

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RATLARDA KARBONTETRAKLORÜR İLE OLUŞTURULAN
HEPATOTOKSİSİTEDE BAZI BİYOKİMYASAL
PARAMETRELER VE PROTEİN ELEKTROFOREZİ
DEĞİŞİMLERİ ÜZERİNE FUCOIDAN'IN ETKİSİ**

Hemşire Nesrullah AYŞİN
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Handan MERT

VAN-2014

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RATLARDA KARBONTETRAKLORÜR İLE OLUŞTURULAN
HEPATOTOKSİSİTEDE BAZI BİYOKİMYASAL
PARAMETRELER VE PROTEİN ELEKTROFOREZİ
DEĞİŞİMLERİ ÜZERİNE FUCOIDAN'IN ETKİSİ**

Hemşire Nesrullah AYŞİN
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Jüri Başkanı
Prof. Dr. Fatmagül YUR

Üye
Prof. Dr. Handan MERT

Üye
Doç.Dr. Devrim SARIPINAR AKSU

TEZ KABUL TARİHİ
/ / 2014

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmam sırasında yol gösteren, tezin yapılmasında büyük katkıları olan ve desteğini esirgemeyen Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Handan MERT'e, Biyokimya Anabilim Dalımızın ğretim yeleri olan Sayın Prof. Dr. Nihat MERT, Prof. Dr. Fatmagül YUR ve Prof. Dr. Yeter DEğER'e, elektroforez analizlerindeki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Semiha DEDE'ye, tezin istatistiklerini yapan Prof. Dr. Sıddık KESKİN ve Öğr. Gör. Sadi ELASAN 'a, tezin deneme ve laboratuvar aőamasındaki yardımlarından dolayı Kemal ZİREK, yüksek lisans ğrencisi arkadaşlarım Alper Cenk KAPLAN, Neőe ATAMAN ve doktora ğrencisi Kıvanç IRAK'a ve beni her zaman destekleyen değerli Anne ve Babama teőekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
Teşekkür.....	III
İçindekiler.....	IV
Simgeler ve Kısaltmalar.....	VI
Tablolar Listesi.....	VII
Şekiller Listesi.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Karaciğerin Yapısı.....	3
2.1.1. Karaciğerin fonksiyonları.....	4
2.2. Karbontetraklorür (CCl ₄).....	5
2.2.1. Karbontetraklorürün karaciğer üzerine etkisi.....	6
2.3. Fucoïdan	7
2.3.1. Fucoïdanın yapısı ve elde edilmesi.....	7
2.3.2. Fucoïdanın fizikokimyasal özellikleri.....	11
2.3.3. Fucoïdanın farmakolojik özellikleri.....	11
2.3.3.1. Fucoïdanın mide koruyucu etkisi.....	13
2.3.3.2. Fucoïdanın antiinflatuvar etkisi.....	14
2.3.3.3. Fucoïdanın hepatopatiye karşı etkisi.....	14
2.3.3.4. Fucoïdanın kan lipitlerine etkisi.....	14
2.3.3.5. Fucoïdanın antitümör ve bağışıklık sistemine etkisi.....	15
2.3.3.6. Fucoïdanın antiviral etkisi.....	15
2.3.3.7. Fucoïdanın antioksidan etkisi.....	16
2.4. Karaciğer Enzimleri.....	17
2.4.1. Transaminazlar (Aminotransferazlar).....	17
2.4.1.1. Alanin aminotransferaz (ALT).....	17
2.4.1.2. Aspartat aminotransferaz (AST).....	18
2.4.2. Gamma glutamil transferaz (GGT).....	19
2.5. Kan Proteinleri.....	21
2.5.1. Albumin	21

2.5.2. Globulin	22
2.6. Total Protein.....	24
2.7. Serum Protein Fraksiyonlarının Belirlenmesi.....	25
2.7.1. Serum protein fraksiyonlarının klinik önemi.....	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
3.1. Gereç.....	31
3.1.1. Hayvan materyali.....	31
3.1.2. Kullanılan alet ve malzemeler.....	31
3.1.3. Kimyasal maddeler.....	32
3.2. Yöntem.....	32
3.2.1. Deneme gruplarının hazırlanması.....	32
3.2.2. Örnek Toplanması.....	33
3.2.3. Alanin aminotransferaz tayini.....	33
3.2.4. Aspartat aminotransferaz tayini	33
3.2.5. Gamma glutamil transferaz tayini.....	34
3.2.6. Albumin tayini.....	34
3.2.7. Globulin tayini.....	35
3.2.8. Total protein tayini.....	35
3.2.9. Sellüloz asetat elektroforezi ile serum proteinlerinin analizi.....	35
3.3. İstatistik analiz.....	37
4. BULGULAR.....	38
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	48
ÖZET.....	61
SUMMARY.....	62
KAYNAKLAR.....	63
ÖZGEÇMİŞ.....	77
EK-1 Araştırma Başvuru Onay Belgesi.....	78
Ek-2. YYÜ Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu Araştırma Kesin Sonuç Onay Belgesi.....	79

SİMGELER VE KISALTMALAR

A/G	: Albumin/Globulin oranı
ALT	: Alanin Aminotransferaz
AMP	: Adenozin Monofosfat
AST	: Aspartat Aminotransferaz
AYKH	: Arteriyel Yumuşak Kas Hücreleri
CCl₃⁻	: Triklorometil Radikali
CCl₃OO⁻	: Triklorometil Peroksit
CCl₄	: Karbontetraklorür
CYP	: Sitokrom P450
D	: Dalton (1D = 1.67x10 ⁻²⁴ g)
GGT	: Gamma Glutamil Transferaz
GMP	: Guanozin Monofosfat
HDL	: Yüksek Dansiteli Lipoprotein
Ig	: İmmüoglobulin
IL-10	: İnterlökin -10
i.p	: İntraperitoneal
kDa	: Kilodalton
Kg	: Kilogram
LDL	: Düşük Dansiteli Lipoprotein
LPO	: Lipit Peroksidasyon
TGF-β	: Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1. Bazı hastalıklarda serum proteinlerinin durumu.....	28
Tablo 2. Bazı hastalıklarda serum proteinlerinin elektroforetik görünümü.....	29
Tablo 3. Kontrol, fucoidan, fucoidan+CCl ₄ , CCl ₄ grubu ratlara ait serum ALT, AST, GGT aktiviteleri ile serum albumin, globulin ve total protein düzeylerinin ortalamaları.....	38
Tablo 4. Kontrol, fucoidan, fucoidan+CCl ₄ ve CCl ₄ grubundaki ratlara ait protein fraksiyonları.....	42

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	Sıçan karaciğeri.....	4
Şekil 2.	Karbontetraklorür	6
Şekil 3.	Fuoidanın kimyasal yapısı	8
Şekil 4.	Fuoidanın üretim şeması.....	10
Şekil 5.	Alanin aminotransferazın katalizlediği reaksiyon.....	18
Şekil 6.	Aspartat aminotransferaz reaksiyonunda pridoksomal fosfat ve pridoksamin fosfatın siklik dönüşümü	19
Şekil 7.	GGT'nin yapısı ve amino asit dizilimi	20
Şekil 8.	Klinik laboratuarda kullanılmak üzere serum proteinlerinin elektroforetik olarak ayrıldığı bantlar ve alt grupları.....	25
Şekil 9.	Serum proteinlerinin elektroforetik görünümü.....	26
Şekil 10.	Kontrol, fuoidan, fuoidan+CCl ₄ , CCl ₄ gruplarındaki ratlara ait serum ALT aktiviteleri	39
Şekil 11.	Kontrol, fuoidan, fuoidan+CCl ₄ , CCl ₄ gruplarındaki ratlara ait serum AST aktiviteleri	40
Şekil 12.	Kontrol, fuoidan, fuoidan+CCl ₄ , CCl ₄ gruplarındaki ratlara ait serum GGT aktiviteleri.....	40
Şekil 13.	Kontrol, fuoidan, fuoidan+CCl ₄ , CCl ₄ gruplarındaki ratlara ait serum albumin düzeyleri	41
Şekil 14.	Kontrol, fuoidan, fuoidan+CCl ₄ , CCl ₄ gruplarındaki ratlara ait serum globulin düzeyleri	41
Şekil 15.	Kontrol, fuoidan, fuoidan+CCl ₄ , CCl ₄ gruplarındaki ratlara ait serum total protein düzeyleri	42
Şekil 16.	Kontrol, fuoidan, fuoidan+CCl ₄ ve CCl ₄ grubu ratlara ait protein fraksiyonundaki albumin düzeyleri (%).....	43

Şekil 17.	Kontrol, fucoïdan, fucoïdan+CCl ₄ ve CCl ₄ grubu ratlara ait protein fraksiyonundaki α ₁ -globulin düzeyleri (%).....	43
Şekil 18.	Kontrol, fucoïdan, fucoïdan+CCl ₄ ve CCl ₄ grubu ratlara ait protein fraksiyonundaki α ₂ -globulin düzeyleri (%).....	44
Şekil 19.	Kontrol, fucoïdan, fucoïdan+CCl ₄ ve CCl ₄ grubu ratlara ait protein fraksiyonundaki β-globulin düzeyleri (%).....	44
Şekil 20.	Kontrol, fucoïdan, fucoïdan+CCl ₄ ve CCl ₄ grubu ratlara ait protein fraksiyonundaki γ-globulin düzeyleri (%).....	45
Şekil 21.	Kontrol, fucoïdan, fucoïdan+CCl ₄ ve CCl ₄ grubu ratlara ait protein fraksiyonundaki A/G oranı.....	45
Şekil 22.	Kontrol grubu bant görüntüsü ve elektroferogram	46
Şekil 23.	Fucoïdan grubu bant görüntüsü ve elektroferogram.....	46
Şekil 24.	Fucoïdan+CCl ₄ grubu bant görüntüsü ve elektroferogram	46
Şekil 25.	CCl ₄ grubu bant görüntüsü ve elektroferogram	47

1. GİRİŞ

Karaciğer önemli birçok metabolik fonksiyonu düzenleyen bir organdır. Karaciğer hastalıkları dünya çapında hala bir sağlık problemi olmaya devam etmektedir. Karaciğer hastalıklarının tedavisinde kullanılan sentetik ilaçlar bazen yetersizdir, bazen de ciddi yan etkilere sahip olabilir. Bu nedenle gelişmiş ülkeler dahil dünya üzerinde pek çok insan için tamamlayıcı ve alternatif tıp gittikçe önem kazanmaktadır (Rao ve ark., 2006; Shalan ve ark., 2008).

Anatomik yerleşimi, fizyolojik ve biyokimyasal görevleri nedeniyle zararlı madde ve ilaçlara sıkça maruz kalan karaciğerde hasar dahil, çeşitli patolojik tablolara yol açan maddelerden biri de CCl₄'dür (Robbins ve ark., 2004). CCl₄'ün düşük dozlarda hepatositlerde yağ dejenerasyonuna; yüksek dozlarda ise hepatositlerin nekrozuna neden olduğu bildirilmektedir (Wang ve ark., 2005; Sanlı, 1988).

CCl₄'e bağlı karaciğer hasarında meydana gelen lipit peroksidasyonu oldukça önemlidir (Nadkarni ve Souza 1988; Parola ve ark., 1996). Çünkü bu hasara bağlı olarak ilerleyen süreç sonunda karaciğer fibrozisi ve siroz oluşabilir. Karaciğer fibrozisi; ekstrasellüler matriks komponentlerinin artması ile karakterizedir. Ekstrasellüler matriksin yapımı ve yıkımı arasındaki denge; oluşan toksik oksijen radikallerine bağlı olarak, potent profibrojenik mediatörlerin de aktive olması ile sürekli matriks yapımı yönünde bozulmaktadır (Liebert ve ark., 2005). Yapılmış olan birçok çalışmada karaciğer hastalıklarında; oksidatif stres ve buna bağlı olarak ortaya çıkan karaciğer hasarı ile fibrozis arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (Shimizui, 2001).

Fucoidan, kahverengi deniz yosunlarından ekstrakte edilen sülfatlı bir polisakkarittir. Kahverengi deniz yosunlarının hücrelerarası bölümlerinde veya zamklı matriksinde bol miktarda bulunur. Antiinflamatuvar, antiviral, antikoagulan, antitümör, antitrombotik ve antifibrotik gibi geniş bir biyolojik aktiviteye sahiptir. Fucoidan verilmesiyle CCl₄ tarafından uyarılan akut ve kronik karaciğer hasarını azalttığı, hepatik fibrozisi zayıflattığı bildirilmektedir (Hayashi ve ark., 2008). Hepatik hasarlarda, hepatositlerdeki tahribat ve hepatik satellit hücrelerin aktivasyonu kilit role sahiptir. CCl₄ serum transforme edici büyüme faktörü β (TGF- β) seviyesini artırır ve reaktif oksijen türlerinin üretimiyle ilgili bir hepatotoksin olarak etki eder (Weiler-Normann ve

ark., 2007). Fucoidanın TGF- β ile interaksiyona girdiği ve reaktif oksijen türlerini yakaladığı rapor edilmiş (Boisson-Vidal ve ark., 1995; McCaffrey ve ark., 1994; Xue ve ark., 2001), CCl₄' n uyardığı lipit peroksidasyonunu azalttığı bildirilmiştir (Hayashi ve ark., 2008). Fucoidanın antifibrojenik etkisi hepatik satellit hücrelerinin aktivasyonunun zayıflatılmasıyla oluşur. TGF- β 'nın inhibisyonu ve reaktif oksijen türlerini yok ederek, hepatik satellit hücrelerin aktivasyonuna neden olan olayların akışını baskılar (Hayashi ve ark., 2008).

CCl₄' n oluşturduğu hepatotoksisite üzerine fucoidanın etkisini inceleyen çalışmaların sayısı oldukça azdır. Bu çalışmada ratlarda CCl₄ ile oluşturulan hepatotoksisitede fucoidan kullanılmasının karaciğer enzimleri (ALT, AST ve GGT), bazı biyokimyasal parametreler (albumin, globulin, total protein) ile protein fraksiyonları üzerine etkisinin araştırılması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

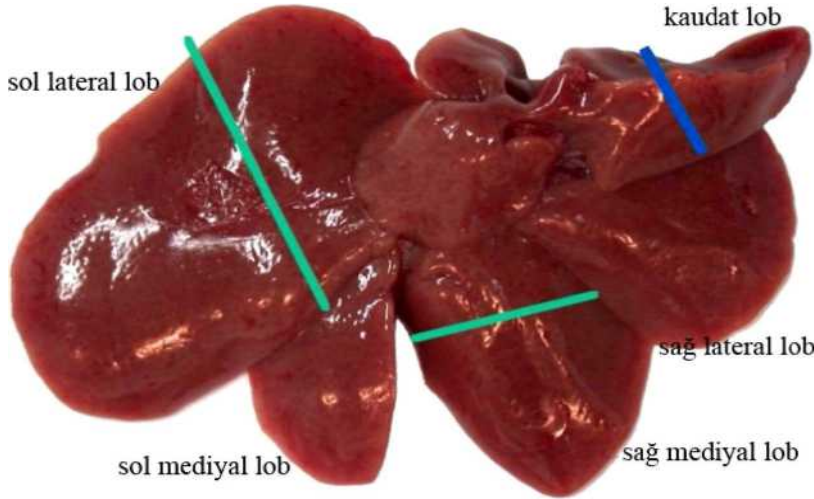
2.1. Karaciğerin Yapısı

Karaciğer, yaşamsal öneme sahip birçok önemli biyokimyasal fonksiyonun merkezi konumunda olan hayati bir organdır. Diyaframın hemen altında ve sağ hipokondriyak boşluğun büyük bir bölümü ve abdominal pelvik kavitenin epigastrik bölgelerinin bir kısmını kapsar. Karaciğer anatomik olarak falsiform ligamentle büyük sağ lob ve daha küçük olan sol lob olmak üzere 2 ana loba ayrılır (Şekil 1). Sağ lob, ayrıca bir inferiyör dördüncü (quadrate) lob ve bir de posteriyör (caudate) lobu bulundurur (Tortora ve Grabowsky, 1996).

20-30 mikron çapında olan, karaciğer hücreleri (hepatositler) poligonol hücre yapısına sahiptir. Hepatositin sitoplazmasının eozinofilik yapıya sahip olması; hemotoksilen eozinle (H.E) boyanmış kesitlerde çok sayıda mitokondri ve bir miktar düz endoplazmik retikulumun bulunması nedeniyledir. Her bir hepatositin yüzeyi; diğer hepatositlerle ve disse aralığı boyunca sinüzoidlerin duvarıyla etkileşim durumundadır. İki hepatositin temas yüzeyinin bitişik olduğu her yerde, hücrelerin arasında safra kanalikülü olarak bilinen tübüler bir yapı bulunur. Safra kanal sisteminin ilk kısımlarını safra kanalikülleri oluşturur. Karaciğer lobülünün plakları boyunca anastomoz yapan ve karmaşık bir ağ oluşturan safra kanalikülleri portal alanlarda son bulurlar. Kübik ya da prizmatik epitel ile kaplı olan safra kanalları belirgin bir bağ dokusu kılıfına sahiptirler. Safra kanalları; sağ ve sol hepatik kanallarını oluşturarak karaciğerden ayrılırlar (Aslan, 2005).

Hepatosit sitoplazması hem düz hem de granüllü endoplazmik retikulumdan zengindir. Hepatositte granüllü endoplazmik retikulum; sitoplazma içine dağılmış kümeler meydana getirir, bunlar bazofilik cisimler olarak adlandırılır. Birkaç farklı protein (fibrinojen, kan albumini) sentezi bu yapılardaki poliribozomlarda yapılır. Hepatositte lizozom organeli de bulunur. Hepatosit lizozomları hücre içi yaşlı organellerin yıkımı ve dönüşümü için önemli fonksiyona sahiptirler. Lizozomlar gibi enzim içeren ve hepatositlerde bol miktarda bulunan diğer bir organelde peroksizomlardır. Peroksizomların görev ve fonksiyonlarından bazıları; yağ asitlerinin

oksidasyonu ve bu oksidasyon sonucunda oluşan hücre için toksik bir madde olan hidrojen peroksitin katalaz aktivitesi yoluyla yıkılması, pürinlerin (AMP, GMP) fazlasının ürik aside dönüştürülmesi, kolesterol, safra asitleri ve miyelin yapımında kullanılan bazı lipitlerin sentezi gibi görevlerle ilgili enzimleri içerir. Golgi kompleksleri hepatositlerde bol miktarda bulunur. Bu organelin fonksiyonları arasında; lizozomların meydana getirilmesi ve plazma proteinlerinin (örn. albumin, kompleman sisteminin proteinleri), glikoproteinlerin (örn. transferrin) ve lipoproteinlerin (örn. çok düşük dansiteli lipoproteinler) salgılanması gibi görevlere sahiptir (Aytekin ve Solakoğlu, 2006).



Şekil 1. Sıçan karaciğeri (Anonim, 2013a)

2.1.1. Karaciğerin fonksiyonları

Karaciğer, metabolizmanın düzenlenmesi ve uyum içerisinde işlemesi için gerekli birçok yaşamsal fonksiyona sahiptir. Bu fonksiyonların başlıcaları;

1. Yabancı veya toksik maddelerin nötralize edilmesi ve atılmaları,
2. İlaçların inaktivitesi, metabolizması ve atılmaları,
3. Karbonhidrat metabolizmasında; glukoneogenez, glikojen sentezi ve yıkımlanması,
4. Lipit metabolizmasında; yağ asidi sentezi, kolesterol sentezi ve atılması, lipoprotein sentezi, ketogenez, safra asitlerinin sentezi ve vitamin D'nin aktivasyonu,

5. Protein metabolizması; pıhtılaşma faktörleri ve bir kısım immunglobulinlerde olduğu gibi plazma proteinlerinin sentezi ve üre sentezi,
6. Tiroit, steroid ve diğer hormonların başlıca katabolizma yeri ve plazma hormon düzeylerinin düzenlenmesinde rol oynaması,
7. Bilirubinün glukuronik asitle konjugasyonu ve atılımı,
8. Bazı vitaminlerin (A, B₁₂, D, E ve K) ve minerallerin (bakır ve demir) depolanması başlıca görevlerinin arasında sayılabilir (Karagül ve ark., 2000).

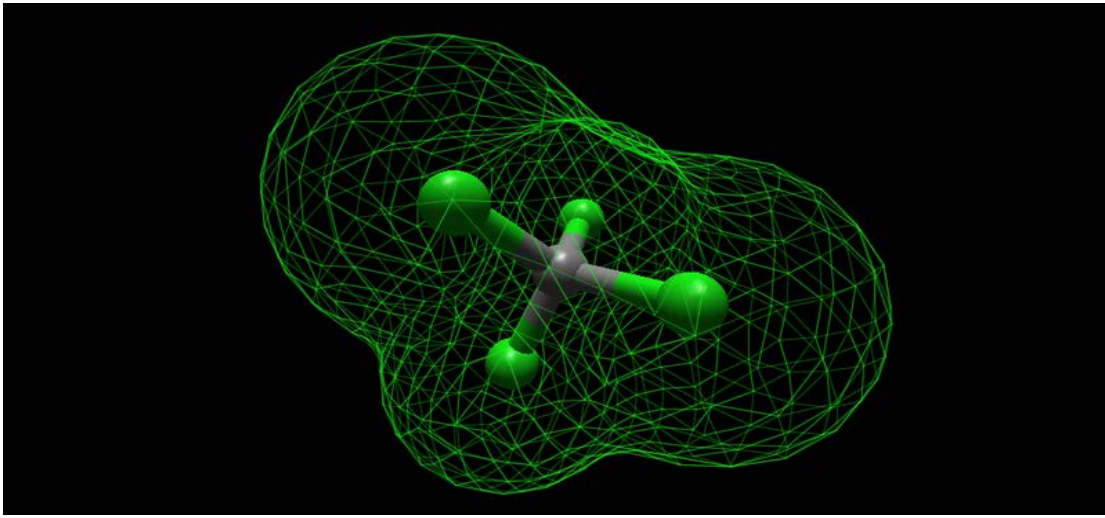
2.2. Karbontetraklorür (CCl₄)

CCl₄, kuru temizleme amaçlı, çözücü ve eskiden dondurucu olarak kullanılan bir hidrokarbon bileşiğidir (Farrell, 1998; Özoran, 1987) (Şekil 2). Karbondisülfürün klorlandırılmasıyla veya aynı bileşiğin kükürt monoklorür ile tepkimesi sonucu ortaya çıkan CCl₄; yüksek dozlarda kullanıldığında karaciğerde harabiyet oluşturur, hatta siroz oluşturabilir. Vücuttaki diğer organlarda da dejenerasyonlar meydana getirir.

CCl₄ vücuda inhalasyon, sindirim ve deri yoluyla alınabilir (Şişmanoğlu, 1995). İnsanlarda CCl₄'ün toksik dozu solunum yolu ile alındığında 65 ppm; ağızdan alındığında ise 4 ml'dir. Emildikten sonra bütün organ ve dokulara dağılım gösteren CCl₄, en çok yağ dokusunda birikir. 2-6 gün içinde yavaşça dokulardan uzaklaşarak başlıca akciğerler ve az miktarda da böbrekler yoluyla vücuttan uzaklaştırılır (Kayaalp, 1991). Zehirlenme bulguları deri, solunum veya ağız yoluyla emilimini takiben hemen ortaya çıkar. CCl₄ zehirlenmesi Merkezi Sinir Sistemi'nin baskılanmasına neden olur. Buna bağlı olarak görülen başlıca belirti ve bulgular; baş ağrısı, baş dönmesi, halsizlik, ataksi, görme bulanıklığı, uyuma hali ve bilinç kaybıdır. Bulantı, kusma ve karın ağrısı ilk günden itibaren şekillenir. Karaciğer yağlanması ve hasarı ile ilgili belirtiler CCl₄'ün emiliminden birkaç gün sonra ortaya çıkar. Karaciğer hücrelerinin nekrozu sonucu aspartat aminotransferaz (AST) ve aldolaz enzim düzeylerinde artış görülür. Protrombin zamanı uzar (Mayer ve Hemmens, 1997; Wang ve ark., 2005). Uzun süreli fakat düşük miktarda (45-100 ppm) CCl₄ solunması huzursuzluk, aşırı hareketlilik ve bağırsakların düzensiz kasılmalarına sebep olur. Maruz kalma birkaç haftayı geçtiğinde

ciltte kuruma, kabarık kırmızı lekeler, tırnaklarda hassaslaşma ve kuruma ortaya çıkar. Solunmadığı sürece bulgular azalır, ancak tekrarlandığında yeniden nüks eder (Wang ve ark., 2005).

Prooksidan aktiviteye sahip olan CCl_4 hepatotoksik etkisinden dolayı deney hayvanlarında siroz oluşturmak için kullanılmaktadır. CCl_4 mikronodüler siroz oluşturur. Değişik deney hayvanlarının CCl_4 'e vereceği cevabı önceden tahmin etmek ve bu yolla karaciğer sirozu modeli oluşturmak zordur (Arii ve ark., 1990; Dashti ve ark., 1989).



Şekil 2. Karbontetraklorür (Anonim, 2013b)

2.2.1. Karbontetraklorürün karaciğer üzerine etkisi

Karaciğerde hasar dahil çeşitli patolojik tablolara yol açan maddelerden biri olan CCl_4 (Robbins ve ark., 2004), insanlarda olduğu gibi deney hayvanlarında da hepatotoksikite oluşturan bir ksenobiyotiktir (Lee ve ark., 2007). Bu hasarın değişik şekillerinin, oksidatif stres ve bunu takiben ortaya çıkan serbest radikallerle oluştuğu bilinmektedir. Toksik oksidatif ve hidroksidatif radikallerinin lipid peroksidasyonu ve başka yollarla hepatosit membranını hasarlayabilecekleri *invivo/invitro* ortamlarda deneysel olarak ortaya konmuştur (Foulis ve ark., 1988; Sherlock, 1986). CCl_4 gibi karaciğer hasarına neden olan hepatotoksik ajanların kullanımını çeşitli ölçülerde hücre yapısının bozulmasına ve hücre ölümü ile karakterize tablonun oluşmasına neden olur (Wu ve ark., 1999).

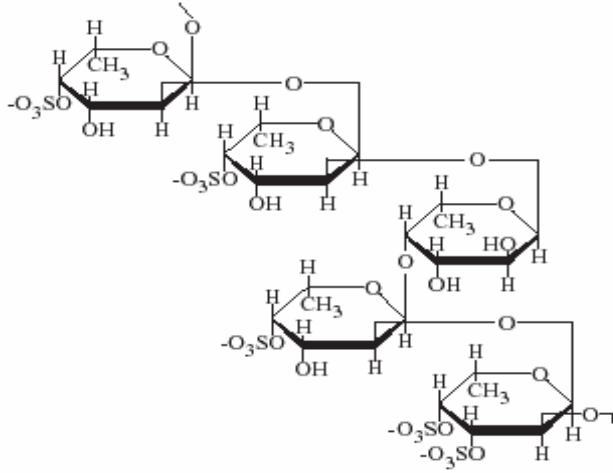
CCl_4 'ün düşük dozlarda hepatositlerde lipit peroksidasyonuna; yüksek dozlarda ise hepatositlerin nekrozuna neden olduğu bildirilmektedir (Wang ve ark., 2005; Sanlı, 1988). Yağlanmaya neden olan ve diğer karaciğer yağlanması yapan ajanlarda olduğu gibi çoğunlukla trigliseritlerin karaciğerden iletiminin önlenmesidir. Apolipoprotein sentezinin dejenere olması, trigliseritlerin apolipoproteinlere bağlanmasının bozulması, lipoproteinlerin hepatosit membranından iletimindeki bozukluklar; trigliseritlerin taşınmasını bozabilir. CCl_4 periferik adipoz dokudan yağ serbestleşmesini de artırmaktadır (İliçin ve ark., 2005).

CCl_4 , sitokrom CYP2E1, CYP2B1, CYP2B2 ve yüksek olasılıkla CYP3A tarafından aktive edilip triklorometil radikali (CCl_3) meydana getirir. Bu radikal nükleik asit, protein ve lipit yapılı hücrel moleküllere bağlanabilir ve aynı zamanda oksijenle reaksiyona girip son derece reaktif olan triklorometil peroksil (CCl_3OO^{\cdot}) radikalini oluşturur. Bu oksijen radikali poliansature yağ asitleriyle reaksiyona girerek lipit peroksidasyon zincir reaksiyonunu başlatır. Mitokondri, endoplazmik retikulum ve plazma membranındaki lipitlerin bozulmasına neden olan bu durum geçirgenliklerini etkiler, bunun sonucunda da hücre içi kalsiyum birikmesi ve homeostazisin bozulmasıyla ciddi hücrel hasara yol açar (Weber ve ark., 2003).

2.3. Fucoïdan

2.3.1. Fucoïdanın yapısı ve elde edilmesi

İlk kez Kylin (Percival ve McDoweell, 1967; Levring ve ark., 1969) tarafından izole edilip adlandırılan fucoïdan literatürde fukoidin olarak da isimlendirilmektedir. Kahverengi deniz yosunlarının hücrelerarası bölümlerinde veya zamklı matriksinde bol miktarda fucoïdan bulunmaktadır. Eksüdanın (polimeri içeren sıvı) alginik asiti de içeren *Laminaria digitata*, *Ascophyllum nodosum* ve *Macrocystis pyrifera* türlerinin yaprağının yüzeyinden sızan müsilaj benzeri özde bulunduğu 1950'den sonraki araştırmalar sonucu gösterilmiş ve türden türe ortalama miktarının değiştiği yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir. Polisakkarit yapısında polimer, higroskopik özelliğe sahip olup, bitki içinde viskoz bir birleşim halinde bulunmakta ve bitkilerin su kaybını önlemektedir. Fucoïdanın kimyasal yapısı Şekil 3'de verilmiştir.



Şekil 3. Fucoidanın kimyasal yapısı (Sezer, 2006)

Kylin (Percival ve McDowell, 1967) fucoidanı *L. digitata*, *F. vesiculosus* ve *A. nodosum*'dan izole etmiştir. Hidrolizi takiben fukozu, fenil-L-fukosazon olarak ayırmış ve böylece hidrolizatta pentozların da varolduğunu bulmuştur. Daha sonraları çeşitli kahverengi deniz yosunları elde edilen fucoidanla ilgili yapılan çalışmalarda, polimerin ksiloz, galaktoz, uronik asit sülfat taşıyan ve birbirlerine 1,4-O- köprüleri ile bağlı olan fukoz çekirdeklerinden oluştuğu saptanmıştır (Chevolot ve ark., 2000; Levring ve ark., 1969; Mabeau ve ark., 1990; Ruperez ve ark., 2002).

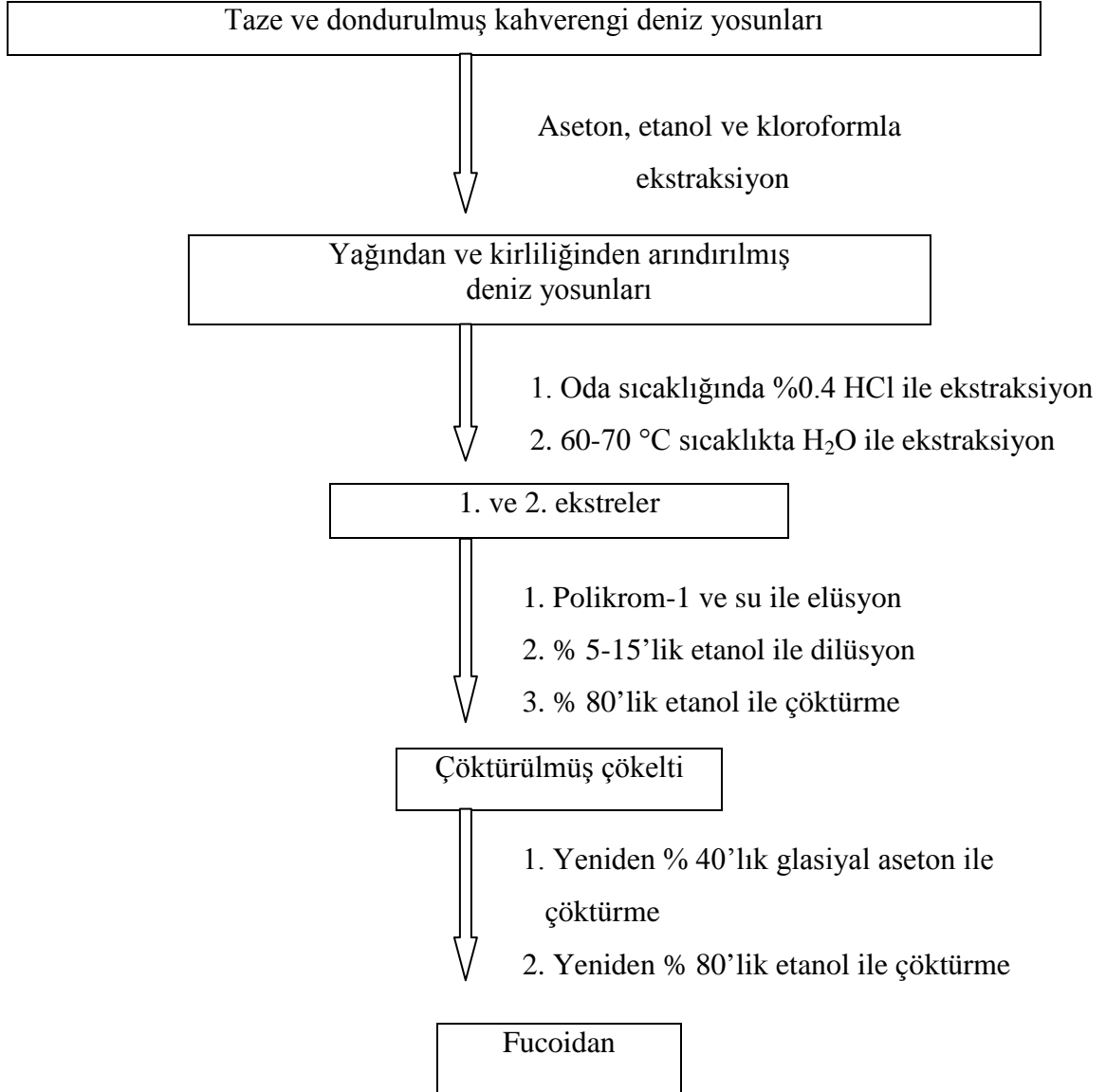
Fucoidanın karmaşık yapısının tek bir çekirdekten meydana gelmediği 1954 yılında O'Neill tarafından, daha sonra 1963 yılında ise Larsen ve Haug tarafından detaylı olarak aydınlatılmıştır. Elde edilen sonuçlar ekstrede, yalnızca farklı oranlarda sülfatlanmış benzer polisakkaritlerin olmasının yanı sıra, çekirdek yapıları farklı olan polisakkaritlerin de bulunduğunu göstermiştir (Percival ve McDowell, 1967).

Su veya asitle muamele edilen fucoidan daha sonra aşağıda belirtilen iki farklı yöntemle elde edilir. Fucoidanın nasıl elde edildiğini gösteren şema Şekil 4'de verilmiştir.

a)Kurşun Hidroksit Kompleksi Halinde Saflaştırma: Daha önceden kurutulmuş olan deniz yosunları, 24 saat süresince kaynar su banyosunda ekstre edilir. Filtrasyondan sonra ekstre, alginat ve protein çöktürme işlemi tamamlanana kadar kurşun asetatla muamele edilir ve filtrata baryum hidroksit eklenir. Böylece fucoidan

kurşun hidroksit kompleksinin ayrışması sağlanır. Diyalizden sonra, ham fucoidan alkolle çöktürülerek ayrılır (Levring ve ark., 1969; Percival ve McDowell, 1967).

b)Alkol İlavesi İle Çöktürme Sonucu Saflaştırma: Kuru öğütülmüş deniz yosunu, pH 2.0 - 4.5 arasında % 10'luk (a/h) hidroklorik asitle ekstrakte edilir. Ekstrenin nötralizasyonu ve kuruyana kadar buharlaştırılmasını takiben elde edilen kahverengi çökelti ham fucoidanı içerir. Ham fucoidanın saflaştırılması için ise suda çözündürülen çökelti % 30-% 60 konsantrasyondaki etanolla muamele edilerek fraksiyonel çöktürme işlemine sokulur. Bu aşamadan sonra % 20- % 30 civarında saf olmayan örnek, formaldehit ve vakumda buharlaştırma yöntemiyle saflaştırılır ve materyalin tekrar suda çözündürülmesi ile berrak bir çözelti elde edilmiş olur (Passaquet ve ark., 1991; Percival ve McDowell, 1967).



Şekil 4. Fucoïdanın üretim şeması (Sezer, 2006)

Fucoïdanın türevlerinin moleküler ağırlığı ve büyüklüğü hakkında ayrıntılı bir bilgi bulunmamaktadır. Çünkü fucoïdan içeriği ve fizikokimyasal özelliği türden türe farklılık gösterebileceği gibi, aynı türden izole edilen polimerin de özelliklerinin kendi içinde değişebileceği bildirilmektedir (Percival ve McDowell, 1967). Osmometrik tayinler sonucu fucoïdanların ortalama molekül ağırlıklarının 133.000 ± 20.000 D arasında değiştiği belirlenmiştir. Ultrasantrifüj ve Svedberg formülü yardımıyla yüksek oranda saflaştırılmış fucoïdan numunesinde yapılan tayinlerde, polimerin molekül ağırlığı 7.8×10^4 D olarak tespit edilmiş; ancak kesin değer numunedeki ultra saflaştırmalara rağmen tam olarak bulunamamıştır. Tuzlu çözeltide, fucan molekülünün

yüksek oranda yüklü, dallanmış, rastgele bir yumak şeklinde biçimlendiği izlenmiştir (Percival ve McDowell, 1967; Levring ve ark., 1969; Mabeau ve ark., 1990; Chevlot ve ark., 2000).

2.3.2. Fucoidanın fizikokimyasal özellikleri

Fucoidan, alkolle çöktürme yöntemi ile hazırlandığında sarı ile kahverengi arasında renkli bir toz şeklinde elde edilmektedir. Suda çok iyi çözünür fakat organik çözücülerde çözünmez. Polimerin -75°C ile -140°C arasında birbirinden ayrı özel değişimlere sahip olduğu ifade edilmektedir (Chizhov ve ark., 1999; Ruperez ve ark., 2002; Mabeau ve ark., 1990; Bilan ve ark., 2002). Bernardi ve Springer tarafından hazırlanan saflaştırılmış fraksiyonlar suda, serum fizyolojikte (% 0.85) ve test edilen tüm tamponlarda % 3 (a/h) oranında çözünmektedir. % 1'lik sulu çözeltide viskozitesi düşük olan fucoidan, ayrıca dilatant özellik de göstermektedir (Percival ve McDowell, 1967). Seyreltik asit veya alkaliler ham materyalin özelliklerinde geri dönüşümsüz değişikliklere yol açabilmektedir. Deniz yosunlarının asitle etkileşmesi sonucunda elde edilen ürünün yüksek yoğunluktaki kalsiyum, potasyum veya alüminyum tuzları suda çözünmezler. Bu çözeltilerde degradasyon olduğu için düşük viskoziteye sahiptirler ve zamk özellikleri yoktur (Ruperez ve ark., 2002; Levring ve ark., 1969; Mabeau ve ark., 1990).

2.3.3. Fucoidanın farmakolojik özellikleri

Canlı metabolizması için önemli ve nadir sentezlenebilen bir pentoz olan L-fukozun kaynağı fucoidandır. Bu şekerin elde edilmesi için kullanılan sınırlı maddeler arasında yer alır (Percival ve McDowell, 1967; Levring ve ark., 1969). Polimerin, antikoagülan özelliği incelenmiş ve antikoagülan aktiviteye sahip fraksiyonlar ham fucoidandan izole edilerek yüksek oranda saflaştırılmıştır. Bazı fucoidan türlerinin rekalsifikasyon testinde % 60 - % 80 oranında ve toplam insan kan koagülasyonu inhibisyon miktar tayininde ise % 15 - % 18 oranında heparin aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir (Giroux ve ark., 1998; Soeda ve ark., 1992; Chevlot ve ark., 1999; Nishino ve Nagumo, 1991; Nishino ve Nagumo, 1992; Minix ve Doctor, 1997; Mauray ve ark., 1998; Kuznetsova ve ark., 2003).

Fucoidanın, sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan beyin enfeksiyonunda lökositler üzerindeki inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Deneysel meningitis oluşturulduktan ilk 6 saat içerisinde hayvanlarda bölgesel serebral kan akışı ve beyin basıncının arttığı saptanmıştır. Deney sonucunda kontrol grubunda serebrospinal sıvı ve beyin su içeriğinde artış saptanırken, fucoidanla tedavi edilen grupta enflamasyonun önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir (Angstwurm ve ark., 1995).

Nashino ve ark. (2000), *E. kurome*'den izole edilen yüksek molekül ağırlığına sahip fucoidanın in vitro plazminojen etkinliğini arttırdığını ve in vivo verilerle bu sonuçların benzer olduğunu ifade etmişlerdir. Benzer sonuçlar; *E. kurome*, *A. nodosum* ve *F. vesiculosus* adlı üç türden izole edilen fucoidanların antikoagülan etkisinin araştırılması sonucunda da saptanmıştır (Church ve ark., 1989; Dürig ve ark., 1997; Nardella ve ark., 1996; Nishino ve ark., 1999).

Önemli farmakolojik özellikleri olan fucoidanın diğer bir özelliği de çeşitli büyüme hormonlarına ve lökositlere karşı olan affinitesidir (Arai ve ark., 1994; Kobayashi ve ark., 1994; Soeda ve ark., 2000; Willenborg ve Parish, 1988; Skinner ve ark., 1991; Linnemann ve ark., 2000). Bu bilgilere dayanarak birçok araştırmacı çeşitli büyüme hormonlarına fucoidanın da içinde bulunduğu sülfatlanmış gluklan ve glikolipitlerin bağlanma özelliklerini araştırıp incelemişlerdir. Arai ve ark. (1994) heparin, yüksek oranda sülfatlanmış heparin, dermatan sülfat ve fucoidanın insulin benzeri büyüme faktörü (IGF) üzerine etkilerini inceledikleri çalışmalarında, polimerlerin sülfatlanma derecesinin proteinlerle kompleks oluşturma özellikleri açısından önemli ve IGF'a bağlanmanın O-bağlı sülfat grupları ile doğrudan ilgili olduklarını saptamışlardır.

Fucoidanın yara tedavi edici etkisi üzerine genellikle in vitro hücre kültürü modelleri ile yapılan az sayıda çalışma mevcut olup, bu konu üzerine in vivo çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Çetin ve ark., 2001; Leary ve ark., 2004; Gan ve ark., 1999; Vischer ve Buddecke 1991; Del Bigio ve ark., 1999; Fujimura ve ark., 2000). Cilt yaralanmalardaki yara iyileşme prosesine fucoidanın etkisini araştırmak amacı ile in vitro fibroblast-kollajen hücre kültürünü kullanmışlar ve *F. vesiculosus*'dan ekstraksiyonla elde edilen fucoidanı fraksiyonlandırarak farklı özellik ve molekül ağırlığına sahip 12 adet fucoidan fragmenti elde etmişlerdir. Bu fraksiyonlardan

molekül ağırlığı 10.000'in üzerinde olanlar jel filtrasyonundan geçirilmiş ve fibroblast hücre kültüründe tedavi etkinlikleri incelenmiştir. Deneyler sonucunda molekül ağırlığı 30.000 ve üzerinde olan fraksiyonların kollajen jel kontraksiyonunu hızlandırdığı, fibroblast göçünü önemli miktarda arttırdığı ve yara iyileşmesi için gerekli olan integrin $\alpha_2\beta_1$ 'in ekspresyonunu arttırdığı tespit edilmiş ve bu tesirin oluşmasında hem çekirdek yapıyı oluşturan fukozun hem de sülfat gruplarının rolünün önemli olduğu kaydedilmiştir. Dermal fibroblast hücre kültüründe fucoidanla birlikte TGF- β 1 etkisi de araştırılmış ve TGF- β 1'in antiproliferatif etkisinin 1 mg/ml ve üzerindeki fucoidan dozları ile önlendiği tespit edilirken, fucoidanın bu doz ve üzerinde uygulanması ile fibroblast popülasyonunda hızlı bir artışın meydana geldiği kaydedilmiştir (Leary ve ark., 2004).

Fucoidan ve heparinin arteriyel yumuşak kas hücreleri (AYKH) üzerine proliferatif etkilerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, AYKH hücre kültürüne 80 ile 100 μ g/ml konsantrasyonları arasında değişen fucoidan veya heparin eklenmiş ve heparinin proliferasyonu engelleyici etkisinin fukopolisakkaritten daha az olduğu görülmüştür. Fucoidanın bu inhibisyon etkisinin zamana bağlı olarak değişiklik gösterdiği ve en yüksek etkiyi ilk 6 saat içerisinde yaptığı tespit edilirken, polisakkaritin hücre proteinleri ve glukokonjugatlar üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı fakat dolaylı olarak fibronektin ve trombospondin sentezini ve salınımını artırdığı saptanmıştır (Vischer ve Buddecke, 1991).

2.3.3.1. Fucoidanın mide koruyucu etkisi

Clodosiphon okamuranus tokida'dan elde edilen fucoidan, potansiyel mide koruyucu özelliğe sahip oldukça güvenli bir maddedir (Shibata ve ark., 2000). Fucoidan *helicobakteri pylori* enfeksiyonlarına karşı antiülser etkisi, adhezyon engelleyici fonksiyonu ile önemli bir madde görünümündedir. Fucoidanlardan hazırlanmış ilaçların yukarıdaki fonksiyonları gerçekleştirdiği bildirilmiştir (Itsuko, 1995). *Clodosiphon okamuranus*'tan elde edilen fucoidanın normal hücrelere herhangi olumsuz bir etkisi olmaksızın kanserli hücrelerin büyümesini engellediği gösterilmiştir (Kawamoto ve ark., 2006).

2.3.3.2. Fucoidanın antiinflamatuvar etkisi

Yangısal model olarak kullanılan ratlarda dokuz farklı kahverengi algden elde edilen fucoidanların lökosit yenilenmesini engellediği, burada fukoz veya sülfat içeriğinin yapısal özelliklerinin fucoidanın etkisini ve yeterliliğini etkilemediği gözlenmiştir (Cumashi ve ark., 2007). Mekabu fucoidanın, pulmuner yangıyı hafifletip, alerjik yangıların tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir (Maruyama ve ark., 2005).

2.3.3.3. Fucoidanın hepatopatiye karşı etkisi

Farelerde konkanavalin A tarafından uyarılmış karaciğer hasarında fucoidan verildiği zaman, endojen interlökin (IL-10) üretimini ayarlayarak, proinflamatuvar sitokini engelleyerek karaciğer hasarını önler (Saito ve ark., 2006). Yenilebilen kahverengi deniz yosunlarındaki fiberler D-galaktozamin tarafından uyarılmış hepatopatiyi baskılayıcı etkiye sahipken, kısmen fucoidan karaciğere koruyucu etki yapar (Kawano ve ark., 2007). Hepatik fibrozisi engelleyen fucoidan çok iyi bir antifibrotik maddedir (Hayashi ve ark., 2008). Hepatik fibrozis; fibriller hücre dışı matriks proteinlerinin ilerleyerek birikmesi ile birlikte karaciğere verilen kronik hasar sonucunda oluşur. Dünyada 100 milyondan fazla insanda hepatik fibrozis vardır. Fucoidanın enjeksiyon yoluyla uygulanması, CC1₄ tarafından uyarılmış, akut ve kronik karaciğer yetmezliğini azaltır. CC1₄ tarafından uyarılmış hepatik fibrozis, aynı zamanda fucoidan enjeksiyonu ile zayıflatılabilmektedir. Hepatositlere verilen zarar ve hepatik satellit hücrelerinin rolü, karaciğer fibrozisinde kilit rol oynar. Fucoidanla hepatositlerin tedavi edilmesi, CC1₄ tarafından uyarılmış hücre ölümlerini önlemiş ve hepatik satellit hücrelerin üremelerini engellemiştir. Bu nedenle, fucoidan; çift fonksiyona sahip anti-fibrotik bir etken, yani hepatositlerin koruyucusu ve hepatik satellit hücrelerin üremesini engelleyen bir ajandır (Hayashi ve ark., 2008).

2.3.3.4. Fucoidanın kan lipitlerine etkisi

Sialik aside benzer aktif bir madde olan fucoidan, hücre yüzeyinde negatif etkiyi artırır. Böylece kolesterolün kanda birikmesini engeller ve kan kolesterol düzeyini azaltır. *L. japonica*'dan elde edilen fucoidan total kolesterolü, trigliseriti ve LDL-C'ü azaltırken, hiperkolesterolemili ve hiperlipidemili farelerin serumundaki HDL-C'ü

arttırır ve hiperkolesterolemi oluşumunu etkili bir şekilde önler (Li ve ark., 1999; Li ve ark., 2001). Karaciğer ve böbreğe hasar yapmaksızın hiperlipidemili hastaların serumlarındaki kolesterol ve trigliserit düzeyini önemli ölçüde azaltır. Fucoidanın ayrıca çok iyi antihipertansif etkisi vardır (Fu ve ark., 2004).

2.3.3.5. Fucoidanın antitümör ve bağışıklık sistemine etkisi

Eisenia bicyclis ve *L.japonika*'dan elde edilen fucoidanlar sarkomaya karşı çok etkilidirler (Usui, 1980; Song ve ark., 2000). *L. japonica* fucoidanı hepatoma hücrelerinin büyümesini in vitro olarak engeller (Shi ve ark., 2000).

Fucoidan human lenfoma HS-sultan hücre hatlarında hücre ölümünü uyarır ve proliferasyonu engeller (Aisa ve ark., 2004). Bazı fucoidanlar meme kanserinde hücrelerin trombositlere tutunmasını engelleyerek metastaz üzerine kritik öneme sahiptir (Cumashi ve ark., 2007). Yine bazı fucoidan türlerinin (*F.evanescens*) ise antitümör ve antimetastatik aktiviteleri bulunur. Farklı substratlarla tümör hücresi adhezyonunu engeller. Fakat bu mekanizmanın nasıl olduğu tam olarak bilinmemektedir (Nishino ve Nagumo 1987). İmmünespresif farelerde *L. japonica* immun fonksiyonu onarır. Direkt olarak makrofaj ve T lenfositler üzerine modülatör etkisi vardır (Wang ve ark., 1994). Fucoidan tümör hücrelerini doğrudan öldürebilir. Kaspaz ve ERK geçitleri ile doğrudan, insan HS-sultan hücreleri üzerinde anti-kanser etkisi bulunmaktadır (Aisa ve ark., 2004). Makrofajların miktarını artırır (Song ve ark., 2000).

Alekseyenko ve ark. (2007), Lewis akciğer adenokarsinoma nakli yapılmış C57Bl/6 farelerde, *Fucus evanescens*'den alınmış fucoidanın antitümör ve antimetastatik aktivitelerini araştırmışlar, 10 mg/kg'lık tek doz ve tekrarlanmış uygulamadan sonra fucoidan, antitümör ve antimetastatik etki göstermiştir.

2.3.3.6. Fucoidanın antiviral etkisi

Sülfatlı polisakkaritler (fucoidan gibi) in vivo ve in vitro antiviral etkiye sahiptirler, ilginç olan olay antiviral ilaçlardan daha az sitotoksik etkileri bulunur. *L. japonica*'dan elde edilen fucoidan anti RNA ve DNA virüs fonksiyonuna sahiptir.

Antiviral etkisi poliovirüs3, adenovirüs3, ECHO6 virüs, coxsackie B3 ve coxsackie A16 üzerine etkisi oldukça fazladır. Fucoidan yukarıdaki virüslerin neden olduğu enfeksiyon ve onların sitopatik etkilerinin gelişimini engeller (Li ve ark., 1995).

Herpes simpleks virüsü 1 ve 2'ye karşı antiviral etki gösterirler. Vironlar üzerine direkt olarak inaktive edici özelliğe sahip değildir. Fucoidan oral olarak alındığında immun defans sistemini güçlendirir, viral replikasyonu önler (Mandal ve ark., 2007). Bazı fucoidanlar, Asya ülkelerinde sıklıkla tüketilen diyetel kahverengi denizyosunu olan gıda ürünlerinde çok miktarda bulunmaktadır. Enteral prion enfeksiyonundan sonra hazmedildiğinde, çoğunlukla kahverengi alglerden alınan fucoidanın, antiprion etki gösterdiğini ve hastalığın başlamasını önlediğini bildirmişlerdir (Doh-ura ve ark., 2007). Diyetel denizyosunu fucoidanı, enfeksiyondan önce değil de, enfeksiyondan sonra 6 gün boyunca oral yolla verilmesi halinde, bağırsak yoluyla scrapie ile virüslenmiş farelerin hastalığının başlangıcını geciktirir. Fucoidanın günlük alınımı, farmakolojik olarak değerlendirilmeye devam edilse de, prion bulaştırılmış maddelerin hazmından kaynaklanan prion hastalıklarına karşı önleyici bir etkisi olabilir (Doh-ura ve ark., 2007).

2.3.3.7. Fucoidanın antioksidan etkisi

Birçok çalışmada fucoidanın önemli ölçüde antioksidan aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Li ve ark., 2002). Fucoidan çok mükemmel ve doğal bir antioksidandır. Serbest radikal aracılı hastalıkları önlemede büyük bir potansiyele sahiptir. *L. japonica*'dan elde edilen fucoidan, diyabetik ratlarda serum, karaciğer ve dalakta lipit peroksit (LPO) artışını engeller (Zhang ve ark., 2003). Fucoidan kuvvetli süper oksit yakalayıcısı olduğu halde hidroksil radikalleri üzerine etkisi zayıftır (Micheline ve ark., 2007).

Antioksidan etki, fucoidanın molekül ağırlığı ve sülfat içeriği ile ilgilidir. *L. japonica*'dan elde edilen fucoidanın düşük molekül ağırlıklı (*L. japonica*-A ve *L. Japonica*-B) fraksiyonları Cu^{+2} tarafından uyarılmış LDL oksidasyonu üzerine çok fazla inhibitör etki gösterir (Wang ve ark., 2005).

2.4. Karaciğer Enzimleri

2.4.1 Transaminazlar (Aminotransferazlar)

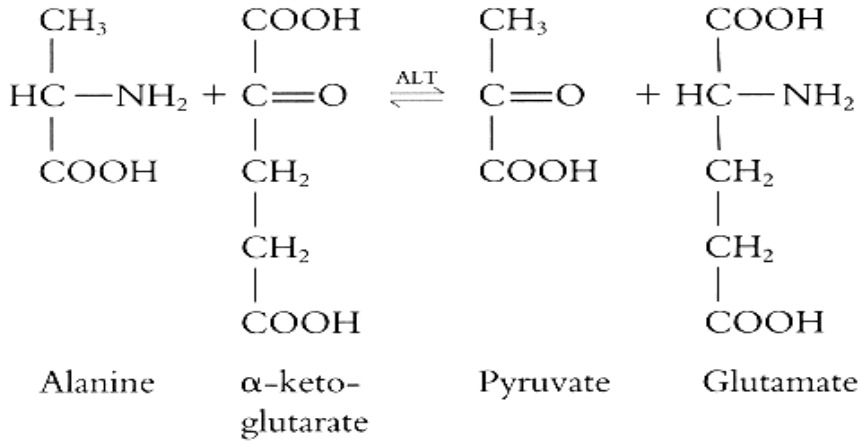
Transaminazlar, keto asitlerin amino asitlere çevrilmesini katalize eden enzimlerdir. Koenzim olarak pridoksinin bir türevi olan pridoksal fosfatı kullanırlar (Benjamin, 1978; Murray ve ark., 1993; Kanat, 2005; Keha ve Küfrevioğlu, 2005). Bu koenzim, enzimin aktif bölgesindeki özgün lizin biriminin ϵ -amino grubuna kovalent bağlarla bağlanmıştır. Aminotransferazlar, bir amino asitin amino grubunu piridoksala transfer ederek piridoksamin fosfat oluştururlar. Piridoksamin daha sonra bir α -keto asit ile reaksiyona girerek bir amino asit oluştururken kendisi de orijinal aldehit formuna yeniden dönüşür. Lizin ve treonin haricindeki tüm amino asitler katabolizmalarının bir aşamasında transaminasyona uğrar. Transaminazlar normalde hücre içi enzimlerdir. Plazmadaki yüksek düzeyleri bu enzimlerden zengin hücre hasarını gösterir. Fiziksel bir travma ya da hastalık hücre lizisine neden olur ve bu durum hücre içi enzimlerin kana karışmasına neden olur (Anonim, 2013c). Serum aminotransferazları kronik hepatitlerde, akut viral hepatitlerinin hafif vakalarında ve ilaca bağlı hepatitlerde orta derecede artar. Sirozda, nonalkolik hepatosteatozda, kolestatik karaciğer hastalıklarında, karaciğer yağlanmasında ve karaciğer tümörlerinde serum aminotransferazları hafif yükselir (Rosalki ve McIntyre, 1999; Pratt ve Kaplan, 1999).

2.4.1.1 Alanin aminotransferaz (ALT)

ALT (2.6.1.2), glutamik asit ile pirüvik asit arasındaki reaksiyonu katalizler (Şekil 5). Serum glutamik-pirüvik transaminaz (SGPT) olarak adlandırılır (Gözükara, 1989; Keha ve Küfrevioğlu, 2005; Mert, 1996).



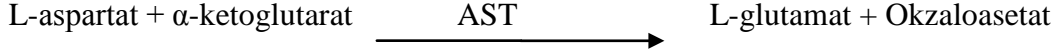
ALT genel olarak kanda düşük yoğunlukta olmasına rağmen dokularda özellikle eritrosit, karaciğer ve akciğerde fazla miktarda bulunur. ALT'nin karaciğer hastalıklarında en önemli belirteç olarak kullanılmasının nedeni, karaciğerde bulunan ALT miktarının diğer dokulara oranla daha fazla olmasıdır. Karaciğer hasarı sırasında oluşan enzim kaçağı serumda ALT aktivitesinin yükselmesine neden olmaktadır (Bizzaro ve ark., 1992; Goldie ve McConnell, 1990).



Şekil 5. Alanin aminotransferazın katalizlediği reaksiyon (Anonim, 2013d)

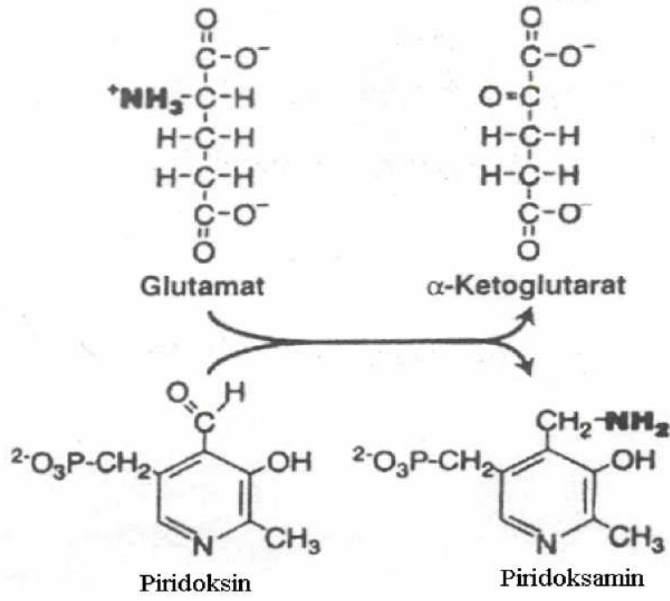
2.4.1.2 Aspartat aminotransferaz (AST)

Serum glutamat oksalaasetat transaminaz (SGOT) olarak adlandırılır (Mert, 1996). Aminoasit metabolizmasının en önemli enzimlerinden biridir (EC.2.6.1.1). Aspartat ve glutamat arasında α -amino grubunu reverzibl olarak katalizler (Şekil 6).



Özellikle çok sayıda hastalıkta, çeşitli organlardaki rejenerasyon ve zehirlenme durumlarında serumda AST düzeyinde artış meydana gelir. AST, daha çok iskelet kası hücreleri olmak üzere karaciğer ve kalp kasında da çok fazla bulunduğu saptanmıştır (Gözükara, 1989; Keha ve Küfrevioğlu, 2005).

AST düzeylerindeki değişimler toksik etkili kimyasalların yanı sıra üreme, hipoksik koşullar ve açlık gibi stres faktörlerinin etkisinde de meydana gelmektedir (Vijayan ve ark., 1997). Viral hepatit, toksik hepatit, Reye sendromu, enfeksiyöz mononükleoz, tıkanma sarılığı ve siroz gibi karaciğer hastalıklarında artar. Kalp ve iskelet kasında da yoğun bulunduğu için akut miyokard enfarktüsü, hepatik konjesyonla birlikte bulunan kalp yetmezliği, bazı perikardit ve miyokardit olgularında artışı gözlenir. Kalp kası hastalıkları dışında kas distrofisi, kas travması, intramüsküler enjeksiyonlarda da AST artışı söz konusudur (Lawrence ve ark., 1996; Henry, 2001).



Şekil 6. Aspartat aminotransferaz reaksiyonunda piridoksal fosfat ve piridoksamin fosfatın siklik dönüşümü (Cahampe ve Harvey, 1994).

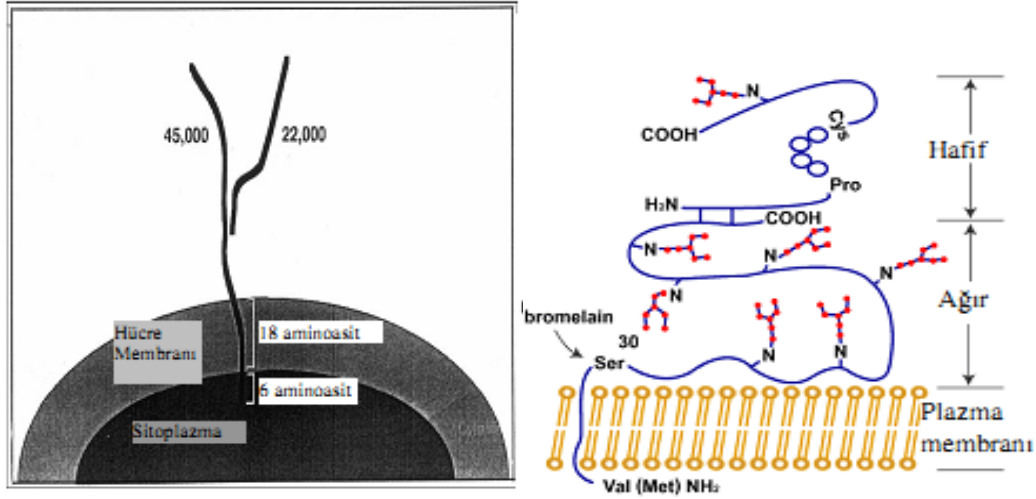
2.4.2 Gamma glutamil transferaz (GGT)

Gamma-glutamil transferaz (GGT, GGTP, gamma-GT), bilimsel adlandırmada EC 2.3.2.2 ve sistematik adlandırmada (5-L-glutamil)-peptit: amino asit 5-glutamil transferaz olarak bilinen bir enzimdir (Mehmetoğlu, 2002). Sitozolde de bulunmasına rağmen, önemli oranda enzim hücre içinde yer alır. Aminoasit ve peptitlerin γ glutamil peptitleri şeklinde hücre içine alınmasından sorumludur (Tietz, 2005).

GGT aynı zamanda memelilerin başlıca tiol antioksidanı olan glutatyonun ekstrasellüler katabolizmasından sorumlu olan enzimdir (Emdin ve ark., 2001).

Enzimin böbrek, karaciğer, pankreas, prostat, testisler, ince bağırsak, beyin, kalp, akciğer, dalak, santral sinir sistemi, trombositler, fibroblastlar, kemik iliği hücreleri, serum gibi birçok yerde varlığı gösterilmiştir. En yüksek GGT aktivitesi böbrekte bulunur. Akciğer çok düşük düzeyde GGT etkinliğine sahiptir. Sağlıklı kişilerin serumları böbrekteki yüksek aktivite ile kıyaslandığında eser miktarda GGT aktivitesi içerir. GGT aktivitesi safra, idrar, beyin omurilik sıvısı, seminal sıvı, amniyon sıvısı ve tükürkte bulunmaktadır (Whitfield, 2001).

Membrana bağılı olan enzim heterodimerik bir glikoproteindir. Küçük alt birimin molekül ağırlığı 21 ile 28 kDa arasındadır ve katalitik yer burada bulunmaktadır. Büyük alt birim 38 ile 72 kDa arasında olup, kısa bir bölümü hidrofobik bölgededir ve enzimi membrana bağlar. Küçük alt birim büyük alt birime non kovalent bağ ile bağlanmıştır (Meys ve ark., 1988; Martin ve Slovin, 2000) (Şekil 7).



Şekil 7. GGT'nin yapısı ve amino asit dizilimi (Hanigan, 1998)

GGT enziminin aktivitesi serum veya plazmada sensitif fakat çok spesifik olmayan karaciğer fonksiyon testi olarak yaygın şekilde klinik laboratuvarlarda kullanılmaktadır (Wannamethee ve ark., 1995).

GGT glutasyon ilişkisinin araştırılması için yapılan çeşitli hayvan çalışmalarında, GGT düzeylerindeki artışın karaciğer hücrelerinde glutasyon varlığının sürdürülmesi için gerekli olduğu vurgulanmıştır. Sülfür içeren bir aminoasit olan sistein, tripeptit olan glutasyonun en önemli aminoasitidir. Glutasyon mevcudiyeti için GGT'nin önemi büyüktür. Karaciğer hücrelerinde glutasyon sentezi için gerekli sistein, dolaşımdaki glutasyondan GGT aracılığı ile sağlanmaktadır (Whitfield, 2001).

GGT serum değerleri glutasyonun azalması dışında obstrüktif karaciğer hastalıkları, yüksek alkol tüketimi, enzim indükleyen ilaçların kullanımı, serbest radikal üretiminin arttığı durumlarda da artmaktadır (Whitfield, 2001). Uzun süreli aşırı yorgunluğa uğramış normal sağlıklı kişilerde bile orta derecede GGT artışları gözlenebilmektedir (Üstdal ve Özgünen, 1997).

GGT'nin çok sayıda izoenzimi vardır ancak doku spesifitesi kesin değildir. Elektroforetik yöntemler kullanılarak serum proteinleri (albumin ve α_1 , α_2 , β , γ globulin) ile karşılaştırma yapıldığında sağlıklı kişilerde serum GGT izoenzimlerinin 2 banttandır olduğu görülmektedir (Burlina, 1978). Bu iki bant serum proteinlerinde α_1 -globulin ve α_2 -globulin fraksiyonları ile örtüşmektedir. Sağlıklı kişilerde yapılan bazı çalışmalarda α_1 -globulin ve α_2 -globulin fraksiyonları arasında bir bant daha gözlemlendiği bildirilmiştir. Çeşitli hastalıklarda serum GGT bantlarının farklı yerlerde ve yoğunlukta olduğu tespit edilmiş olup, özellikle karaciğere bağlı çeşitli hastalıklarda hastalığın teşhisi için kullanılabilirliği ifade edilmiştir. Karaciğer tümörü olan hastalarda alb-GGT, α_1 -GGT ve β -GGT izoenzimlerine, siroz hastalarında α_1 -GGT, β -GGT izoenzimlerine rastlanmaktadır (Sacchetti ve ark., 1988). Obstrüktif sarılık ve viral hepatit olan hastaların serumlarında alb-GGT, α_1 -GGT, α_2 -GGT, β -GGT olmak üzere 4 izoenzim tespit edilmiştir (Nemesanszk ve Lott, 1985).

Karaciğer kanseri oluşturulmuş sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalarda serum ve karaciğer GGT izoenzimlerine ait farklı bantlar bulunmuştur. Sıçanların kanser oluşumundan sonra GGT izoenzimlerinin zamana bağlı olarak farklı fraksiyonlarda olduğu saptanmış ve kanserin erken safhalarında ise kanserli hücrelerin gelişmesiyle GGT'nin ilişkili olduğu belirlenmiştir (Yao ve ark., 2004).

2.5. Kan Proteinleri

2.5.1. Albumin

Albumin başlıca karaciğerde sentezlenir ve plazma yarılanma ömrü 15-19 gün arasındadır (McPherson, 1991). Plazma proteinlerinin en büyük kısmını albumin meydana getirir. Kan plazmasında % 3-4 g kadar bulunur. Serum albumininin elektroforezde daha hızlı göçen ve mol ağırlığı daha küçük olan bir fraksiyonu saptanmıştır, bu prealbumin olarak adlandırılır. Serum albumin molekülü 150 Å'lık bir uzunluk ve 38 Å'lık bir genişlikle elipsoid biçimdedir. Bu sebeple, eriyikleri öbür plazma proteinlerin eriyiklerinden daha az yoğunluğa sahiptir (Yenson, 1988).

Protein sentezi için büyük bir protein kaynağına sahip olan organ karaciğerdir ve kaybolan protein yenilenebilir. Hayvanlarda albumin yarı ömrü uzun olduğundan,

serum albumin konsantrasyonu ancak diffuz ve kronik hepatopatilerde azalır. Serum albumin seviyelerinin ölçümü hepatik hastalıkların komplikasyonlarının ortaya konması için önemlidir. Albumin ölçümü aynı zamanda kronik hepatit gibi bazı sorunların sebebini tahmin etmek için gereklidir (Turgut, 2000). Serum albumin yoğunluğu dehidrasyonda arttığı saptanmıştır (Prinsen ve ark., 2004).

Albumin konsantrasyonu başlıca hepatik sentezin azalması, albumin yıkımlanmasının artması, bağırsaklar ve idrar yoluyla aşırı kayıp nedeniyle azalmaktadır. Bu kayıpların en büyük nedenlerinin başında renal glomerüler hastalıklar, protein kaybına yol açan enteropatiler, uzun süreli açlık ve bazı kötü huylu tümöre benzer yapılanmalardır (Prinsen ve ark., 2004).

Ayrıca birçok hastalık süresince düşük albumin düzeyi ile birkaç faktör arasında bağlantı kurulabilir. Yangı, dokuların hasarı, karaciğer hastalıkları ya da sonuçta azalan protein emilimi nedeniyle albumin düzeyinde azalma görülür. Protein kaybı; protein katabolizması, idrarla protein kaybı, amino asitlerin iyi emilememesi (Crohn's Hastalığı), böbrek sendromları, kötü huylu tümörler sonucu meydana gelir. Karaciğer fonksiyonlarının ve hastaların diyetlerinin izlenmesinde de klinik olarak yararlanılabilir (Doumas ve ark., 1971; Grant ve ark., 1987).

Birbirine bağlı gelişen sentez, salgılanma ve yıkımlanma olayları arasındaki dengeyi damar içi sıvının albumin düzeyi sağlamaktadır (Hill, 1985). Albumin aynı zamanda hücre içinde yıkımlanarak, diğer proteinlerin sentezi için aminoasit deposu olarak görev yaptığı da saptanmıştır (McPherson, 1991).

2.5.2. Globulin

Globulinler seyreltik nötral tuz çözeltilerinde çözülmezler, ısıtılınca pıhtılaşır (Keha ve Küfrevioğlu, 1993). Bunlar α_1 , α_2 , β ve γ -globulin olarak dört fraksiyon halinde bulunurlar:

α_1 -globulinler: α_1 -globulinlerin başlıca kısmını glikoproteinler ile HDL oluşturur. Gebeliğin son iki trimesterinde α_1 -globulin düzeyinde orta derecede artış meydana gelmekle beraber, akut ve kronik enfeksiyonlar, poliarteritis nodoza, akut romatizmal ateşin erken dönemi, sistemik lupus eritematozis (SLE), koroner arter

trombozu, radyasyona bağlı doku hasarı, kemik kırıkları, akut ve kronik nefritler, piyelonefritler, romatoid artrit, karaciğer hastalıkları gibi bazı patolojik durumlarda da artış saptanır.

Nefrotik sendrom ve karaciğer nekrozunda $\alpha 1$ -globulinlerin düzeyinde azalmalar meydana gelir (Turgut, 2000; Mehmetoğlu, 2002; Anonim, 2013e).

$\alpha 2$ -globulinler: Eritrositlerin parçalanmasıyla açığa çıkan hemoglobini yakalayan haptoglobini, bakırlı protein olan seruloplazmini, kanın pıhtılaşmasından sorumlu olan protrombini, bazı glikoproteinleri ve çok düşük dansiteli lipoproteini (VLDL) içerir (Yenson, 1988). Akut ve kronik enfeksiyonlar, sistemik lupus eritematozis, romatoid artrit, poliarteritis nodoza, akut romatizmal ateşin erken dönemi, akut ve kronik nefritler, piyelonefritler, nefrotik sendrom, Cushing sendromu, viral hepatit, siroz, karaciğer nekrozu ve malign hastalıklarda $\alpha 2$ -globulinlerde artış görülür (Turgut, 2000; Anonim, 2013e).

β -globulinler: Bunların en büyük kısmı, demir bağlayıcı protein ve düşük dansiteli lipoproteinden (LDL) oluşur. β -globulinlerin artışındaki asıl patolojik durumlar; viral hepatit, esansiyel hiperlipidemi, primer ksantomatozis, biliyer siroz, esansiyel hiperkolesterolemi, multiple miyeloma, poliarteritis nodoza ve nefrotik sendromdur.

Bazı karaciğer nekrozlu olgularda β -globulinlerin düzeyinde azalmalar meydana gelir. β -globulin proteinleri kan dolaşımında demir gibi maddelerin taşınmasında rol oynar (Turgut, 2000; Mehmetoğlu, 2002; Anonim, 2013e).

γ -globulinler: Bu grupta bulunan globulinler birbirinden farklı alt grup içerdiklerinden homojen değildirler. Bunların en büyük kısmını, antikorlar yani immunoglobulinler (Ig'ler) oluşturur. Bu immunoglobulinlerin beş çeşidi vardır: A, D, E, G, M. Bunların tümü de, heterojen bir özellik gösterir ve herbiri yüzlerce, binlerce immunoglobulinlerden meydana gelmiştir. Ultrasantrifüjdeki çöküşlerine göre hafif (L) ve ağır (H) denilen iki küçük, iki de büyük polipeptit zincirinden oluşurlar. γ -globulin bandı geniş ve yaygındır; çünkü yapılarındaki farklılıktan dolayı değişik hızlarda hareket ederler. Karaciğerde sentezlenmeyen tek serum proteini immunoglobulinler olarak isimlendirilen γ -globulinlerdir (Busher, 1990; Turgut, 2000; Mehmetoğlu, 2002).

Patalojik durumlar sonucunda yükselen immunoglobulin düzeyleri, diğer proteinlerin artışına neden olabilir. Yetersiz beslenme ve doğuştan gelen zayıf bağışıklık sistemi total globulin sentezinin azalmasına yol açar (Busher, 1990).

Serum γ -globulin fraksiyonunun arttığı durumların başında; akut ve kronik karaciğer hastalıkları, akut diffüz enfeksiyonlar, kronik enfeksiyonlar, glomerulonefrit, sarkoidoz, karsinom ve otoimmün hastalıklar gelir. Azaldığı durumlar ise; nefrotik sendrom, ağır malabsorpsiyon ve malnütrisyon, primer immun yetmezlik ve sekonder immun yetmezliktir (Turgut, 2000; Anonim, 2013e).

2.6. Total Protein

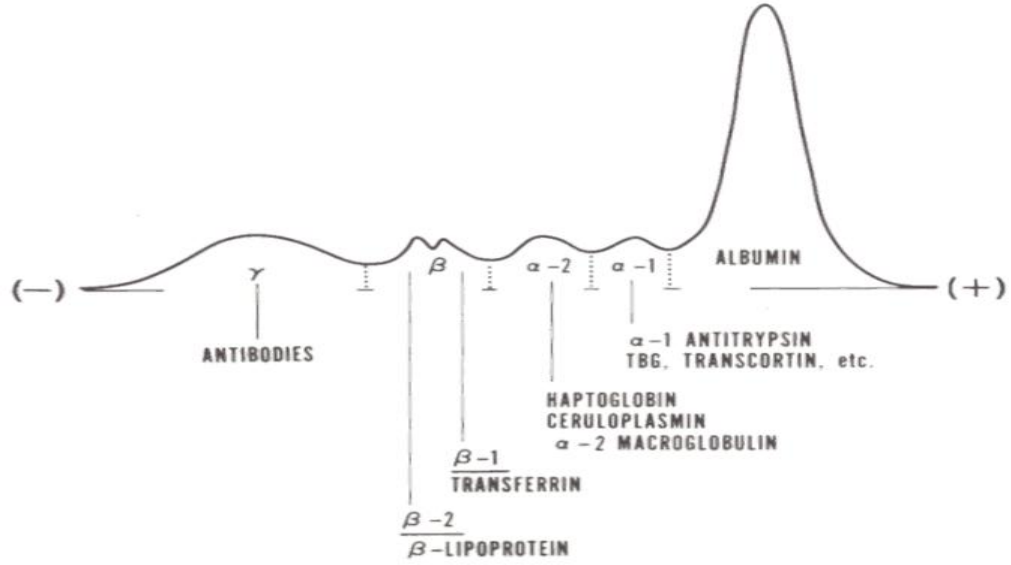
Kan plazmasındaki çözülmüş katı maddelerin büyük kısmını proteinler oluşturur. Total plazma proteininin 3.5-5.0 g/dl kadarını serum albumin, 2.5-3.2 g/dl kadarını da globulinler meydana getirir.

$$\% \text{ g toplam protein} - \% \text{ g toplam albumin} = \% \text{ g toplam globulin}$$

Proteinler, fonksiyonel görevlerinin yanında dokular için besin kaynağı olarak da görev yapabilirler. Ayrıca toplam plazma protein miktarlarının bilinmesi hayvanlardaki beslenme durumunu yansıtır. Besinsel durum, uygun ve yeterli düzeyde protein veya protein yapıcı maddelerin varlığı ile yakından ilişkilidir (Aras ve Erşen, 1975; Coles, 1986; Murray ve ark., 1990). Serum toplam protein konsantrasyonundaki artma ve azalmalar disproteinemi olarak adlandırılır. Disproteinemiler, hiperproteinemi (serum protein konsantrasyonu artışı) ve hipoproteinemi (serum protein konsantrasyonu azalışı) olmak üzere iki çeşittir. Hipoproteinemi, hiperproteinemilerden daha yaygındır. Protein alınımındaki yetersizlik, protein sindiriminin bozulması, protein sindirimine yol açan enteropatiler, karaciğer hastalıkları, akut ve kronik hemorajiler, kalp yetmezliği gibi durumlarda gözlenir (Aslan ve ark., 1993; Jain, 1986; Turgut, 1995).

2.7. Serum Protein Fraksiyonlarının Belirlenmesi

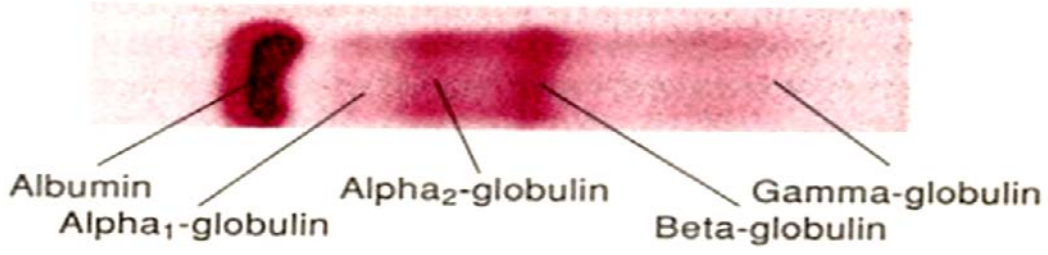
Serum proteinleri, klinik laboratuarda kullanılmak üzere elektroforetik olarak 5-6 banta ayrılır (Anonim, 2013f) (Şekil 8).



Şekil 8. Klinik laboratuarda kullanılmak üzere serum proteinlerinin elektroforetik olarak ayrıldığı bantlar ve alt grupları (Anonim, 2013f)

Serum protein fraksiyonlarını ayırmada kullanılan en yaygın yöntem elektroforezdir. Bu işlemde; uygun tamponlu çözücüler hazırlanıp proteinler çözülür ve bir kağıdın ya da bir nişasta bloğun ortasına yerleştirilerek elektrik akımına tutulur. Elektrik yükü farklılıklarından dolayı protein komponentleri farklı yönlerde doğru yön alırlar. Proteinler pozitif veya negatif yük taşıdığından akışkan içinde elektrik alana yerleştirildiğinde kolay şekilde hareket ederler. Elektroforez yöntemi kullanılarak benzer boyut, şekil ve iyon grupları içeren kan serum proteinleri bir elektriksel alanda fraksiyonlara ayrılırlar (Busher, 1990; Anonim, 2013e).

Serum proteinlerinin elektroforezinde anoda en hızlı göç eden fraksiyon, prealbumin ve albumindir, en yavaş göç eden fraksiyon ise γ-globulin fraksiyonudur. Rutin serum proteinleri elektroforezinde prealbumin fraksiyonu fark edilmez, albumin fraksiyonu ise koyu ve yoğun olarak belirlenir (Anonim, 2013f) (Şekil 9).



Şekil 9. Serum proteinlerinin elektroforetik görünümü (Anonim, 2013f)

2.7.1. Serum protein fraksiyonlarının klinik önemi

Serum proteinleri normal bireylerde bazı değişiklikler gösterebilir. Gerek kantitatif gerekse kalitatif olarak yaş, hamilelik, sıcaklık, gibi fizyolojik durumlar, beslenme, cinsiyet, çevresel etkenler ve genetik polimorfizmi gibi durumlardan etkilenip farklılık görülebilir. Genellikle yaşam boyunca serum proteinlerinde yavaş da olsa bir artış vardır. Fakat bu etkenler dışında bazı hastalık durumlarında da değişimler olabilir. Bu değişim, organizmanın görevini yerine getirememesi sonucu ortaya çıkabilir (Erdal, 1987; Karagül ve ark., 2000; Onat ve ark., 2002).

Beslenme bozuklukları veya ağır protein kaybı olgularında gelişen hipoproteinemilerde tüm bantlarda azalma görülmesine rağmen, en belirgin azalma albuminde rastlanır. Ağır açlık durumlarında veya ilerleyen kronik hastalıklarda albuminde görülen azalmaya α_1 ve α_2 bantlarında yer alan; α_1 -antitripsin, α_2 -makroglobulin, haptoglobulin ve transferrin katılmaktadır. Protein kaybedilen enteropatilerde, tüm bantlarda sentez azalmasına veya kaybın artmasına bağlı olarak bantlarda soluklaşma, α_2 bandında ise artış görülmektedir. Protein kaybıyla sonuçlanan nefropatilerde albumin, α_1 , β ve γ -globulinlerde azalma meydana gelir. Demir eksikliği olgularında transferrin artışına bağlı belirgin β bandı izlenir. Haptoglobulin, hemoliz arttığında (hemolitik anemi) azalır ve serbest haptoglobin tespit edilemez. Akut enfeksiyonlarda ve travmayı takiben plazmada haptoglobulin düzeyinde artış izlenir. Nefrotik sendromda da artış vardır. Aktif hemoliz sonucu haptoglobulin eksikliği olan kişilerde α_2 veya β bölgelerine göçen bağımsız bir hemoglobin bandı gözlenmektedir. Kronik hepatosellüler bozuklukta plazma albumin seviyesi düşer ve bunu izleyen safhalarda hastalığın takibinde iyi bir değer olarak yararlanılır. Böyle olmasına rağmen

akut karaciğer hastalıklarında plazma albumininde azalma yoktur ya da çok azdır (Erdal, 1987; Anonim, 2013e).

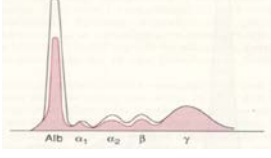
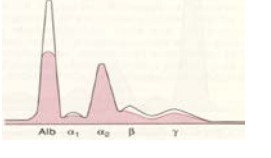
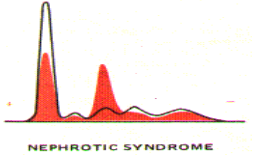
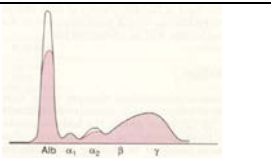
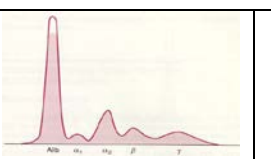
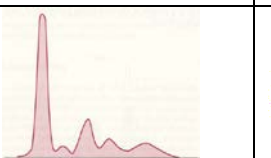
Albumindeki azalma γ fraksiyonundaki immunoglobulinlerin artışı ile denge sağlamaktadır. Portal fibrozda karakteristik değişiklik genellikle serum albumin düzeyinde düşüş ve γ -globulindeki artış şeklinde ifade edilir. Karaciğer sirozu olgularında albumin sentezinin azalması ve kaybının artması sonucu serum konsantrasyonu azalmaktadır. Sirozda serum albumin seviyesi düşer, serum γ -globulin artışı da hafiftir, α -globulin ve β -globulin konsantrasyonları serum lipoproteinindeki artışa bağlı olarak artar (Erdal, 1987; Karagül ve ark., 2000).

Değişik klinik durumlarda, normalde bulunmayan bantların görünür hale gelmesi de gözlenmiştir. Bazı kötü huylu tümörlerde albumin ile α_1 bandı arasında beliren soluk bir bant izlenir, bu durum α_1 -fetoproteine bağlıdır. Monositer lösemilerde lizozim düzeyindeki artışa bağlı olarak γ bölgesinden ileride bir bant oluşmaktadır (Erdal, 1987; Karagül ve ark., 2000; Onat ve ark., 2002; Anonim, 2013e). Bazı hastalıklarda serum proteinlerinin durumu Tablo 1'de ve serum proteinlerinin elektroforetik görünümü ise Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 1. Bazı hastalıklarda serum proteinlerinin durumu (Prinsen ve ark., 2004; Okita, 2004; Mariee DA ve Al-Shabanah 2006; Anonim, 2013g).

Protein fraksiyonu	Hastalık	Durum
Albumin	Önemli karaciğer hastalıklarında	Artar
α1-globulinler		
α 1-lipoprotein	Ağır inflamasyonlarda	Azalır
	Sirozda	Azalır
	Akut hepatitte	Azalır
α 1-lipoprotein	Nefrotik sendromda	Azalır
	Ağır alkoliklerde	Artar
	Gebe kadınlarda	Artar
α 1-antitripsin	Akut inflamasyonda	Artar
α 1-antitripsin	Nefrotik sendromda	Azalır
α2- globulinler		
α 2-makroglobulinler	Nefrotik sendromda	Artar
	Hemolitik anemide	Artar
	Diyabetlilerde	Artar
	Malign hastalıklarda	Artar
	Sirozda	Artar
Haptoglobulin	Hemolitik anemide	Artar
β -globulinler	Aktif karaciğer hastalıklarında, nefrotik sendromda, apse oluşturan deri hastalıklarında	Artar
Transferrin	Gebelik ve östrojen tedavisinde, demir eksikliği anemisinde	Artar
β -lipoproteinler	Gebelik ve östrojen tedavisinde, demir eksikliği anemisinde	Artar
γ -globulinler (immunoglobulinler)	Bazı deri hastalıklarında, solunum yolu enfeksiyonlarında, kronik enfeksiyonlarda, çeşitli tümörlerde	Artar

Tablo 2 . Bazı hastalıklarda serum proteinlerinin elektroforetik görünümü (Prinsen ve ark., 2004; Okita, 2004; Mariee DA ve Al-Shabanah 2006; Anonim, 2013h)

Elektroforez bantı	Hastalık
	Siroz
	Renal protein kaybı
	Nefrotik sendrom
	Hepatit
	Kronik inflamasyon
	Akut inflamasyon

Nefrotik sendrom, ağır malabsorpsiyon ve malnütrisyon, primer ve sekonder immun yetmezlik durumlarında serum γ -globulin fraksiyonu azalır. Serum globulin düzeyleri, karaciğer hastalıklarının tayininde önemli olan diğer testlerle birlikte bilgi verebilir. Akut ve kronik karaciğer hastalıkları, kronik enfeksiyonlar, akut diffüz glomerulonefrit, sarkoidoz, karsinom ve otoimmün hastalıklarda serum γ -globulin

fraksiyonu artar (Tablo 2). Karaciğer hastalıklarında özellikle β -globulin fraksiyonunda belirgin bir artma gözlenir. Tüm immunoglobulinleri kapsayan γ -globulin fraksiyonundaki artma ve yavaş β -hipogammaglobulinemi (HGG) hastalığının sebebi düşük seviyedeki gamma globulin bölgesine uzanan IgA artışıdır ve β - γ köprüleşmesi olarak adlandırılmaktadır (Onat ve ark., 2002; Anonim, 2013e).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Hayvan materyali

Çalışmanın hayvan materyalini Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesi'nden temin edilen yaklaşık 7-8 haftalık, 200-250 g ağırlığındaki 32 adet Wistar Albino dişi ratlar oluşturdu. Deney öncesinde ratların 7 gün süreyle ortama adaptasyonu sağlandı.

Ratlar 8 günlük deneme süresince 12 saat karanlık/aydınlama uygulanarak sıcaklığı $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ olarak ayarlanmış odalardaki kafeslerde barındırıldı. Hayvanlara ticari rat yemi (pellet yem) ve içme suyu ad libitum verildi.

3.1.2. Kullanılan alet ve malzemeler

Cobas Integra 800 otoanalizörü (Roche).

Universal 320R soğutmalı santrifüj.

Otomatik pipetler (Socorex).

Derin dondurucu (Arçelik).

Ependorf tüp (Germany)

Hassas terazi (Gee Avery).

Helena Lab - Titan III sellüloz asetat kartları.

Helena Lab- 4063 elektroforez tankı.

Helena Lab -1511 güç kaynağı.

Kronometre (Larus JAPAN).

Platinum IV (paket program).

Tarayıcı.

3.1.3. Kimyasal maddeler

Karbon tetraklorür (Merck, Germany)

Fucoidan (Sigma, USA)

Glasiyal asetik asit (Merck)

Metanol (Merck)

Ponceau S stain (Cat. No. 5526)

Clear aid (Cat. No. 5005)

ALT kiti (Roche/Hitachi Kit No: 20764957, Germany).

AST kiti (Roche/Hitachi Kit No: 20764949, Germany).

GGT kiti (Roche/Hitachi Kit No: 03002721, Germany).

Albumin kiti (Roche/Hitachi Kit No: 04469658, Germany).

Total protein kiti (Roche/Hitachi Kit No: 03183734, Germany).

3.2. Yöntem

3.2.1. Deneme gruplarının hazırlanması

Çalışmada kullanılan ratlar rastgele her biri 8 rattan oluşan 4 gruba ayrıldı:

1.grup kontrol grubu: Fizyolojik tuzlu su 8 gün süreyle intragastrik gavaj yoluyla verildi.

2.grup fucoidan grubu: Bu grupta bulunan 8 rata fucoidan 100 mg/kg/gün 8 gün süreyle intragastrik gavaj yoluyla verildi.

3.grup fucoidan+CCl₄ grubu: Bu grupta bulunan 8 rata fucoidan 100 mg/kg/gün 8 gün intragastrik gavaj yoluyla verilip, 8. gün CCl₄ 1 ml/kg intraperitoneal yoldan tek doz enjekte edildi.

4.grup CCl₄ grubu: Bu grupta bulunan 8 rata 8 gün süreyle fizyolojik tuzlu su intragastrik gavaj yoluyla verilip, 8. gün CCl₄ 1 ml/kg intraperitoneal yoldan tek doz enjekte edildi.

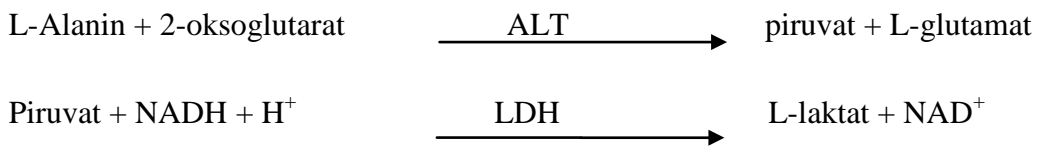
3.2.2. Örneklerin toplanması

8 günlük deneme süresinden 24 saat sonra, yani 9. gün intraperitoneal olarak ketamin (90 mg/kg) enjekte edilerek anestezide alınan hayvanların kalplerinden (sol ventrikülden) enjektörle girilip antikoagülsüz tüplere kanlar alındı. Tüplere alınan kanlar 3000 devirde +4°C'de 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Elde edilen serum numunelerinde ALT, AST, GGT aktiviteleri ile albumin, globulin ve total protein düzeylerinin analizi otoanalizörde, serum protein fraksiyonları ise elektroforezde yapıldı.

3.2.3. Alanin aminotransferaz tayini

ALT tayini Roche Modüler P 800 otoanalizörü ile Roche/Hitachi (Kit No: 20764957) marka kit kullanılarak belirlendi.

Prensip: Alanin aminotransferaz, L-alanin ile 2-oksoglutarat arasındaki reaksiyonu katalize eder. Oluşan piruvat, L-laktat ve NAD⁺'nın oluştuğu ve laktat dehidrojenazın (LDH) katalize ettiği bir reaksiyonda NADH tarafından indirgenir.

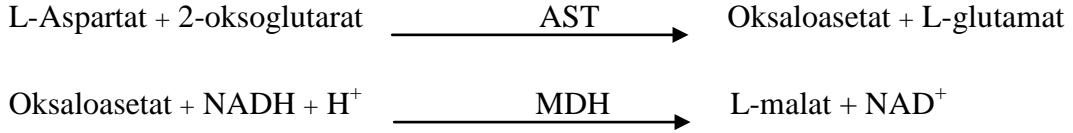


NADH yükseltgenmesinin hızı katalitik ALT aktivitesiyle doğru orantılıdır ve absorbanstaki azalmanın ölçülmesiyle belirlenir.

3.2.4. Aspartat aminotransferaz tayini

AST tayini Roche Modüler P 800 otoanalizörü ile Roche/Hitachi (Kit No: 20764949) marka kit kullanılarak tespit edildi.

Prensip: Aspartat aminotransferaz, oksaloasetat ve L-glutamatın oluşması için L-aspartat ile 2-oksoglutarat arasında bir amino grubunun transferini katalize eder. Oksaloasetat daha sonra NAD⁺'nin oluşması için malat dehidrojenaz (MDH) varlığında NADH ile reaksiyona girer.



NADH yükseltgenmesinin hızı katalitik AST aktivitesiyle doğru orantılıdır ve absorbanstaki azalmanın ölçülmesiyle tayin edilir.

3.2.5. Gamma glutamil transferaz tayini

GGT tayini Roche Modüler P 800 otoanalizörü ile Roche/Hitachi (Kit No: 03002721) marka kit kullanılarak yapıldı.

Prensip: γ -glutamil transferaz, L- γ -glutamil-3-karboksi-4-nitroanilidin γ -glutamil grubunu glisilglisine transfer eder.



Serbest kalan 5-amino-2-nitrobenzoat miktarı numune içindeki GGT aktivitesi ile orantılıdır ve absorbanstaki artış fotometrik olarak ölçülür.

3.2.6. Albumin tayini

Albumin tayini Roche Modüler P 800 otoanalizörü ile Roche/Hitachi (Kit No: 04469658) marka kit kullanılarak belirlendi.

Prensip: Anti-albumin antikorları numune içindeki antijenle reaksiyona girip, antijen/antikor kompleksleri oluşturur. Aglütinasyonun ardından bu komplekslerin türbidimetrik olarak ölçümü yapılır.

3.2.7. Globulin tayini

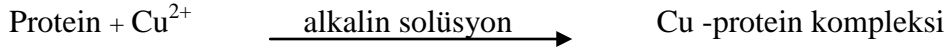
Serum toplam protein miktarından, serum albumin miktarının çıkarılmasıyla serum globulin miktarı elde edilir.

$$\% \text{ g toplam globulin} = \% \text{ g toplam protein} - \% \text{ g toplam albumin}$$

3.2.8. Total protein tayini

Total protein tayini Roche Modüler P 800 otoanalizörü ile Roche/Hitachi (Kit No: 03183734) marka kit kullanılarak saptandı.

Prensip: İki değerlikli bakır alkalın solüsyonu içinde protein peptit bağları ile reaksiyona girerek karakteristik mor renkli biüret kompleksini oluşturur. Sodyum potasyum tartarat bakır hidroksidin çökmesini önler ve potasyum iyodür bakırın otomatik indirgenmesini engeller.



Renk yoğunluğu fotometrik olarak tayin edilebilen protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

3.2.9. Sellüloz asetat elektroforezi ile serum proteinlerinin analizi

Çözeltiler;

Tampon solüsyonunun hazırlanması: pH'sı 8.6-9.0 olan Electra HR[®] Buffer (Cat. No. 5805) 750 ml distile suda eritildi.

Clear Aid solüsyonu: Clear Aid (Cat. No. 5005) polietilen glikol içerir. 30 birim glasiyal asetik asit, 70 birim metanol ve 4 birim Clear Aid karıştırılarak elde edildi.

Ponceau S stain: Bir paket Ponceau S stain (Cat. No. 5526) 1 lt distile suda eritildi. % 3.5 triklorasetik asit ve % 3.5 sülfosalisilik asitin sulu solüsyonunda 250 ml % 0.50 Ponceau S içerir.

Elektroforetik analizin yapılışı;

- Gerekli olan ayıraçlar hazırladı.
- Sellüloz asetat kartı, pH'sı 8.6-9.0 olan barbital buffer ve tris içeren tampon solüsyonunda (Electra HR Buffer Cat No. 5805) karta negatif yük yüklemek için ortalama 20 dakika bekletildi.
- Bekleme sonucunda alınan asetat kartı kurutma kağıdı arasında hafifçe kurutuldu.
- Yürütme tankının + ve – kutuplarının olduğu bölmelere 100'er ml (2/5'i kadar) aynı tampon solüsyonundan konuldu.
- Filtre kağıdı yardımıyla yürütme tankı ile tampon solüsyonu arasında temas sağlandı.
- Senter applikatör yardımıyla, sellüloz asetat kartının sellüloz kısmına 8–10 µl serum örneği uygulandı.
- Sellüloz asetat kartının sellüloz kısmı aşağı gelecek şekilde yürütme tankına konulan filtre kağıtlarının üzerine yerleştirildi ve üzerine kaymaması için lam bırakıldı.
- Yürütme tankının kapağı kapatıldı, 180 V'da 15 dakika bekletildi.
- Yürütme sonucu oluşacak bantlar uygulama noktasına en yakından başlayarak γ -globulin, β -globulin, α_2 -globulin, α_1 -globulin ve albumin bantları oluştu. Molekül ağırlığı küçük olan en uzağa gitti.

Boyama işlemi;

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra sellüloz asetat kartı lam sepetine alınıp, sırasıyla şu işlemlere tabi tutuldu.

- Ponceau S solüsyonunda 6 dakika bekletildi.

- %5'lik glasiyal asetik asitte ikişer dakika süreyle üç defa değiştirilerek bekletildi.
- %100'lük metanolde ikişer dakika süre ile iki defa değiştirilerek bekletildi.
- 5-10 dakika (7 dakika tercih edilir) süre ile Clear Aid solüsyonunda bekletildi.
- Sellüloz asetat kartı 15 dakika süre ile 50-60 °C'de etüve alındı ve kart şeffaf hale geldi.
- Şeffaf hale getirilen asetat kartı, tarayıcıya alındı ve görüntüsü taranarak dijital ortama aktarıldı. Elde edilen jel görüntüsü Platinum 3 (version 3.0) (Helena, BioScience Europe) paket program kullanılarak değerlendirildi.

3.3. İstatistik analiz

Üzerinde durulan özellikler için tanımlayıcı istatistikler; Ortalama ve Standart Sapma olarak ifade edildi. Bu özellikler bakımından grupları karşılaştırmada Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Farklı grupları belirlemede Dunnet testi yapıldı. Hesaplamalarda istatistik anlamlılık düzeyi %5 olarak alındı ve hesaplamalar için SPSS (ver:13) istatistik paket programı kullanıldı.

4. BULGULAR

Kontrol, fucoidan, fucoidan+CCl₄, CCl₄ grubu ratlara ait serum ALT, AST, GGT aktiviteleri ile serum albumin, globulin ve total protein düzeylerinin ortalamaları Tablo 3’de verildi.

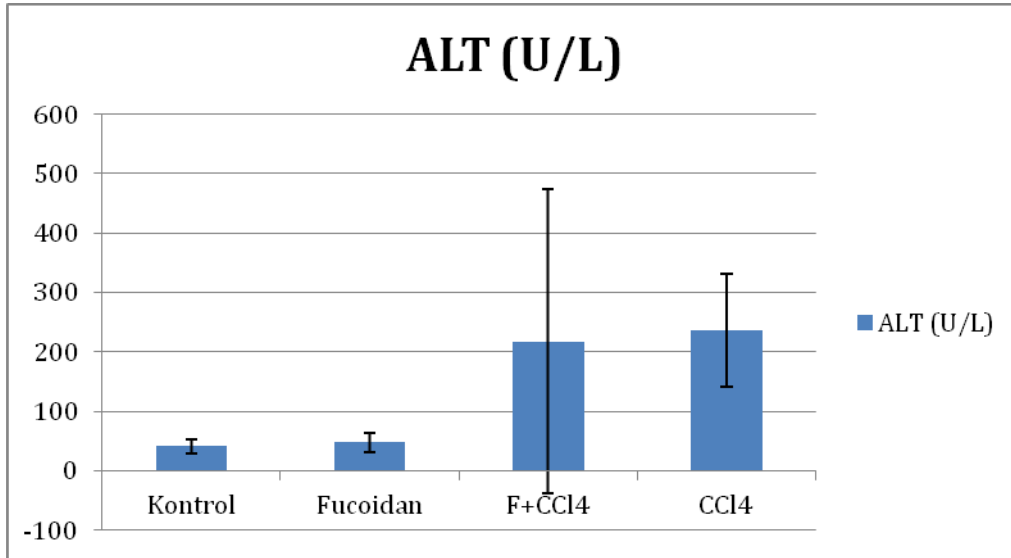
Tablo 3. Kontrol, fucoidan, fucoidan+CCl₄, CCl₄ grubu ratlara ait serum ALT, AST, GGT aktiviteleri ile serum albumin, globulin ve total protein düzeylerinin ortalamaları

	Kontrol		Fucoidan		Fucoidan+CCl ₄		CCl ₄		p
	n	X ± S _x	n	X ± S _x	n	X ± S _x	n	X ± S _x	
ALT (U/L)	8	41.38 ± 12.43 ^b	7	48.43 ± 15.97 ^b	8	218.00 ± 256.55 ^a	8	237.25 ± 94.97 ^a	.011 *
AST (U/L)	8	162.25 ± 54.0 ^c	7	195.86 ± 59.91 ^c	8	397.88 ± 190.22 ^b	8	527.00 ± 94.17 ^a	.001 ***
GGT (U/L)	8	1.00 ± 0.74 ^c	7	2.47 ± 1.15 ^b	8	3.06 ± 0.60 ^b	8	4.41 ± 0.43 ^a	.001 ***
Albumin (g/dl)	8	3.78 ± 0.42	7	3.80 ± 0.16	8	3.55 ± 0.30	8	3.71 ± 0.46	.507
Globulin (g/dl)	8	2.38 ± 0.25 ^b	7	2.23 ± 0.34 ^b	8	2.39 ± 0.16 ^b	8	2.89 ± 0.45 ^a	.002 **
T.Protein (g/dl)	8	6.14 ± 0.32 ^b	7	6.04 ± 0.40 ^b	8	5.95 ± 0.34 ^b	8	6.60 ± 0.38 ^a	.006 **

a, b, c: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir

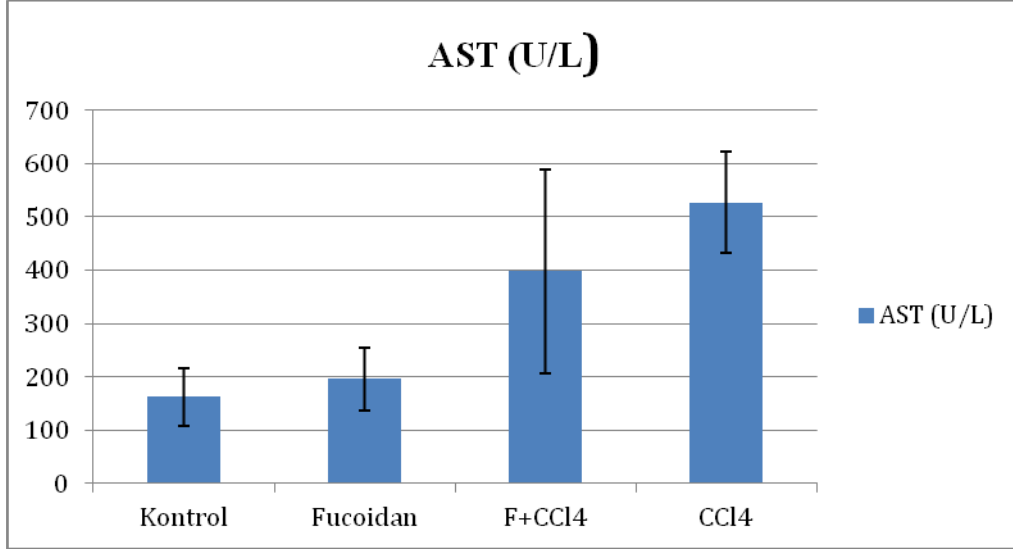
*p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001

Serum ALT aktivitesi kontrol, fucoïdan, fucoïdan+CCl₄, CCl₄ grubunda sırası ile 41.38 ± 12.43, 48.43 ± 15.97, 218.00 ± 256.55 ve 237.25 ± 94.97 U/L olarak belirlendi. Yüksek ALT aktivitesine sahip CCl₄ ve fucoïdan+CCl₄ grubu arasında istatistiksel olarak önem bulunmazken, bu iki grup ile kontrol ve fucoïdan grubu arasında p<0.05 düzeyinde önem saptandı (Şekil 10).



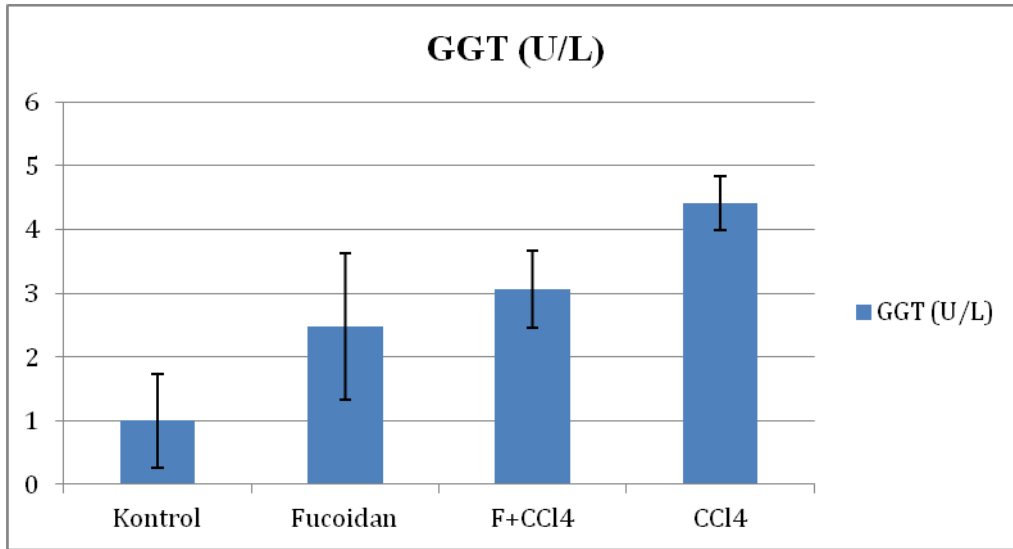
Şekil 10. Kontrol, fucoïdan, fucoïdan+CCl₄, CCl₄ grubundaki ratlara ait serum ALT aktiviteleri

Serum AST aktivitesi kontrol grubunda 162.25 ± 54.0 U/L, fucoïdan grubunda 195.86 ± 59.91 U/L, fucoïdan+CCl₄ grubunda 397.88 ± 190.22 U/L ve CCl₄ grubunda 527.00 ± 94.17 U/L olarak bulundu. İstatistiksel olarak kontrol ve fucoïdan grubu arasında önem saptanmazken, CCl₄ grubu ile diğer üç grup arasında p<0.001 düzeyinde önem tespit edildi (Şekil 11).



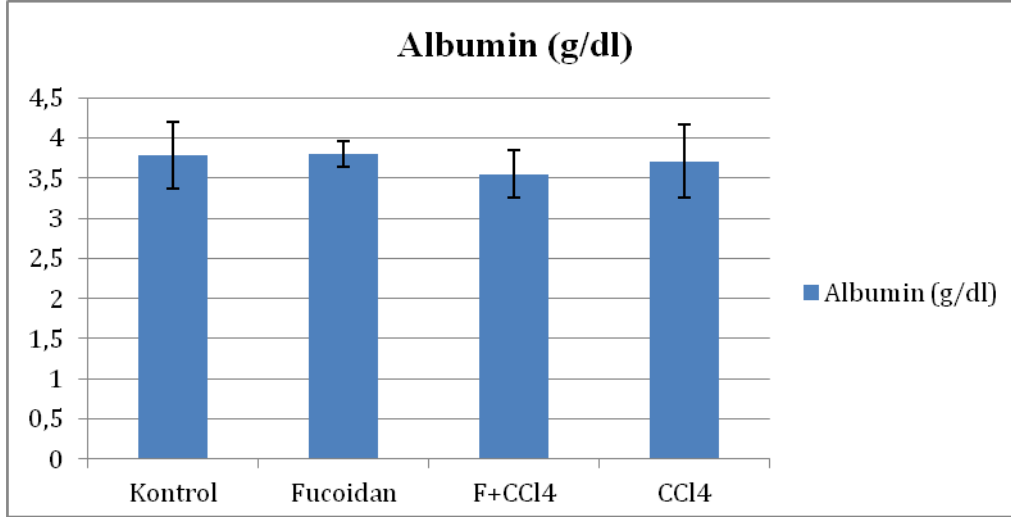
Şekil 11. Kontrol, fucoïdan, fucoïdan+CCl₄, CCl₄ grubundaki ratlara ait serum AST aktivitelemi

Serum GGT aktivitesi en yüksek olarak CCl₄ grubundaki ratlarda bulundu (4.41 ±0.43 U/L) ve diğer gruplara göre istatistiksel olarak p<0.001 düzeyinde önem tespit edildi. En düşük GGT aktivitesi kontrol grubunda (1.00 ± 0.74 U/L) saptanırken, fucoïdan grubunda 2.47 ± 1.15 U/L ve fucoïdan+CCl₄ grubunda ise 3.06 ± 0.60 U/L olarak bulundu (Şekil 12).



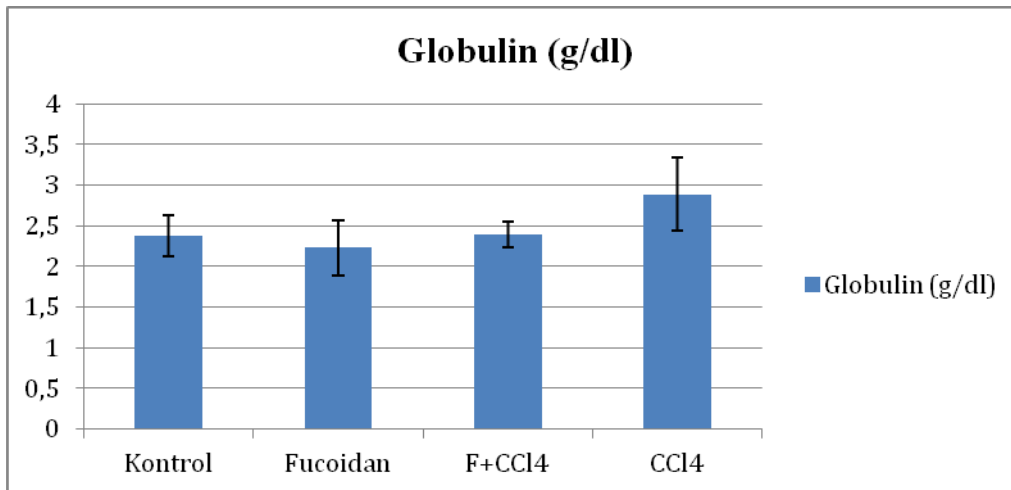
Şekil 12. Kontrol, fucoïdan, fucoïdan+CCl₄, CCl₄ grubundaki ratlara ait serum GGT aktivitelemi

Serum albumin düzeyleri kontrol, fucoïdan, fucoïdan+CCl₄ ve CCl₄ grubunda sırasıyla 3.78 ± 0.42 , 3.80 ± 0.16 , 3.55 ± 0.30 , 3.71 ± 0.46 g/dl olarak bulundu ve gruplar arasında istatistiksel olarak önem saptanmadı ($p>0.05$) (Şekil 13).



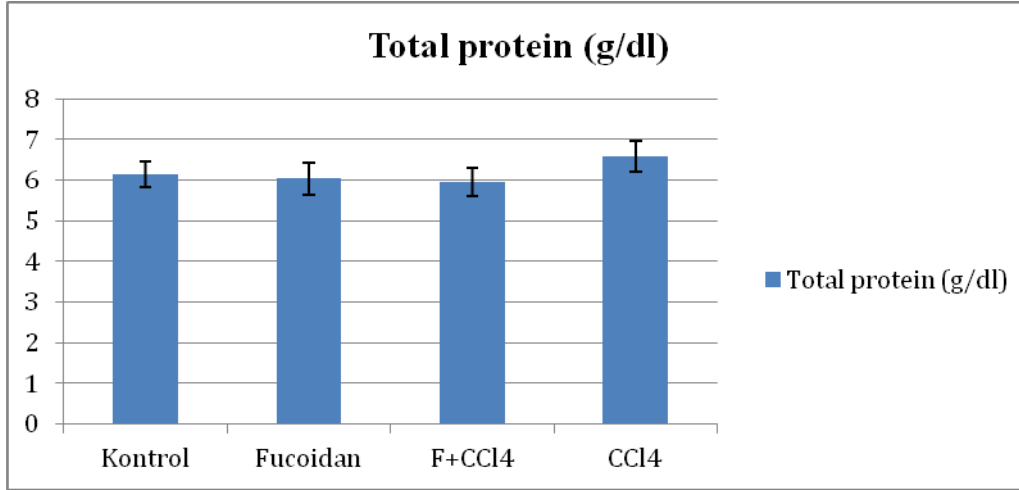
Şekil 13. Kontrol, fucoïdan, fucoïdan+CCl₄, CCl₄ grubundaki ratlara ait serum albumin düzeyleri

CCl₄ grubundaki ratlara ait serum globulin düzeyleri (2.89 ± 0.45 g/dl), kontrol (2.38 ± 0.25 g/dl), fucoïdan (2.23 ± 0.34 g/dl), fucoïdan+CCl₄ (2.39 ± 0.16 g/dl) grubundaki ratların globulin düzeylerine göre yüksekti ve istatistiksel olarak $p<0.01$ düzeyinde önem bulundu (Şekil 14).



Şekil 14. Kontrol, fucoïdan, fucoïdan+CCl₄ ve CCl₄ grubundaki ratlara ait serum globulin düzeyleri

Serum total protein düzeyi kontrol, fucoidan, fucoidan+CCl₄ grubundaki ratlarda sırası ile 6.14 ± 0.32 , 6.04 ± 0.40 , 5.95 ± 0.34 g/dl olarak birbirine yakın değerler belirlenirken, CCl₄ grubunun total protein düzeyi (6.60 ± 0.38 g/dl) diğer üç gruba göre istatistiksel olarak $p < 0.01$ düzeyinde önemle yüksek saptandı (Şekil 15).



Şekil 15. Kontrol, fucoidan, fucoidan+CCl₄ ve CCl₄ grubundaki ratlara ait serum total protein düzeyleri

Kontrol, fucoidan, fucoidan+CCl₄, CCl₄ grubu ratlara ait protein fraksiyonları Tablo 4’de verildi.

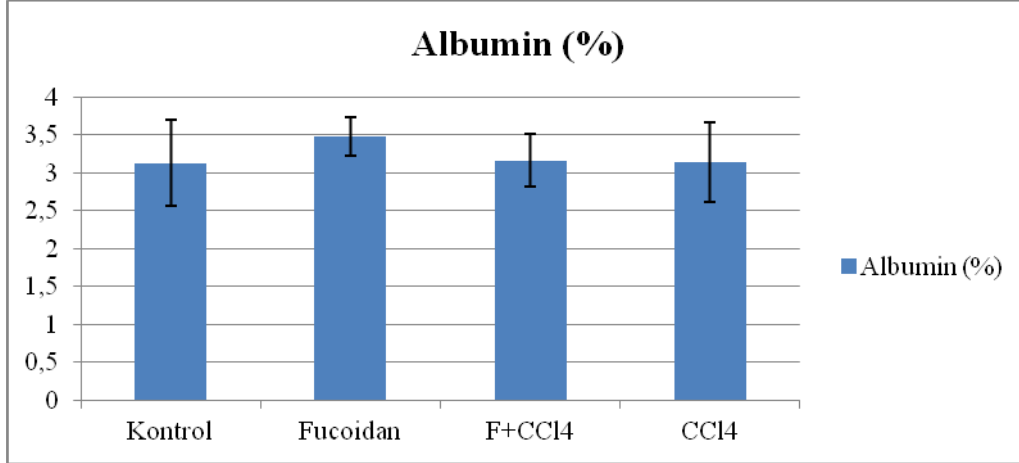
Tablo 4. Kontrol, fucoidan, fucoidan+CCl₄ ve CCl₄ grubundaki ratlara ait protein fraksiyonları

	Kontrol		Fucoidan		Fucoidan+CCl ₄		CCl ₄		p
	n	X ± S _x	n	X ± S _x	n	X ± S _x	n	X ± S _x	
Albumin (%)	8	3.13 ± 0.57	7	3.48 ± 0.26	8	3.16 ± 0.35	8	3.14 ± 0.53	.416
α₁-globulin (%)	8	1.03 ± 0.21	7	0.96 ± 0.13	8	0.99 ± 0.21	8	1.05 ± 0.11	.746
α₂-globulin (%)	8	0.69 ± 0.16	7	0.51 ± 0.12	8	0.65 ± 0.17	8	0.73 ± 0.15	.058
β-globulin (%)	8	1.02 ± 0.16 ^b	7	0.94 ± 0.20 ^b	8	1.06 ± 0.20 ^b	8	1.41 ± 0.33 ^a	.002 **
γ-globulin (%)	8	0.26 ± 0.08 ^b	7	0.13 ± 0.07 ^b	8	0.13 ± 0.04 ^b	8	0.39 ± 0.23 ^a	.001 ***
A/G	8	1.07 ± 0.29 ^b	7	1.40 ± 0.26 ^a	8	1.16 ± 0.30 ^{ab}	8	0.89 ± 0.21 ^b	.010 **

a, b: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir

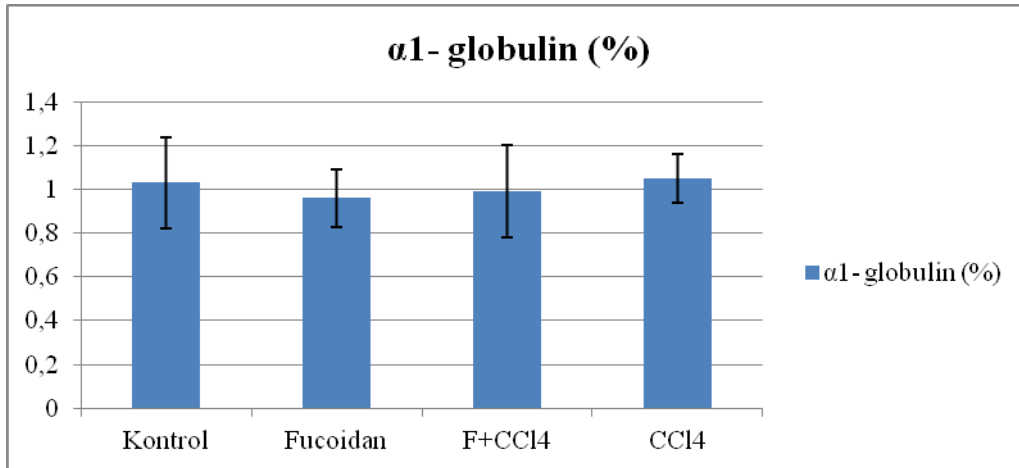
** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Farklı gruplarda protein fraksiyonunda belirlenen % albumin düzeylerinde istatistiksel olarak önem bulunmadı ($p>0.05$). Albumin düzeyi kontrol, fucoidan, fucoidan+ CCl_4 ve CCl_4 grubunda sırası ile % 3.13 ± 0.57 , 3.48 ± 0.26 , 3.16 ± 0.35 , 3.14 ± 0.53 olarak tespit edildi (Şekil 16).



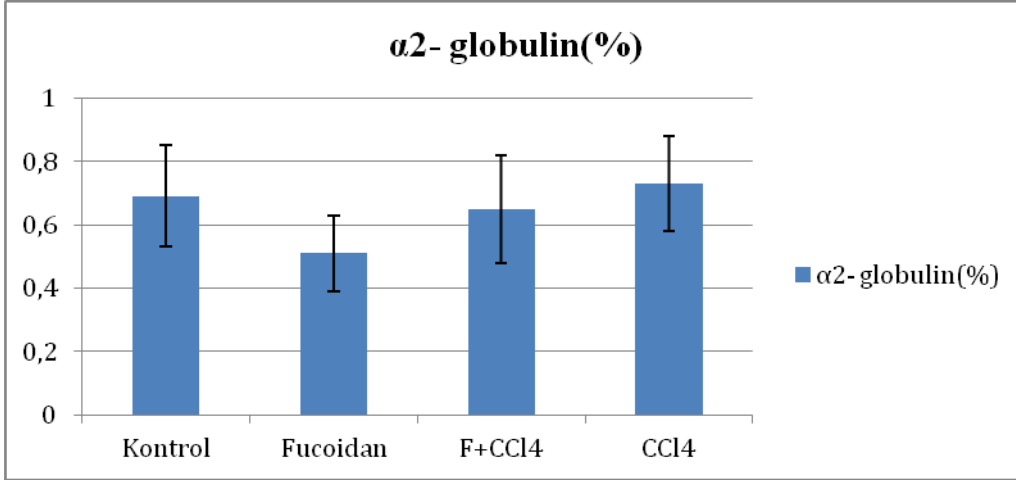
Şekil 16. Kontrol, fucoidan, fucoidan+ CCl_4 ve CCl_4 grubu ratlara ait protein fraksiyonundaki albumin düzeyleri (%)

Protein fraksiyonundaki α_1 -globulin düzeyleri (%) kontrol grubunda % 1.03 ± 0.21 , fucoidan grubunda % 0.96 ± 0.13 , fucoidan+ CCl_4 grubunda % 0.99 ± 0.21 ve CCl_4 grubunda % 1.05 ± 0.11 olarak saptandı ve gruplar arasında önem bulunmadı ($p>0.05$) (Şekil 17).



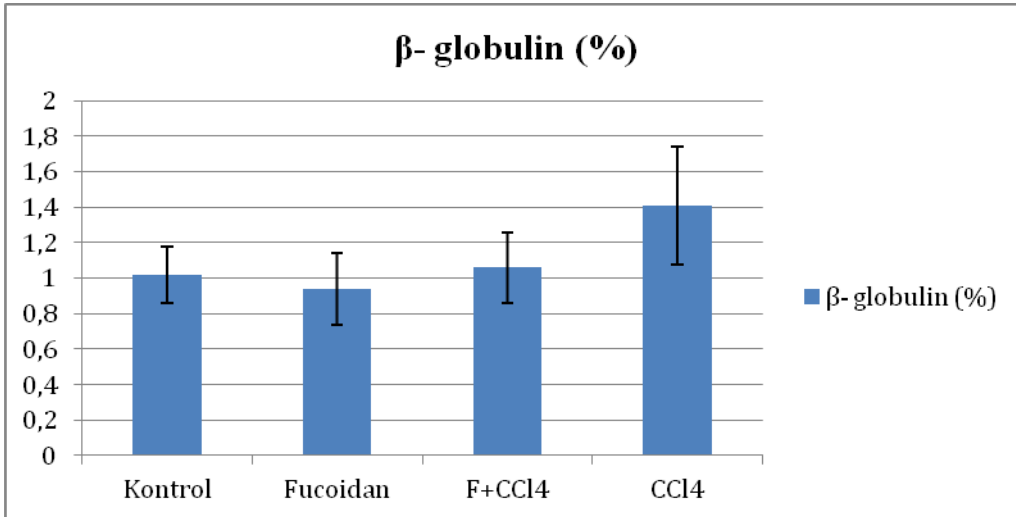
Şekil 17. Kontrol, fucoidan, fucoidan+ CCl_4 ve CCl_4 grubu ratlara ait protein fraksiyonundaki α_1 -globulin düzeyleri (%)

α_2 -globulin düzeyleri (%) kontrol, fucoidan, fucoidan+CCl₄ ve CCl₄ grubunda sırasıyla % 0.69 ± 0.16 , 0.51 ± 0.12 , 0.65 ± 0.17 , 0.73 ± 0.15 olarak belirlendi ve önem tespit edilmedi (Şekil 18).



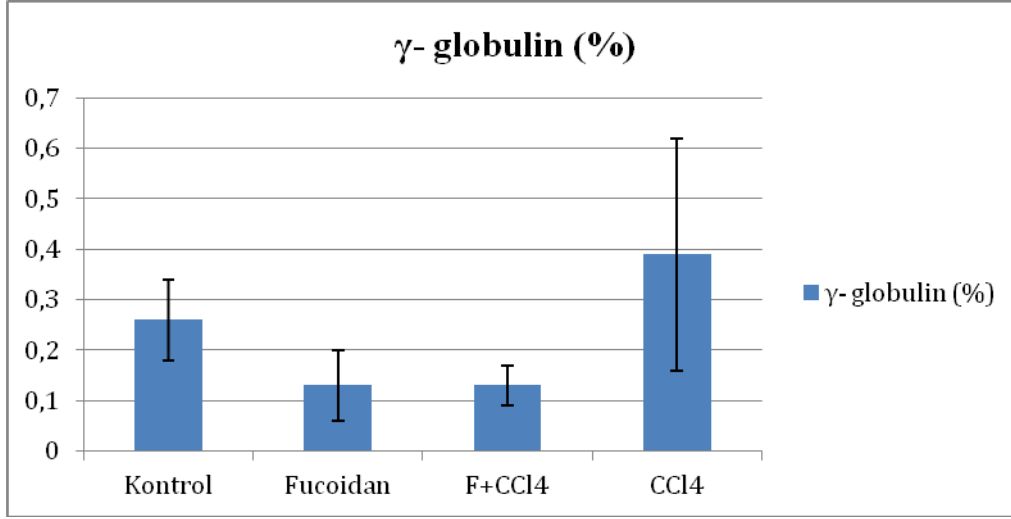
Şekil 18. Kontrol, fucoidan, fucoidan+CCl₄ ve CCl₄ grubu ratlara ait protein fraksiyonundaki α_2 -globulin düzeyleri (%)

CCl₄ grubundaki ratlara ait serum β -globulin düzeyleri (% 1.41 ± 0.33), kontrol (% 1.02 ± 0.16), fucoidan (% 0.94 ± 0.20), fucoidan+CCl₄ (% 1.06 ± 0.20) grubundaki ratların β -globulin düzeylerine göre yüksekti ve istatistiksel $p < 0.01$ düzeyinde önem bulundu (Şekil 19).



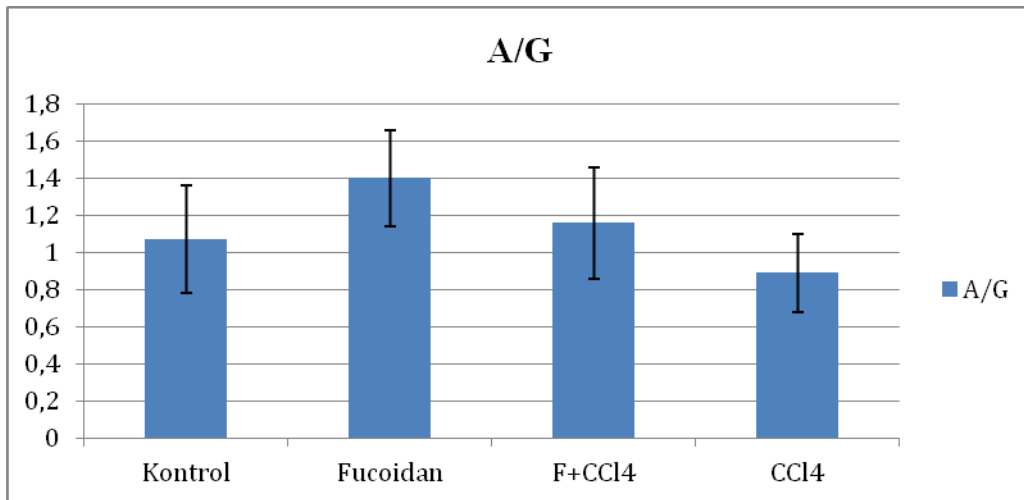
Şekil 19. Kontrol, fucoidan, fucoidan+CCl₄ ve CCl₄ grubu ratlara ait protein fraksiyonundaki β -globulin düzeyleri (%)

γ -globulin düzeyleri en yüksek olarak CCl_4 grubundaki ratlarda bulundu (0.39 ± 0.23) ve diğer gruplara göre istatistiksel olarak $p < 0.001$ düzeyinde önem tespit edildi. En düşük γ -globulin düzeyleri 0.13 ± 0.07 - 0.13 ± 0.04 olarak fucoidan ve fucoidan+ CCl_4 grubunda saptanırken, kontrol grubunda 0.26 ± 0.08 olarak saptandı (Şekil 20).



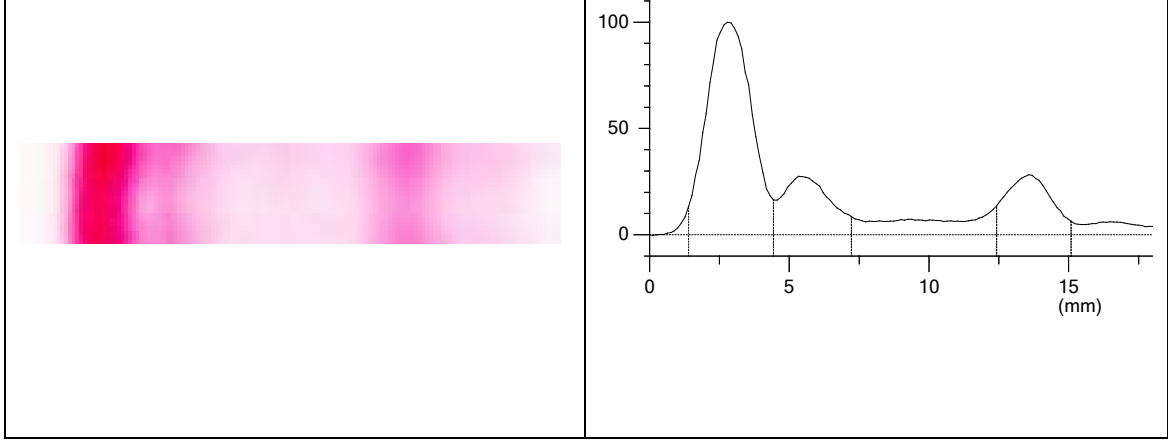
Şekil 20. Kontrol, fucoidan, fucoidan+ CCl_4 ve CCl_4 grubu ratlara ait protein fraksiyonundaki γ -globulin düzeyleri (%)

A/G oranı en düşük olarak CCl_4 grubunda (0.89 ± 0.21) ve en yüksek olarak fucoidan grubunda (1.40 ± 0.26) saptandı. Fucoidan grubu ile CCl_4 grubu ve kontrol grubu (1.07 ± 0.29) arasında $p < 0.01$ düzeyinde önem bulundu. Fucoidan grubu ile fucoidan+ CCl_4 grubu (1.16 ± 0.30) arasında önem tespit edilmedi ($p > 0.05$) (Şekil 21).

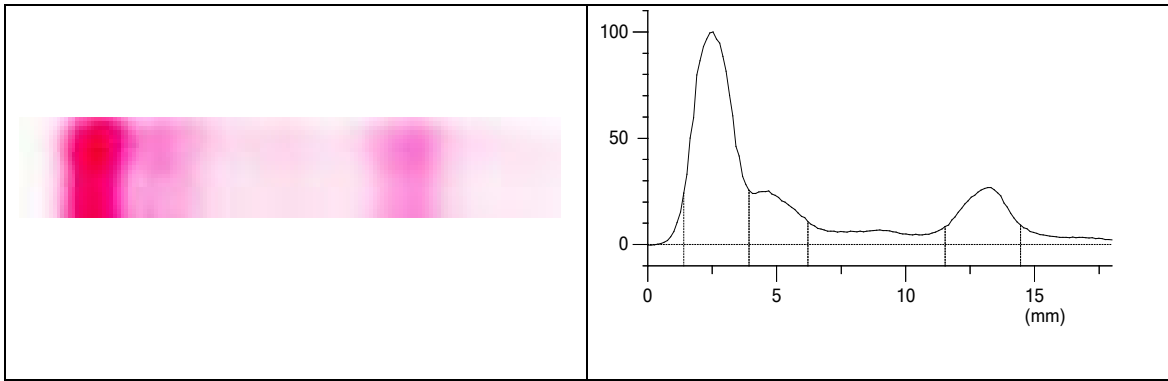


Şekil 21. Kontrol, fucoidan, fucoidan+ CCl_4 ve CCl_4 grubu ratlara ait protein fraksiyonundaki A/G oranı

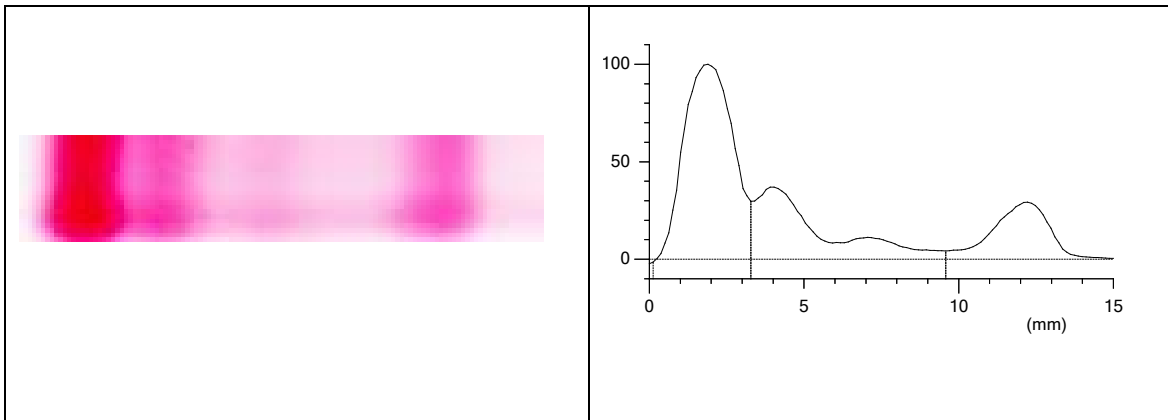
Kontrol, fucoidan, fucoidan+CCl₄ ve CCl₄ grubu ratlara ait protein fraksiyonlarının bant görüntüsü ve elektroferogramları Şekil 22, 23, 24 ve 25’de gösterildi.



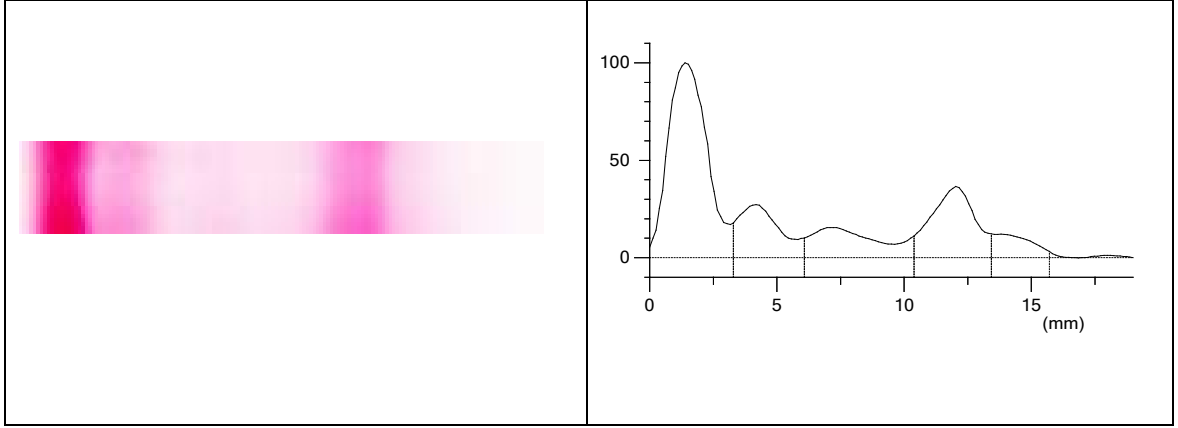
Şekil 22. Kontrol grubu bant görüntüsü ve elektroferogram



Şekil 23. Fucoidan grubu bant görüntüsü ve elektroferogram



Şekil 24. Fucoidan+CCl₄ grubu bant görüntüsü ve elektroferogram.



Şekil 25. CCl₄ grubu bant görüntüsü ve elektroferogram

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Karaciğer, çeşitli toksinler, kimyasal ajanlar ve ilaçlarla sürekli karşılaşan ve onları detoksifiye eden veya oluşan hasara rejenerasyon yeteneği ile karşılık veren hayati bir organdır. Sindirim sistemi ve dolaşım sistemi arasındaki yerleşimi ve ortaya koyduğu fonksiyonlar nedeniyle karaciğer farklı etkenlerle hasarlanabilmektedir. Kimyasal ajanlar, ilaçlar, viral hepatitler, alkol kullanımı, metabolik hastalıklar gibi bir çok neden karaciğerde akut ve kronik hasarlara yol açar. Hasarlanma süreci etkin bir rejenerasyon ve onarımla sonuçlanmazsa normal karaciğer yapısı bozulur. Bu gibi sebeplerden dolayı hasar gören karaciğer araştırmalarda çok yaygın olarak kullanılan bir organdır (Çetinkaya, 2009).

Karaciğer hasarının değişik formları, oksidatif stres ve bunu takiben oluşan toksik serbest radikallerle oluşmaktadır. Serbest radikal düzeyi belirli miktarları aştığında önemli hücresel hasarlar oluşmaktadır (Brattin ve ark., 1985). Oksidatif stres oluşumunda rol alan ve birçok araştırmacı tarafından karaciğer hasarı oluşturduğu tespit edilen en önemli kimyasallardan biri CCl_4 'dür (Arosio ve ark., 2000). CCl_4 , deneysel amaçlı olarak karaciğer hasarı geliştirmesi bakımından çok sık kullanılmaktadır (Bahçecioğlu ve ark., 1999; Muriel ve Escobar 2003; Wang ve ark., 2005; Devay, 2008). Yapılan bu çalışmada da karaciğerde hasar oluşturmak için CCl_4 toksisite modeli uygulandı.

CCl_4 'ün hepatotoksik etkisi, ara ürünlerinin metabolik aktivasyonuna ve lipit peroksidasyonundaki artışa bağlı olup; oluşan lipit peroksidasyonu sonucu endoplazmik retikulum ve diğer membranların yapıları değişmekte, azalan metabolik enzim aktivasyonu ve protein sentezi sonucunda karaciğer hasarı oluşmaktadır (Azri ve ark., 1992). Literatürlerde tek doz (Gnanaprakash ve ark., 2010; Abdel-Wahhab El-Deen ve ark., 2011; Etim ve ark., 2008; Zuinen ve ark., 2007) uygulanan CCl_4 ile karaciğer hasarının meydana geldiğini bildiren çalışmaların yanı sıra, CCl_4 'ün ardışık iki-yedi gün (Sen ve ark., 2007; Bayram ve ark., 2007), haftanın üç günü (İlhan ve Seçkin, 2005), bir ay (Khorshid ve ark., 2008) ve elli gün süreyle haftada iki kez (Balderas-Renteria ve ark., 2007) gibi, uygulandığı süre bakımından farklılıklar gösteren çalışmalar da mevcuttur. Bu çalışmalarda CCl_4 , deney hayvanlarına intragastrik sonda (Gnanaprakash

ve ark., 2010; Balderas-Renteria ve ark., 2007; Maksimchik ve ark., 2008), intraperitoneal (Zuinen ve ark., 2007; Bayram ve ark., 2007) veya subkutan (İlhan ve Seçkin, 2005; Khorshid ve ark., 2008) enjeksiyon gibi farklı şekillerde uygulanabilmektedir. Bu uygulamalar; zeytinyağı (Gnanaprakash ve ark., 2010; Zuinen ve ark., 2007; Bayram ve ark., 2007), ayçiçeği yağı (Khorshid ve ark., 2008), mısırözüyağı (Zuinen ve ark., 2007; Balderas-Renteria ve ark., 2007) gibi farklı çözücülerle yapıldığı gibi; uygulanan CCl_4 dozu da, 0.8 ml/kg (Bayram ve ark., 2007), 10 ml/kg (Sen ve ark., 2007) gibi geniş bir aralık içinde değişebilmektedir. Zuinen ve ark., (2007), farklı dozlarda ve farklı çözücülerle yaptıkları çalışmada, CCl_4 toksisitesinin, çözücü türüne bağlı olmaksızın, dilüsyon oranına paralel olarak arttığını bildirmişlerdir. Saf CCl_4 daha hızlı ve daha az emilirken; zeytinyağı gibi organik çözücü içinde uygulanan CCl_4 , daha yavaş fakat daha fazla emilmektedir (Rieth ve ark., 2010).

Tüm bu literatür bilgisi dikkate alınarak, rat modeli üzerinde yapılan bu çalışmada, 1:1 oranında zeytinyağı ile dilüe edilen tek doz CCl_4 , kilogram rat ağırlığı başına 1 ml olacak şekilde, intraperitoneal olarak ratlara enjekte edildi.

Yapılan literatür taramalarında CCl_4 ve fucoidanın birlikte kullanıldığı çalışmalar yok denecek kadar azdır. Bu nedenle fucoidanın veya CCl_4 'ün başka maddelerle beraber kullanıldığı çalışmalardaki sonuçlar bu çalışmada irdelenecektir.

Fucoidan, farelerde konkanavalin A tarafından uyarılmış karaciğer hasarını endojen interlökin-10 (IL-10) üretimini ayarlayarak, proinflamatuvar sitokini engelleyerek karaciğer hasarını önlemiştir (Saito ve ark., 2006). Yenilebilen kahverengi deniz yosunlarındaki fiberler D-galaktozamin tarafından uyarılmış hepatopatiyi baskılayıcı etkiye sahipken, kısmen fucoidan karaciğere koruyucu etki yapar (Kawano ve ark., 2007). Hepatik fibrozisini engelleyen fucoidan, çok iyi bir antifibrotik maddedir (Hayashi ve ark., 2008). Hepatik fibrozis fibriller hücre dışı matriks proteinlerinin ilerleyerek birikmesi ile birlikte karaciğere verilen kronik hasar sonucunda oluşur. Dünyada 100 milyondan fazla insanda hepatik fibrozis vardır. Fucoidanın enjeksiyon yoluyla uygulanması, CCl_4 tarafından uyarılmış akut ve kronik karaciğer yetmezliğini azaltır. CCl_4 tarafından uyarılmış hepatik fibrozis, aynı zamanda fucoidan enjeksiyonu ile zayıflatılabilmektedir. Hepatik hasarlarda, hepatositlerdeki tahribat ve hepatik satellit hücrelerin aktivasyonu kilit role sahiptir ve fucoidanla hepatositlerin tedavi edilmesi,

CCl₄ tarafından uyarılmış hücre ölümlerini önlemiş ve hepatik satellit hücrelerin üremelerini engellemiştir. Bu nedenle fucoidan; çift fonksiyona sahip antifibrotik bir etkidir, yani hepatositleri korur ve hepatik satellit hücrelerin üremesini engellemektedir (Hayashi ve ark., 2008).

Alanin aminotransferaz hepatositlerde bulunan sitoplazmik bir enzimdir. Bu enzimin serumda yüksek bulunması zar permeabilitesinde oluşan bozukluklar sonucu meydana gelen hücre ölümlerinin bir göstergesi olarak kabul edilir (Lu ve ark., 2002). Karaciğer hücre hasarını gösteren bir diğer enzim de aspartat aminotransferazdır (Lu ve ark., 2002). Sıçanlarda CCl₄ ile oluşturulan toksikasyon sonucu AST ve ALT enzim aktivitelerinde önemli oranlarda artış saptanmıştır (Ichinose ve ark., 1994; Qiusheng ve ark., 2004; Tanrıverdi, 2005; Üstündağ ve ark., 2005). Ratlarda oral olarak 1 ml/kg dozunda CCl₄ ile karaciğer toksisitesi oluşturulan bir çalışmada, ALT ve AST aktivitesinin CCl₄ uygulanan grupta 12. saatte artmaya başladığı ve 24. saatte kontrol grubuna göre en yüksek seviyeye ulaştığı bildirilmiştir (Lida ve ark., 2009).

Altınsaat ve Sert (2008), gebe ve gebe olmayan sıçanlara CCl₄'ü tek doz (2 ml/kg) enjekte ettikten sonra, 24. saatte kan örneklerini almışlar, deneme sonrası gebe olmayan sıçanların AST aktivitesinin 944±329 U/L'den 3816±926 U/L'ye, gebe sıçanlarda ise 443±241 U/L'den 3579±1058 U/L'ye, ALT aktivitesinin gebe olmayan sıçanlarda 151±36 U/L'den 2460±781 U/L'ye, gebelerde ise 85±27 U/L'den 1833±697 U/L'ye yükseldiğini gözlemişlerdir.

Tanrıverdi (2005) yaptığı çalışmada kronik CCl₄ uygulaması ile karaciğer hasarının oluştuğunu, CCl₄ grubunda AST ve ALT aktivitelerinin kontrol grubuna göre artış gösterdiğini rapor etmiştir. Başka bir çalışmada (Üstündağ ve ark., 2005), ratlara 5 hafta süresince haftada 3 gün olmak üzere intraperitoneal CCl₄ uygulanmış, yapılan analizler sonucunda CCl₄ grubunda plazma ve karaciğer dokusu MDA düzeylerinin arttığını, AST ve ALT artışının ise kontrol grubuna göre yaklaşık olarak 5 kat olduğunu tespit etmişlerdir.

Lida ve ark. (2009), CCl₄ enjeksiyondan 24 saat sonra karaciğer enzimlerinin en yüksek seviyeye ulaştığını belirlemişlerdir. Yine CCl₄ enjeksiyonundan 72 saat sonra alınan serumlarda AST ve ALT düzeylerindeki düşüş, CCl₄ toksikasyonunun etkisinin zamanla azaldığının, karaciğer hasarının gerilediğinin belirtisi olarak kabul edilmiştir.

Özenirler ve ark. (1996), CCl₄'e maruz kalan sıçan hepatositlerinde lipit peroksidasyon oluşumunun arttığını ve karaciğerde yağlı dejenerasyonla birlikte sentrilobuler nekroz görüldüğünü bildirmişlerdir.

Yang ve ark. (2007), piknogenolün karaciğer üzerine koruyucu etkisini araştırmak için 30 ratta CCl₄ ile karaciğer hasarı oluşturmuşlar, 1.25 ml/kg'lık tek doz halinde uygulanan CCl₄'ün hepatotoksitiye neden olduğunu ve serum AST, ALT değerlerinin arttığını göstermişlerdir. AST ve ALT, karaciğer hasarını saptamada rutinde en sık kullanılan belirleyicilerdir. AST karaciğerde olduğu kadar kalp, kas, beyin, pankreas, böbrek, akciğer, lökosit ve eritrositte de yoğun olarak bulunmaktadır. Buna karşılık ALT yoğun olarak yalnızca karaciğerde bulunur. Yaklaşık olarak hepatositte bulunan AST'nin % 80'i mitokondridedir. Oysa ALT'nin predominant formu non-mitokondriyal olanıdır. Bu nedenle hafif hepatosellüler hasarda, hepatosit membranı hasara uğramış ancak mitokondriyal membranı sağlam ise sitoplazmik AST ve ALT seruma salınır. Daha ciddi hepatosellüler hasarlarda mitokondri membranında da hasar olur ve mitokondriyal AST salınımı ile sonuçlanır (Rosalki ve McIntyre, 1999; Pratt ve Kaplan, 1999).

Shallan ve ark. (2008) oral olarak mısır yağı içinde 1 ml % 10 CCl₄ vererek oluşturdukları hepatoksisitede *Solanum nigrum L.*'nin antioksidan etkisini incelemişler, CCl₄'le intoksikasyona uğramış ratların serum ALT ve AST aktivitesini kontrol grubuna göre oldukça yüksek düzeyde önemle arttığını bulmuşlar, ALP aktivitesinde ise önem saptayamamışlardır. Karaciğerdeki hasarla artan serum ALT, AST aktivitesinin karaciğerde hücre membran bütünlüğünün göstergesi olduğuna işaret etmişlerdir. Verilen bitki ekstraktı ile serum transaminazlarının normale dönmesini ise hepatik parankimada iyileşmeye ve hepatik rejenerasyona bağlamışlardır.

Saito ve ark. (2006) Con A uygulamasından 8 saat sonra oluşan karaciğer hasarında ALT aktivitesini 15 ± 2 KU/L'den 2055 ± 259 KU/L'ye yükseldiğini saptamışlardır. Con A enjeksiyonundan 30 dakika önce verilen fucoidanın doza bağlı olarak, artan plazma ALT aktivitesi üzerine inhibe edici etkisi olduğunu ifade etmişlerdir. Aynı çalışmada; Con A enjeksiyonu sonucu artan plazma ALT aktivitesinin (2204 ± 272 KU/L), fucoidan uygulamasından sonra 8. saatte belirgin olarak azaldığını ve bu inhibitörük etkinin 24 saat içinde zayıfladığını (1044 ± 289 KU/L) belirtmişlerdir.

Kawano ve ark. (2007), ratlarda D-galaktozamin tarafından oluşturulan hepatopati üzerine dört farklı algin etkisini incelemişler, fucoidan verilen grupta serum ALT ve AST aktivitelerini diğer alglerin verildiği gruplara göre çok düşük olarak bulmuşlardır.

Thomas ve ark. (2010), ratlarda izoproterenol ile uyarılmış miyokard infarktüsünde fucoidanla tedavi edilen grupta miyokardiyal hasarın azaldığını saptamışlar, ALT aktivitesini kontrol, izoproterenol ve fucoidan+izoproterenol grubunda sırasıyla 37.25 ± 3.35 , 64.22 ± 2.65 ve 54.33 ± 2.15 IU/L olarak bulmuşlardır. Yine AST aktivitesini sırasıyla 161.15 ± 5.45 , 246.67 ± 6.65 ve 141.0 ± 5.34 IU/L olarak tespit etmişlerdir. İzoproterenol ile uyarılmış miyokard infarktüsünde fucoidanın kalp koruyucu etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Choi ve ark., (2010) ratlarda aspirinle oluşturulan mide ülserinde fucoidanın etkisini araştırmışlar, fucoidanın karaciğer üzerine yan etkilerini görmek için serum ALT ve AST aktivitelerini ölçmüşlerdir. Yalnızca aspirin verilen hayvanlarda hepatik hasarın indikatörü olarak ölçülen serum ALT ve AST aktivitelerinde yükseliş olduğunu ve fucoidanla tedavi sonucunda serum ALT ve AST'nin aşırı salınımının engellendiğini saptamışlardır. Aspirin verilen gruptaki ratların ALT ve AST düzeyleri fucoidan + aspirin grubuna göre $p < 0.01$ düzeyinde önemle yüksek bulunmuştur.

Kim ve ark., (2014) fucoidanın antiobesite etkisini araştırmak için yaptıkları çalışmalarında ALT ve AST düzeylerine bakmışlar, yüksek yağlı diyetle (HFD) 5 hafta besledikleri ratlara % 1 ve % 2 fucoidan vererek ALT ve AST aktivitelerini sadece yüksek yağlı diyetle beslenen HFD grubunda standart diyetle beslenenlere göre (kontrol) sırasıyla 2.5 ve 1.6 kat fazla olduğunu bulmuşlardır. % 1 fucoidan+HFD ve % 2 fucoidan+HFD gruplarının AST aktivitesi HFD grubuyla karşılaştırıldığında, AST aktivitesinin sırasıyla % 36.3 ve % 56.2 oranında önemle azaldığını görmüşlerdir. Yine ALT aktivitesi ise % 1 fucoidan+HFD grubunda % 39, % 2 fucoidan+HDF grubunda ise % 43.4 oranında HDF grubunun ALT aktivitesine göre önemle azaldığını tespit etmişlerdir.

Kang ve ark. (2008) CCl_4 'le oluşturulan oksidatif strese karşı fucoidan ekstraktlarının antioksidan özelliğini incelemek için yaptıkları çalışmalarında ratlara

100 mg/kg dozda fucoidan ekstraktı vemişler ve ratların serumunda ALT, AST, ALP, LDH aktiviteleri, karaciğer homojenatında SOD, CAT, GP_x aktiviteleri ile MDA düzeylerini ölçmüşlerdir. CCl₄ verilen grupta ALT, AST, ALP, LDH aktiviteleri ve MDA seviyeleri artarken, SOD, CAT, GP_x aktiviteleri düşmüştür. Fucoidan ekstraktı ile ön tedavi edilen grupta ALT, AST, ALP, LDH ve MDA artışı baskılanırken, SOD, CAT, GP_x düzeylerinde ilk değerlere ulaşılmıştır. Fucoidan verilen grubun karaciğer dokusunda nekroz ve siroz görülme olasılığının önemle azaldığı, CCl₄'le oluşturulan oksidatif strese karşı fucoidan ekstraktlarının antioksidan özelliğinin bulunduğunu bildirmişlerdir.

Hayashi ve ark. (2008) ratlara CCl₄'ü tek doz intraperitoneal vererek akut, sekiz hafta süresince haftada iki kez oral vererek kronik karaciğer hasarı oluşturmuşlar ve karaciğer hasarı üzerine fucoidanın etkisini incelemişlerdir. Özellikle CCl₄ enjeksiyonundan 24 saat sonra serum AST aktivitesinin 125'ten 707 karumen U/ml'ye, ALT aktivitesinin ise 21'den 752 karumen U/ml'ye yükseldiğini saptamışlardır. Tek doz 25 mg/ kg i.v. fucoidan verilmesinden sonra artan AST aktivitesinin 304 karumen U/ml'ye, ALT aktivitesinin ise 214 karumen U/ml'ye düştüğünü bulmuşlardır. Özellikle 50 mg/ kg fucoidan enjeksiyonundan sonra serum AST ve ALT aktivitesinin normal seviyelere (77 ve 67 karumen U/ml) geldiğini ve bu sonuçlara göre fucoidanın CCl₄ ile oluşan akut karaciğer hasarında güçlü bir inhibitör olduğunu vurgulamışlardır. Yine aynı çalışmada oluşturulan kronik karaciğer hasarında serum AST seviyesininin 149'dan 433 karumen U/ml'ye, ALT aktivitesinin ise 101'den 568 karumen U/ml'ye yükseldiğini saptamışlar, fucoidan uygulamasından sonra AST ve ALT aktivitesinin sırasıyla 265 ve 238 karumen U/ml'ye düştüğünü gözlemişlerdir. Fucoidanın CCl₄'ün neden olduğu fibrotik alanlardaki artışı zayıflattığı ve kronik karaciğer hasarının tedavisinde kullanılabileceği ifade edilmiştir.

Sunulan bu çalışmada karaciğer hasarında indikatör olarak kabul edilen serum ALT ve AST aktiviteleri ölçüldü. Serum ALT aktivitesi 237.25 ± 94.97 U/L olarak en yüksek CCl₄ grubunda saptandı. CCl₄+fucoidan grubunda ALT aktivitesi biraz daha düşük (218.00 ± 256.55 U/L) bulundu ancak CCl₄ grubuyla arasında istatistiksel olarak önem yoktu (p>0.05). Bu iki grup ile kontrol ve fucoidan grubu arasında p<0.05 düzeyinde önem saptandı. Yine serum AST aktivitesi kontrol grubunda 162.25 ± 54.0

U/L, fucoidan grubunda 195.86 ± 59.91 U/L, fucoidan+CCl₄ grubunda 397.88 ± 190.22 U/L ve CCl₄ grubunda 527.00 ± 94.17 U/L olarak bulundu. CCl₄ grubu ile diğer üç grup arasında $p < 0.001$ düzeyinde önem tespit edildi. Artan serum ALT ve AST aktiviteleri değerlendirildiğinde CCl₄'ün karaciğerde hasar oluşturduğu, ancak fucoidan uygulamasından sonra CCl₄ verilmesiyle, her ne kadar kontrole yakın değerlere ulaşılmasa da, azalan enzim değerlerine bakarak bu hasarın zayıfladığı söylenebilir.

Gama glutamil transferaz (GGT), bir karboksi peptidazdır. C-terminal glutamil gruplarını koparır ve diğer peptidlere veya glisilglisin gibi maddelere transfer eder, glutasyon metabolizmasına katılır. Enzim, mikrozomal membranda (sellüler GGT aktivitesinin % 95'i) ve sitozolde (% 5) yerleşmiş durumdadır. Serum GGT aktivitesi primer olarak karaciğer kaynaklıdır (Karagül ve ark., 2000). Ancak GGT sadece karaciğerde bulunmaz, böbrek, akciğer, pankreas, vasküler endotel gibi organlarda da bulunur. Bunların dışında ekstraselüler sıvılarda, α ve β lipoproteinler ve albumin taşıyan moleküllerde de mevcuttur (Jennifer ve ark., 2010).

Çeşitli hastalıklarda GGT enzim aktivitesinin serumdaki normal değerlerinin üzerine çıktığı tespit edildiğinden, klinik teşhiste kullanılabilir. GGT en fazla böbrekte bulunmasına rağmen seruma geçen enzimin esas kaynağının hepatobiliyer sistem olduğu saptanmıştır. Yapılan bir araştırmada hepatobiliyer hastalığı olan kişilerin büyük çoğunluğunda GGT aktivitesi yüksek olarak bulunmuştur (Ideo ve ark., 1972; Jörfeld ve ark., 1984).

Muriel (1998), erkek Wistar sıçanlarda CCl₄ enjeksiyonu ile kronik karaciğer hasarında, GGT düzeyinin yaklaşık $8 \mu\text{mol/L}$ 'den $13 \mu\text{mol/L}$ 'ye yükseldiğini ve bu enzim aktivitesindeki artışın karaciğer hasarının en belirgin göstergesi olduğunu bildirmektedir.

Üstündağ ve ark. (2005) ratlarda CCl₄'le oluşturdukları karaciğer hasarı üzerine soy izoflavonların etkisini incelemişler; kontrol grubundaki normal diyetle beslenen ratların GGT aktivitesini 1.33 ± 0.81 U/L ve normal diyetle beslenip CCl₄ verilen ratlarda ise aktiviteyi 4.12 ± 1.34 U/L olarak saptamışlardır.

Kartik ve ark. (2010), N-nitrosodietilamin ve CCl₄ ile ratlarda hepatokarsinogenez şekillendirmişler, hepatik diagnostik markerler olarak serum AST, ALT, ALP, GGT aktiviteleri ile bilirubin düzeylerini ölçmüşlerdir. Kontrol grubunda AST, ALT, ALP, GGT ve bilirubin düzeylerini sırasıyla 191.22 ± 3.19 U/L, 81.25 ± 1.58 U/L, 231.11 ± 11.31 U/L, 30.8 ± 5.1 U/L ve 0.76 ± 0.03 U/L olarak bulurken, NDEA + CCl₄ verilen grupta yine sırasıyla 362.21 ± 22.32 U/L, 378.51 ± 29.78 U/L, 437.38 ± 28.33 U/L, 158.9 ± 8.2 U/L, 1.32 ± 0.06 U/L olarak saptamışlardır. Ksenobiyotik ve karsinogenikler tarafından oluşturulan hepatosellüler hasarda, tahrip olmuş hepatositlerden bu enzimlerin çıkmasıyla serumdaki aktivitelerinin yükseldiğini ifade etmişlerdir.

Yapılan bu çalışmada serum GGT aktivitesi en yüksek olarak CCl₄ grubundaki ratlarda bulundu (4.41 ± 0.43 U/L) ve diğer gruplara göre istatistiksel olarak p<0.001 düzeyinde önem tespit edildi. Fucoidan+CCl₄ grubunda ise bu enzim aktivitesi 3.06 ± 0.60 U/L olarak saptandı. Kontrol grubu (1.00 ± 0.74 U/L) ile bu grup arasında p<0.001 düzeyinde önem bulundu. İncelenen ALT, AST ve GGT aktivitelerindeki azalmaya bakılarak, fucoidan uygulamasından sonra CCl₄ verilmesiyle oluşturulan grupta (fucoidan + CCl₄) hepatik hasarın zayıfladığı, fucoidanın karaciğer koruyucu özelliğinin bulunduğu söylenebilir.

Karaciğer serum proteinlerinin sentezi için önemli bir yerdir ve serum proteinlerinin düzeyi bazı karaciğer hastalıklarında azalır. Hepatik tahribatta bazı aminoasitlerin oksidatif hasarı metabolik disfonksiyonun başlıca sebebi olarak kabul edilir (Bandyopadhyay ve ark., 1999).

Albumin karaciğerde sentezlenir ve kronik karaciğer hastalıklarının bir sonucu olarak serum albumin düşüşü gözlenir. Ayrıca, akut ve kronik karaciğer hastalığı ile ilgili sentez azlığı, kapiller permeabilite ile ilgili damar dışına doğru kayıp (ağır yanıklar) ya da aşırı su alımı veya seröz birikmesi (asites), katabolizmada artış gibi durumlarda da albumin düzeyleri azalır. Portal fibroz ve karaciğer sirozu olgularında albumin sentezinin azalması ve kaybının artmasına bağlı olarak serumdaki aktivitesi de azalmaktadır (Erdal, 1987; Karagül ve ark., 2000; Onat ve ark., 2002).

Globulinler, suda zor çözünebilir fakat seyreltik nötral tuz çözeltilerinde

çözünebilen, amonyum sülfatın yarı doymuş konsantrasyonunda çözünebilen basit bir proteindir (Tekman ve Öner, 1994). Globulin artışı; nefrotik sendrom, aktif karaciğer hastalığı, suppuratif dermatopatilerde mevcuttur (Karagül ve ark., 2000).

CCl₄ ilavesi hücre membranında hasara, enzim aktivitesinde değişikliklere ve sonunda hepatik nekroza neden olur, hücre ölümü gerçekleşir (Achliya ve ark., 2003). Hepatik hasar, hücrenin çözünebilir proteinlerinin seruma geçişine neden olur (ALT, AST gibi). Bunun üzerine transaminazların aktivitesi artar. Tam tersine total çözünür proteinlerin düzeyi serumda azalır. Çünkü CCl₄'le intoksikasyona uğramış ratlarda protein sentezi inhibe edilir (Rao ve ark., 2006), protein katabolizması ise normaldir.

In vivo (Khorshid ve ark., 2008) ve in vitro (Li ve ark., 2010) çalışmalarda, CCl₄'ün protein sentezini de inhibe ettiği gösterilmiş; albumin ve fibrinojen gibi proteinlerin plazma düzeylerinin düştüğü belirlenmiştir.

Üstündağ ve ark. (2005), 5 hafta i.p. olarak haftada 3 gün 0.15 ml/100 g oranında zeytin yağı içinde CCl₄ vererek oluşturdukları karaciğer hasarına karşı soy izoflavonların etkisini araştırmışlar ve CCl₄ grubunda total protein ve albumin düzeyini sırasıyla 6.53 g/dl, 2.91 g/dl, kontrol grubunda ise 7.6 g/dl ve 3.3 g/dl olarak bulmuşlardır.

Huang ve ark. (2014), 7 hafta süresince haftada iki kez 10 ml/kg subkutan yolla CCl₄ vererek oluşturdukları karaciğer fibrozisi üzerine kallistatinin koruyucu etkisini araştırmışlar ve kontrol grubunda albumin düzeyini 45.50 ± 3.20 g/L, CCl₄ grubunun albumin düzeyini ise kontrol grubuna göre p<0.01 düzeyinde önemle düşük bulmuşlardır (25.3 ± 2.50 g/L). Karaciğerin protein sentez kapasitesinin, hepatik fonksiyonel rezervin önemli bir yönü olarak kabul edildiğini (Shaker ve ark., 2011) ve serum albumin düzeyinin yaygın olarak kullanılan önemli bir marker olduğunu belirtmişlerdir.

Murali ve ark. (2012), 7 gün süreyle günde 1 kez sıvı parafin içinde 0.5 ml / kg CCl₄ p.o vererek oluşturdukları hepatotoksistide *Hemidesmus indicus var. pubescens* yapraklarının koruyucu etkisini incelemişlerdir. Yaptıkları çalışmada kontrol grubunun total protein düzeyini 6.7 ± 0.11 g/dl, albumin düzeyini 3.8 ± 0.1 g/dl ve CCl₄ grubunun

total protein ve albumin düzeyini sırasıyla 4.9 ± 0.8 g/dl, 2.8 ± 0.1 g/dl olarak bulmuşlardır.

Shallan ve ark. (2008), oral olarak mısır yağı içinde 1 ml %10 CCl₄ vererek oluşturdukları hepatoksisitede *Solanum nigrum L.*'nin antioksidan etkisini incelemişler, kontrol grubunun total protein, globulin, albumin düzeyini sırasıyla 9.66 g/dl, 3.37 g/dl, 6.29 g/dl olarak bulmuşlar, A/G oranını ise 1.87 olarak saptamışlardır. CCl₄ ile intoksikasyon oluşturdukları grubun total protein düzeyini kontrol grubuna göre istatistik olarak yüksek önemle düşük düzeyde (6.10 g/dl) tespit etmişlerdir. Yine kontrol grubuyla karşılaştırıldığında CCl₄ grubunun globulin, albumin düzeylerini ve A/G oranını sırasıyla 2.75 g/dl (orta düzeyde önem), 3.35 g/dl (yüksek düzeyde önem) ve 1.22 olarak düşük bulmuşlardır.

Yapılan bu çalışmada kontrol, fucoidan, fucoidan+CCl₄ ve CCl₄ grubunun serum albumin düzeyleri sırasıyla 3.78 ± 0.42 , 3.80 ± 0.16 , 3.55 ± 0.30 , 3.71 ± 0.46 g/dl olarak bulundu ve gruplar arasında önem saptanmadı ($p>0.05$). Genel olarak CCl₄ ile yapılan deneysel hepatotoksisitelerde albumin düzeyinin önemle düştüğü tespit edilmesine rağmen (Shallan ve ark., 2008; Murali ve ark., 2012), bu çalışmada gruplar arasında çok farklı bir değişim gözlenmedi. Bunun nedeni akut hepatotoksisitelerde serum albuminin yarılanma ömrünün uzaması ve bu nedenle seviyede değişimin tespit edilememesi olabilir.

Yine yapılan bu çalışmada serum globulin düzeyi en yüksek olarak 2.89 ± 0.45 g/dl ile CCl₄ grubunda tespit edildi. Serum globulin düzeyi fucoidan+CCl₄ grubunda 2.39 ± 0.16 g/dl, kontrol grubunda 2.38 ± 0.25 g/dl, fucoidan grubunda ise 2.23 ± 0.34 g/dl olarak birbirine yakın değerler saptandı. CCl₄ grubu ile diğer üç grup arasında $p<0.01$ düzeyinde önem bulundu. Karaciğer hastalığı olanlarda hipergamaglobulinemi yaygın olarak görüldüğünden (Kurahori ve ark., 1978; Hirayama ve ark., 1970), CCl₄ grubunda serum globulin düzeyi yüksek olarak bulundu, fucoidan verilmesiyle globulin düzeyinin kontrol grubunun düzeyine yaklaştığı saptandı.

Bütün serum proteinleri (immunoglobulin hariç) karaciğerde sentezlendiğinden, CCl₄ tarafından oluşturulan karaciğerdeki hücre hasarları albumin düzeyinin azalmasına neden olur. Okazaki ve ark. (1985), akut karaciğer hasarında albumin düzeyinde önemli

azalma saptamışlar, kronik karaciğer hasarında ise önemli bir değişim tespit edememişlerdir. Akut ve kronik hasarda total protein düzeyinde azalma gözlenmemişlerdir. Şiddetli karaciğer hasarları protein katabolizmasını azaltır ve protein yarı ömrünün uzaması hayvan vücudunda protein sentezinin azalmasını telafi eder. Serum protein düzeyinin ratlarda yaş, cinsiyet, gebelik ve CCl₄ verilmesi nedeni ile değiştiği bildirilmiştir (Horne ve Ferguson, 1972; Horne ve ark., 1973). Karaciğer hastalığı olanlarda hipergamaglobulinemi de çok yaygındır (Hirayama ve ark., 1970). Yaygın olarak hakim olan görüş bir çok antijen fagosite edildiği zaman antijenik özelliklerini kupffer hücrelerinde kaybeder. Fakat hasarlı karaciğerde bir çok antijen kupffer hücrelerinin fagositozuna daha az oranda maruz kalacaktır. Çünkü bu hücreler bir çok hasarlı hücreyi de fagosite etmek zorundadır. Bu sebeple yabancı maddeler kanda antikör oluşturan hücrelerle daha fazla temas etme şansına sahiptirler ve bu nedenle de serumda yüksek gamaglobulin düzeyi bulunur. Okazaki ve ark. (1985) da yüksek γ -globulin düzeyini bildirmişler ve kupffer hücrelerinin fagositozunun endojen komponent ve ekzojen materyallerin miktarına bağlı olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Yapılan bu çalışmada total protein düzeyi kontrol, fucoidan, fucoidan+CCl₄ grubundaki ratlarda sırası ile 6.14 ± 0.32 , 6.04 ± 0.40 , 5.95 ± 0.34 g/dl olarak birbirine yakın değerler belirlenirken, CCl₄ grubunda istatistiksel olarak $p < 0.01$ düzeyinde önemle yüksek tespit edildi (6.60 ± 0.38 g/dl). Şiddetli karaciğer hasarlarında protein katabolizmasının azaldığı ancak protein yarı ömrünün uzamasıyla hayvan vücudunda azalan protein sentezini telafi ettiği bildirilmiş, akut ve kronik karaciğer hasarlarında total protein düzeyinde azalma gözlenmediği ifade edilmiştir (Okazaki ve ark., 1985). Shallan ve ark. (2008) ise total protein düzeyinin CCl₄ grubunda kontrollere göre düşük bulmuşlar ve CCl₄'le intoksikasyona uğramış ratlarda protein sentezinin inhibe edildiğini (Rao ve ark., 2006), protein katabolizmasının ise normal olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada da CCl₄ grubunun total protein düzeyinde azalma tespit edilmedi ve diğer üç gruba göre istatistiksel olarak $p < 0.01$ düzeyinde önemle yüksek bulundu. CCl₄ ile oluşan hepatotoksisitede protein sentezi inhibe olmasına rağmen protein katabolizmasının normal işlemesi nedeniyle total protein düzeyinde azalma olmadığı gibi, γ -globulin düzeyinin yükselmesine bağlı olarak total protein düzeyinde artış olduğu saptandı.

Serum proteinlerinin ayrılması ve bunların elektroforetik profillerinin çıkarılması klinik biyokimyada önemlidir ve tanıda yardımcıdır. Anormal serum protein profilleri hastalıkların tipleri ile bazı inceliklerinin ayrılmasında kullanılır. Köpek, at, koyun ve insan gibi türlerde albumin/globulin oranında, albumin miktarı globulin miktarı üzerine etki eder (Kaneko, 1997).

Okazaki ve ark. (1985) yaptıkları çalışmada, tek doz her fareye 0.04 ml CCl₄ haftada 3 kez 5 hafta süresince vererek, tek dozda akut, çoklu dozlarda kronik karaciğer hasarı oluşturmuşlardır. Serum proteinlerini elektroforetik olarak analiz etmişler; kontrol grubunda albumin, α , β ve γ -globulin değerlerini sırasıyla % 73.8 \pm 4.53, 16.7 \pm 2.43, 8.21 \pm 0.11, 0.80 \pm 0.88 olarak bulurlarken, akut karaciğer hasarı oluşturulan grupta bu değerler % 61.8 \pm 3.72, 27.3 \pm 1.80, 8.31 \pm 0.08, 2.68 \pm 0.89 olarak ölçülmüştür. Kronik karaciğer hasarı oluşturulan grupta protein fraksiyonları % 51.1 \pm 5.36, 21.4 \pm 3.41, 15.86 \pm 2.31 ve 11.07 \pm 4.70 olarak saptanırken kontrollerde yine sırasıyla % 52.8 \pm 2.86, 21.7 \pm 6.64, 13.67 \pm 2.06, 8.10 \pm 3.17 olarak tespit edilmiştir. Tek doz veya çoklu doz uygulanan gruplar arasında total protein düzeylerinde değişim olmadığı, akut karaciğer hasarında albumin düzeylerinde düşüş, α , β ve γ -globulin düzeylerinde artışın şekillendiği bildirilmiştir. Kronik hepatik hasarda ise tüm değerlerde değişimler gözlenmemiş, ancak γ -globulinlerin artışa meyilli olduğu belirtilmiştir. Akut hepatik hasarda A/G oranında düşme gözlenmiştir.

Yapılan literatür taramalarında fucoidanın protein elektroforezi üzerine etkisini gösteren çalışmaya rastlanılamamıştır. CCl₄ verilerek hepatotoksisite oluşturulup protein fraksiyonlarını inceleyen çalışmaların sayısı da oldukça sınırlıdır. Sunulan bu çalışmada protein elektroforezinde % albumin, α_1 -globulin, α_2 -globulin fraksiyonlarında gruplar arasında istatistiki olarak önem saptanmadı ($p > 0.05$). β -globulin (%) değeri kontrol, fucoidan, fucoidan+CCl₄, CCl₄ grubunda sırasıyla % 1.02 \pm 0.16, 0.94 \pm 0.20, 1.06 \pm 0.20, 1.41 \pm 0.33 olarak bulundu ve CCl₄ grubu ile diğer üç grup arasında istatistiki olarak $p < 0.01$ düzeyinde önem tespit edildi. Yine γ -globulin değerini (%) kontrol, fucoidan, fucoidan+CCl₄, CCl₄ grubunda sırasıyla % 0.26 \pm 0.08, 0.13 \pm 0.07, 0.13 \pm 0.04 ve 0.39 \pm 0.23 olarak saptandı ve CCl₄ grubu ile diğer üç grup arasında istatistiki olarak $p < 0.001$ düzeyinde önem bulundu. A/G oranı ise en düşük olarak CCl₄ grubunda (0.89 \pm 0.21) tespit edilirken kontrol, fucoidan, fucoidan+CCl₄ grubunda

sirasıyla 1.07 ± 0.29 , 1.40 ± 0.26 , 1.16 ± 0.30 olarak saptandı. Fucoïdan+ CCl_4 grubunda A/G oranı CCl_4 grubuna göre yüksek saptanmasına rağmen bu iki grup arasında istatistiki olarak önem belirlenmedi ($p > 0.05$). Klasik olarak bilindiği gibi karaciğer hastalıklarında enzimatik değişimin yanısıra total protein düzeyleri ve protein fraksiyonları hastalığın seyrine bağlı olarak değişimi olan önemli biyokimyasal parametrelerdir. Burada da CCl_4 'ün hepatotoksik etkileri nedeniyle karaciğer hasarı olduğu görüldü, beklendiği gibi elektroforetik fraksiyonların değişim gösterdiği saptandı. Özellikle γ -globulin düzeyinin CCl_4 grubunda yüksek olması karaciğer hasarının fazla olduğunu gösterir. Yukarıda da belirtildiği gibi bir çok antijen fagosite edildiği zaman antijenik özelliklerini kupffer hücrelerinde kaybeder. Fakat hasarlı karaciğerde bu antijenler kupffer hücrelerinin fagositozuna daha az oranda maruz kalır. Çünkü bu hücreler bir çok hasarlı hücreyi de fagosite etmek zorunda olduğundan, antijenler kanda antikor oluşturan hücrelerle daha fazla temas ederler ve bu nedenle de serumda gamaglobulin düzeyi yükselir (Okazaki ve ark.,1985). Fucoïdan+ CCl_4 grubunda γ -globulin (%) düzeyinin düşmesi karaciğerde rejenerasyonunun gerçekteştiğinin bir göstergesi olarak kabul edilebilir. Ayrıca fucoïdan+ CCl_4 grubunun A/G oranında saptanan yükseliş, globulin miktarındaki azalmaya bağlı olduğundan fucoïdanın karaciğer koruyucu ve iyileştirici etkisinin olduğu anlaşılmaktadır.

Sonuç olarak, karaciğer hasarlarını yosun ekstraktlarını vererek tedavi etme konusunda yapılan çalışmaların sayısının az olması nedeniyle bu çalışma bilimsel bir öneme sahiptir. Sunulan bu çalışmada CCl_4 'le oluşturulan hepatotoksisitede incelenen karaciğer enzim aktivitelerine (ALT, AST, GGT), bazı biyokimyasal parametrelere (albumin, globulin, total protein) ve protein fraksiyonlarındaki değişimlere bakarak CCl_4 toksisitesinden önce fucoïdan verilmesinin CCl_4 'ün oluşturduğu hepatik hasarı zayıflattığı, fucoïdanın karaciğer koruyucu özelliğinin bulunduğu söylenebilir. Ancak kahverengi yosunlardan elde edilen ve Uzakdoğu'da yaygın olarak kullanılan fucoïdanın terapötik mekanizmasının daha iyi anlaşılması, deneysel tedaviler süresince karaciğer fonksiyonlarına etkisinin daha iyi değerlendirilmesi için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

ÖZET

Aysin N, Ratlarda karbontetraklorür ile oluşturulan hepatotoksistede bazı biyokimyasal parametreler ve protein elektroforezi değişimleri üzerine fucoidan'ın etkisi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Van 2014. Fucoidan, kahverengi deniz yosunlarından ekstrakte edilen sülfatlı bir polisakkarittir. Bu çalışmada ratlarda CCl₄ ile oluşturulan hepatotoksistede fucoidan kullanılmasının bazı biyokimyasal parametreler (ALT, AST, GGT, albumin, globulin, total protein) ile protein fraksiyonları üzerine etkisinin araştırılması hedeflenmiştir. Çalışmada kullanılan ratlar rastgele her biri 8 rattan oluşan 4 gruba ayrıldı: Kontrol grubu, fucoidan grubu (fucoidan 100 mg/kg/gün, 8 gün intragastrik), fucoidan+CCl₄ grubu (fucoidan 100 mg/kg/gün, 8 gün intragastrik+tek doz CCl₄ 1 ml/kg i.p), CCl₄ grubu (tek doz CCl₄ 1 ml/kg i.p). 8 günlük deneme süresinden 24 saat sonra kan örnekleri alındı, elde edilen serumlarda ALT, AST, GGT aktiviteleri ile total protein, albumin ve globulin düzeylerinin analizi otoanalizörde, serum protein fraksiyonları ise elektroforetik olarak tespit edildi. Serum ALT, AST, GGT aktiviteleri ile globulin ve total protein düzeyleri en yüksek olarak CCl₄ grubunda saptandı. Fucoidan+CCl₄ grubunda ise CCl₄ grubuna göre AST (p<0.001), GGT (p<0.001) aktiviteleri ile globulin (p<0.01) ve total protein (p<0.01) düzeylerinin istatistik olarak önemle azaldığı tespit edildi. Protein elektroforezinde albumin (%), α₁ globulin (%), α₂ globulin (%) düzeylerinde gruplar arası önem bulunmadı. β globulin (%) ve γ globulin (%) düzeyleri en yüksek olarak CCl₄ grubundaki ratlarda tespit edildi, diğer gruplara göre istatistik olarak sırasıyla p<0.01, p<0.001 düzeyinde önem saptandı. A/G oranı ise en düşük olarak CCl₄ grubunda, en yüksek olarak fucoidan grubunda belirlendi (p<0.01). Sonuç olarak; CCl₄'le oluşturulan hepatotoksistede incelenen bazı biyokimyasal parametrelere (ALT, AST, GGT, albumin, globulin, total protein) ve protein fraksiyonlarındaki değişimlere bakarak CCl₄ toksisitesinden önce fucoidan verilmesinin CCl₄'ün oluşturduğu hepatik hasarı zayıflattığı, fucoidanın karaciğer koruyucu özelliğinin bulunduğu söylenebilir. Ancak kahverengi yosunlardan elde edilen ve Uzakdoğu'da yaygın olarak kullanılan fucoidanın terapötik mekanizmasının daha iyi anlaşılması, deneysel tedaviler süresince karaciğer fonksiyonlarına etkisinin daha iyi değerlendirilmesi için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Sözcükler: CCl₄, Hepatotoksiste, Fucoidan, Protein Elektroforezi, Enzim

SUMMARY

Aysin N, The effect of fucoidan on the changes of some biochemical parameteres and protein electrophoresis in hepatotoxicity induced by carbontetrachloride in rats. The University of Yüzüncü Yıl, Health Sciences Institute, Department of Biochemistry, MSci. Thesis, Van 2014.

Fucoidan is a sulfate polysaccharide that extracted from the brown algae. This study was aimed to search the effect of fucoidan on some biochemical parameters (ALT, AST, GGT, albumin, globulin, total protein) and protein fractions in hepatotoxicity induced by CCl₄ in rats. The rats which are used in the study were randomly divided into 4 groups that each of has 8 rats : Control group, fucoidan group (fucoidan 100 mg/kg/day, 8 days intragastric) fucoidan+CCl₄ group (fucoidan 100 mg/kg/day, 8 days intragastric+single dose CCl₄ 1 ml/kg i.p), CCl₄ group (single dose CCl₄ 1ml/kg i.p). After 24 hours from the process of eight-day experiment, blood samples were taken. The analysis of total protein, ALT, AST, GGT activities, albumin and globulin levels were done by autoanalyser and also serum protein fractions were electrophoretically determined. The higher levels of globulin and total protein levels ALT, AST, GGT activities were found in the group of CCl₄. On the other hand, in the group of fucoidan+CCl₄ it was determined that the levels of globulin (p<0.01), total protein (p<0.01) and the activity of AST (p<0.001), GGT (p<0.001) statistically decreased compared to CCl₄ group. There was not a statistical importance between groups in the levels of albumin (%), α₁ globulin (%), α₂ globulin (%) in protein electrophoresis. The levels of β globulin (%) and γ globulin (%) were determined as maximum in group of CCl₄ and there is a statistical importances between other groups, respectively p<0.01, p<0.001. The lowest and the highest A/G ratios were estimated in CCl₄ and fucoidan groups, respectively (p<0.01). As conclusion, it can be said that giving fucoidan before CCl₄ toxicity decreases the hepatic damage of CCl₄ and fucoidan has the property of liver protective by looking to some biochemical parameters (ALT, AST, GGT, albumin, globulin, total protein) that examined in hepatotoxicity induced by CCl₄ and changes in protein fractions. However, there is need to new studies so as to better understand therapeatic mechanism of fucoidan which is created from Brown algae which used widely in Far East and also so as to better evaluate the effect of liver fonctions during process of experimental treatment.

Key Words: CCl₄, Hepatotoxicity, Fucoidan, Protein Electrophoresis, Enzyme

KAYNAKLAR

- Abdel-Wahhab El-Deen KG, El-Shamy KA, El-Zizz El-Beih NA, Morcy FA, Mannaa FAE (2011). Protective effect of a natural herb (*Rosmarinus officinalis*) against hepatotoxicity in male albino rats. *Comunicata Scientiae*, 2, 9-17.
- Achliya GS, Kotagale NR, Wadodkar SG, Dorle AK (2003). Hepatoprotective activity of panchagavyaghrita against CCl₄ induced hepatotoxicity in rats. *Indian Journal of Pharmacology*, 35, 308-311.
- Aisa Y, Miyakawa Y, Nakazato T, Shibata H, Saito K, Ikeda Y, Kizaki M (2004). Fucoidan induces apoptosis of human HS-Sultan cells accompanied by activation of caspase-3 and down-regulation of ERK pathways. *Am J Hematol*, 78, 7-14.
- Alekseyenko TV, Zhanayeva SY, Venediktova AA, Zvyagintseva TN, Kuznetsova TA, Besednova NN, Korolenko TA (2007). Antitumor and antimetastatic activity of fucoidan, a sulfated polysaccharide isolated from the Okhotsk sea fucus evanescens brown algae. *Bull Exp Biol Med*, 143, 730-732.
- Altınsoat Ç, Sert NN (2008). Gebe ve gebe olmayan sıçanlarda karbon tetraklorürün (CCl₄) bazı biyokimyasal değerler üzerine olan etkileri. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 14, 2, 237-242.
- Angstwurm K, Weber JR, Segert A, Bürger W, Weih M, Freyer D, Einhaupl KM, Dirnagl U (1995). Fucoidin, a polysaccharide inhibiting leukocyte rolling, attenuates inflammatory responses in experimental pneumococcal meningitis in rats. *Neurosci Lett*, 191, 1-4.
- Anonim (2013a). http://www.itemfraunhofer.de/reni/trimming/img_1_liver_m_1.jpg Erişim Tarihi: Kasım 2013.
- Anonim (2013b). <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:CCl4.png> dan adepte edildi.
- Anonim (2013c). <http://www.biyokimya.8m.net/transferazlar.html> Erişim Tarihi: Kasım 2013.
- Anonim (2013d). <http://okulsel.net/docs/index-41428.html?page=5> Erişim Tarihi: Eylül 2013.
- Anonim (2013e). <http://www.webmd.com/a-to-z-guides/serum-protein-electrophoresis-spe?page=3>. Erişim Tarihi: Ekim 2013.
- Anonim (2013f). <http://pro2services.com/Lectures/Winter/Proteins/indexpr.htm>. Erişim Tarihi: Ağustos 2013.
- Anonim (2013g). <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/56-1-1-03.ppt> (2004). Erişim Tarihi: Temmuz 2013

Anonim (2013h). <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/89-2-05.pdf> Erişim Tarihi: Kasım 2013.

Arai T, Parker A, Busby W, Clemmons DR (1994). Heparin, heparan sulfate, and dermatan sulfate regulate formation of the insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein complex. *J Biol Chem*, 269, 20388-20393.

Aras K, Erşen G (1975). *Klinik Biyokimya*, AÜ Diş Hekimliği Fak Yayınları, Ankara, AÜ Basımevi, 198-215.

Arii S, Monden K, Hai S, Sasaoki T, Adachi Y, Funaki N, Higashitsuji H, Tobr T (1990). Depressed function of kupffer cells in rats with CCl₄ -induced liver cirrhosis. *Res Exp Med*, 190, 173-182.

Arosio B, Gagliano N, Fusaro LMP, Parmeggiani L, Tagliabue J, Galetti P, Castri DD, Moscheni C, Annoni G (2000). Aloe-Emodin quinone pretreatment reduces acute liver injury induced by carbon tetrachloride. *Pharmacology and Toxicology*, 87, 229-233.

Aslan D (2005). Tietz, ''*Klinik Kimyada Temel İlkeler*'', Beşinci Baskıdan Çeviri, Palme Yayıncılık, 748-760.

Aslan V, Maden M, Ok M, Başoğlu A (1993). Sığır hastalıklarının teşhis ve prognozunda kan proteinleri ve glutaraldehit testinin önemi. *Doğa Tr, J Vet Anim Sci*, 17, 73-79.

Aytekin Y, Solakoğlu S (2006). *Temel Histoloji, Nobel Tıp Katabevleri*, Ankara, 332-347.

Azri S, Mata HP, Reid LL, Gandlofi AJ, Brendel K (1992). Further examination of the selective toxicity of CCl₄ rat liver slices. *Toxicol Applied Pharmacology*, 112, 81-86

Bahçecioğlu IH, Üstündağ B, Özeran İ, Ergül E, Baydaş G, Akdere T, Demir (1999). A protective effect of Ginkgo Biloba extract on CCl₄-induced liver damage. *Hepatology Research*, 15, 215-224.

Balderas-Renteria I, Camacho-Corona M, Carranzo-Rozales P (2007). Hepatoprotective effect of *Leucophyllum frutescens* on Wistar albino rats intoxicated with carbon tetrachloride. *Ann Hepatology Journal*, 6, 251-254.

Bandyopadhyay U, Dipak D, Banerji RK (1999). Reactive oxygen species, oxidative damage and pathogenesis. *Curr Sci*, 5, 658.

Bayram I, Özbek H, Uğraş S, Tuncer I, Reçber D (2007). Askorbik asit ve alfatokoferol'ün karbon tetraklorürle oluşturulmuş akut karaciğer toksisitesi modelinde karaciğeri koruyucu etkisi. *Van Tıp Dergisi*, 11, 32-38.

Benjamin MM (1978). *Outline of Veterinary Clinical Pathology*. Third ed, Colorado State Univ, USA.

- Bilan MI, Grachev AA, Ustuzhanina NE, Shashkov AS, Nifantiev EN, Usov AI (2002). Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C.Ag. *Carbohd Res*, 337, 719-730.
- Bizzaro N, Tremolada F, Casarin C (1992). Serum alanine aminotransferase levels among volunteer blood donors, effect of sex, alcohol intake and obesity, *Ital J Gastroenterol*, 24, 5, 237-241.
- Boisson-Vidal C, Haroun F, Ellouali M, Blondin C (1995). Biological activities of polysaccharides from marine algae, *Drugs Future*, 20, 1237-1249.
- Brattin WJ, Glende EA, Recknagel RO (1985). Pathological mechanism in carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Free Radical Biology and Medicine*, 1, 27-28.
- Burlina A (1978). Improved method for fractionating γ -glutamyl transpeptidase by electrophoresis on cellulose acetate. *Clinical Chemistry*, 24, 3, 502-504.
- Busher JT (1990). Serum Albumin and Globulin, Chapter 101. *Clinical Methods*, The history, physical, and laboratory examinations 3rd, edition, Editors, Walker HK, Hall WD, Hurst JW Boston, Butterworths.
- Cahampe PC, Harvey RA (1994). Lippincott's Illustrated Reviews, *Biochemistry 2nd ed*, Philadelphia.
- Chevolot L, Foucault A, Chaubet F, Kervarec N, Siquin C, Fisher AM, Vidal CB (1999). Further data on the structure of brown seaweed fucans, relationships with anticoagulant activity, *Carbohyd Res*, 319, 154-165.
- Chevolot L, Foucault A, Collic-Jouault S, Ratiskol J, Siquin C (2000). Improvement purification of sulfated oligofucan by ion-exchange displacement centrifugal partition chromatography. *J Chromatogr A*, 869, 353-361.
- Chizhov AO, Dell A, Morris HR, Halsam SM, McDowell RA, Shashkov AS, Nifat'ev NE, Khatuntseva EA, Usov AI (1999). A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*. *Carbohyd Res*, 320, 108-119.
- Church FC, Meade JB, Treanor R, Whinna HC (1989) Antithrombin activity of fucoidan. *J Biol Chem*, 264, 3618-3623.
- Choi JI, Raghavendran HR, Sung NY, Kim JH, Chun BS, Ahn DH, Choi HS, Kang KW, Lee JW (2010). Effect of fucoidan on aspirin-induced stomach ulceration in rats. *Chem Biol Interact*, 183, 1, 249-254.
- Coles EH (1986). *Veterinary Clinical Pathology*, Fourth Edition, WB Saunders Co Philadelphia, 146-240.
- Cumashi CE, Ushakova NA, Preobrazhenskaya ME, D'Incecco A, Piccoli A, Totani L, Tinari N, Morozevich GE, Berman AE, Bilan MI, Usov AI, Rabinovich GA (2007). Comparative study of the antiinflammatory, anticoagulant, antiangiogenic and

antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology*, 17, 541-552.

Çetin C, Köse AA, Aral E, Çolak Ö, Erçel C, Karabağlı Y, Özyılmaz M, Alataş Ö, Eker A (2001). Protective effect of fucoidin (a neutrophil rolling inhibitor) on ischemia reperfusion injury, experimental study in rat epigastric island flaps. *Ann Plast Surg*, 47, 540-546.

Çetinkaya A (2009). Ratlarda N-asetil sistein ve L-karnitin'in karbon tetraklorür ile oluşturulan akut karaciğer hasarı üzerine etkileri (*Yan Dal Uzmanlık Tezi*). Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bilim Dalı, Kahramanmaraş, Türkiye.

Dashti H, Jeppsson B, Hagerstrand I, Hultberg B, Srinivas U, Abdulla M, Bengmark S (1989). Thioacetamide and carbon tetrachloride induced liver cirrhosis. *Eur Surgical Research*, 21, 83-91.

Del Bigio MR, Yan HJ, Campbell TM, Peeling J (1999). Effect of fucoidan treatment on collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. *Neurol Res*, 21, 415-419.

Devay SD (2008). Karbon tetraklorür ile deneysel siroz oluşturulan ratlarda serbest radikal metabolizması; Stobadin'in antioksidan etkisi (*Uzmanlık Tezi*). Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye.

Doh-ura K, Kuge T, Uomoto M, Nishizawa K, Kawasaki Y, Iha M (2007). Prophylactic effect of dietary seaweed fucoidan against enteral prion infection. *Antimicrob Agents Chemotherapy*, 51, 2274-2277.

Doumas BT, Watson WA, Biggs HG (1971). Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clinica Chimica Acta*, 31, 87-96.

Dürig J, Bruhn T, Zurborn KH, Gutensohn K, Bruhn HD, Beress L (1997). Anticoagulant fucoidan fraction from *Fucus vesiculosus* induce platelet activation in vitro. *Thromb Res*, 85, 479-491.

Emdin M, Passino C, Miechelossi C, Titta F (2001). Prognostic value of serum gamma glutamyl transferase activity after myocardial infraction. *Ueropian Heart Jornal*, 22, 1802-1807.

Erdal ME (1987). Kanserli serum proteinleri düzeyinin ve bazı haptoglobulin tipleri sıklığının Gel Disk Elektropherez yöntemi ile araştırılması (*Doktora Tezi*). Dicle Üniv Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.

Etim OE, Akpan EJ, Usuh IF (2008). Hepatotoxicity of carbon tetrachloride protective effect of *Gongronema latifolium*. *J Pharm Sci*, 21, 268-274.

Farrell GC (1998). Liver Disease Caused by Drugs, Anesthetics and Toxins, '*Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease*' Vol 2, Ed. Feldman M, Sleisenger MH, WB Saunders Company, Pennsylvania, Philadelphia, 1221-1253.

- Foulis PR, Sandford BH, Gottfried M (1988). Drug induced morphologic changes in the liver, *Ann Clin Lab Sci*, 18, 215-228.
- Fu XY, Xue CH, Ning Y, Li ZJ, Xu JC (2004). Acute antihypertensive effects of fucoidan oligosaccharides prepared from *Laminaria japonica* on renovascular hypertensive rat. *J Ocean Univ Qingdao*, 34, 560-564.
- Fujimura T, Shibuya Y, Moriwaki S, Tsukahara K, Kitahara T, Sano T, Nishizawa Y, Takema Y (2000). Fucoidan is the active component of *Fucus vesiculosus* that promotes contraction of fibroblast-populated collagen gels. *Biol Pharm Bull*, 23, 1180-1184.
- Gan L, Fagerholm P, Joon Kim H (1999). Effect of leukocytes on corneal cellular proliferation and wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40, 575-581.
- Giroux JL, Bretauiere J, Matou S, Fischer AM (1998). Fucoidan, as heparin, induces tissue factor pathway inhibitor release from cultured human endothelial cells. *Thromb Haemost*, 80, 692-695.
- Gnanaprakash K, Madhusudhana CC, Ramkanth S (2010). Aqueous extract of *Flacourtia indica* prevents carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rat. *International Journal of Biological Sciences*, 6, 51-55.
- Goldie DJ, McConnell AA (1990). Serum alanine transaminase (ALT) reference ranges estimated from blood donors. *J Clin Pathol*, 43, 929-931.
- Gözükara E (1989). *Enzimler, Biyokimya, Ofset Repromat Ltd, Şti*, Ankara, 572-576.
- Grant GH, Silverman LM, Christenson RH (1987). Amino acids and proteins. In Tietz NW ed, *Fundamentals of Clinical Chemistry*, 3rd edition, *WB Saunders, Philadelphia*, 328-330.
- Hanigan MH (1998). G-glutamyl transpeptidase a glutathione: Its expression and function in carcinogenesis. *Chem Biol Interact*, 111-112, 333-342.
- Hayashi S, Itoh A, Isoda K, Kondoh M, Kawase M, Yagi K (2008). Fucoidan partly prevents CCl₄-induced liver fibrosis. *Eur J Pharmacol*, 580, 380-384.
- Henry JB (2001). *Clinical Diagnosis and Management By Laboratory Methods* WB, *Saunders Company*, 20th ed, 1512.
- Hill PG (1985). The measurement of albumin in serum and plasma. *Ann Clin Biochem*, 22, 565-578.
- Hirayama C, Fukuda T, Toda T (1970). Metabolism of [¹³¹I] gamma globulins in patients with chronic liver disease. *Clin Chim Acta*, 27, 409-413.
- Horne CHW, Ferguson J (1972). The effect of age, sex, pregnancy, oestrogen and progesterone on rat serum proteins. *J Endocrinol*, 54, 47-53.

Horne CHW, Scott CA, Busuttil A, Macsween RNM (1973). Effect of the production of experimental cirrhosis in rats on serum protein levels. *Biomedicine*, 19, 3-6.

Huang X, Wang X, Lv Y, Xu L, Lin J (2014). Protection effect of kallistatin on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats via antioxidative stress. *Plos one*, 9, 1-8.

Ichinose T, Miller MG, Shibamoto T (1994). Determination of free Malondyaldehyde formed in liver microsomes up on CCl₄ oxidation. *Journal of Applied Toxicology*, 14, 6, 453-455.

Ideo G, Morganti A, Dioguardi N (1972). Gama-glutamyl transpeptidase a clinical and experimental study, *Digestion*, 5, 326-336.

Itsuko K (1995). Antiulcer agent and adhesion inhibitor for Helicobacter pylori. *Eur Pat*, EP0645143.

İlhan N, Seçkin D (2005). Protective effect of Nigella sativa seeds on CCl₄- induced hepatotoxicity. *Firat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 19, 175-179.

İliçin G, Biberoglu K, Süleymanlar G, Ünal S (2005). *İç hastalıkları, Ankara, Güneş Kitabevi*.

Jain NC (1986). The plasma proteins. Dysproteinemas and Immun Deficiency disorders. In, Schalm's Vet Hema Jain NC, Fourth Ed, Lea and Febiger, *Philadelphia*, 34, 940-989.

Jennifer E, Mason RN, Rodman D, Starke MD, Kirk JEV (2010). Gamma-glutamyl transferase, A novel cardiovascular risk biomarker. *Preventive Cardiology*, 13, 36-41.

Jörnfeld A, Samsioe G, Walden SJ, Erieksson B (1984). Gamma- glutamyltransferase in normal pregnancy, *Clin Chem*, 30, 5, 807-808.

Kanat Y (2005). Ağır asfalt işlerinde çalışan işçilerin ve kırsal kesimde yaşayan kişilerin kan serumlarında bazı ağır metal iyonları ile bazı spesifik karaciğer enzimleri ve testosteron hormonu miktarlarının tesbiti (*Yüksek Lisans Tezi*). YYÜ Fen Bilimleri Ens, Van.

Kaneko JJ (1997). Serum proteins and dysproteinemias. Clinical Biochemistry of Domestic Animals Ed, Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, 5'th ed., *Academic Press. San Diego*, 117-138.

Kang KS, Kim ID, Kwon RH, Lee JY, Kang JS, Ha BJ (2008). The effects of fucoidan extracts on CCl₄-induced liver injury. *Arch Pharm Res*, 31, 622-627.

Karagül H, Altıntaş A, Fidancı UR, Sel T (2000). *Klinik Biyokimya, Medisan Yayınları, Ankara*, 45.

Kartik R, Rao Ch V, Trivedi SP, Pushpangadan P, Reddy GD (2010). Amelioration effects against N-nitrosodiethylamine and CCl₄ -induced hepatocarcinogenesis in Swiss

albino rats by whole plant extract of *Achyranthes aspera*. *Indian Journal of Pharmacology*, 42, 6, 370-375.

Kawamoto H, Miki Y, Kimura T, Tanaka K, Nakagawa T, Kawamukai M, Matsuda H (2006). Effects of fucoidan from Mozuku on human stomach cell lines. *Food Sci Technol Res*, 12, 218-222.

Kawano N, Egashira Y, Sanada H (2007). Effect of dietary fiber in edible seaweeds on the development of D-galactosamine-induced hepatopathy in rats. *J Nutr Sci Vitaminol*, 53, 446-450.

Kayaalp O (1991). *Tıbbi Farmakoloji, 1. Cilt, Feryal Matbaacılık*, Ankara.

Keha EE, Küfrevioğlu Öİ (1993). *Enzimler, Biyokimya Kitabı, Derya Yayınevi*, 2, 89, Trabzon.

Keha EE, Küfrevioğlu Öİ (2005). *Biyokimya, Aktif Yayınevi*, Erzurum.

Khorshid HR, Azonov JA, Novitsky YA, Farzamfar B, Shahhosseiny MH (2008). Hepatoprotective effects of setarud against carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *Indian J Gastroenterol*, 27, 110-112.

Kim MJ, Jeon J, Lee JS (2014). Fucooidan prevents high-fat diet-induced obesity in animals by suppression of fat accumulation. *Phytotherapy Research*, 28, 1, 137-43, 1099-1573

Kobayashi T, Honke K, Miyazaki T, Matsumoto K, Nakamura T, Ishizuka I, Makita A (1994). Hepatocyte growth factor specifically binds to sulfoglycolipids. *J Biol Chem*, 269, 9817-9821.

Kurahori T, Koda T, Ichikawa M, Watanabe Y (1978) Phagocytic activity of reticulo endothelial system of patients with chronic liver diseases. *Liver*, 20, 249-260.

Kuznetsova TA, Besednova NN, Mamaev AN, Momot AP, Shevchenko NM, Zvyagintseva TN (2003). Anticoagulant activity of fucoidan from Brown algae *Fucus evanescens* of the okhotsk sea. *Bull Exp Biol Med*, 5, 471-473.

Lawrence A, Kaplan, Amadeo J, Pesce (1996). *Clinical Chemistry, Theory, Analysis and Correlation*, 3rd ed, Mosby, 1064.

Leary RO, Rerek M, Wood EJ (2004). Fucooidan modulates the effect of transforming growth factor (TGF)- β 1 on fibroblast proliferation and wound repopulation in vitro models of dermal wound repair. *Biol Pharm Bull*, 27, 266-270.

Lee KJ, Choi JH, Jeong HG (2007). Hepatoprotective and antioxidant effects of the coffee diterpenes kahweol and cafestol on carbontetrachloride induced liver damage in mice. *Food Chem Toxicol*, 45, 2118-2125.

Levring T, Hoppe HA, Schmid OJ (1969). *Marine Algae Fucooidan. Cram, De Gruyter & Co, Hamburg*, 330-332.

- Li DY, Xu RY, Zho WZ, Sheng XB, Yang AY, Cheng JL (2002). Effects of fucoidan extracted from brown seaweed on lipid peroxidation in mice. *Acta Nutrim Sin*, 24, 389-392.
- Li DY, Xu Z, Huang LM, Wang HB, Zhang SH (2001). Effect of fucoidan of *L japonica* on rats with hyperlipidaemia. *Food Sci*, 22, 92-95.
- Li DY, Xu Z, Zhang SH (1999). Prevention and cure of fucoidan of *L japonica* on mice with hypercholesterolemia. *Food Sci*, 20, 45-46.
- Li F, Tian TC, Shi YC (1995). Study on antivirus effect of fucoidan in vitro. *JN Bethune Univ Med Sci*, 21, 255-257.
- Li XW, Zhu R, Li B (2010). Mechanism underlying carbon tetrachloride inhibited protein synthesis in liver. *World J Gastroenterol*, 16, 3950-3956.
- Lida C, Fujii K, Koga E, Washino Y, Kitamura Y, Ichi I, Abe K, Matsura T, Kojo S (2009). Effect of alpha-tocopherol on carbon tetrachloride intoxication in the rat liver. *Archives of Toxicology*, 83, 5, 477-483.
- Liebert J, Matlawska I, Bylka W, Murias M (2005). Protective effect of aquilegia vulgaris on APAP induced oxidative stress in rats. *J Ethnopharm*, 97, 351-358.
- Linnemann G, Reinhart K, Parade U, Philipp A, Pfister W, Straube E, Karzai W (2000). The effects of inhibiting leukocyte migration with fucidin in a rat peritonitis model. *Intensive Care Med*, 26, 1540-1546.
- Lu KL, Tsai CC, Ho LK, Lin CC, Chang YS (2002). Preventive effect of the Taiwan folk medicine *ixeris laevigata* var. *Oldhami* on a-nophthyl-isothiocyanate and carbon tetrachloride induced acute liver injury in rats. *Phytotherapy Research*, 16, 45-50.
- Mabeau S, Kloareg B, Joseleau JP (1990). Fraction and analysis of fucans from brown algae. *Phytochemistry*, 29, 2441-2445.
- Maksimchik YZ, Lapshina EA, Sudnikovich EY, Zabrodskaya SV, Zavodnik IB (2008). Protective effects of N-acetyl-L-cysteine against acute carbon tetrachloride hepatotoxicity in rats. *Cell Biochem Funct*, 26, 11-18.
- Mandal P, Mateu CG, Chat Topadhyay K, Pujol CA, Damonte EB, Ray B (2007). Structural features and antiviral activity of sulphated fucans from the Brown seaweed *Cystoseira indica*. *Antiv Chem Chemother*, 18, 153-162.
- Mariee DA, Al-Shabanah O (2006). Protective ability and binding affinity of captopril towards serum albumin in an in vitro glycation model of Diabetes mellitus. *J Pharm Biomed Anal*, 41, 2, 571-575.
- Martin MN, Slovin PJ (2000). Purified γ -glutamyl transpeptidase from tomato exhibit high affinity for glutathione and glutathione S-conjugates. *Plants Physiology*, 122, 1417-1426.

- Maruyama H, Tamauchi H, Hashimoto M, Nakano T (2005). Suppression of Th2 immune responses by Mekabu fucoidan from *Undaria pinnatifida* Sporophylls. *Int Arch Allergy Immunol*, 137, 289-294.
- Mauray S, Raucourt ED, Chaubet F, Maiga-Revel O, Sternberg C, Fischer AM (1998) Comparative anticoagulant activity and influence on thrombin generation of dextran derivatives and of a fucoidan fraction. *J Biomater Sci Polymer Edn*, 9, 373-387.
- Mayer B, Hemmens B (1997). Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *TIBS*, 22, 477-481.
- McCaffrey TA, Falcone DJ, Vicente D, Du B, Consigli S, Borth W (1994). Protection of transforming growth factor-beta 1 activity by heparin and fucoidan. *J Cell Physiol*, 159,51-59.
- McPherson RA (1991). Specific Proteins Clinical Diagnosis Management by Laboratory Methods. Ed Henry JB, 18' th ed, WB Saunders, *Philadelphia*, 215-228.
- Mehmetoğlu (2002). *Klinik Biyokimya Laboratuvarı El Kitabı*, İnci ofset, Konya.
- Mert N (1996). *Veteriner Klinik Biyokimya, Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı Yayın No*, 12, 232-235.
- Meyts RE, Heisterkamp N, Groffen J (1988). Cloning and nucleotide sequence of human γ -glutamyl transferase. *Proc Natl Acad Sci*, 85, 8840-8844.
- Micheline RS, Cybelle M, Celina GD, Fernando FS, Hugo OR, Edda L (2007). Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. *J Appl Phycol*, 19, 153-160.
- Minix R, Doctor VM (1997). Interaction of fucoidan with proteases and inhibitors of coagulation and fibrinolysis. *Thromb Res*, 87, 419-429.
- Murali A, Ashok P, Madhavan V (2012). Antioxidant and hepatoprotective effects of the roots of *Hemidesmus indicus* (L.) R. Br var. *pubescens* (W.& A.) Hk f, *Asian J Trad Med*, 8, 36-46.
- Muriel P (1998). Nitric oxide protection of rat liver from lipid peroxidation, collagen accumulation, and liver damage induced by carbon tetrachloride. *Biochemical Pharm*, 56, 773-779.
- Muriel P, Escobar Y (2003). Kupffer cells are responsible for liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride. *Journal of Applied Toxicology*, 23, 2, 103-108.
- Murray KR, Mayes PA, Granner DK, Rodwell VW (1990). *Harper's Biochemistry*, 21'nd *Appleton&Lange Medical Publication*, California.
- Murray KR, Mayes PA, Granner DK, Rodwell VW (1993). *Harper'in Biyokimyası*, 22. *Baskı, Barış Kitabevi*, İstanbul.

- Nadkarni GD, Souza NB (1988). Hepatic antioxidant enzymes and lipid peroxidation in carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis in rats. *Biochem Med and Met Biol*, 40, 42-45.
- Nardella A, Chaubet F, Boisson-Vidal C, Blondin C, Duran P, Jozefonvicz J (1996). Anticoagulant low molecular weight fucans produced by radical process and ion exchange chromatography of high molecular weight fucans extracted from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Carbohyd Res*, 289, 201-208.
- Nashino T, Yamauchi T, Horie M, Nagumo T, Suzuki H (2000) Effects of a fucoidan on the activation of plasminogen by u-PA and t-PA. *Thromb Res*, 99, 623-634.
- Nemesanszky E, Lott AJ (1985). Gamma-glutamyltransferase and its isoenzymes, progress and problems. *Clinical Chemistry*, 31, 6, 797-803.
- Nishino T, Fukuda A, Nagumo T, Fujihara M, Kaji E (1999). Inhibition of the generation of thrombin and factor Xa by a fucoidan from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. *Thromb Res*, 96, 37-49.
- Nishino T, Nagumo T (1987). Sugar constituents and blood-anticoagulant activities of fucose-containing sulfated polysaccharides in nine brown seaweed species. *Nippon Noeikagaku Kaishi*, 61, 361-363.
- Nishino T, Nagumo T (1991). Structural characterization of a new anticoagulant fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. *Carbohyd Res*, 211, 77-90.
- Nishino T, Nagumo T (1992). Anticoagulant and antithrombin activities of oversulfated fucans. *Carbohyd Res*, 229, 355-362.
- Okazaki M, Furuya E, Kasahara T, Sakamoto K (1985). Function of reticuloendothelial system on CCl₄ induced liver injury in mice. *Jpn Pharmacol*, 39, 4, 503-514.
- Okita M (2004). Chronic hepatic disease and dietary instruction. *Hepatol Res*, 30, 1, 92-95.
- Onat T, Kaya E, Sözmen EY (2002). *İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık*. Ankara, 184-218.
- Özenirler S, Dinçer S, Akyol G, Öz I, Kandilci U, Babül A (1996). CCl₄'ün oluşturduğu karaciğer hasarına Ginkgo Biloba'nın etkisi. *13. UGK, Antalya, Sözlü Bildiriler*, 138.
- Özoran Y (1987). Hücre Zedelenmesi ve Adaptasyonu, "Patoloji " (Robbins and Kumar Basic Pathology), Uluoğlu Ö (Çeviri Editörü), Güneş Kitabevi, Ankara, 9-10.
- Parola M, Rubio M, Varela G (1996). Effects of S adenosylmethionine on lipid peroxidation and liver fibrogenesis in carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *J Hepatol*, 25, 2, 200-205.

- Passaquet C, Thomas JC, Caron L, Hauswirth N, Puel F, Berkaloff C (1991) Light-harvesting complexes of brown algae, biochemical characterization and immunological relationships. *FEBS*, 280, 21-26.
- Percival E, McDowell RH (1967). Sulphated polysaccharides containing neutral sugars, fucoidan. Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides. *Academic Press, London and New York*, 157-175.
- Pratt DS, Kaplan MM (1999). Evaluation of the Liver. Schiff MF, (Eds), Diseases of the Liver, Volume 1, (Eight ed) *Philadelphia, Lippincott- Raven*, 205-244.
- Prinsen B, Monique GM, Velden S (2004). Albumin turnover: experimental approach and its application in health and renal diseases. *Clin Chim Acta*, 347 (1-2), 11-14.
- Qiusheng Z, Xubo SX, Gang L, Meng S, Changhai W (2004). Protective effects of luteolin-7-glucoside against liver injury caused by carbon tetrachloride in rats. *Pharmazie*, 59, 4, 286-288.
- Rao GMM, Rao VC, Pushpangadan P, Shirwaikar A (2006). Hepatoprotective effects of rubiadin, a major constituent of *Rubia cordifolia* Linn. *Journal of Ethnopharmacology*, 103, 484-490.
- Rieth S, Sams R, Manibusan M (2010). Toxicological Review of Carbon Tetrachloride, *United States Environmental Protection Agency, Washington*, 3-260.
- Robbins SL, Cotran RS, Kumar V (2004). Basic Pathology, 6th Ed, Philadelphia, WB Saunders Company, 516-519.
- 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.
- Ruperez P, Ahrazem O, Leal A (2002). Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *J Agric Food Chem*, 50, 840-845.
- Sacchetti L, Castaldo G, Salvatore F (1988). The gamma-glutamyltransferase isoenzyme pattern in serum as a signal discriminating between hepatobiliary disease, including neoplasias. *Clinical Chemistry*, 34, 2, 352-355.
- Saito A, Yoneda M, Yokohama S, Okada M, Haneda M, Nakamura K (2006). Fucoidan prevents concanavalin A-induced liver injury through induction of endogenous IL-10 in mice. *Hepatol Res*, 35, 3, 190-198.
- Sanlı Y (1988). *Veteriner Farmakoloji. Ankara Üniv Vet Fak Yay*, No, 412, Ankara.
- Sen A, Şahin B, Agus HH (2007). Prevention of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity by *Urtica urens* in rats. *Journal of Applied Biological Sciences*, 1, 29-32.

Sezer AD (2006). Fucoïdan İçeren Farmasötik Őekillerin Yanık Tedavisinde Değerlendirilmesi. Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı (*Doktora Tezi*), 269.

Shaker ME, Salem HA, Shiha GE, Ibrahim TM (2011) Nilotinib counteracts thioacetamide-induced hepatic oxidative stress and attenuates liver fibrosis progression. *Fundam Clin Pharmacol*, 25, 248-257.

Shallan MA, El-Baz GD, Ali Hanaa FM, Helmy YS (2008). Antitoxicant effects against CCl₄-induced liver damage of ripe fruits ethanol extract of Black Nightshades. *Journal of biological and Chemical Environmental Science*, 3.

Sherlock S (1986). The spectrum of hepatotoxicity due to drugs, *Lancet*, 2, 440-444.

Shi ZY, Guo YZ, Wang Z (2000). Pharmacological activity of fucoïdan from *Laminaria japonica*. *J Shanghai Fish Univ*, 9, 268-271.

Shibata H, Kimura-Takagi I, Nagaoka M, Hashimoto S, Aiyama R, Iha M, Ueyama S, Yokokura T (2000). Properties of fucoïdan from *Cladosiphon okamuranus tokida* in gastric mucosal protection. *Bio Factors*, 11, 235-245.

Shimizui I (2001). Antifibrogenic therapies in Chronic HCV infection, *Current Drug Targets Infectious Disorders*, 1, 2, 227-240.

Skinner MP, Lucas CM, Burns GF, Chesterman CN, Berndt MC (1991). GMP- 140 binding to neutrophils is inhibited by sulfated glycans. *J Biol Chem*, 266, 5371-5374.

Soeda S, Kozako T, Iwata K, Shimeno H (2000). Oversulfated fucoïdan inhibits the basic fibroblast growth factor-induced tube formation by human umbilical vein endothelial cells, its possible mechanism of action. *BBA*, 1497, 127-134.

Soeda S, Sakaguchi S, Shimeno H, Nagamatsu A (1992). Fibrinolytic and anticoagulant activities of highly sulfated fucoïdan. *Biochem Pharmacol*, 43, 1853-1858.

Song JQ, Xu YT, Zhang HK (2000). Immunomodulation action of sulfate polysaccharide of *Laminaria japonica* on peritoneal macrophages of mice. *Chin J Immunol*, 16, 70.

Şişmanoğlu M (1995). Karaciğer ve Biliyer Sistem hastalıkları, “*Cecil Essentials of Medicine*” Tuzcu M. (eviri Editörü) ,Yüce Yayınları, İstanbul, 336-342.

Tanrıverdi G (2005). Karbon tetraklorür (CCl₄) ile oluşturulmuş karaciğer hasarında değişik dozlardaki nikotinamidin protektif etkisinin ışık ve elektron mikroskopik olarak incelenmesi (*Yüksek Lisans Tezi*). İstanbul Üniversitesi CerrahpaŐa Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye.

Tekman Ő, Öner N (1994). *Genel Biyokimya*, Fakülteler Matbaası, İstanbul, 341-346.

- Thomas P, Rajendran M, Pasanban B, Rengasamy R (2010). Cardioprotective activity of *Cladosiphon okamuranus* fucoidan against isoproterenol induced myocardial infarction in rats. *Phytomedicine*, 15, 18, 1, 52-57.
- Tietz (2005). *Klinik Kimyada Temel İlkeler*. Ed Burtic CA, Ashwood RE, Beşinci baskıdan çeviri. Çeviri Ed. Aslan D, Palme Yayıncılık, İstanbul, 325-352.
- Tortora GJ, Grabowsky SK (1996). *Principles of Anatomy and Physiology*, 8th edition Harper Collins Publishers Inc, New York, 1-352.
- Turgut K (1995). *Veteriner Klinik Laboratuar Teşhis*, Özel Baskı, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fak Yayınları, Konya, 1-50.
- Turgut K (2000). *Veteriner Klinik Laboratuar Teşhis*, Geliştirilmiş 2. Baskı, Bahçivanlar Basım Sanayi, Konya, 496.
- Usui T (1980). Isolation of highly purified fucoidan from *Eisenia bicyclis* and its anticoagulant and antitumor activities. *Agric Biol Chem*, 44, 1965-1966.
- Üstdal M, Özgünen T (1997). *Hekimlikte Biyokimya*. Hangi Test İstenmeli. Barış Kitapevi, İstanbul, 1-520.
- Üstündağ B, Bahçecioğlu İH, Şahin K, Gülcü F, Düzgün S, Özercan İH, Gürsu MF (2005). Soy izoflavonların karbon tetraklorüre (CCl₄) bağlı karaciğer hasarı ve plazma paraoksonaz ile arilesteraz aktivite düzeylerine olan etkileri. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 19, 4, 263-271.
- Vijayan MM, Pereira C, Grau EG, Iwama GK (1997). Metabolic responses associated with confinement stress in Tilapia; The role of cortisol. *Biochem Physiol*, 116C, 1, 89-85.
- Vischer P, Buddecke E (1991). Different action of heparin and fucoidan on arterial smooth muscle cell proliferation and thrombospondin and fibronectin metabolism *Eur. J Cell Biol*, 56, 407-414.
- Wang H, Wei W, Wang NP (2005). Melatonin ameliorates carbontetrachloride-induced hepatic fibrogenesis in rats via inhibition of oxidative stres. *Life Sci*, 77, 1902-1915.
- Wang WT, Zhou JH, Xing ST, Guan HS (1994). Immunomodulating acalgae sulfated polysaccharides on normal and immunosuppressed mice. *Chin J Pharm Toxicol*, 8, 199-202.
- Wannamethee G, Ebrahim S, Shaper G (1995). Gamma-glutamyl transferase: Determinants and association with mortality from ischemic heart disease and all causes. *American Journal of Epidemiology*, 142, 699-708.
- Weber LW, Boll M, Stampfl A (2003). Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol*, 33, 2, 105-136.

- Weiler-Normann C, Herkel J, Lohse AW (2007). Mouse models of liver fibrosis. *Z Gastroenterol*, 45,43-50.
- Whitfield BJ (2001). Gamma glutamyl transferase. *Critical Review In Clinical Laboratory. Sciences*, 38, 1417-1426.
- Willenborg DO, Parish CR (1988). Inhibition of allergic encephalomyelitis in rats by treatment with sulfated polysaccharides. *J Immunol*, 140, 3401-3405.
- Wu J, Danielsson, A Zern MA (1999). Toxicity of hepatotoxins new insights into mechanisms and therapy. *Expert Opin Investig Drugs*, 8, 585-607.
- Xue CH, Fang Y, Lin H, Chen L, Li ZJ, Deng D, Lu CX (2001). Chemical characters and antioxidative properties of sulfated polysaccharides from *Laminaria japonica*. *J Appl Phycol*, 13, 67-70.
- Yang Y, Ahn T, Lee J (2007). Protective effects of pycnogenol on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in Sprague–Dawley Rats. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 1, 380-387.
- Yao FD, Dong ZZ, Yao BD, Wu HX, Wu W, Qui WL, Wang MH, Meng YX (2004). Abnormal expression of hepatoma derived γ -glutamyl transferase subtyping and its early alteration for carcinogenesis of hepatocytes. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 3, 4, 564-570.
- Yenson M (1988). *İnsan Biyokimyası, Beta Basım Yayım Dağıtım AŞ*, İstanbul Yay No, 146, İstanbul, 396-410.
- Zhang QB, Yu PZ, Zhou GF, Li MZ E, Xu ZH (2003). Studies on antioxidant activities of fucoidan from *Laminaria japonica*. *Chin Trad Herbal Drugs*, 34, 824-826.
- Zuinen R, Yamaji K, Aoki M, Chikuma T, Hojo H (2007). Early induced, high-level interleukin-6 expression in the rat peritoneal cavity into which a hepatotoxicant carbon tetrachloride was administered. *Toxicol Lett*, 170, 42-48.

ÖZGEÇMİŞ

Van'ın Gürpınar ilçesinde 1987 yılında doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Van da tamamladı. 2007 yılında girdiği Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Yüksek Okulu Hemşirelik Bölümünden 2011 yılında mezun oldu. 2011 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesine atandı. 2011 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans programına başladı. 2013 yılında Hakkari Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokuluna Öğretim Görevlisi olarak atandı. Halen burada görev yapmaktadır.

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

ARAŞTIRMA BAŞVURU ONAY BELGESİ

Araştırmanın Adı	Ratlarda Karbontetraklorür ile Oluşturulan Hepatotoksisitede Bazı Biyokimyasal Parametre ve Protein Elektroforezi Değişimleri Üzerine Fucoidan' ın Etkisi
Araştırmanın Yürütücüsü	Prof. Dr. Handan MERT
Yardımcı Araştırmacılar	Yük. Lis. Öğr. Nesrullah AYŞIN
Kurumu	Veteriner Fakültesi
Araştırmanın Tahmini Süresi	5 Ay
Kullanılacak Hayvan Türü ve Sayısı	Sıçan 32 Adet
Destekleyecek Kuruluş (lar)	
Başvuru Tarihi	15/01/2013

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2013/-02/...	Tarih:28.02.2013
	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi öğretim üyesi /elemanı Prof. Dr. Handan MERT'in sorumluluğunda yürütülmesi planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma projesi gerekçe, amaç ve yöntemler dikkate alınarak ilgi başvuru belgeleri incelendi. Çalışmanın etik açıdan uygun olduğuna, projenin aşağıdaki hususlar dikkate alınarak yürütülmesine ve proje yürütücüsüne iletilmesine oy birliği /oy çokluğu ile karar verildi. 1) Projede herhangi bir değişiklik gerektiğinde kurulumuzdan onay alınması. 2) Projede çalışacağı bildirilen araştırmacılar da değişiklik olduğunda kurulumuzdan onay alınması. 3) Deney hayvanları üzerinde yapılacak girişimin başlangıç ve bitiş tarihlerinin bildirilmesi. 4) Çalışma süresinde tamamlanamaz ise ek süre talebinde bulunulması. 5) Çalışma tamamlandığında sonuç raporunun gönderilmesi.	

ETİK KURUL ÜYELERİ	
BAŞKAN Prof. Dr. İdris TÜREL	BAŞKAN YARDIMCISI Prof. Dr. Hasan ÜLKER
ÜYELER	
Prof. Dr. Murat DEMİREL	Prof. Dr. Duran BOLAT
Doç. Dr. Fazıl ŞEN	Doç. Dr. Ali İhsan ZENGİNGÜL
Doç. Dr. Sıddık KESKİN	Doç. Dr. Fatma İLHAN
Yrd. Doç. Dr. Fatih GARÇA	Yrd. Doç. Dr. Atilla DURMUŞ
Yrd. Doç. Dr. Barış Atalay USLU	Zir. Müh. Kenan YILDIRIMOĞLU
Vet. Hekim Y. Ay BAŞBUĞAN	Orhan SOFUOĞLU (Sivil Üye)

*Bu form YÜHADYEK tarafından doldurulacaktır.



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

YUZUNCU YIL UNIVERSITY (TURKEY)
ANIMAL RESEARCHES LOCAL ETHIC COMMITTEE
RESEARCH FINAL REPORT APPROVAL CERTIFICATE

Araştırmanın Adı <i>Title of the Research</i>	Ratlarda Karbontetraklorür ile Oluşturulan Hepatotoksisitede Bazı Biyokimyasal Parametre ve Protein Elektroforezi Değişimleri Üzerine Fucoidan'ın Etkisi The effect of Fucoidan on the changes of some Biochemical Parameters and Protein Electrophoresis of serum in rats after CCl ₄ induced hepatotoxicity
Araştırmacı(lar) <i>Investigator(s)</i>	Yürütücü / <i>Chief investigator</i> : Prof. Dr. Handan MERT Yardımcı Araştırmacı(lar) / <i>Co-investigator(s)</i> : Nesrullah AYŞİN
Araştırmanın Başlama Tarihi / <i>Research Starting Date</i> : 15.01.2013	
Araştırmanın Bitiş Tarihi / <i>Research Completion Date</i> : 20.05.2014	
Proje Süresi / <i>Total Time of Project</i> :	
Proje No / <i>Project Number</i> :	
Araştırmayı Destekleyen Kuruluş (varsa) / <i>Funding institution(s) (if available)</i> : -	
Destek Şekli ve Miktarı / <i>Type and amount of funding</i> : -	
Karar: Yukarıda bilgileri verilen araştırma projesinin kesin sonuç raporu Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu'nun 29/05/2014 tarih ve 2014/06 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.	
Decision: <i>Final report of the research project detailed above was approved by Yuzuncu Yil University Animal Researches Local Ethic Committee in the session held on 29/05/2014 (decision number 2014/06).</i>	
Başkan / Chair Prof. Dr. İdris TÜREL Üyeler / Members	
Prof. Dr. Duran BOLAT	Prof. Dr. Hasan ÜLKER
Prof. Dr. Siddık KESKİN	Doç. Dr. Fazıl ŞEN
Doç. Dr. Fatma İLHAN	Doç. Dr. Atilla DURMUŞ
Doç. Dr. Barış Atalay USLU	Doç. Dr. M. Fatih GARÇA
Yrd. Doç. Dr. Birkan Taha ÖZKAN	Vet. Dr. Yıldırım BAŞBUĞAN
Zir. Müh. Kenan YILDIRIMOĞLU	Orhan SOFUOĞLU (Sivil Üye)