
AST	SG	45,2±7,3(IU/L)	45,0(37-53)(IU/L)	SG – MTM	<0,001
	MTM	208,0±19,0(IU/L)	202(190-241)(IU/L)	MTM -MMA	<0,001
	MMA	128,7±7,9(IU/L)	129,5(117-140)(IU/L)	SG -MMA	<0,001
AST/ALT	SG	1,23±0,23	1,20(0,90-1,51)	SG -MTM	<0,001
	MTM	2,81±0,21	2,89(2,49-3,01)	MTM -MMA	<0,031
	MMA	2,49±0,11	2,54(2,29-2,59)	SG -MMA	<0,001



Şekil 4.1. Serum ALT, AST ve AST/ALT değerlerinin şematik gösterimi

4.1.1. Serum ALT Analiz Sonuçları

Tablo 4,2’de görüldüğü gibi, SG, MTM ve MMA rat gruplarının kan serumunda ALT miktarı sırası ile $37,0 \pm 4,6$ (IU/L), $74,0 \pm 5,0$ (IU/L) ve $51,8 \pm 1,9$ (IU/L) olarak bulunmuştur. SG-MTM, MTM-MMA ve SG-MMA çiftleri arasındaki ilişki ($P < 0.05$) olarak bulunmuştur.

Tablo 4.2. Serum ALT analiz sonuçları

		Mean±SD	Pairwise comparison	P
ALT	SG	37,0±4,6(IU/L)	SG – MTM	<0,001
	MTM	74,0±5,0(IU/L)	MTM – MMA	<0,001
	MMA	51,8±1,9(IU/L)	SG -MMA	<0,001

4.1.2.Serum AST Analiz Sonuçları

Tablo 4.3’de görüldüğü gibi, SG, MTM ve MMA rat gruplarının kan serumunda AST miktarı sırası ile 45,2±7,3(IU/L), 208,0±19,0(IU/L) ve 128,7±7,9(IU/L) olarak bulunmuştur. SG-MTM, MTM-MMA ve SG-MMA çiftleri arasındaki ilişki (P<0.001) olarak bulunmuştur.

Tablo 4.3.Serum AST analiz sonuçları

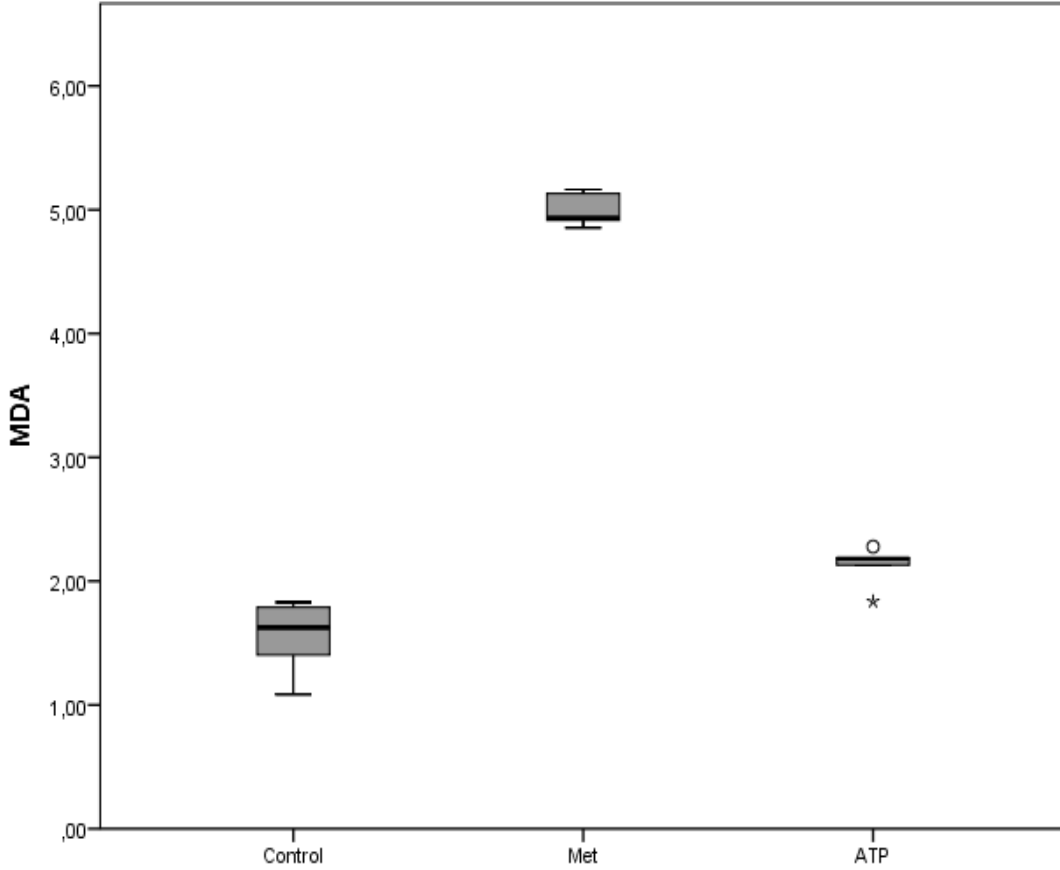
		Mean±SD	Pairwise comparison	P
AST	SG	45,2±7,3(IU/L)	SG – MTM	<0,001
	MTM	208,0±19,0(IU/L)	MTM - MMA	<0,001
	MMA	128,7±7,9(IU/L)	SG -MMA	<0,001

4.1.3.Doku MDA Analiz Sonuçları

Tablo 4.4’de görüldüğü gibi, SG, MTM ve MMA rat gruplarının karaciğer dokusunda MDA miktarı sırası ile 1,56±0,28, 4,99±0,13 ve 2,13±0,15 olarak bulunmuştur. SG-MTM, MTM-MMA ve SG-MMA çiftleri arasındaki ilişki (P<0.001) olarak bulunmuştur.

Tablo 4.4. Doku MDA analiz sonuçları

		Mean±SD	Pairwise comparison	P
MDA	SG	1,56±0,28(µmol/ g)	SG - MTM	<0,001
	MTM	4,99±0,13(µmol/ g)	MTM - MMA	<0,001
	MMA	2,13±0,15(µmol/ g)	SG - MMA	<0,001



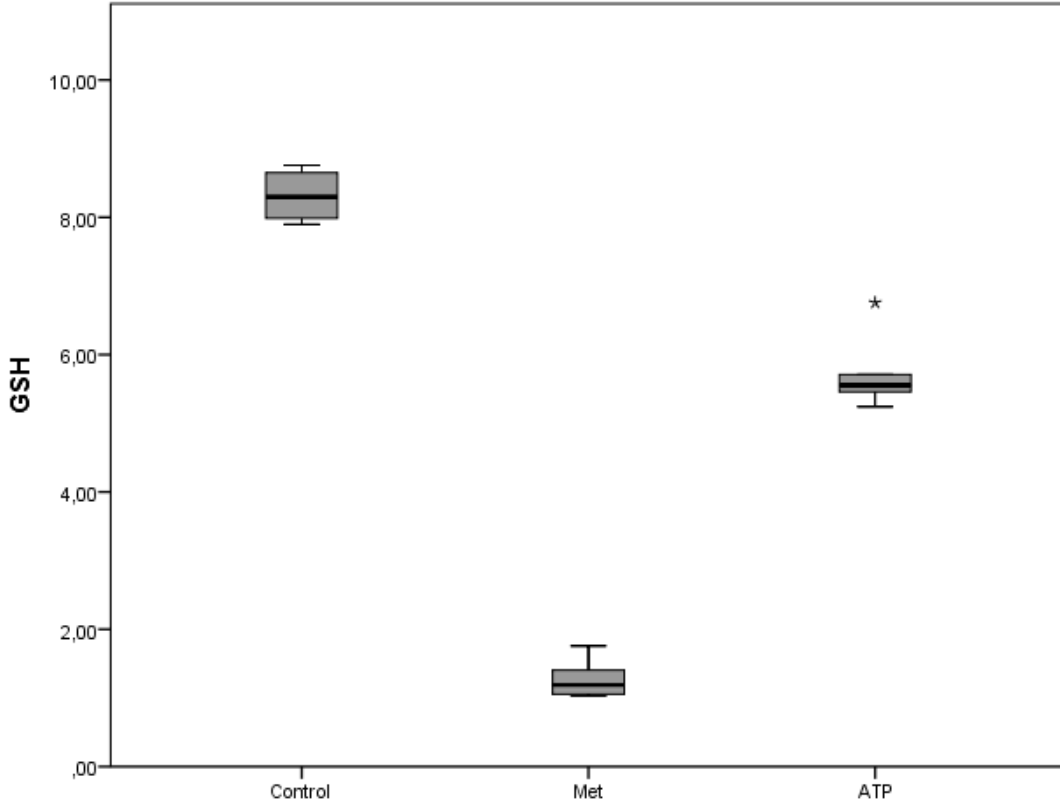
Şekil 4.2. MDA analiz sonuçları

4.1.4. Doku GSH Analiz Sonuçları

Tablo 4.5’de görüldüğü gibi, SG, MTM ve MMA sıçan gruplarının karaciğer dokusunda GSH miktarı sırası ile $8,31\pm 0,35$ nmol/g, $1,27\pm 0,27$ nmol/g ve $5,71\pm 0,53$ nmol/g olarak bulunmuştur. SG-MTM, MTM-MMA ve SG-MMA çiftleri arasındaki ilişki ($P<0.001$) olarak bulunmuştur.

Tablo 4.5. Doku GSH analiz sonuçları

	Mean±SD	Pairwise comparison	P
SG	8,31±0,35nmol/g	SG – MTM	<0,001
GSH MTM	1,27±0,27nmol/g	MTM – MMA	<0,001
MMA	5,71±0,53nmol/g	SG -MMA	<0,001



Şekil 4.3. Doku GSH analiz sonuçları

4.2. Histopatoloji Bulguları

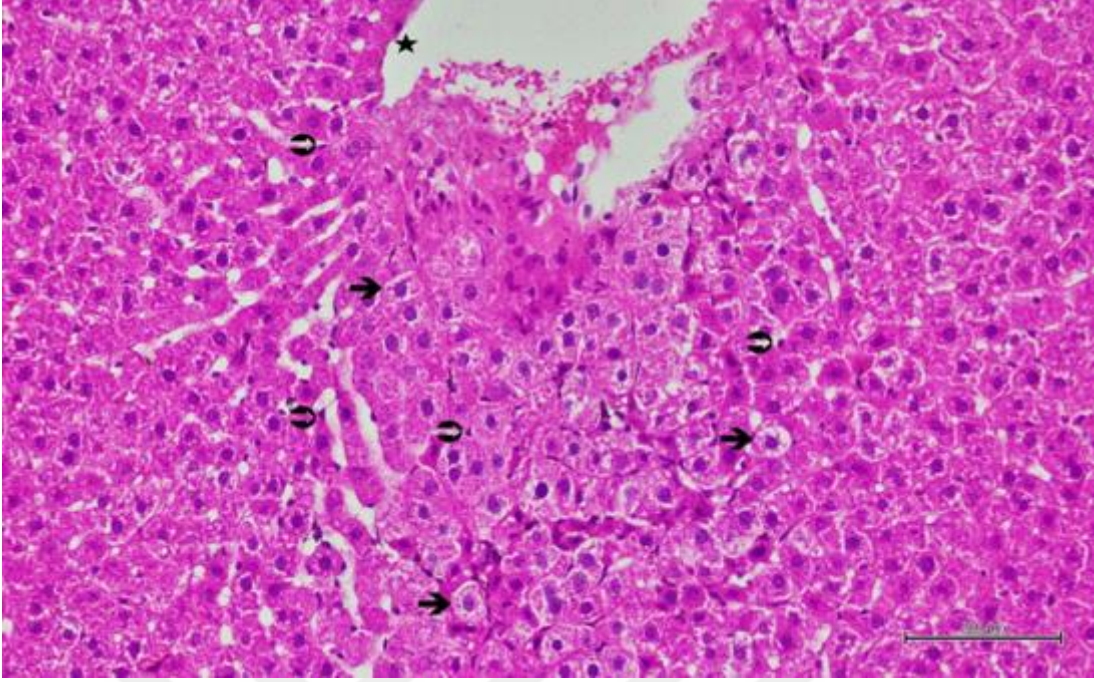
Işık mikroskopik gözleminde karaciğer kontrol dokusunun belirgin yuvarlak çekirdekli ve eozinofilik sitoplazmalı normal poligonal hücreler, hepatosit kordları arasına dağılmış Kupffer hücrelerinin vasküler formasyonu normal histolojik yapı gösterdi (Şekil 4.5).

Metotreksat+Metanol grubunda en belirgin değişiklik hepatosit dejenerasyonu ve hepatikkord çözünmesidir. Hepatositler şişti ve güçlü hipertrofi gösterdi. Hepatosit

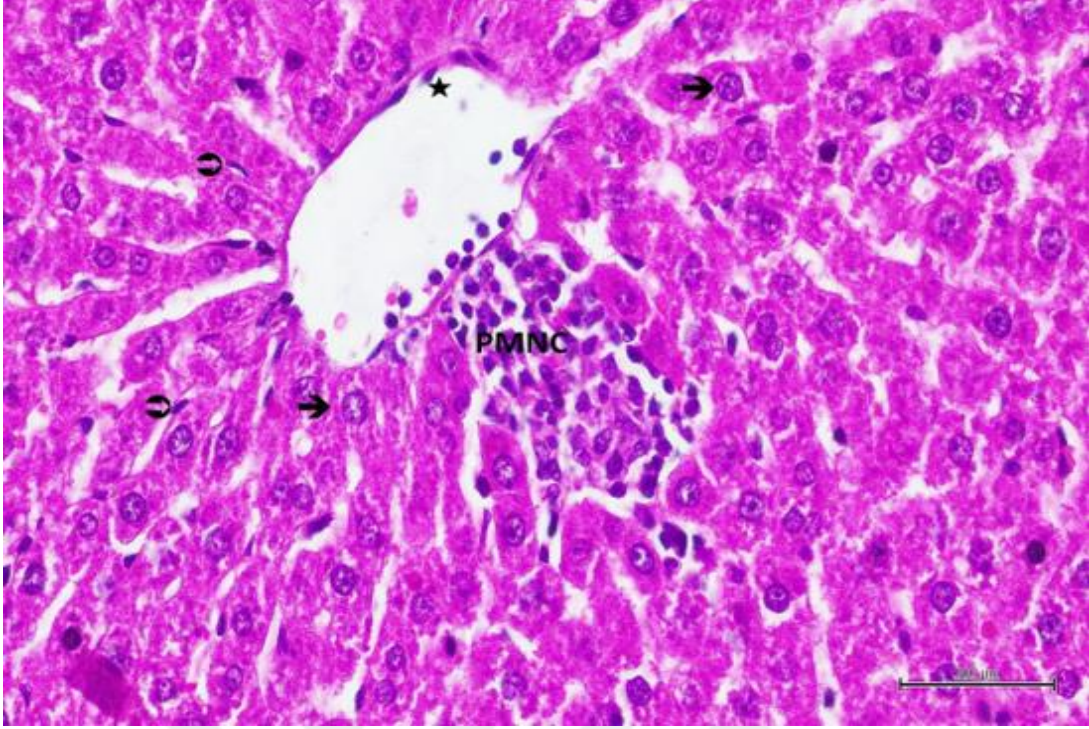
sitoplazmasında boş vakuol varlığı dikkat çekiciydi. Kupffer hücrelerinin sayıca arttığı görüldü. Kan damarları aynı anda tıkanmış ve genişlemiştir (Şekil 4.6.). Bununla birlikte, merkezi damar çevresinde yoğun polimorfonükleer hücre infiltrasyonu gözlemlendi (Şekil 4.7.). Metotreksat+Metanol+ATP grubundaki sıçanlarda; hepatik kordların şekli normaldi ve hepatositlerde dejenerasyon azaldı. Bu nedenle kan damarları ve genel histolojik mimari normaldi. Kupffer hücrelerin sayısı göreceli olarak azalmış ve santral damarlarda az miktarda polimorfonükleer hücre görülmüştür (Şekil 4.8.).



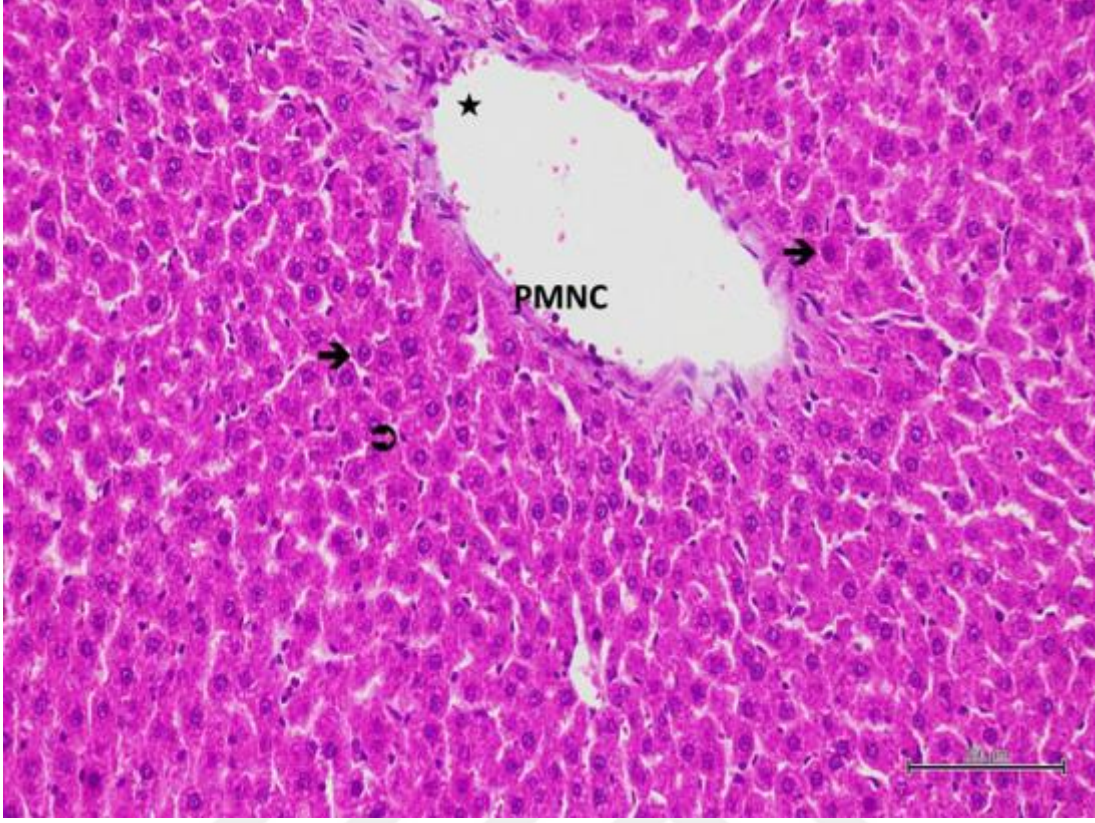
Şekil 4.4. Sağlıklı gruptaki karaciğer dokusunda hematoksilin-eozin boyama; →: hepatosit, ⊖ : Kupffer hücre, ★ : kan damarı, x200.



Şekil 4.5. Metotreksat + metanol grubunda karaciğer dokusunda hemaksilin-eozin boyama; →: dejenere hepatosit ○: Kupffer hücre, ★ : genişlemiş ve tıkanmış kan damarı, x200.



Şekil 4.6. Metotreksat + metanol grubunda karaciğer dokusunda hemaksilin-eozin boyama; ➔: dejenere hepatosit, ◐ : Kupffer hücre, PMNC: polimorfonükleer hücre, ★ : dilate kan damarı, x400.



Şekil 4.7. Metotreksat + metanol + ATP grubunda karaciğer dokusunda hematoksilin-eozin boyama; →: hepatosit, ○: Kupffer hücre, PMNC: az miktarda polimorfonükleer hücre, ★ : kan damarı, x200.

5.TARTIŞMA

Karaciğer; protein sentezi, detoksifikasyon ve kimyasal sindirim gibi birçok fonksiyonu olan bir organdır. Günlük yaşamda aşırı alkol tüketimi her ne sebeble olursa olsun birçok olumsuz metabolik değişimler meydana getirmekte ve özellikle de karaciğer de hepatoksisiteye neden olmaktadır. Aynı zamanda toksik nedenlerle akut veya kronik hastalıklara zemin hazırlamaktadır. Çalışmamızda ATP'nin, metanol ile oluşturulmuş deneysel karaciğer toksisitesine karşı koruyucu etkisinin araştırılmasını amaçladık.

Metil alkol renksiz, uçucu özeliğe sahip ve oda sıcaklığında sıvı halde bulunan bir alkoldür ve zehirlenmeleri genellikle oral yolla olmakla birlikte nadiren solunum ve deri yoluyla da olabilmektedir (12). Alkol tüketmek isteyen fakat maddi veya başka sebeplerden dolayı etil alkole ulaşamayan bireyler alternatif olarak metanolü tüketmeleri epidemilere yol açmaktadır. Nadir görülen bir intoksikasyon olmakla birlikte genellikle ölümlerle sonuçlanır (16). Ülkemizde metil alkol zehirlenmelerinin büyük bir kısmını, kanun dışı yollarla hazırlanıp piyasaya sürülen ve içerisinde metanol bulunduran alkollü içecekler ile kolonyalar oluşturmaktadır. Elmas ve arkadaşlarının yayınlarında, ülkemizdeki ölüm ile sonuçlanmış metil alkol zehirlenmelerinin % 42,5'inin alkollü içeceklerin içilmesi, %19,2'sinin kolonya içilmesinden kaynaklandığını belirtmektedirler (91). Literatüre göre, metil alkol zehirlenmelerinde kullanılan etkili medikal tedaviye rağmen ölüm oranı %20 olarak bildirilmektedir. Ölüm ile sonuçlanan zehirlenme olgularının bir kısmı hastaneye ulaştırılmadan gerçekleşmektedir (92). Yayıncı ve arkadaşları metil alkol alınmasından sonraki asemptomatik dönemin ölüm oranlarının artışında etkili olduğunu öne sürmekte ve hastanın bu asemptomatik dönemde alkol alımına devam ederek daha

yüksek dozda metanol aldığını bildirmektedir (18). Alkol tüketiminin birçok olumsuz metabolik değişime neden olduğunu ve özellikle karaciğer dokusunda harabiyet meydana getirdiğini bildirilmiştir (93). Alkol karaciğerde metabolize edilir. Ancak birim zamanda karaciğer tarafından zararsız hale getirilen alkol miktarı sınırlı orandadır. Bu orandan fazlasını zararsız hale getirme işlemi sırasında, karaciğerin diğer fonksiyonlarında aksaklıklar meydana gelir. Karaciğer hücreleri zarar görerek yapısal değişikliklere uğrayabilir. (94,95).

Çalışmamızda biyokimyasal bulguların, histopatolojik bulgularla örtüştüğü görülmüştür. MDA, ALT ve AST düzeylerinin yüksek, tGSH düzeyinin düşük bulunduğu MTM grubunun hepatositlerinde şiddetli dejenerasyon, Kupffer hücre sayısında artma, konjesyon ve PMNC infiltrasyonu gibi histopatolojik bulgulara rastlanmıştır. ATP grubunda hem biyokimyasal bulgular hemde histopatolojik incelemelere bakıldığında hafif karaciğer hasarı olduğu değerlendirilmiştir. Köksal ve arkadaşları da metanolün karaciğer hücre hasarına yol açtığını histopatolojik olarak göstermişlerdir (96). Kasacka ve arkadaşının çalışmasında ise metanolla indüklenen hepatosit hasarının nekrozla sonuçlandığı bildirilmiştir (97). Zehra ve arkadaşları metanolün hepatositlerde nekroz dışında, inflamasyonda yol açtığını rapor etmişlerdir (98).

Çalışmamızda, deneysel olarak oluşturulan metanol hasarına ATP uygulanması ile histopatolojik olarak makroskobik hasarların giderildiği, mikroskopik olarak karaciğer dokusunda kayıp olduğu görüldü.

Genellikle kronik alkol tüketimi sonucu gelişen metanol intoksikasyonu B vitamini yetersizliği ve sinir sistemine doğrudan toksik etkisinin yanı sıra lipid peroksidasyonunu bozması ile oksidatif stres meydana getirmektedir. Lipid

peroksidasyonunda artış, sitokrom-C oksidaz inhbisyonu, mitokondri elektron transport zincirinin inhibisyonu ve aerobik metabolizma için ihtiyaç duyulan ATP üretiminde azalma ve serbes oksijen radikallerinde (SOR) artışa sebep olmaktadır. Artan SOR ların, karaciğer hücre mitokondri hasarına neden olduğu bildirilmiştir (99).

Karaciğer çeşitli sebeplerle dejenerasyona uğrasada rejenerasyonda oluşmaktadır. Ancak, dejenerasyon uzun süre devam ederse karaciğerde bağ dokusu artışı görülür. Hepatik fibroz ilerleyici patolojik bir olaydır. Alkol kullanımı, viral hepatitler, metabolik hastalıklar ve ilaç kullanımı karaciğerde kronik hasar ve fibrozise neden olur. Bu durum tedavi edilmediği takdirde karaciğerin normal yapısı bozulur. Disse aralığında (hepatositlerle endotel hücreleri arasındaki mesafe) ekstraselüler matriks proteinleri ve kollajen birikmesi başlar. Bu bağ dokusu artışı ile siroz olarak adlandırılan karaciğerde yapısal bozukluk oluşur (95).

Parthasarathy ve arkadaşları, metanole bağlı olarak rat serum ALT ve AST aktivitelerinde yükselme olduğunu (100), Hamouda ve arkadaşları çalışmalarında da rat serum AST ve ALT aktivitesinde ise artma olduğunu bildirmişlerdir (101). Yapılan çalışmalarda AST ve ALT aktivitelerin karaciğer hücre hasarını belirlemede önemli parametreler olduğu gösterilmiştir. Alkol kullanımına bağlı olmayan karaciğer hasarında AST/ALT oranı düşükken, alkole bağlı karaciğer hasarlarında bu oran yüksektir (102, 103, 104). Bu çalışmada, metanol verilen ratlarda AST ve ALT'lerin tek tek artışının yanı sıra, AST/ALT oranındaki artış da anlamlı ($p<0.031$) bulunmuştur.

ALT ve AST karaciğer hasarını belirlemede rutinde sıkca kullanılan parametrelerdir. AST karaciğerin yanı sıra akciğer, kas, kalp, beyin, böbrek, pankreas ve kan hücrelerinde bulunmaktadır. ALT ise yoğun olarak sadece

karaciğerde bulunmaktadır. Karaciğer hücrelerinde bulunan AST'nin yaklaşık olarak %80'i mitokondridedir. Hâlbuki ALT'nin predominant formu nonmitokondriyal olanıdır. Bu nedenle mitokondriyal membranın sağlam olduğu hafif hepatosellüler hasarda sitoplazmik ALT ve AST seruma salınır. Kolestatik karaciğer hastalıklarında, nonalkolik hepatosteatozda, sirozda, karaciğer tümörlerinde ve karaciğer yağlanması serum amino transferazlarında hafif derecede artış olurken. Kronik hepatitlerde, ilaca bağlı hepatitlerde ve akut viral hepatitlerinin hafif vakalarında serum amino transferazlarında orta derecede artış olur. Mitokondriyal membranında hasar oluşturacak kadar ciddi hepatosellüler hasarlarda ise mitokondriyal AST salınımı görülür. (105, 106). Çalışmamızda literatür bulgularına uyumlu olarak, hem ALT ve AST seviyeleri ve hem de AST/ALT oranı yüksek bulunan metanol grubunun karaciğer dokusunda ciddi hasarın meydana geldiği görülmüştür. Ancak, ATP'nin sıçanlarda serum ALT ve AST aktivitelerinin ve AST/ALT oranının metanolla artmasını anlamlı ölçüde önlediği saptanmıştır. Ayrıca, ATP uygulanan gruptaki sıçanların serum ALT ve AST seviyeleri ve AST/ALT oranı sağlıklı gruptaki değerlere yakın bulunmuştur.

Kimyasal maddeler, ilaç toksikasyonu, radyasyon veya hastalıklar SOR üretimini artırarak hücre bileşiklerinde çeşitli zararlı etkiler oluşturmaktadır. Serbest radikal üretiminin hücre savunma sistemini aşacak düzeye yükselmesi sonucunda, zararlı etkilerini lipidler üzerinde gösterirler. Membranın yapısında bulunan kolesterol ve doymamış fosfolipidler serbest oksijen radikalleriyle kolaylıkla reaksiyona girmesi sonucunda lipid peroksidasyonu oluşur. Lipid peroksidasyonu hücresel hasarın iyi tanımlanmış bir mekanizmasıdır ve oksidatif stresin bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. Lipid peroksidasyonu sırasında oluşan aldehitler,

serbest radikallerin ilk oluştuğu yerden daha uzaktaki bir hücrenel hedefe diffüze olabilir. Membran lipidlerindeki doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu ile meydana gelen son ürün MDA'dır. MDA'nın hücre çoğalması üzerindeki toksik etkisi, MDA'yı hücrenel toksik aldehtlerden biri yapmaktadır. (107, 108, 109). Hamouda ve arkadaşları, metanol ile oksidatif hasar oluşturulmuş ratlarda birçok biyokimyasal parametre ile birlikte malondialdehit (MDA) seviyelerini incelemişlerdir. Bu çalışmada kontrol, metanol ve tedavi grupları arasındaki ilişki araştırılmış, metanol grubundaki MDA seviyeleri kontrol grubundan yüksek olarak bulmuşlardır (101). Rajamani ve arkadaşları yaptıkları çalışmada MTX (Metotreksat)'ın tek başına optik sinirde MDA'yı artırdığını, tGSH'yı ise azalttığını açıklamışlardır. Aynı zamanda MTX (Metotreksat) + metanol kombinasyonunun MDA miktarını aşırı yükselttiğini, tGSH'ı ise ciddi oranda azalttığını rapor etmişlerdir (110). Çalışmamızda da Tablo 4.4 ve Şekil 4.3'te de görüldüğu gibi metanol uygulanan grubun MDA miktarında istatistiksel açıdan aşırı artış olduğu, bu durum metanol'ün SOR üretimini indüklemesi sonucunda lipid peroksidasyonu oluşturması şeklinde açıklanabilir.

GSH, vücudun antioksidan savunma mekanizmasını düzenlemede merkezi rolü olan ve protein yapısında olmayan bir tioldür. Normal hücre yapı ve fonksiyonunu koruyucu etkisi redoks ve detoksifikasyon reaksiyonlarıyla gösterilmiştir. Rajagopal ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında alkol verilen sıçanların doku GSH düzeylerinin azaldığını belirtmişlerdir. Düşük GSH düzeyleri, antioksidan bir enzim olan glutatyon peroksidazın kullanımındaki artış sebebiyle olabileceğini açıklamışlardır (111). Organizmada antioksidan savunma sistemleri, SOR'nin hasar oluşturucu etkilerine karşı gelişmiştir. Normal şartlarda SOR'nin hasar oluşturucu etkileri antioksidanlarla durdurulmaktadır ve böylece oksidatif hasar sonucu ortaya

çıkan doku hasarı en aza indirilmektedir. Dokularda serbest oksijen radikallerini nötralize etme kapasitesi sınırlıdır. Sırasıyla süperoksid anyonunu hidrojen perokside, hidrojen peroksidi suya çeviren bu mekanizmalar katalazı ve SOD içerir. Bunlara ilaveten glutatyon çifti-GSH ve GSSG- bir mekanizma ile okside olmuş molekülleri redükte ederek antioksidan sistem görevi görür ve hekzozmonofosfat yolundan üretilen NADPH'ye ihtiyaç duyar. Hücre kültür ve organ sistemlerinde oksidatif stresin belirlenmesinde, GSH'ın hücresel düzeylerinin azalması, GSSG düzeylerinin artması (GSH/GSSG oranı) kullanılır (112). Serbest radikal üretimi belirli bir seviyenin üzerine çıkar ve antioksidanlar SOR'ları nötralize etmede yetersiz kalırsa, SOR'lar hücrede lipid, protein, karbonhidrat, enzimleri ve nükleik asitleri bozarak zararlı etkiler oluşturur (112). Kandaki GSH düzeyinin düşüklüğü, GSH sentezinin yetersizliğinden kaynaklandığı bilinmektedir. Glutatyon, SOR ilişkili lipid peroksidasyonu sonucu ortaya çıkan toksik ürünlerle reaksiyona girerek bu ürünlerin uzaklaştırılmasında rol alan güçlü bir antioksidandır (113, 114). Kurata ve arkadaşları (115), yaptıkları çalışmalarında bazı memeli türlerindeki eritrosit antioksidan sistemlerini karşılaştırmış ve GSH'ın SOR'ları nötralize etmede harcandığını bildirmişlerdir. Glutatyon, hücreleri serbest radikallerin oluşturduğu hasardan korumakta ve buna ek olarak yabancı toksik maddelerin ortadan kaldırılmasında da görev almaktadır. Bununla birlikte, GSH (Glutatyon)'un GSSG'a oksidasyonu ve adaptasyon mekanizmasının bozulması sonucu meydana gelen ciddi bir oksidatif stres tGSH seviyesini baskılayabilir. Buna göre metanol uygulaması serbest oksijen radikallerinin üretimini artırmakta ve oluşan bu SOR'ları nötralize etmek için ortamda bulunan tGSH'ların tüketildiği düşünülmektedir. MDA düzeyindeki bu artış biyokimyasal bulgularımızı desteklemektedir (116, 117, 118). Çalışmamızda

literatürle uyumlu olarak metanol uygulanan grupta MDA değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış ($p<0.001$) ve tGSH değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.001$) düzeyde bir azalma söz konusudur.

Bu çalışmada, sıçanlara metanol uygulanarak oksidatif karaciğer hasarı oluşturulmuştur. ATP 4 mg/kg lık dozda tedavi edici olarak ratlara i.p olarak verilmiştir. Metanol ile karaciğer hasarı oluşturulan ratlardan alınan kan serumunda AST ve ALT seviyelerinde artış AST/ALT oranında yükselme oluşmuş, bu ratlardan alınan karaciğer dokusunda yapılan test sonucunda da MDA seviyesi artarken, tGSH seviyesinde azalma tesbit edilmiştir. Metanol+ATP uygulanan gruptan alınan numune sonuçlarında AST ve ALT seviyeleri sadece metanol uygulanan gruba göre önemli oranda düşük bulunmuş ve AST/ALT oranında da önemli oranda düşme olduğu görülmüştür. Karaciğer dokusunda MDA seviyesi metanol uygulanan gruba oranla daha düşük olduğu bulunurken, tGSH seviyesi ise daha yüksek bulunmuştur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Konrol grubu dışındaki sıçanlarda metilalkol'e bağlı hepatotoksisitede oksidatif hasar oluşturulduğu, AST ve ALT serum değerleri ile AST/ALT oranının değerleri bir göstergesi olduğu görüldü. Karaciğer doku örneklerinin histopatolojik değerlendirilmesi sonucu metanol'ün karaciğer hasarı yaptığı tespit edildi.
- Deneysel elde edilen verilerde Metatreksat+Metanol+ATP grubunda AST ve ALT seviyesi Metotreksat+Metanol uygulanan gruba göre önemli oranda düşük bulundu ve yine AST/ALT oranında da önemli oranda düşme olduğu görüldü. Karaciğer dokusunda yapılan çalışmada ise MDA seviyesi metanol uygulanan gruba oranla daha düşük olduğu bulunurken GSH seviyesi ise daha yüksek bulundu. Karaciğer doku örneklerinin histopatolojik değerlendirilmesi sonucu Metanol+ATP grubundaki karaciğer hasarının alkol grubuna göre daha az olduğu ya da patolojik özellik göstermediği görüldü.
- Mevcut çalışmada bir antioksidan olan tGSH sentezinde önemli role sahip ATP'nin, karaciğer hasarında dışarıdan verilmesiyle GSH düzeylerinin arttırılabileceğini düşündürmektedir.
- Sonuç olarak, eksojen olarak uygulanan ATP, alkolik karaciğer dokusunda oksidan parametre olarak bilinen MDA'nın artışını önledi ve antioksidan olan GSH'nın düzeylerini arttırdı. Bu sonuçlar klinikte ATP'nin alkolik karaciğer hasarına karşı önleyici bir madde olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

- Bütün bu değerlendirmelerle beraber oksidatif stres ile açıklanan alkolik karaciğer hastalıklarının gelişim sürecinde deneysel olarak ATP 'in koruyucu etkisi olduğu sonucuna varıldı.



KAYNAKLAR

1. Prabhakaran V, Ettler H, Mills A. Methanol poisoning: two cases with similar plasma methanol concentrations but different outcomes. *CMAJ* 1993;148:6:981-984.
2. Yayıncı N, İnancıcı MA. Methylalcohol (methanol) intoxication. *Türkiye Klinikleri J Foren Med* 2005;3:101-108.
3. Yazgan ÜC, Elbey B, Kuş S, Baykal B, Keskin I, Yılmaz A, Şahin A. Effect of caffeic acid phenethyl ester on oxidant and anti-oxidant status of liver and serum in a rat model with acute methanol intoxication. *Ir J Med Sci.* 2017 May;186(2):519-523. doi: 10.1007/s11845-016-1462-2. Epub 2016 Apr 30.
4. Hayreh MS, Hayreh SS, Baumbach GL, Cancilla P, Martin-Amat G, Tephly TR, Mc Martin KE, Makar AB. Methyl alcohol poisoning III. Ocular toxicity. *Arch Ophthalmol.* 1977;95(10):1851-1858
5. Liesivuori J, Savolainen H. Methanol and formic acid toxicity: biochemical mechanisms. *Pharmacol Toxicol* 1991;69:157-163.
6. Chen J, Wang L-X, Xia W (2010) Advancement of methanol poisoning mechanism research. *Fa Yi Xue Za Zhi* 26:294-296
7. Jennings RB, Reimer KA. The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med* 1991; 42:
8. Serkan Kumbasar Nihal Cetin Omer Erkan Yapca Ebru Sener Unal Isaoglu Mehmet Yilmaz Suleyman Salman Ayse Nur Aksoy Mehmet Ali Gul VII Halis Suleyman. Exogenous ATP administration prevents ischemia/reperfusion-induced oxidative stress and tissue injury by modulation of hypoxanthine metabolic pathway in rat ovary. *Ciência Rural, Santa Maria*, v.44, n.7, p.1257-1263, jul, 2014.
9. Bizzaro N, Tremolada F, Casarin C, Bonetti P, Noventa F, Diodati G, Drago C, Realdi G. Serum alanine aminotransferase level among volunteer blood donors: effect of sex, alcohol intake and obesity. *Ital J Gastroenterol*, 1992, 24: 237-41. 157.
10. Goldie DJ, Mc Connell AA. Serum alanine transaminase (ALT) reference ranges estimated from blood donors. *J Clin Pathol*, 1990, 43: 929-31.
11. Gupta SK, Saxena A, Singh U, Arya DS. Bosentan, the mixed ETA-ETB endothelin receptor antagonist, attenuated oxidative stress after experimental myocardial ischemia and reperfusion. *Mol Cell Biochem*, 2005, 275: 67-74.

12. Barceloux GD, Bond GR, Krenzelok EP, Cooper H, Vale JA. American Academy of Clinical Toxicology Practice Guidelines on the Treatment of Methanol Poisoning. *Clinical Toxicology*, 2002;40(4):415-446.
13. IPCS, Healthy and Safety Guide No. 105. Methanol; World Health Organization: Geneva,1997;105.
14. Curtis D Klaasen. Incaserett ve Doull S. Toxic effects of solvents and vapor. *Toxicology*. 5th ed 1996. p.755-7.
15. Yaycı N, İnancıcı MA. Metil Alkol (Metanol) Zehirlenmesi. *Türkiye Klinikleri J Foren Med*,2005;2:101-108.
16. Julia J. Liu, Mohamud R.Daya, N.Clay Mann. Methanol-Related Deaths in Ontario. *Clinical Toxicology*,1999;37(1):69-73.
17. Naraqi S, Dethlefs RF, Slobodniuk RA, Sairere JS. An out break of acute methylalcohol intoxication. *Aust. N Z J Med*1979;9:65-68.
18. Yayci N, Ağritmiş H, Turla A, Koç S. Fatalities due to methylalcohol intoxication in Turkey: an 8 year study. *Forensic Science International*, 2003;131:36- 41.
19. Rley RJ, Ison BE, Narins RG. Acute metabolic acid basedis order. *Crit Care Clin* 1987;5:699-724.
20. Suit PF, Estes ML. Methanol intoxication: Clinical features and differential diagnosis. *Cleve Clin J Med*1990;57:464-71.
21. Scrimgeour, EM. Outbreak of Methanol and Isopropanol Poisoning in New Britain, Papua New Guinea. *Med. J. Aust.* 1980;2:36-38.
22. Vicellio P. *Emergency Toxicology* 2nd ed. 1998. p.277-85.
23. Winchester F. M.D. Methanol, isopropylalcohol, higher alcohols, ethylene glycol, cellosolves, acetone, nadoxalate james. In *Clinical Management of Poisoning and Drug Overdose* 2nd ed. Haddad Winchester 1990. Chapter 37.687-702.
24. Goldfrank LR, Flomenbaum NE, Levin NA, Howland MA. Methanol and Ethylene Glycol in Gold frank's toxicologic emergencies 3rd ed. Norwalk Ct. Appleton&Lange, 1986. p.453-65.
25. Palmisano J, Gruver C, Adams ND. Absence of anion gap metabolic asidosis in severe methanol poisoning: A Case report and review of the literature. *Am J Kidney Dis*1987;9:441.

26. Shahangian S, Ash KO. Formic and lactic asidosis in a fatal case of methyl alcohol intoxication Clin Chem 1986;32:395-7.
27. Nicholls P. The effect of formate on cytochrome a and on electron transport in the intact respiratory chain. Biochim Biophys Acta 1976;430:201-8.
28. Martin Amat G, McMartin KE, Hayreh SS, Hayreh MS, Tephly TR. Methanol poisoning. Ocular toxicity produced by formate. Toxicol Appl Pharmacol 1978;45:201-8.
29. Litovitz T. The alcohols: Ethanol, methanol, isopropanol, ethylene glycol. Pediatric Clin N Am 1986;33:311.
30. Rumack BH. Poisondex toxicologic management (Vol 59). Denver: Micromedex, 1989.
31. Tong TG. The Alcohols Crit Care 1982;4:75-85.
32. Kruse JA. Methanol poisoning. Intensive Care Med. 1992;18:391-7.
33. Osterloh JD, Pond SM, Grady S, Becker CE. Serum formate concentrations in methanol intoxication as a criteria for hemodialysis. Ann Intern Med 1986;104:200-3.
34. National Institute of health. Use of folate analogue in treatment of methyl alcohol toxic reactions is studied. JAMA 1979;242:1961-2.
35. Mercanlıgil, S.M. 2008. Karaciğer, safra kesesi ve pankreas hastalıklarında beslenme. Diyet El Kitabı. Hatipoğlu Yayınları: 116, Yüksek öğretim Dizisi: 36, 5. Baskı, s.179-213, Ankara.
36. Kuran O. Sistemik Anatomi. Filiz Kitabevi, İstanbul 1983; ss 429-443.
37. Soyder, A. (2008). Anti-TNF monoklonal antikor tedavisinin karaciğer rezeksiyonu sonrası rejenerasyon sürecine etkisi (Doctoral dissertation, Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi).
38. Couinaud C. Liver anatomy: portal (and suprahepatic) biliary segmentation. Digest Surg 1999;16:459-67.
39. Ratych RE, Smith GW. Anatomy and physiology of the liver. GD Zuidema.(Ed). Shackelford's Surgery Of The Alimentary Tract. Fourth ed. Philadelphia: Saunders, 1996: Vol.3;357-73.
40. Fausto N: Hepatic regeneration. Zakim D, Boyer TD (eds). Hepatology WB Saunders, Philadelphia 32-58, 1996.

41. Nagasue N, Yukaya H, Ogawa Y et al. Human liver regeneration after major hepatic resection. *Ann Surg* 1987;206:30-9.
42. Townsend MC, Beauchamp RD, Evers BM. Liver. In: Meyers WC, Chan RS (Eds). *Sabiston Textbook of Surgery* 16th. WB Saunders Company, Philadelphia 2001; pp 997-1059.
43. Smith C, Marks A, Lieberman M. Enzymes as catalysts. Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach. 2 Baskı. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2005: 135-136.
44. Yang RZ, Park S, Reagan WJ, Goldstein R, Zhong S, Lawton M, Rajamohan F, Qian K, Liu L, Gong DW. Alanine aminotransferase isoenzymes: molecular cloning and quantitative analysis of tissue expression in rats and serum elevation in liver toxicity. *Hepatology*, 2009, 49: 598-607.
45. Kaplan MM. Alanine aminotransferase levels: what's normal? *Ann Intern Med*, 2002, 137: 49-51.
46. Friedman LS, Martin P, Munoz SJ. Laboratory Evaluation of the Patient with Liver Disease. İçinde: Zakim D, Boyer TD (editörler). *Hepatology: A Text book of Liver Disease*, 4 Baskı. Philadelphia, Saunders, 2003: 661-670.
47. Uslusoy HS, Nak SG, Gulden M, Biyikli Z. Non-alcoholic steato hepatitis with normal amino transferase values. *World J Gastroenterol*, 2009, 15: 1863-8.
48. Uchida T, Kao H, Quispe-Sjogren M, Peters RL. Alcoholic foamy degeneration-a pattern of acute alcoholic injury of the liver. *Gastro enterology* 1983;84:683-92.
49. Nanji AA, French SW, Mendenhall CL. Serum aspartate aminotransferase to alanine aminotransferase ratio in human and experimental alcoholic liver disease: relationship to histologic changes. *Enzyme* 1989;41:112-5.
50. Leiber CS. Biochemical factors in alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 1993;13:136-53.
51. Akkuş T. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya, Mimoza Yayınları, 1995: 1-80.
52. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2006, 160: 1-40.
53. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2007, 39: 44-84.

54. Kılınç A, Kılınç K. Nitrik Oksit Biyolojik Fonksiyonları ve Toksik Etkileri, 1. Baskı. Ankara, Palme Yayıncılık, 2000.
55. Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research*, 2004, 567: 1-61.
56. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *The Biochemical Journal*, 1984, 219: 1-14.
57. Bayır Y. Usnea Longissima Ach. Liken Türünden İzole Edilen Difraktaik Asit'in İndometazin Ülseri Üzerine Koruyucu Etkisi ve İn-Vivo Antioksidan Özelliklerinin Araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2004.
58. The rond P, Bonnefont-Rousselot D, Davit-Spraul A, Conti M, Leqrand A. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2000;3: 373-84.
59. Nourooz-Zadeh J. Ferro usion oxidation in presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxides in plasma. *Methods Enzymol*1999;300:58- 62.
60. Valdez LB, Arnaiz SL, Bustamante J, Alvarez S, Costa LE, Boveris A. Free radical chemistry in biological systems. *Biol Res* 2000;33: 1-8.
61. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. Newyork: Oxford University Press Inc; 2007.p.55-79.
62. Sargowo D, Ovianti N, Susilowati E, Ubaidillah N, Widya Nugraha A, Vitriyaturrida, Siwi Proboretno K, et al. The role of polysaccharide peptide of Ganoderma lucidum as a potent anti-oxidant against atherosclerosis in high risk and stable angina patients. *Indian Heart J* 2018 Sep - Oct;70(5):608- 614.
63. Goulart M, Batoreu MC, Rodrigues AS, Laires A, Rueff J. Lipoperoxidation products and thiol antioxidants in chromium exposed workers. *Mutagenesis*, 2005, 20: 311- 315.
64. Gutteridge JMC. Lipid-Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue-Damage. *Clinical Chemistry*, 1995, 41: 1819-1828.
65. Burton G.W., (1989); Antioxidant Action of Carotenoids. *J Nutr*, 119, 109- 111.
66. Köse K., Doğan P., (1992) Lipid Peroksidasyonu. *Erciyes Üniversitesi Tıp Dergisi*, Ek 1, 340-350.
67. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, VM. R. Harper's Biochemistry. 25. Baskı. USA, McGraw-Hill Press, 2000.

68. Akbari M, Ostad mohammadi V, Lankarani KB, Tabrizi R, Kolahdooz F, Heydari ST, Kavari SH, Mirhosseini N, Mafi A, Dastorani M, Asemi Z. The Effects of Vitamin D Supplementation on Biomarkers of Inflammation and Oxidative Stress Among Women with Polycystic Ovary Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Horm Metab Res*. 2018 Feb 23. doi: 10.1055/s-0044-101355.
69. Tsai AC. Lipid Peroxidation and Glutathione Peroxidase Activity in Liver of Cholesterol-Fed Rats. *Journal of Nutrition*, 1975, 105: 946-951.
70. Brigelius-Flohe R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, 27: 951-965.
71. Mannervik B., (1985) Glutathione Peroxidase. *Method Enzymology* 113, 490-495.
72. Pickett CB, Lu AY. Glutathione S-transferases: gene structure, regulation, and biological function. *Annual review of biochemistry*, 1989, 58: 743-764.
73. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*, 1994, 344: 721-724.
74. Sorg O. Oxidative stress: a theoretical model or biological reality? *C.R. Biologies*, 2004; 327: 649-662.
75. Kidd PM. Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage. *Alternative Medicine Reviews* 1997; 2: 155-176.
76. Champe PC, Harvey RA. Glikoz aminoglikanlar. Tokullugil A, Dirican M, Ulukaya E. *Lippincott's illustrated reviews serisinden: Biyokimya*. 2. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 1997. s.147-156.
77. Liebman JF, Greenberg A. *Mechanistic principles of enzyme activity*. New York: VCH Publishers; 1988.
78. Reed DJ. *Mechanisms of chemically induced cell injury and cellular protection*, (E. Hodgson; R.C. Smart, Editörler). *Introduction to biochemical toxicology*. United States of America: Wiley and Sons Inc; 2000. s. 221-253.
79. Anderson ME. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chemico Biological Interactions* 1998; 111-112: 1-14.
80. Pena-Ilopis S, Ferrando MD, Pena JB. Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by NA cetylcycteine. *Aquatic Toxicology* 2003; 65: 337- 360.

81. Griffith, O.W. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radical Biology and Medicine* 1999; 27: 922-935.
82. Kılınç, E., Sinir Sisteminde Pürinerjik Mekanizmalar: Adenozin Trifosfatın Migren Patofizyolojisindeki Rolü 2016: Volume Cilt 5 Issue Sayı 2.
83. Dulkadiroğlu, E., Prediyabetik ve Yeni Tanı Tip 2 Diyabetik Hastalarda Hücre İçi Enerji Metabolizmasının Değerlendirilmesi, 2012. T. C. Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi.
84. Oğuz A.,2019 Akrolein Verilen Ratlarda Whey Proteinin Rat Karaciğeri Mitokondrial Oksidatif Stres ve Solunum Enzimleri Üzerine Etkisi T.C.Amasya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi
85. Headache Classification Subcommittee of the International Headache Society. The International Classification of Headache Disorders. 2nd edition. *Cephalalgia*, 2004; 24 (1): 16-151.
86. Masterson CG, Durham PL. DHE repression of ATP-mediated sensitization of trigeminal ganglion neurons. *Headache*, 2010; 50(9):1424-1439.
87. Zhang X, Kainz V, Zhao J, Strassman AM, Levy D. Vascular extracellular signal-regulated kinase mediates migraine-related sensitization of meningeal nociceptors. *Ann Neurol*, 2013; 73(6):741-750.
88. Bulanova E, Bulfone-Paus S. P2 receptor-mediated signaling in mast cell biology. *Purinergic Signal*, 2010; 6(1):3-17.
89. Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci*, 2009;32(1):19-29.
90. Burnstock G. Historical review: ATP as a neuro transmitter. *Trends Pharmacol Sci*, 2006; (3):166-176.
91. Elmas İ, Tüzün B, İmrağ C, Korkut M. Evaluation of deaths due to methyl alcohol intoxication with respect to forensic medicine. *İstanbul Med Faculty*. 1996;59(4):64-9.
92. Krishnamurthi MV, Natarajan AR, Shanmugasundaram K, Padmanabhan K, Nityanandan K. Acute methyl alcohol poisoning. (A review of an outbreak of 89 cases). *The Journal of the Association of Physicians of India*. 1968 Oct;16(10):801-5. PubMed PMID: 5715506.

93. Koch OR., Galeotti T., Bartoli GM., Boveris A.: Alcohol-induced oxidative stress in rat liver. *Xenobiotica*.21(8):1077-84, 1991.
94. Sherlock S., Dooley J., (1997) Chronic Hepatitis, Sherlock S. (Eds). *Diseases of the Liver and Biliary System*. (10th Edition), Oxford, Black well Science Ltd, 303-330.
95. Çakaloğlu Y., (2001) Kronik hepatit, Ökten A (ed), *Gastroentero hepatoloji İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Temel ve Klinik Bilimler Ders Kitapları*. İstanbul, 387-399.
96. Koksall M., Kurcer Z., Erdogan D., Iraz M., Tas M., Eren MA., Aydogan T., Ulas T. (2012) Effect of Melatonin and N-Acetylcysteine on Hepatic Injury in Rat Induced by Methanol Intoxication: A Comparative Study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*.16(4):437-444.
97. Kasacka I., Skrzydlewska E. (1999) Morphological Changes in the Liver of Rats Intoxicated With Methanol. *Rocz Akad Med Bialymst*. 44:89-101.
98. Kurcer Z., Oğuz E., Iraz M., Fadillioglu E., Baba F., Koksall M., Olmez E. (2007) Melatonin Improves Methanol Intoxication-Induced Oxidative Liver Injury in Rats. *J Pineal Res*. 43(1):42-49.
99. Moral A.R., Çankayalı İ., Sergin D., Boyacılar Ö., Deneysel Akut Metanol İntoksikasyonunda Nöromusküler Fonksiyonlar. *Turk J Anaesth Reanim* 2015; 43: 337-43
100. Parthasarathy NJ. Kumar RS., Manikandan S., Devi, RS. (2006). Methanol-induced oxidative stress in rat lymphoid organs. *J Occup Health* 48: 20-27.
101. Hamouda AF., Shaban NZ, El Kersh Mohamed AR., Thaali AFAL, Khardalic IA., Oraiby ME., Atafi MA. (2018) Study on Agarwood and caspase-3 activation in rat liver toxicity induced by methanol, *Pharmacy&Pharmacology International Journal*. 6 (2), 127-130.
102. Samir P., Desai MD., Sana Isa-Pratt MD.: *Clinician's Guide to Laboratory Medicine*. Chapter 66, p.612- 613, Lexi-CompInc, 2004.
103. Dolar E.: *Klinik Karaciğer Hastalıkları*. Bölüm 4, s. 133-146, 1.Baskı, Nobel&Güneş Tıp Kitabevi, 2002.
104. Tietz *Fundamentals of Clinical Chemistry*, p. 354-355, 5th. edition, SaundersCompany, 2005.

105. Rosalki SB, McIntyre N., (1999) Biochemical Investigations in the Management of Liver Disease. J Bircher (Eds), Oxford Textbook of Clinical Hepatology. Volume 1, (Second ed.), Oxford University Press, 503-521.
106. Pratt DS., Kaplan MM, (1999) Evaluation of the Liver. Schiff M.F., (Eds), Diseases of the Liver, Volume 1, (Eight ed.) Philadelphia, Lippincott- Raven, 205-244.
107. Bulky GB., (1993) Free Radicals and Other Reactive Oxygen Metabolites. Clinical Relevance and The Therapeutic Efficacy of Antioxidant Therapy. Surgery 113, 479-483.
108. Yu BP., (1994) Cellular Defenses Against Damage from Reactive Oxygen Species. Physiol Rev. 74, 139-162.
109. Öztürk M., Güzelhan Y., Sayar K. ve ark., (2001) Yaygın Gelişim Bozukluğu Olan Çocuklarda Plazma Malondialdehit ve Glutasyon Düzeylerinin Araştırılması. Klinik Psikofarmakoloji Bülteni 11, 155-159.
110. Rajamani R, Muthuvel A, Senthilvelan M, Sheeladevi R. Oxidative stress induced by methotrexate alone and in the presence of methanol in discrete regions of the rodent brain, retina and optic nerve. Toxicol Lett. 2006;265-273.
111. Rajagopal S.K., Manickam P., Periyasamy V., Namasivayam N. (2003) Activity of Cassia auriculata leaf extract in rats with alcoholic liver injury. J Nutr Biochem 14, 452-458
112. Dupont I., Bodenez P., Berthou F., Simon B., Bardou L.G., Lucas D. (2000) Cytochrome P-450 2E1 activity and oxidative stress in alcoholic patients. Alcohol Alcohol 35, 98-103.
113. Ulakoğlu Z. Gümüştaş M.K., Belce A., (1998) Strese Bağlı Mide Mukozası Hasarında Endojen Glutasyon Tükeneşinin Enerji Metabolizması ile İlişkisi. Cerrahpaşa J. Med 29 (3), 127-131.
114. John P. Richie, Jr., (1992) The Role of Glutathione in Aging and Cancer. Experimental Gerontology 27, 615-626.
115. Kurata M., Suzuki M., Agar N.S., (1993) Antioxidant Systems and Erythrocyte Life Span in Mammals. Comp. Biochem. Physiol., 106 B, 477-487.
116. Halliwell B., Gutteridge JMC. (1999) Free Radicals in Biology and Medicine. (3rd edition) New York.
117. Akkuş İ., (1995) Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Konya Mimoza Yayınları, (1. Baskı), 1-84.

118. Arıkanoğlu A., Yüksel H., Göçmez C., Uzar E., Acar A., Aluçlu M.U. Metanol İntoksikasyonuna Bağlı Serebeller Doku Hasarı Üzerine Kafeik Asit Fenetil Esterin Etkisi: Deneysel Çalışma.Turk Nöroloji Dergisi 2013; 19(3): 93-96



EKLER

EK1. ETİK KURUL ONAY SAYFASI

TOPLANTI TARİHİ : 27.12.2018

TOPLANTI SAYISI : 13

KARAR N0 249: Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Rektörlüğü, Tıp Fakültesi Dekanlığı, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Taha Abdulkadir ÇOBAN'ın yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülecek olan “**Sıçanlarda Metanol İle İndüklenen Oksidatif Karaciğer Hasarına Adenozin Trifosfatın Etkisi**” isimli araştırma çalışması ile ilgili 25.12.2018 tarih ve 77040475-641.04-E.1800374296 sayılı Atatürk Üniversitesi Rektörlüğü, Hukuk Müşavirliğinin yazısı ekindeki Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Rektörlüğü, Tıp Fakültesi Dekanlığının 17.12.2018 tarih ve 21142744-804.01-55634 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, çalışma sonucunun Başkanlığımıza bildirilmesine, mevcut oy birliği ile kabulüne; karar verildi.

Ek : Sonuç Raporu. 1 Adet.

ÖZGEÇMİŞ

Araştırmacı Yunus KOÇ Erzincan’ da doğdu. İlköğretim ve lise eğitimini burada tamamladı. 2007 yılında Fırat Üniversitesi Veterinerlik Fakültesinde lisans eğitimine başlayarak buradaki eğitimini 2012 yılında tamamladı. 2013 yılında Erzincan Tarım ve Orman İl Müdürlüğünde göreve başladı ve halen devam ettirmekte. 2016 yılında Erzincan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı.

