T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BENOMİLE BAĞLI SUBKRONİK KARACİĞER HASARI VE FİBROGENEZİNE KARŞI KONDROİTİN-4-SÜLFAT (C4S) VE α-LİPOİK ASİTİN (LA) KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Hüsniye EYTİŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Tülin AKTAÇ

2010-EDİRNE

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Benomile Bağlı Subkkronik Karaciğer Hasarı ve Fibrogenezine Karşı Kondroitin-4-Sülfat (C4S) ve α-Lipoik Asitin (LA) Koruyucu Etkilerinin Araştırılması

Hüsniye EYTİŞ

Yüksek Lisans Tezi

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu çalışma …./…../…..... tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Tülin AKTAÇ
(Danışman)

Doç. Dr. Figen ERTAN

Doç. Dr. Hülya YAĞAR

EDİRNE - 2010

ÖZET

Bu çalışmada, fungusit olarak kullanılan benomile bağlı oluşan subkronik karaciğer hasarı ve fibrosise karşı kondroitin-4-sülfat (C4S) ve α-lipoik asit (LA)' in koruyucu etkileri incelendi.

Benomil (200 mg/kg), α-lipoik asit (200 mg/kg) ve kondroitin-4-sülfat (25 mg/kg) 5 hafta boyunca haftada bir kez olmak üzere intraperitonal (IP) injeksiyon yoluyla uygulandı. LA ve C4S benomil uygulamasından 30 dakika önce uygulandı. Deney süresi sonunda ölçülen vücut ağırlıklarında, benomil grubundaki hayvanlarda önemli bir değişiklik olmaz iken, antioksidan uygulanan hayvanlarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış ($p<0.01$, $p<0.02$) tespit edildi.

Hepatik hücre hasarının belirlenmesi için karaciğerde miyeloperoksidaz (MPO) enziminin aktivitesi ölçüldü; Benomil grubundaki hayvanların karaciğer dokusu MPO aktivitesinin önemli olarak arttığı ($p<0.001$), buna karşılık C4S ($p<0.05$) ve LA uygulanan hayvanlarda MPO aktivitesinin kontrol düzeylerine geri döndüğü ($p<0.01$) gözlendi. C4S ve LA' nın birlikte uygulandığı grupta azalma daha fazladır ($p<0.05$).

Benomil uygulanmış hayvanların karaciğerlerinde fibrosis oluştuğu histolojik olarak ekstraselüler matriks ve sinüzoidal alanlarda bağ doku artışı ile gösterildi. C4S ve LA uygulamasının kollagen fibril oluşumunda artışa neden olmadığını göstermiştir. Sonuç olarak, antioksidan özellikleri bilinen C4S ve LA' nın, benomile bağlı olarak oluşan karaciğer hasarına ve fibrozise karşı da etkili oldukları söylenebilir.

Anahtar kelimeler: Benomil, α-lipoik asit, kondroitin-4-sülfat, antioksidan, antifibrojenik etki

---

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TÜBAP-2010/42 no'lu proje kapsamında desteklenmiştir.

ABSTRACT

In this study, the protective effects of α-lipoic acid and chondroitin-4-sulphate, against subcronic liver damage and fibrosis as a result of benomyl, which is used as fungucide, were examined.

Benomyl (200 mg/kg), α-lipoic acid (200 mg/kg) and chondroitin-4-sulphate (25 mg/kg) are applied by intraperiotenal injection once in each week for a period of 5 weeks.

it was determined that body weigths of animals in the groups of control, benomyl+ α-lipoic acid, benomyl+ chondroitin-4-sulphate and benomyl+α-lipoic acid+ chondroitin-4-sulphate were significantly increased although the body weights of animals in the group of benomyl didn't change considerably.

Myeloperoxidase activities were found to be significantly increased in benomyl group when compared with control group . These enzyme activities were observed to significantly decrease in benomyl+α-lipoic acid, benomyl+ chondroitin-4-sulphate and benomyl+α-lipoic acid+ chondroitin-4-sulphate groups when compared with benomyl group.

It was determined that when C4S and LA were injected in the rats, they didn't cause an increase in kollagen fibril appearance. It was observed that fibrosis appeared in the liver of rats injected benomil and connective tissue increased in extracellular matrix and sinusoidal areas.

The protective effects of C4S and LA against subcronic liver damage and fibrosis as a result of benomyl which is used as fungucide, were examined.

Consequently, ıt can be said that C4S and LA, which are antioxidan, are effective against fibrosis and liver damage as a result of benomyl

Key words; Benomyl, α-lipoic acid, chondroitin-4-sulphate, antioxidant

TEŞEKKÜR

Tezimin planlanması ve yürütülmesinde bana her türlü olanağı sağlayan, bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren değerli hocam sayın Prof. Dr. Tülin Aktaç'a; deneysel çalışmalarım sırasında gerekli imkanların hazırlanmasında ve kullanılmasında gösterilen anlayış ve bilimsel destekten dolayı Biyoloji Bölüm Başkanlığı'na; çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Figen Ertan'a; bilimsel desteklerinden dolayı Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine; yardım ve desteklerinden dolayı Arş. Gör. Dr. Elvan Bakar'a; Arş. Gör. Dr. Utku Güner'e; katkılarından dolayı T.Ü. Deney Hayvanları Biriminde görev yapan Vet. Hek. Ziya Çukur'a; yardımlarından dolayı Yrd.Doç.Dr. Seda Balkan'a; her zaman destekleri ile yanımda olan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım

İÇİNDEKİLER

ÖZET……I

ABSTRACT……II

TEŞEKKÜR……..…III

İÇİNDEKİLER……..IV

ŞEKİLLER LİSTESİ……...VI

TABLOLAR LİSTESİ……..VIII

KISALTMALAR……IX

1.GİRİŞ

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğer Anatomisi ve Histolojisi……...6

2.2. Hepatik Fibroz…….....14

2.3. Oksidatif Stres …….....20

2.3.1. Serbest Radikaller…….....22

2.3.2. Serbest Radikallerin Oluşum Mekanizmaları……...22

2.3.3. Serbest Radikallerle Oluşan Lipid Peroksidasyonu……..24

2.3.4. Antioksidan Savunma Sistemleri……..25

2.4. Miyeloperoksidaz…...……..41

2.4.1. Biyokimyasal yapısı…….....41

2.4.2 Katalitik mekanizmalar ve in vivo substratları……..42

2.5. Glikozaminoglikanlar (GAG) …….43

2.6.Pestisitler……...46

2.6.1.Pestisitlerin Sınıflandırılması……47

2.6.2.N-metil karbamatlar …….....50

2.6.3. Benomil…….50

3. MATERYAL VE METOD ……52

3.1.Enzimatik İnceleme ……....53

3.2.Histolojik inceleme……...54

3.3.İstatistiksel Analizler ……...56

4. BULGULAR……57

4.1. Vücut Ağırlıkları……...57

4.2. Enzimatik İnceleme……....58

4.3. Histolojik İnceleme……..59

5. TARTIŞMA ……68

6.KAYNAKLAR...……..75

7.ÖZGEÇMİŞ……..95

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.1 Karaciğerin genel yapısı ve kan donanımı ……..……..6

Şekil 2.1.2. Bir karaciğer lobülünün görünümü……..8

Şekil 2.1.3. Hepatik asinus ve zonlar……12

Şekil 2.1.4. Karaciğer hücresinin elektron mikroskopik yapısı……...13

Şekil 2.2.1. Karaciğer sirozunda yapısal değişiklikler……..15

Şekil 2.2.2. Primer ve sekonder fibrogenezis……..17

Şekil 2.2.3. Stellat hücre aktivasyonu ve kollagen artışı……...19

Şekil 2.2.4. Sirozda sinüzoidlerde görülen kapillerleşme……..19

Şekil 2.3.1. Oksidatif strese bağlı hastalıklar……21

Şekil 2.3.4.1. Alfa-lipoik asit; dihidrolipoik asit kimyasal yapıları……..32

Şekil 2.3.4.2. Alfa Lipoik Asidin R ve S formlarının Kimyasal Yapıları……33

Şekil 2.5.1.Kondroitin sulfat ……..45

Şekil 2.5.2.Kondroitin-4-sulfat ……45

Şekil 2.6.3.1. Benomil'in kimyasal yapısı ..……...50

Şekil 4.2.1.: Miyeloperoksidaz aktivitesi üzerinde benomil, lipoik asit ve kondroitin-4-sülfatın Etkileri ……..…58

Şekil 4.3.1. Kontrol grubu (Masson trikrom) yeşil renkler: bağ doku, bar 100 mikron…….59

Şekil 4.3.2. Kontrol grubu (Masson trikrom) yeşil renkler : bağ doku, bar 100 mikron……60

Şekil 4.3.3. Kontrol grubu (Masson trikrom) yeşil renkler : bağ doku, bar 100 mikron …….……..60

Şekil 4.3.4. Kontrol grubu (Masson trikrom) yeşil renkler : bağ doku, bar 50 mikron …...……..61

Şekil 4.3.5. Benomil grubu (Masson trikrom) yeşil renkler : bağ doku, bar 100 mikron ……..…61

Şekil 4.3.6. Benomil grubu (Masson trikrom) yeşil renkler : bağ doku, bar 50 mikron ……..……..62

Şekil 4.3.7. Benomil grubu (Masson trikrom) yeşil renkler : bağ doku, bar 50 mikron …...……..…62

Şekil 4.3.8. Benomil grubu (Masson trikrom) yeşil renkler : bağ doku, bar 50 mikron……..……...63

Şekil 4.3.9. Benomil+lipoik asit grubu (Masson trikrom) yeşil renkler : bağ doku, bar 100 mikron…63

Şekil 4.3.10. Benomil+lipoik asit grubu (Masson trikrom) yeşil renkler: bağ doku, bar 50 mikron….64

Şekil 4.3.11. Benomil+lipoik asit grubu (Masson trikrom) yeşil renkler : bağ doku, bar 50 mikron…64

Şekil 4.3.12. Benomil+C4S grubu (Masson trikrom) yeşil renkler: bağ doku, bar 100 mikron.....65

Şekil 4.3.13. Benomil+C4S grubu (Masson trikrom) yeşil renkler : bağ doku, bar 50 mikron ……....65

Şekil 4.3.14. Benomil+C4S grubu(Masson trikrom) yeşil renkler : bağ doku, bar 50 mikron.……....66

Şekil 4.3.15. Benomil+lipoik asit+C4S grubu (Masson trikrom) yeşil renkler : bağ doku, bar 100 mikron…….66

Şekil 4.3.16. Benomil+lipoik asit+C4S grubu (Masson trikrom) yeşil renkler : bağ doku, bar 50 mikron…….67

Şekil 4.3.17. Benomil+lipoik asit+C4S grubu(Masson trikrom) yeşil renkler : bağ doku, bar 50 mikron…….67

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1: Bazı ekstrasellüler matriks proteinlerinin hücresel kaynakları……..……..….16

Tablo 2.2 : α-Lipoik asit (LA) ve Dihidrolipoik asit (DHLA) Tarafından Yakalanan Reaktif Oksijen Türleri ……..…….34

Tablo 2.3: Pestisitlerin Sağlık Üzerine Etkilerine Göre Sınıflandırılması……..……49

Tablo4.1: Sıçanlarda; Benomil, lipoik asit, ve kondroitin 4 sülfatın vücut ve karaciğer ağırlıkları üzerine etkileri……57

Tablo 4.2: Miyeloperoksidaz aktivitesi üzerinde benomil, lipoik asit ve kondroitin-4-sülfatın etkileri ……..……..58

KISALTMALAR

B: Benomil

CAT: Katalaz

CCl_4: Karbon tetraklorür

CS: Kondroitin sülfat

C4S: Kondroitin-4-sülfat

C6S: Kondroitin-6-sülfat

DHLA: Dihidroksilipoik asit

ECM: Ekstraselüler matriks

GPx: Glutatyon peroksidaz

GR: Glutatyon redüktaz

GSH: Glutatyon

HSH: Hepatik stellat hücre

HETAB :Hekzadesiltrimetil-amonyum bromür

H_20_2: Hidrojen peroksit

CAT: Katalaz

LA: α-Lipoik asit

LPO: Lipid peroksidasyon

MDA:Malondialdehit

SOD: Süperoksit dismutaz

Dk: Dakika

g: Gram

kg: Kilogram

ml: Mililitre

mg: Miligram

mM: Milimolar

µ:Mikro

µl: Mikrolitre

MPO: Miyeloperoksidaz

1. GİRİŞ

Artan dünya nüfusunun besin ihtiyacının karşılanması günümüzdeki en önemli sorunlardan biridir. Pestisit kullanımı tarımsal ürün miktarının arttırılması için tüm dünyada yaygın olarak kullanılan yöntemlerdendir. Pestisitler hedef canlı olan ürün zararlıları ile mücadelede etkin olarak kullanılırken, hedef dışı canlılarda da bazen geri dönüşümsüz organ hasarlarına, genotoksik zararlara neden olabilmektedirler (Condes-Lara vd., 1999; Çelik vd., 2005).

Pestisitler serbest radikal üretimine ve oksidatif strese yol açabilirler. Lipit peroksidasyonu, pestisitlerin neden olduğu zehirlenme mekanizmalarından biridir ve hücredeki oksidatif stresin göstergesi olarak kullanılmaktadır (Kehrer, 1993). Bilindiği gibi reaktif oksijen türleri organizmada herhangi bir nedenle aşırı miktarda üretildiği zaman nükleik asitler, lipitler, proteinler ve polisakkaritler gibi moleküllerle etkileşmekte, hücre ve doku hasarlarına yol açmaktadırlar.

Oksidasyona neden olan serbest radikaller temel olarak oksijen kaynaklı metabolitler, (süperoksit anyonları O_2^-, hidrojen peroksit H_2O_2, hidroksil radikali OH^-) hipoklorik asit, kloraminler, azot dioksit, ozon ve lipit peroksitlerdir (Kaur ve Kapoor, 2001). Bunlar organizmalar tarafından hücre içinde mitokondriyal solunum zincirinde, ya da hücre dışında, özellikle de fagositler tarafından oluşturulur. Serbest radikaller, bir atom ya da molekül yörüngesinde eşleşmemiş bir elektron içeren yüksek oranda reaktif kimyasal ürünlerdir (Sohol, 1993; Southarn ve Powi, 1993). Vücutta doğal metabolik yollarla serbest radikaller oluşmakta, ancak radikal parçalayan antioksidan sistemlerle oluşan serbest radikaller ortadan kaldırıldığından, herhangi bir sitotoksite ortaya çıkmamaktadır. Ancak bu işleyişin radikaller lehine bozulduğu durumlarda bir dizi patolojik olay ortaya çıkmaktadır (Yen ve Wu, 1999) . Bu patolojik olaylar oksidatif stres olarak da adlandırılmaktadır.

1. GİRİŞ

Artan dünya nüfusunun besin ihtiyacının karşılanması günümüzdeki en önemli sorunlardan biridir. Pestisit kullanımı tarımsal ürün miktarının arttırılması için tüm dünyada yaygın olarak kullanılan yöntemlerdendir. Pestisitler hedef canlı olan ürün zararlıları ile mücadelede etkin olarak kullanılırken, hedef dışı canlılarda da bazen geri dönüşümsüz organ hasarlarına, genotoksik zararlara neden olabilmektedirler (Condes-Lara vd., 1999; Çelik vd., 2005).

Pestisitler serbest radikal üretimine ve oksidatif strese yol açabilirler. Lipit peroksidasyonu, pestisitlerin neden olduğu zehirlenme mekanizmalarından biridir ve hücredeki oksidatif stresin göstergesi olarak kullanılmaktadır (Kehrer, 1993). Bilindiği gibi reaktif oksijen türleri organizmada herhangi bir nedenle aşırı miktarda üretildiği zaman nükleik asitler, lipitler, proteinler ve polisakkaritler gibi moleküllerle etkileşmekte, hücre ve doku hasarlarına yol açmaktadırlar.

Oksidasyona neden olan serbest radikaller temel olarak oksijen kaynaklı metabolitler, (süperoksit anyonları O_2^-, hidrojen peroksit H_2O_2, hidroksil radikali OH^-) hipoklorik asit, kloraminler, azot dioksit, ozon ve lipit peroksitlerdir (Kaur ve Kapoor, 2001). Bunlar organizmalar tarafından hücre içinde mitokondriyal solunum zincirinde, ya da hücre dışında, özellikle de fagositler tarafından oluşturulur. Serbest radikaller, bir atom ya da molekül yörüngesinde eşleşmemiş bir elektron içeren yüksek oranda reaktif kimyasal ürünlerdir (Sohol, 1993; Southarn ve Powi, 1993). Vücutta doğal metabolik yollarla serbest radikaller oluşmakta, ancak radikal parçalayan antioksidan sistemlerle oluşan serbest radikaller ortadan kaldırıldığından, herhangi bir sitotoksite ortaya çıkmamaktadır. Ancak bu işleyişin radikaller lehine bozulduğu durumlarda bir dizi patolojik olay ortaya çıkmaktadır (Yen ve Wu, 1999) . Bu patolojik olaylar oksidatif stres olarak da adlandırılmaktadır.

Oksidatif stresin; lipit peroksidasyonu, enzimlerin inaktivasyonu ve aktivasyonu, kanser, arterosklerozis, kardiyovasküler hastalıklar, sıtma, nörodejeneratif hastalıklar, böbrek bozuklukları, immun sistem bozukluğu, katarakt, DNA hasarı ve yaşlanmaya neden olan birçok etkileri olduğu saptanmıştır (Halliwell, 1997). Serbest radikaller organizmada normal olarak meydana gelen oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları sırasında oluştuğu gibi çeşitli dış kaynaklı etkenler ile de oluşabilir. Serbest radikal yaratan kaynaklar radyasyon, virüsler, güneş ışınlarının bir kısmı olan ultraviole ışınları, hava kirliliğini yaratan fosil kökenli yakıtların yanma sonundaki ürünleri, sigara dumanı, enfeksiyon, stress, yağ metabolizması sonunda çıkan ürünler gibi hücre metabolizmasının toksik ürünleri, bazı tahrip edici kimyasallar, haşere kontrol ilaçları ve birçok başka etkenlerdir (Bolzan ve Bianchi, 1997; Schoneich, 1999).

Pestisit zehirlenmelerinde mekanizmalardan biri de lipid peroksidasyonudur (Kehrer, 1993). Bu mekanizmalarla açığa çıkan serbest radikallerle hücre zarları, DNA, RNA gibi yapılarda hasar meydana gelir. Bu durum, pestisidlerin pekçok organda neden oldukları hasarın temel nedenleri arasında yer almaktadır. (Kaya vd., 1998).

Vücudun en büyük organı olan karaciğer kimyasal maddelere karşı çok duyarlıdır. Nedeni yabancı kimyasal maddelerin biyotransformasyona uğradığı başlıca yer olmasıdır. Ayrıca karaciğerde bu maddeleri metabolize eden enzimlerin, sitokrom P-450 monooksijenaz sisteminin konsantrasyonu oldukça yüksektir. Bu nedenle ksenobiyotiklerin aktivasyonu ile oluşan birçok aktif metabolitler burada hepatotoksik maddelere dönüşürler. Bu maddeler karaciğer bozukluklarının etiyolojisi ve patojenitesinde etken olurlar (Vural, 2005).

Karaciğere zarar veren kimyasal maddeler en az yüzyıldan beri bilinmektedir.1880 li yıllarda, bilim adamları sarı fosforla oluşan karaciğer yağlanmasının mekanizmalarını araştırmışlardır. Daha sonraları arsfenamin, klorluhidrokarbonların (karbon tetraklorür, kloroform gibi) deney hayvanlarında hepatotoksik etkileri araştırılmıştır.

Oksidatif stres, stellat hücre aktivasyonu ile kollajen sentezini artırarak karaciğer fibrozu gelişiminde etkili olmaktadır. Oksidatif stres, serbest radikallerin artması veya antioksidan savunma mekanizmalarının zayıflamasıyla oluşabilmektedir. Serbest radikaller hepato-biliyer hastalıkların önemli bir kısmının patogenezinde kofaktör olarak yer almaktadır (Şentürk, 2004). Karaciğer fibrozunun etiyopatogenezinde; serbest radikallerce oluşturulan oksidatif stres ve lipid peroksidasyonunda artış etkili bulunmuştur (Shimizu vd., 1999; Montilla vd., 2001).

Oksidatif stres ve lipid peroksidasyon ürünleri stellat hücrelerini uyararak kollajen sentezini artırabilmektedir. Ayrıca lipid peroksidasyonunun hücre kültüründe kollajen gen transkripsiyonunu stimüle ettiği gösterilmiştir (Svegilati Baroni vd., 1998; Shimizu vd., 1999). Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehidin (MDA) stellat hücreleri aktive ettiği ve bu aktivasyonun antioksidan ajan etkisiyle bloke edildiği gösterilmiştir (Lee, 1995).

Serbest radikal hasarlarını değerlendirmede oksidan ve antioksidan parametreler çalışılarak ajanlarla elde edilen etkinliklerin ilişkileri değerlendirilebilmektedir. Serbest radikaller doku hasarının bir göstergesi olması yanında, stellat hücrelerin uyarımı ile de kollajen sentezini artırarak patolojik sürece aracılık ederler (Lee vd., 1995).

Siroz hastalığında temel patoloji olan karaciğer fibrozu, karaciğerde başta kollajen olmak üzere hücre dışı matriks proteinlerinin birikimi ile karakterizedir (Shimizu vd., 1999). Hücre dışı matriks proteinleri, hasarlı karaciğerde Disse aralığındaki stellat hücreler (İto hücresi, yağ depolayan hücre, liposit) tarafından üretilerek karaciğer fibrozunu oluştururlar. Üretilen hücre dışı matriks proteinleri; kollajen tip I, III ve IV, fibronektin, laminin ve proteoglikanlar olup (Shimizu vd., 1999), bunlardan en çok artanları kollajen tip I ve III ' dür (Rojkind vd., 1979).

Antioksidanlar, serbest radikalleri nötralize ederek vücudun onlardan etkilenmemesini veya kendini yenilemesini sağlayan maddelerdir. Antioksidanlar gıdalarda düşük konsantrasyonlarda bulunduğunda okside olabilir diğer substratlara oranla, o substratın oksidasyonunu önemli ölçüde geciktiren veya engelleyen maddelerdir (Aruoma, 1998). Antioksidanlar, endojen (doğal) ve eksojen kaynaklı antioksidanlar olmak üzere başlıca iki gruba ayrılabilirler. α-Lipoik asit (LA) ve kondroitin 4-sülfat (C4S) endojen kaynaklı antioksidanlar grubunda yer almaktadırlar.

Alfa lipoik asid (α-LA) tiyol grubu içeren, antioksidan özelliği olan bir moleküldür. Ditiyolan halkası sayesinde yüksek bir indirgeme özelliğine sahiptir. Diyette yeterli miktarda bulunmasına rağmen; fizyolojik sistemlerde mitokondride bulunan lipoik asid sentaz tarafından sentezlenebilmektedir. Vücutta dihidrolipoik asid (DHLA)'e indirgenir. DHLA antioksidan etkisinin yanında özellikle demir varlığında prooksidan etki gösterebilir (Çakatay, 2006). Çeşitli organizmalarda farklı yollarla oluşturulan oksidatif stres modelleri üzerinde LA ve kondroitin sülfatın (CS) koruyucu etkilerinin araştırıldığı bazı çalışmalar vardır. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada, cisplatin ile kohleada meydana getirilen ototoksisitenin α-lipoik asit tarafından önemli ölçüde geriletildiği gösterilmiştir (Rybak vd., 1999). Bir başka çalışmada ise, sıçanlara CCl_4 ile oluşturulan hepatoksisite modelinde, intraperitonal olarak uygulanan kondroitin sülfatın antioksidatif etkisi rapor edilmiştir (Ha ve Lee, 2003). Pires Das Neves ve arkadaşları, yaptıkları bir çalışmada farelerde oluşturdukları sodyum arsenit toksisitesine karşı α-lipoik asitin koruyucu bir etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir (Pires Das Neves vd., 2004). Farelerde yapılan bir başka çalışmada, α-lipoik asitin X-ışınlarının neden olduğu oksidatif stresi gerilettiği belirtilmiştir (Manda vd. 2007). Bir diğer çalışmada, asetaminofene bağlı olarak oluşan hepatik ve renal hasarlarda α-lipoik asitin koruyucu etkisi gösterilmiştir (Abdel-Zahaer vd., 2008).

Serbest oksijen radikallerinin etkilerini ortadan kaldırmak için canlı organizmada çeşitli savunma mekanizmaları bulunmaktadır. Serbest radikalleri etkisizleştiren antioksidanlar, lipid peroksidasyonunu engellemelerinin yanında protein, nükleik asidler ve karbonhidratlar gibi

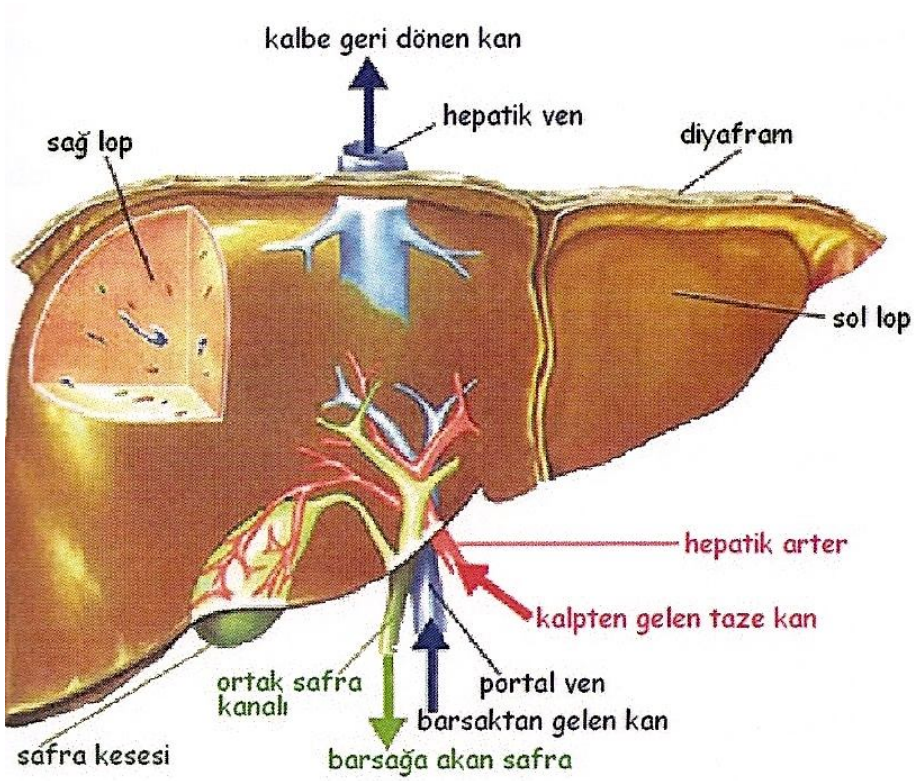
hedef moleküllerin korunmasını sağlarlar. Serbest radikaller, fagositler ve myofibroblastların aktivitelerini artırırlar. Lipid peroksidasyonu ve lipid peroksidasyon ürünleri ile oluşturulan fibrozun, hayvan modellerinde antioksidanların kullanımı ile azaltıldığı gösterilmiştir (Muriel 1998).

Bu çalışmada, subkronik benomil uygulaması ile oluşturulan karaciğer hasarı ve fibrozda, kondroitin 4-sülfat ve α-lipoik asit'in tek tek ve birlikte uygulanmalarının etkilerinin araştırılması planlanmıştır. Bu amaçla, karaciğer hasarı miyeloperoksidaz aktivitesi ölçümü ile ve kollagen fibril artışı histokimyasal olarak kollagen boyaması ile belirlenecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğer Anatomisi ve Histolojisi

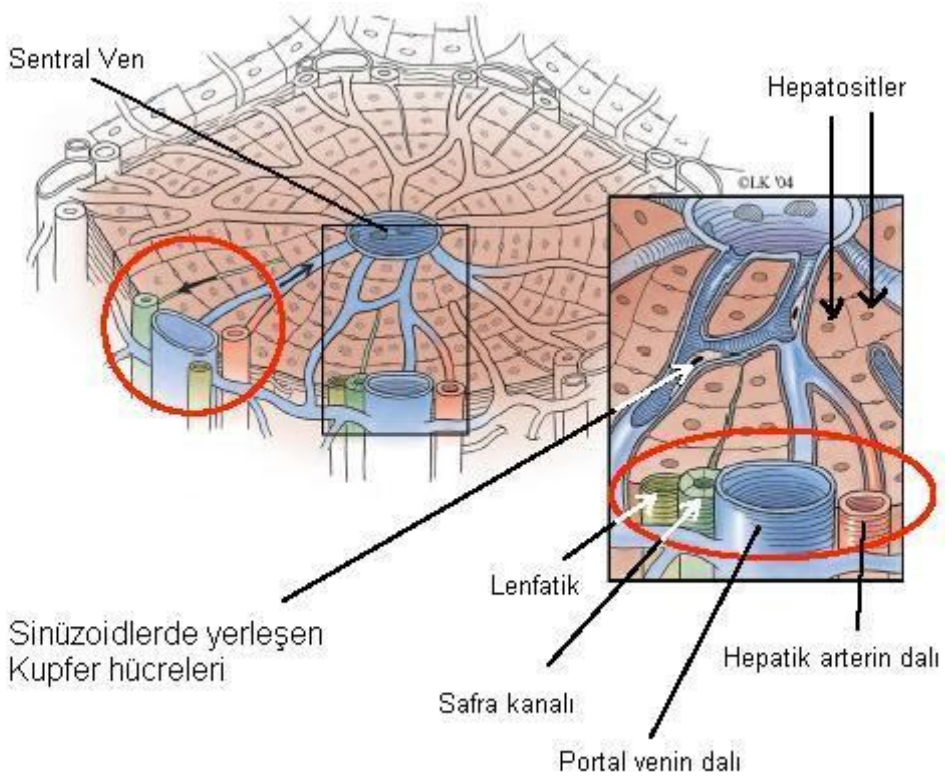
Karaciğer, vücudun en büyük tek organı ve en büyük bezidir. Ağırlığı yaklaşık 1,5-2 kg'dır. Vücudun sağında, diyaframın altında abdominal boşlukta yerleşmiştir. Sağ ve sol olmak üzere iki lobtan oluşan karaciğer hepatik arterden ve portal venden kanlanır (Şekil 2.1.1). Karaciğere gelen kanın %70-80'i portal venden, %20-30'u hepatik arterden gelir. Tüm ince barsaklar boyunca emilen maddelerin çoğu portal ven yoluyla karaciğere ulaşır, şilomikronlar ise lenfatikler ile gelir. Karaciğer ince bir bağ dokusu kapsülü (Glisson kapsülü) ile örtülüdür. Hilus portal ven ve hepatik arterin giriş, sağ ve sol hepatik kanallar ve lenfatiklerin çıkış yeridir (Junqueira vd, 1993). Glisson kapsülünden içeri doğru uzanan Tip-I ve Tip-III kollagen lifler içeren bağ dokudan bölmeler karaciğeri lobüllere ayırır (Aktümsek, 2004; Birvar ve Dergün, 1989; Blackbourne vd., 2001).



Şekil 2.1.1 Karaciğerin genel yapısı ve kan donanımı (http://www.answer-my-healthquestion.info/images/how-to-detoxify-your-liver-l.jpg).

Karaciğer lobülleri, ortalama 0,2x2 mm boyutlarında olup en küçük yapısal ve işlevsel birimleri oluştururlar. Bunlara klasik lobül (lobulus hepaticus) denir. Lobüllerin merkezinde yer alan vena centralislerin duvarında bulunan lifler, tip-I kollagen liflerdir (Aktümsek, 2004; Hatiboğlu, 2004; Yoshikawa vd., 2002). Karaciğerde fonksiyonel ve yapısal birim karaciğer lobülüdür. Klasik karaciğer lobülü genelde altıgen olarak tarif edilen, kan sinüzoitlerinin birleştiği merkezi bir venül içeren çok yüzlü bir yapıdır. (İnt. Kyn1) Lobüller birbirleriyle yakın temasta oldukları için, kesin sınırı belirlemek oldukça güçtür. Lobüllerin aralarında safra kanalları, lenfatikler, sinirler ve kan damarları içeren bağ dokusu bölgelere portal alanlar denilmektedir (Şekil 2.1.2). Portal alanlar, lobüllerin köşelerinde bulunur ve portal triadları içerir. Her bir portal triadda bir ven (portal venin dalı), bir arter (hepatik arterin dalı), bir kanal (safra kanalının bir parçası) ve lenfatik damarlar bulunur. Bu yapıların hepsi bir bağ dokusu içerisindedir. İnsan karaciğerinde her lobülde 3-6 portal triad bulunur (Junqueria vd, 1998).

Klasik karaciğer lobülü; vasküler, biliyer damarlar ve bağ dokusuyla ayrılmış polihedral bir yapıdır. Merkezi ven lobülün merkezindedir. Parankimal epitel hücrelere ait tek hücre tabakaları merkezi venden çıkarak yayılırlar. Sinuzoidler; karaciğer hücre tabakalarının her iki tarafına kan taşıyan vaskuler kanallardır. Bunlar merkezi ven yakınlarında zengin intralobuler, vaskuler bir ağ oluştururlar. Sinuzoidleri kaplayan hücreler endotel hücreleri ve Kupffer hücreleridir. Sinüzoidlerde bol miktarda tip-IV kollagen bulunur (Yoshikawa vd, 2002).



Şekil 2.1.2. Bir karaciğer lobülünün görünümü (http://www.bartleby.com/107/250.html)

Endotelyal hücreler ile hepatositler arasındaki doku aralığı Disse aralığı olup; besin maddeleri ile kan ve karaciğerden artık ürünlerin transferini sağlayan interstisyel sıvıyı içerir (Diler, 2005). Disse aralığı, karaciğer parankim hücreleri ile sinüzoidler arasında yoğun madde geçişinin gerçekleştiği bir aralıktır. Madde geçişine uygun hücrelerarası matriks, kollagen lifleri ve retikulum liflerini içerir (Junqueria vd, 1998).

Disse aralığında, delikli bazal membrandan süzülen plazma, özellikle tip I ve tip IV olmak üzere kollajenler, fibronektin ve proteoglikanlar bulunur. Disse aralığında kollajen fibriller hepatositlere destek olan retiküler çatıyı oluşturur. Bu çatının korunması da karaciğerin rejenerasyonunun ve bütünlüğünün devamı için gereklidir. Eğer retikuler çatı bozulur ise hepatosit hasarının iyileşmesi fibroz ile sonuçlanır. Karaciğer fibrozunun artışı aynı zamanda kan akımını ve karaciğer içi kan dolaşımını etkileyerek, onun yeniden düzenlenmesine ve

vaskuler çatının bozulmasına, sonuç olarak da siroza yol açmaktadır (Bissel, vd., 1990; Bissel, vd., 1996).

Hepatositler, dar aralıklar bırakarak (perisinüzoidal aralık), sinüzoid tipi kapiller yapılarla birlikte v.centralisin çevresinde ışınsal olarak uzanan kordonlar yaparlar. Karaciğerde kollagen üretimiyle ilgili olarak yapılan çalışmalar; hepatositler, uydu (stellat) hücreleri ve endotel hücrelerinin, normal insan karaciğerinde bulunan ekstrasellüler matriks bileşenlerinin üretiminde yer aldığını göstermektedir. Normalde tip-III ve Tip-IV kollagen sentez etmeyen hepatositler, fibroziste bu kollagenleri üretebilir duruma geçerler (Clement,vd., 1986).

Karaciğerdeki hücrelerin %65'ini, karaciğer hacminin %80'ini hepatositler oluşturur. Parankimde, hepatositlerin dışında Kupffer hücreleri (sinuzoidal makrofajlar) ve perisinuzoidal yıldızsı hücreler (İto hücreleri) bulunur. Hepatositler, karaciğer lobülü içinde ışınsal olarak dizilmişlerdir. Karaciğer hücreleri (hepatositler); 20-30 mikron çapında, poligonal hücrelerdir. Hematoksilen eozinle (H.E) boyanmış kesitlerde; çok sayıda mitokondri ve bir miktar düz endoplazmik retikulumun bulunması nedeniyle, hepatositin sitoplazması eozinofiliktir. Her bir hepatositin yüzeyi; diğer hepatositlerin yüzeyi ve Disse aralığı boyunca sinuzoidlerin duvarıyla temas halindedir. Bir hepatositin bazolateral ve apikal olmak üzere iki adet hücresel bölgesi bulunur. *Bazolateral bölge* çok sayıda mikrovillus içerir ve yüzü *Disse aralığına* doğrudur. Bu bölge kandan kaynaklanan maddelerin emilmesine ve plazma proteinlerinin salgılanmasına katkıda bulunur. *Apikal bölge* ise mikrovilluslarla çevrelenmis bir girinti şeklinde olup safra kanalikülünün kenarını çevreler. İki hepatositin bitişik olduğu her yerde, hücrelerin arasında safra kanalikulu olarak bilinen tübüler bir aralık bulunur. Safra kanalikulleri; safra kanal sisteminin ilk kısımlarıdır. Safra kanalikülleri karaciğer lobulunun plakları boyunca anastomoz yapan karmaşık bir ağ oluştururlar ve portal alanlarda sonlanırlar. Bu nedenle safra kanın ters yönünde, yani lobülün merkezinden çevresine doğru ilerleyerek, kübik hücrelerden oluşmuş safra kanalcıkları ya da Hering kanallarına girer. Kanalcıklar kısa bir mesafe katettikten sonra portal alanlardaki safra kanallarında sonlanırlar. Safra kanalları; kübik ya da prizmatik epitel ile

örtülüdür ve belirgin bir bağ dokusu kılıfına sahiptir. Safra kanalları; sağ ve sol hepatik kanalları oluşturarak karaciğeri terk ederler. Safra kanalının epitel hücreleri, bazal membranlarını oluşturan tip IV kollageni üretirler.

Hepatosit; bol miktarda kaba ve düz endoplazmik retikuluma sahiptir. Hepatositte kaba endoplazmik retikulum; sitoplazma içine saçılmış kümeler oluşturur, bunlar bazofilik cisimler olarak isimlendirilir. Bu yapılardaki poliribozomlarda birkaç tip protein (kan albumini, fibrinojen) sentezi yapılır. Sitoplazma içinde yaygın olarak dağılmış düz endoplazmik retikulum; çeşitli maddelerin vücuttan atılmadan önce etkisizleştirilmesi için gerekli oksidasyon, metilasyon ve konjugasyon işlemlerinden sorumludur. Hepatositte bulunan diğer bir organel de lizozomlardır. Hepatosit lizozomları; hücre içi organellerin yıkımı ve dönüşümü için önemlidir. Peroksizomlar da; lizozomlar gibi enzim içeren ve hepatositlerde bol miktarda bulunan organellerdir. Peroksizomların işlevlerinden bazıları; yağ asitlerinin oksidasyonu ve bu oksidasyon sonucunda oluşan H_2O_2' in katalaz aktivitesi yoluyla yıkılması, pürinlerin (AMP, GMP) fazlasının ürik asite yıkılması, kolesterol, safra asitleri ve miyelin yapımında kullanılan bazı lipidlerin sentezine katılmasıdır (Aytekin ve Solakoğlu,2006).

Hepatositte Golgi kompleksleri de bol miktardadır. Bu organelin işlevleri arasında; lizozomların oluşturulması ve plazma proteinlerinin (örn. albumin, kompleman sisteminin proteinleri), glikoproteinlerin (örn. transferrin) ve lipoproteinlerin (örn. çok düşük yoğunluklu lipoproteinler; VLDL) salgılanması vardır (Aytekin ve Solakoğlu, 2006).

Endotel hücrelerinin yanında, sinüzoitler mononükleer fagositik serinin fagositik hücreleri olan Kupffer hücrelerini de içerir. *Kupffer hücreleri* tipik makrofajlardır ve endotel hücrelerinin lümene bakan yüzeyinde bulunur. Yaşlı eritrositleri metabolize etmek, hemoglobini sindirmek ve immünolojik olaylarla ilgili proteinleri salgılamak Kupffer hücrelerinin başlıca görevleridir. Yağ depolayıcı hücreler olan *İto hücreleri* ise Disse aralığına yerleşmiş yıldızsı hücrelerdir. Bu hücreler dışarıdan verilen A vitaminini lipit damlaları içinde retinil esterler

halinde biriktirme kapasitesine sahiptir ancak A vitamini metabolizmasındaki rolü tam olarak bilinmemektedir (Sadler,1993; Şeftalioğlu,1998). İto hücreleri düşük miktarlarda tip-I, tip-III ve yüksek miktarda tip-IV kollagen salgılarlar.

Karaciğer Lobülleri:

1) Klasik karaciğer lobülü: Enine kesitlerde lobül altıgen şeklindedir. Her köşesinde Glisson üçgeni ortasında vena sentralis bulunur. Vena sentralis çevresinde ışınsal seyirli karaciğer hücreleri vardır. Tek hücre kalınlığındaki karaciğer hücre kordonlarına "Remark hücre kordonları" denir.

2) Portal lobül: Safra salgılanışı göz önüne alınmıştır. Portal aralık içindeki bir safra duktusuna safra veren komşu karaciğer hücrelerince oluşturulur. Üç klasik karaciğer lobülünün vena sentralislerinin birleştirilmesiyle oluşur.

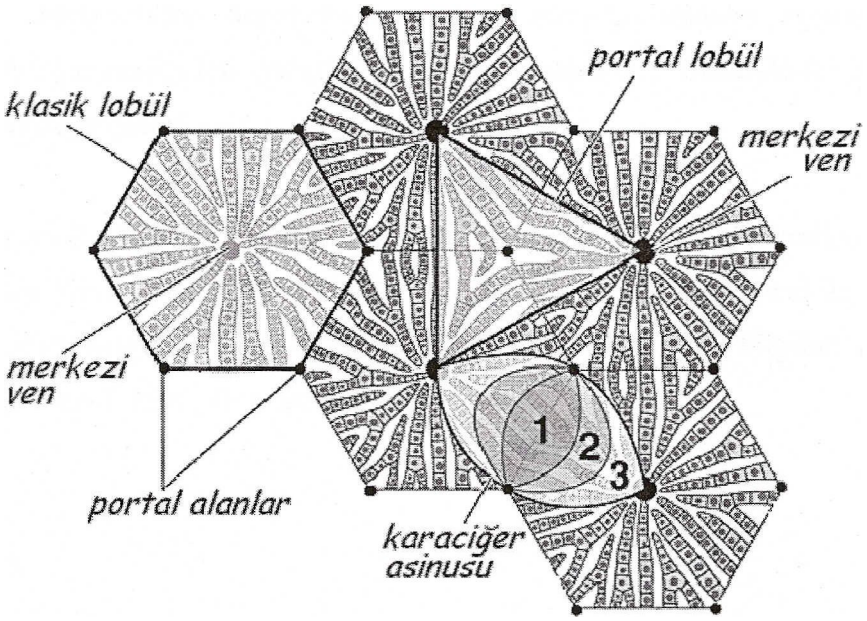
3) Asinüs: İki komşu klasik lobül içinde aynı interlobüler venden kanlanan hücre gruplarıdır. Lobüller arasında ilerleyen interlobüler ven komşu iki lobüle dağılır. Sınırları iki vena sentralis ve iki portal aralığın birleştirilmesi ile oluşur.

Hepatositler kanlanmaya göre 3 zona ayrılır.

1) Periferik zon: Glikojen, oksijenden en zengin kanla karşılaşan hücreler vardır. Glikojenin en çok depolandığı yerdir.

2) Ara zon: Periferik ve santral zon arasında kalan alandır

3) Santral zon: Vena sentralis çevresindeki dinlenme evresindeki hücrelerdir. Yağ birikimi bu zondaki hücrelerde başlar.

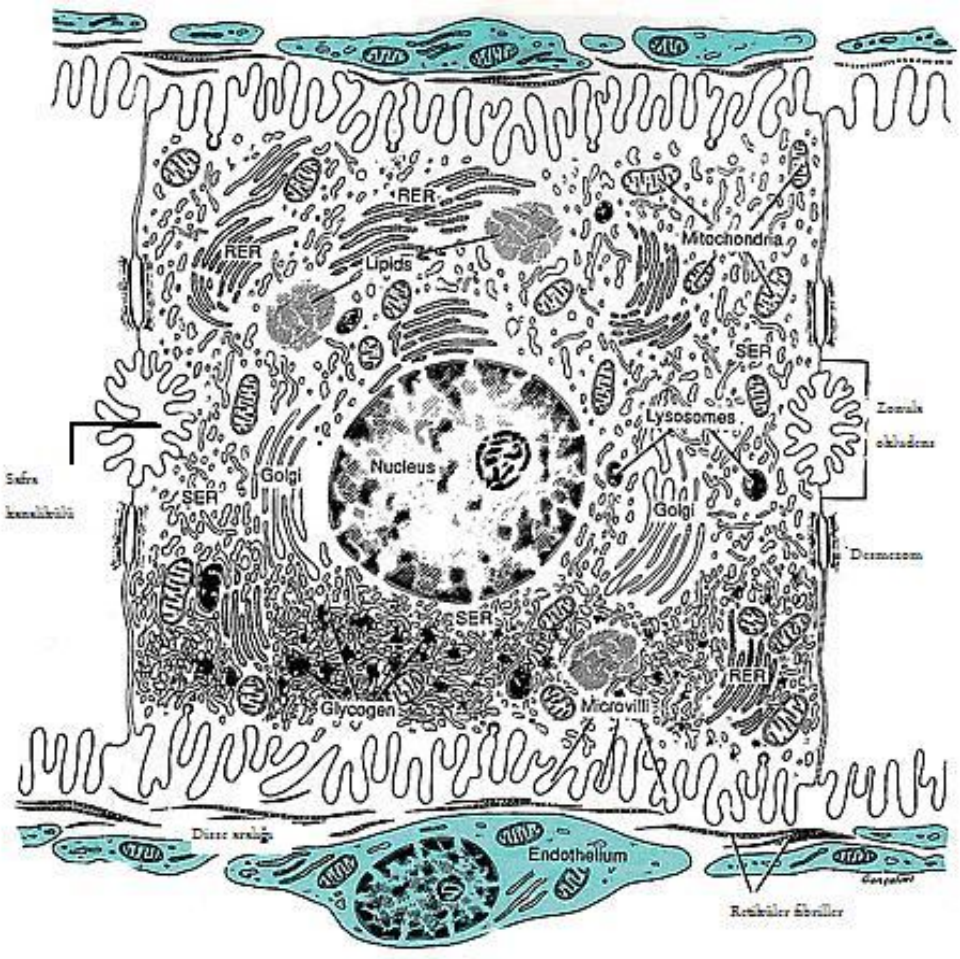


Şekil 2.1.3. Hepatik asinus ve zonlar. PA: portal alan, MY: merkezi ven (http:/ /www.drcemre.googlepages.com/k.catanomi3 - full.jpg)

Karaciğerin fonksiyonel birimlerinden biri de karaciğer parankimasının birimi olarak kabul edilen hepatik asinusdur (Şekil 2.1.3). Hepatik asinus, iki komşu lobül içinde aynı interlobüler venden kanlanan hücre grupları olarak tanımlanır. Lobüller arasında ilerleyen interlobüler ven komşu iki lobüle dağılmaktadır. Hepatik asinus da dağıtıcı venlere olan yakınlığına göre zonlara ayrılır. I. zondaki hücreler damarlara en yakın ve bu nedenle de gelen kandan ilk olarak etkilenen hücrelerdir. II. zondaki hücreler kana ikinci derecede cevap veren hücrelerdir, III. Zondaki hücreler ise, önceden I. ve II. zondaki hücreler tarafından değiştirilmiş olan portal ven kanıyla karşılaşacaktır. Bu zonal düzenleme, hepatositlerin çeşitli zararlı ajanlar ya da hastalıklarda, farklı derecelerde hasar görmelerinin nedenini açıklayabilir.

Karaciğer; yaşam için gerekli birçok farklı fonksiyona sahiptir. Aminoasitleri, karbonhidratları, lipidleri, vitaminleri, mineralleri alır, işler ve depolar. Albumin, α ve β globulinler, pıhtılaşma faktörleri ve transport proteinleri dahil olmak üzere birçok plazma proteini karaciğer hücreleri (Şekil 2.1.4) tarafından sentezlenmektedir. Karaciğer; ilaçlar ve

toksinler gibi ekzojen bileşiklerin detoksifikasyonunda primer organdır. Karaciğerin diğer önemli bir fonksiyonu da bilirubinin glukuronik asitle konjugasyonudur. Karaciğer; safra asitlerinin kolesterolden sentezi ve safraya sekresyonu; böylece kolesterol metabolizmasının düzenlenmesi ve diyetsel yağların absorbsiyonunun kolaylaştırılmasından da sorumludur. Karaciğer; tiroid, steroid ve diğer hormonların başlıca katabolizma yeridir ve plazma hormon düzeylerinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Aytekin ve Solakoğlu, 2006).



Şekil 2.1.4. Karaciğer hücresinin elektron mikroskopik yapısı (www.med-ed.virginia.edu/.../MMHndt_Liver.html)

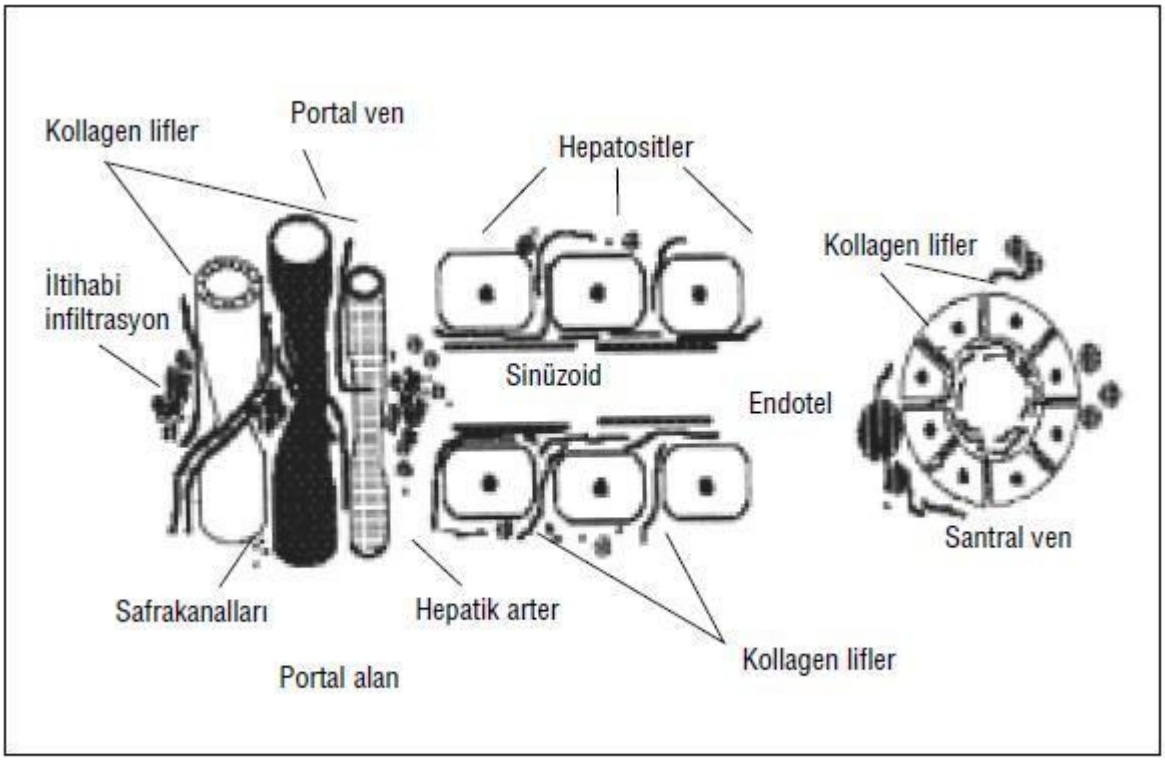
2.2. Hepatik Fibroz

Karaciğerin fibrozisi karaciğerde hasar oluşturan tekrarlayıcı veya kronik uyarılara karşı sekonder gelişen, bağ dokusunun progresif birikimiyle sonuçlanan "yara iyileşmesi benzeri" karmaşık ve dinamik bir süreçtir (Combettes vd., 1988; Krahenbühl vd., 1994).

Altta yatan etyolojik faktörden ve hasarı tetikleyen mekanizmalardan bağımsız olarak fibrozis süreci içinde ekstraselüler matriks yapımında artış, skleroza dönüşme eğilimi ve bağ dokusunun dejeneratif değişimi sonucunda birçok kronik karaciğer hastalığının son noktası olan karaciğer sirozuna kadar uzanan bir süreç görülmektedir (Combettes vd., 1988).

Eğer karaciğerde hasara yol açan durum akut ve geçici ise inflamatuvar bir yanıt sonrası parankimal hücreler rejenere olmakta ve nekrotik ya da apoptotik hücrelerin yerini almaktadır. Fakat hasar kronikleşirse rejenerasyon yetersiz kalır ve hepatositlerin yerini fibriler kollajenden zengin ECM alır. Bu fibroz materyalin birikim yeri, etiyolojiye bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Örneğin kronik viral hepatitlerde ve kronik kolestatik hastalıklarda fibrotik materyal portal alanların etrafında birikirken, alkole bağlı karaciğer hastalığında perisentral ve perisinuzoidal alanlarda olmaktadır. Ancak fibrotik süreç ilerledikçe ayrım yapmak güçleşmektedir. Kollajen bantlar, fibrotik köprülere dönüşmekte ve nihayetinde siroz gelişmektedir (Bataller ve Brenner, 2005).

Başlangıcında etiyolojik nedene bağlı olarak gelişen bir hepatoselüler hasar ve buna eşlik eden iltihabi infiltrasyon sözkonusudur. Uzun süre devam eden iltihabi infiltrasyon karaciğerde aşırı bağ dokusu birikimi olarak ifade edebileceğimiz fibrozise neden olmakta, gelişen fibrozis karaciğerin normal yapısı ile mikrovasküler ilişkilerini bozmakta ve devam eden bu süreç neticesinde karaciğer sirozu gelişmektedir. Bu yapısal değişiklikler presinüzoidal alan, sinüzoidler düzeyi ve postsinüzoidal alanda (santral ven) farklı morfolojik oluşumlarla temsil edilir (Şekil 2.2.1) (www.steteskop.net).



Şekil 2.2.1. Karaciğer sirozunda yapısal değişiklikler (www.steteskop.net)

Fibrozisi anlayabilmek için, ekstraselüler matriksin yapısını bilmek ve karaciğerin parenkimal (hepatosit) ve non-parenkimal hücrelerinin kronik karaciğer hastalığı zemininde gelişen iltihabi infiltrasyona verdiği yanıtı incelemek gerekir. Karaciğerin hücresel yapısının yaklaşık %65'ini hepatositler, %35'ini ise nonparankimal hücreler oluşturur. Nonparankimal hücre topluluğunun büyük kısmı(%70) endotelyal hücrelerdir. Kupffer hücreleri %20, yıldızsı hücreler (hepatic stellate cells) yaklaşık %10 kadardır. Ekstrasellüler matriksin yapısında başta kollagen olmak üzere, proteoglikanlar, fibronektin, nidogen, undulin (elastin), laminin, hyaluronat ve tenascin gibi matriks proteinleri bulunur. Bu proteinler karaciğerdeki çeşitli hücreler tarafından sentezlenip salgılanır (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Bazı ekstrasellüler matriks proteinlerinin hücresel kaynakları (www.steteskop.net)

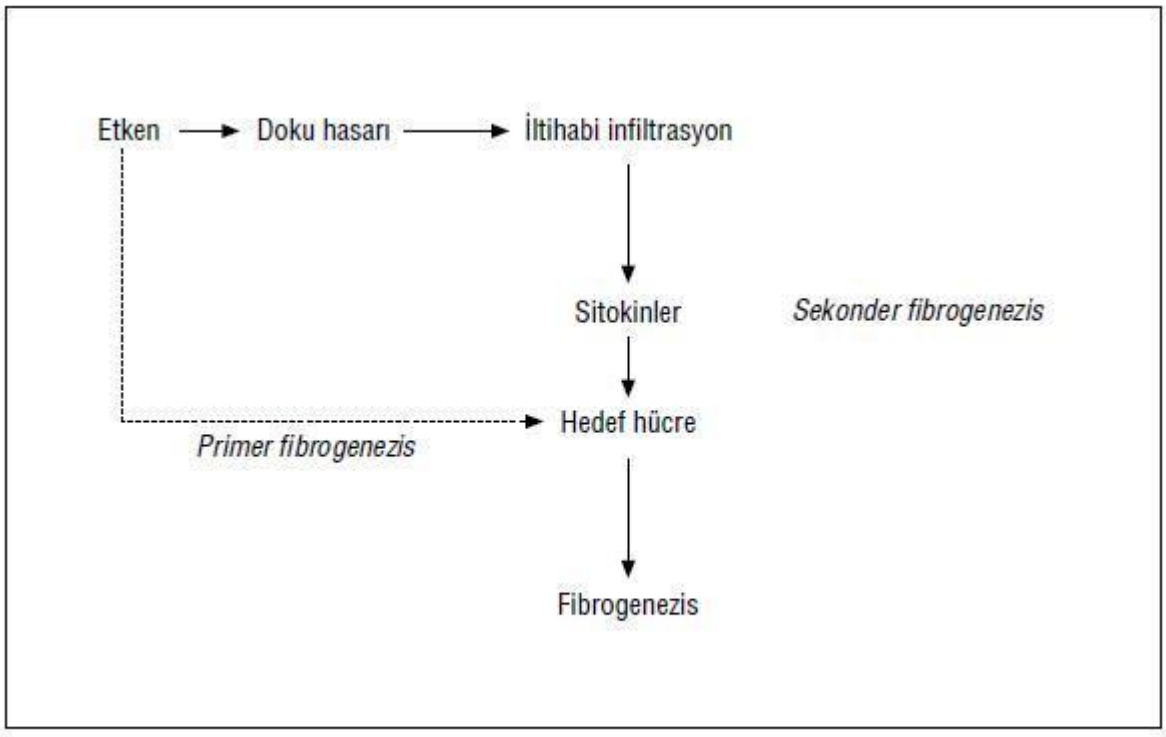
Matriks proteini	Hepatosit	Yıldızsı hücreler	Endotelyal hücreler	Kupffer hücreleri	Safra yolu epiteli
Fibronektin	+	++	-	-	?
Laminin	-	+	-	-	+
Kollagen- I	+/-	+	-	-	-
Kollagen-III	+/-	++	-	-	-
Kollagen-IV	-	+	+	-	+
Decorin	-	+	?	-	?

Bu hücrelerden ekstrasellüler matriks sentezindeki en önemli rol yıldızsı hücrelere (hepatik stellat hücre-HSH) aittir. İltihabi infiltrasyon ortamında bazı yapısal değişikliklere uğrayan bu hücrelerin lipid içeriği ve retinoid konsantrasyonu azalırken hücre yüzey reseptörlerinde de bazı değişiklikler meydana gelir. Morfolojik olarak da önemli ölçüde değişmiş olan hücrenin bu yeni formu "miyofibroblast" olarak adlandırılır. Miyofibroblastlar ekstraselüler matriks proteinlerinin sentez ve sekresyonu yanısıra çok sayıda profibrogenik sitokin ve büyüme faktörünün sentezinden de sorumludur. Yıldızsı hücrelerin uyarımı diğer nonparankimal hücreler üzerinden olabileceği gibi hepatositler tarafından da başlatılabilir.

Ekstrasellüler matriks yalnızca bir dolgu malzemesi olmayıp, hücresel fonksiyonları da etkileyen dinamik bir dokudur. Disse aralığında, HSH'ler veya diğer ECM üretebilen hücreler tarafından salgılanan ECM bir taraftan yeni damarlanmayı uyarırken diğer taraftan içerisindeki glikoproteinler, proteoglikanlar ve glikozaminoglikanlar aracılığı ile başka HSH'lere bağlanarak onların da aktive olmasına sebep olabilir. Böylece ECM üretimi daha da artmaktadır. ECM biriktikçe sinuzoidal endotel hücrelerin aralarındaki delikler kapanmakta ve hepatositler

mikrovilluslarını kaybetmektedir. Bunun neticesinde sinuzoidlerden hepatositlere madde transportu engellenmektedir (Friedman vd, 1989, Friedman 2007).

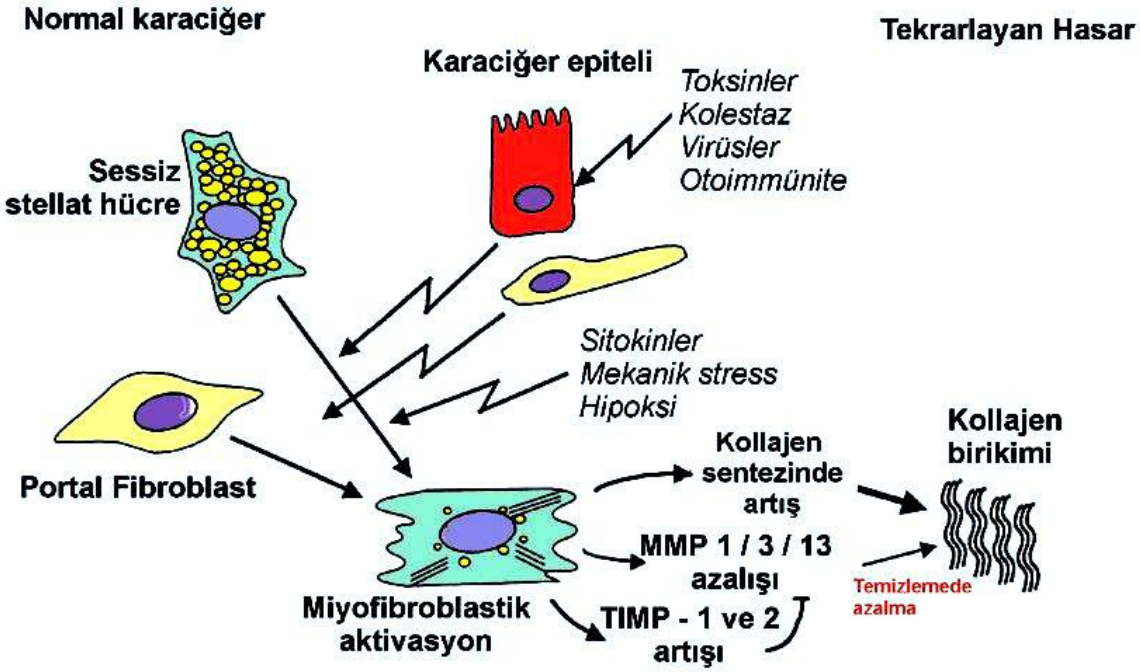
Fibrogenezisi başlatan süreç immun yanıt, yara iyileşmesi gibi bir neden ya da primer fibrogenezis şeklinde oluşabilir. Bunların ilk ikisinde fibrogenetik uyaran iltihabi infiltrasyon üzerinden gelişen indirekt bir etkileşime dayanırken alkolik karaciğer hastalığı ve hemokromatozisde alkol metabolitleri (asetaldehid) ve demirin direk uyarıcı etkisi ön planda yer almaktadır (Şekil 2.2.2).



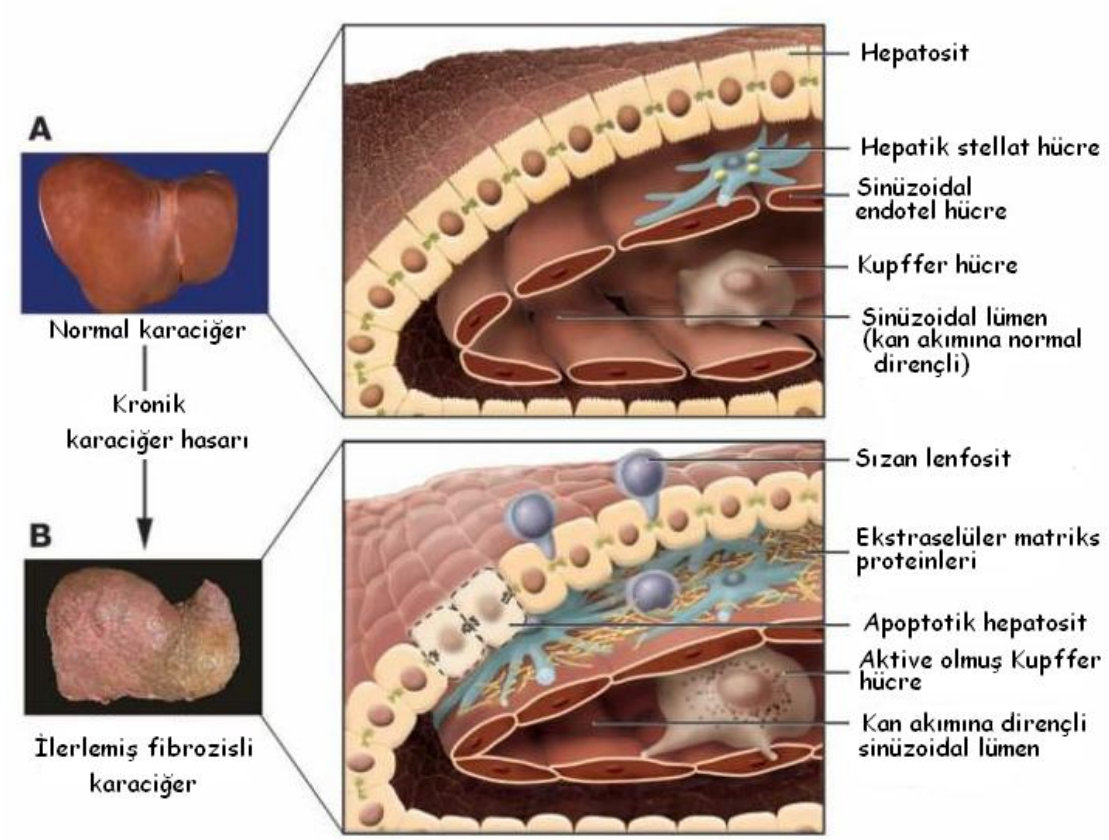
Şekil 2.2.2. Primer ve sekonder fibrogenezis. (www.steteskop.net)

Hepatik fibrozis oluşurken ekstraselüler matrikste normalde bulunan düşük yoğunluklu bazal membran benzeri matriksin yüksek yoğunluklu interstisyel tip matrikse dönüştüğünü görmekteyiz (Krahenbühl, vd., 1994). Nitekim fibrozis artarak tablo siroza doğru ilerledikçe normal karaciğer dokusunda 1:1 olan kollagen tip I / kollagen tip III oranının, sirozlu karaciğer dokusunda 4:1'e yükseldiği görülmektedir (Tolunay, 2001; Kılıçturgay, vd., 2001). Hepatik stellate hücreler, Kupffer hücreleri ve yeni gelişen mononükleer hücreler karaciğer fibrozisinin anahtar hücreleridir. Bu hücreler arasındaki etkileşim ise TGF-β'nın ağırlıklı rol oynadığı, bir takım kimyasal mediyatörler tarafından tetiklenmekte ve kolaylaştırılmaktadır. Bu inflamatuar ve profibrojenik sitokinlerin sentezi ve salınması esas olarak redoks-sensitif reaksiyonlar tarafından kontrol edilmektedir. Bunun da ötesinde serbest oksijen radikalleri ve lipid peroksidasyon ürünlerinin etkileri, hepatik fibrogenezisin temel reaksiyonları olan stellate hücre aktivasyonu ve metalloproteinazların sentezi basamaklarında da gösterilmiştir.

HSH'ler kadar olmasa da, sinuzoidal endotel hücreleri de ECM sentezleyebilmektedir. Ancak sinuzoidal endotel hücrelerinin sentezlediği ECM erken fibroziste önemlidir. Bu hücrelerin normalde sentezlediği ECM ile karaciğer hasarı varlığında sentezledikleri ECM farklıdır. Normalde sentezledikleri bazal ECM bir düzen içinde bir taraftan yapılırken diğer taraftan yıkılmaktadır. Hasar varlığında sentezledikleri ECM daha fazla fibronektin içermektedir ve HSH aktivasyonu için daha uygun bir ortam oluşmaktadır (Friedman, 2007).



Şekil 2.2.3. Stellat hücre aktivasyonu ve kollagen artışı (www.medscape.com)



Şekil 2.2.4. Sirozda sinüzoidlerde görülen kapillerleşme**. (**www.tasl.org.tr./pdf/**salihakarca**.pdf)

Kollajen

Kollajen, tendonlarda, kıkırdakta, kemiklerin organik matriksinde ve gözün korneasında önemli miktarlarda bulunan basit, fibriler skleroproteindir. Kollajen, hayvanlar aleminde çok yaygındır; memeli hayvanların vücut ağırlığının %6'sını, tüm vücut proteinlerinin %30'unu oluşturur. Kollajen moleküllerinin en belirleyici özelliği, üç polipeptit alt biriminden oluşan büklümlenmiş kangal olan üçlü sarmaldır Kollajenin yapısındaki aminoasitlerin yaklaşık %35'i glisin, %21'i prolin ve hidroksiprolin, %11'i alanindir.

Kollajen, bulunduğu dokulara dayanıklılık verir, doku şeklini korur ve dokuya gerilme direnci sağlar. Kollajen, kanın pıhtılaşmasında etkilidir; kan pıhtısı ile etkileşerek yara deliğini kapatır, kan pıhtısı zamanla büzüldüğü halde kollajen lifleri ağı zedelenme yeri üzerinde yeni bir hücre tabakası gelişinceye kadar yarayı örter. Kollajen, yaraların iyileşmesinde de rol oynar.

Kollajen, kondroitin sülfatla 1:1 oranında birleşerek kıkırdağı, 9:1 oranında elastin alarak tendonları, kendinin 4 katından çok hidrate kalsiyum fosfat alarak kemikleri oluşturur; deride ise kendi kadar dermatan sülfat ve 9:1 oranında elastinle birliktedir.

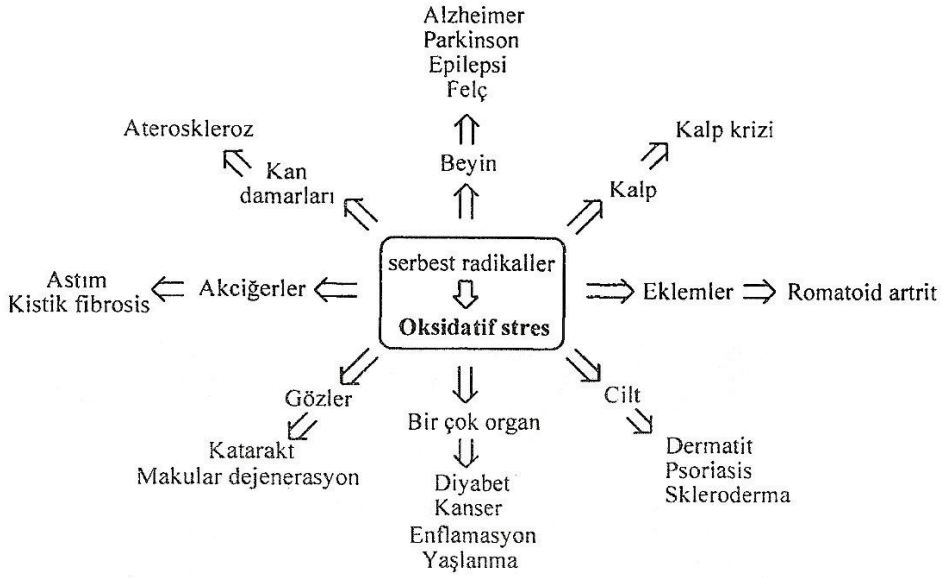
Kollajen molekülünün üçlü sarmalını oluşturan α zincirlerinin farklılığına göre değişik kollajen tipleri saptanmıştır: Bunlar ; Tip I, II, III, IV ve V tir.

2.3. Oksidatif Stres

Serbest radikaller, vücutta sürekli olarak oluşturulan ve antioksidan savunma sistemi tarafından ortadan kaldırılan moleküllerdir. Bu dengenin bozulması, serbest radikallerin artmasına ve hücre hasarı oluşturmalarına yol açar. Bu duruma oksidatif stres denilmektedir. Oksidatif stres, antioksidan savunma mekanizmasının yetersiz kalmasıyla ya da çeşitli

durumlarda serbest radikallerin artmasıyla oluşur. Bunun sonucunda, hücrede DNA, protein, lipid, karbonhidrat ve enzimler zarar görebilir (Sies, 1985; Sorg, 2004).

Oksidatif stres, ateroskleroz, diabet, kanser, kronik inflamasyon hastalıkları, santral sinir sistemi bozuklukları gibi patofizyolojik olaylarda, hücre yaşlanmasında ve dolayısıyla hücresel yıkım, hücre hasarı ve hücre ölümünde rol oynayan önemli bir mekanizma olarak son yıllarda büyük önem kazanmıştır (Abuja, vd., 2001; Sorg, 2004). Oksidatif stresin bu hastalıklardaki doku ve hücre hasarına sebep olduğuna inanılmaktadır. Reaktif oksijen ve azot türleri içeren serbest radikal üretiminin artması veya azalmış antioksidan korumasının bir sonucu olarak oksidatif stres artmakta ve bu işlem dokuya spesifik olmamaktadır (Evans ve Goldfine, 2000).



Şekil 2.3.1. Oksidatif strese bağlı hastalıklar (Gürkan, 2004)

2.3.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren atom veya moleküllerdir. Bu atom veya molekül ortaklanmamış elektronunu bir başka moleküle vererek veya başka bir molekülden alarak daha kararlı hale gelme eğilimindedir. Bu nedenle serbest radikaller son derece reaktif bileşiklerdir (Halliwell, 1994; Halliwell ve Gutteridge, 1999; Şenses, vd., 1999).

2.3.2. Serbest Radikallerin Oluşum Mekanizmaları

1. *Kovalent bağların homolitik bölünmesi:* Kovalent bağlı (: elektron çiftini ifade eder) molekülün bölünme sonrasında her bir parçasında ortak elektronlardan birisi kalır.

$$\mathbf{X : Y \rightarrow X^{\cdot} + Y^{\cdot}}$$

2. *Normal bir molekülden tek bir elektron kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi:* Kovalent bağın açılması esnasında moleküldeki atomlardan birisi iki elektronu da alır.

$$\mathbf{X : Y \rightarrow X:^{-} + Y^{+}}$$

3 .*Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi:*

$$\mathbf{X + e^{-} \rightarrow X^{\cdot -}}$$

Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu meydana gelirler. Serbest radikaller, pozitif yüklü, negatif yüklü veya nötral olabilirler (Halliwell vd, 1999).

Serbest radikaller (+) yüklü, (-) yüklü veya elektriksel olarak nötral olabilirler. Cu^{+2}, Mn^{+2}, Fe^{+3} ve Mo^{+5} gibi geçiş metallerinin de ortaklanma elektronları olduğu halde serbest radikal olarak kabul edilmezler. Fakat bu iyonlar reaksiyonları katalize ettiklerinden dolayı serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar.

En reaktif ve toksik etkili radikal olan hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) Haber – Weiss tepkimesi ile oluşmaktadır.

$$H_2O_2 + O_2^{\cdot} + H^+ \rightarrow OH^{\cdot} + H_2O + O_2$$

Metallerin varlığında ise aynı tepkime geçiş metalleri aracılığıyla (Fenton tepkimesi) gerçekleşmektedir.

$$Fe^{+3} + O_2^{-\cdot} \rightarrow Fe^{+2} + O_2$$

$$Fe^{+2} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3} + OH^{\cdot} + OH^-$$

Vücutta üretilen radikaller her zaman tehlikeli ve zararlı maddeler olarak değerlendirilmemelidirler. Zararlı etkilerinin yanında vücut için gerekli birçok fonksiyonun gerçekleşmesinde de önemli rol oynarlar. Moleküler oksijenin biyokimyasal tepkimelerde kullanılabilmesi için reaktif formlara çevrilmesi zorunludur. Hücre farklılaşması ve apoptozis, mikroorganizmalara karşı savunma, steroid yapıda çok sayıdaki bileşiğin üretimi, eikozanoidler gibi biyolojik aktif moleküllerin sentezi, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, çok sayıda oksidaz ve hidroksilaz enzimlerinin etkileri ve sitotoksik etkilere sahip hücrelerin fonksiyonları için, serbest radikal yapımı olmazsa olmaz bir koşuldur. (Cheeseman ve Slater, 1993; Bergendi, 1999).

Aktive olmuş makrofajlar, nötrofiller ve eozinofillerde fagositik solunumsal patlama sırasında da çeşitli serbest radikaller oluşur. Nötrofiller ve monositlerin primer lizozomal

granüllerinde Fe-hem içeren miyeloperoksidaz enzimi bulunur. Çeşitli uyarıcıların etkisiyle fagositler miyeloperoksidaz içeren granüllerini ekstrasellüler aralıktaki fagositik vakuol içine boşaltırlar. Miyeloperoksidaz, hidrojen peroksit (H_2O_2) varlığında klorür, iyodür ve bromürün oksidasyonunu katalizleyerek hipoklorik asit (HOCl), hipoiyodik asit (HOI) ve hipobromik asit (HOBr) oluşturur. Bu bileşikler ve bunların tuzları güçlü oksidanlardır, biyolojik olarak önemli moleküllerle reaksiyona girerek mikroorganizmayı etkileyen toksik ajanlar meydana getirirler (Akkuş, 1995).

2.3.3. Serbest Radikallerle Oluşan Lipid Peroksidasyonu

Organizmanın yaşam sürecinde karşılaştığı radikal türlerinin çeşitli olması nedeniyle, serbest radikallerin biyolojik etkilerini genellemek zordur. Oluşan serbest radikaller, ortamdan uzaklaştırılamadığı takdirde metabolik bozukluklara, hücre hasarına ve hatta ölüme yol açarlar (Boyunağa,vd.,1996). Serbest radikaller, kimyasal modifikasyonlarla protein, lipit, karbonhidrat ve DNA'da hasar oluştururlar. Lipitler; reaktif oksijen türlerinin yıkıcı etkilerine en fazla maruz kalan biyolojik moleküllerdir. Hücre membranı serbest oksijen radikalleri ile hızla reaksiyona girebilen çoklu doymamış yağ asitlerinden oldukça zengindir. Bu yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle reaksiyona girip peroksidasyona neden olur. Membran akışkanlığı, membran lipitlerinin yan zincirlerinde bulunan doymamış yağ asitleri ile sağlanır. Doymamış yağ asitlerinin hasarı, membran akışkanlığını azaltıcı etki gösterir.

Lipit peroksidasyonu, oksijen türevi serbest radikaller tarafından tetiklenen oksidatif stresin en önemli organik göstergelerinden birisidir. Üç karbonlu bir ketoaldehid olan Malondialdehit normal metabolik şartlarda, önce asetat veya malonata kadar okside olur, daha sonra krebs siklusu ile CO_2'e indirgenerek atılır. Fakat aşırı lipid peroksidasyonunda MDA konsantrasyonu artar ve dokulara hasar verir (Ulusu, vd., 2003).

Lipid peroksidasyonu ve lipid peroksidasyon ürünleri ile oluşturulan fibrozun, hayvan modellerinde antioksidanların kullanımı ile azaltıldığı gösterilmiştir (Tahan, vd., 2004). Stellat hücrelerin MDA tarafından aktive edildikleri ve bu aktivasyonun antioksidan etkisiyle bloke edildiği gösterilmiştir (Southorn, 1988). Hücre kültürü ortamında, sıçan stellat ve kupffer hücreleri fonksiyonlarına antioksidanların etkileri araştırılmış ve bu iki hücrenin düzenleyici fonksiyonları aynı zamanda karaciğer hasarından da sorumlu tutulmaktadır.

2.3.4. Antioksidan Savunma Sistemleri

Serbest radikallerin oluşumunu ve meydana getirdikleri hasarları önlemek ve detoksifikasyonunu sağlamak için normal fizyolojik şartlarda çeşitli "antioksidan savunma sistemleri" gelişmiştir. Kısaca "antioksidanlar" olarak da adlandırılan bu sistemdeki moleküller, serbest radikallerin ortadan kaldırılmasında ve dolayısıyla oksidatif hasarın önlenmesinde önemlidirler (Halliwell vd, 1999; Gutteridge vd., 2000; Urso vd., 2003).

Antioksidanlar,

• oksijeni uzaklaştırarak,

• geçiş metal iyonlarını uzaklaştırarak,

• reaktif oksijen türlerini baskılayarak veya temizleyerek,

• başlamış olan zincir reaksiyonunu kırarak etkili olurlar (Halliwell 1997).

Antioksidanlar başlıca dört yolla oksidanları etkisiz hale getirirler;

1. Süpürme etkisi: Oksidanları daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürerek etkisizleştirir. Antioksidan enzimler ve mikromoleküller bu yolla etki eder.

2. Söndürme etkisi: Oksidanlara bir hidrojen aktararak inaktive etmesine denir. Vitaminler, flavanoidler, timetazidin ve mannitol bu şekilde etki eder.

3. Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi: Hemoglobin, serüloplazmin ve ağır mineraller oksidanları kendilerine bağlar ve inaktive eder.

4. Onarma etkisi: Oksidatif hasar görmüş biyomolekülü onarırlar (Arrigo, 1999, Gökpınar vd 2006).

Antioksidanlar, *endojen kaynaklı (doğal)* ve *eksojen kaynaklı antioksidanlar* olmak üzere başlıca iki gruba ayrılabilir. (Yalçın, 1998).

Endojen antioksidanlar

1. Enzimler

Glutatyon peroksidaz (GSH-Px)

(Hidrojenperoksit detoksifikasyonu)

Katalaz

(Hidrojenperoksit detoksifikasyonu)

Sitokrom oksidaz

(Hücre oksijeninin % 95-98'nin detoksifikasyonu)

Süperoksit dismutaz (SOD)

(Süperoksit anyonlarının detoksifikasyonu)

2.Enzim olmayanlar

Lipid fazda bulunanlar

Alfa-tokoferol

(süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcı)

Beta-karoten

(süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcı)

Alfa-lipoik asit

(singlet oksijen ve hidroksil radikali toplayıcı)

Sıvı fazda (Hücre sitoplazmasında veya kan plazmasında) bulunanlar

Albumin

(Lipithidroperoksid toplayıcı)

Askorbik asit

(Lipithidroperoksid toplayıcı)

Bilirubin

(süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcı)

Ferritin

(Doku demirinin bağlanması)

Glutatyon

(GSH-Px aktivitesinin desteklenmesi, süperoksit ve hidroksil radikali ile direkt reaksiyona girmesi)

Laktoferrin

(Dolaşımdaki serbest demirin bağlanması)

Melatonin

(SOD ve GSH-Px aktivitesini arttırmak)

Seruloplazmin

(Dolaşımdaki demirin bağlanması)

Sistein

(SOD benzeri aktivite)

Transferin

(Dolaşımdaki serbest demirin bağlanması)

Ürat

(Süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcı)

Eksojen antioksidanlar

Ksantin Oksidaz İnhibitörleri

Allopurinol

Oksipurinol

Pterin aldehid

Tungsten

(Ksantin oksidazla süperoksit üretiminin inhibisyonu)

NADPH Oksidaz İnhibitörleri

Adenozin

Kalsiyum kanal blokerleri

Lokal anestezikler

NADPH oksidaz monoklonal antikor

Non-steroid antiinflamatuar ilaçlar

(Nötrofil ve makrofajlarda NADPH ile süperoksit üretiminin inhibisyonu)

Süperoksit Dismutaz (SOD)

Doğal SOD

IgA'ya bağlı SOD

Lipozom kapsüllü SOD

Polietilen glikol SOD (PEG-SOD)

(Süperoksit radikalinin hidrojen peroksite katalizlenmesi)

Katalaz

Doğal katalaz

Lipozom kapsüllü katalaz

Polietilen glikol katalaz (PEG-katalaz)

(Hidrojen peroksitin su ve oksijene dönüşüm reaksiyonunun katalizlenmesi)

Nonenzimatik Serbest Radikal Toplayıcılar

Albumin

(Lipithidroperoksid toplayıcı)

17-aminosteroidler (Lazoroidler)

(Lipithidro peroksid ve süperoksit toplayıcı)

Bilirubin

(Süperoksit ve hidroksil radikali tutucusu)

Glutatyon

(Süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcı)

Mannitol

(Hidroksil radikali toplayıcı)

Ürat

(Süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcı)

Demir Redoks Döngüsünün İnhibitörleri

Desferroksamin

Seruloplazmin

(Serbest demir bağlama)

Glutatyon Peroksidaz Aktivitesini Artıranlar

Glutatyon

Melatonin

(GSH-Px aktivitesinin arttırılması)

Oksidatif stresin meydana getirdiği hasarlar vücudun antioksidan savunma mekanizması ile engellenir. Enzimatik savunma mekanizmasına ait olan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi enzimler, lipid peroksitlerin ortadan kaldırılması ve onların detoksifiye edilmesini sağlayan anahtar enzimlerdir (Sivaprasad, 2004).

Glutatyon (GSH)

Glutatyon (γ-glutamilsisteinilglisin), organizmada tiyol grubu içeren, düşük molekül ağırlıklı önemli bir tripeptiddir. DNA ve protein sentezleri, enzim aktivitelerinin düzenlenmesi, hücre içi ve dışı transportlar gibi hücresel fonksiyonları dışında başlıca antioksidan olarak hücre savunmasında da önemli rolü vardır (Meister, 1994). GSH'a antioksidan özelliğini sisteinin

tiyol grubu kazandırır. Serbest radikal ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. GSH birçok enzimin kofaktorüdür (örneğin HMG CoA reduktaz). Tiroid hormon sentezinde rol oynar. Bunun dışında proteinlerdeki –SH gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı muhafaza eder. Demirin +2 halde tutulmasını sağlar. Böylece, protein ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller hatta rejenere olmalarını sağlar. Karaciğer vücut GSH içeriğinin en önemli kaynağını oluşturmaktadır. Ekstraselluler mesafede çok düşük konsantrasyonlarda bulunur.

Superoksit Dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1)

"SOD, superoksit anyonunu hidrojen peroksit ve moleküler oksijene çeviren bir metalloenzimdir.

$$2\ O_2^{-\cdot} + 2\ H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

Bu reaksiyon, süperoksit zincirleme radikal reaksiyonlarının güçlü bir başlatıcısı olduğundan oksidatif strese karşı 'ilk savunma' olarak değerlendirilir.

Memelilerde üç çeşit SOD bulunmaktadır:

1) *Sitozolik SOD (Cu-ZnSOD, SOD1)*: Genellikle sitozolde ve lizozomal fraksiyonlarda yer alır, fakat mitokondriyal boşlukta da bulunmaktadır. İki alt birimden oluşmaktadır. Kofaktörleri çinko ve bakırdır. Enzimin aktivitesinden bakır, stabilitesinden çinko sorumludur.
2) *Mitokondrial SOD (Mn-SOD, SOD2)*: Mitokondride bulunur ve tetramerik yapıdadır. Kofaktörü mangandır.

3) *Ekstrasellüler SOD (EC-SOD, SOD3)*: Tetramerik yapıdadır ve ekstraselluler bölümlere salgılanır. Kofaktörleri çinko ve bakırdır. Ayrıca bazı bakterilerde Fe-SOD da saptanmıştır (Powers, vd., 1999).

Glutatyon Peroksidaz (GPx; EC.1.11.1.9) ve Glutatyon Reduktaz (GR; EC.1.6.4.2)

GPx, lipit peroksitlerini daha az toksik yağ asitlerine indirger. Kofaktör olarak glutatyonu (GSH) kullanmaktadır.

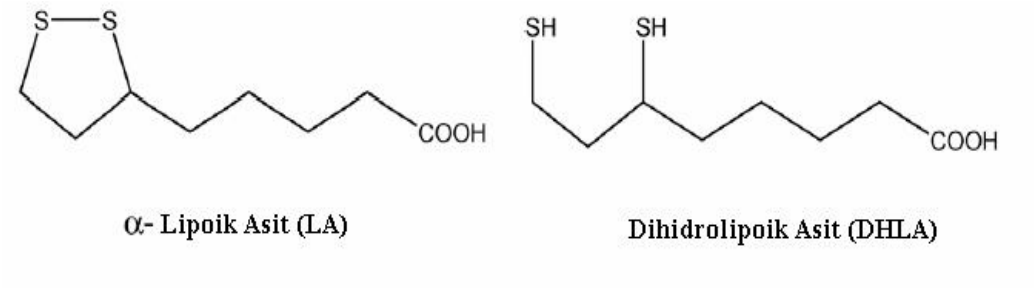
GPx, hücrede H_2O_2'nin temizlenmesinden sorumlu iki enzimden biri olup diğer enzim ise katalazdır. Glutatyon-GPx sistemi H_2O_2'nin H_2O 'ya indirgenmesini katalizlerken organik hidroperoksitleri de parçalamaktadır (Basaga, 1990).

Genel olarak GPx'ın H_2O_2'e karşı en belirgin savunma sistemi olduğu düşünülmektedir. Tetramerik yapıda olan enzim en çok karaciğer ve eritrositte aktif olarak bulunmaktadır. Kalp, akciğer ve beyinde orta, kasta ise düşük aktivitede bulunur. %60-75'i sitoplazmada, %25-40'ı mitokondride yer alır.

α-Lipoik Asit

Lipoik asit; enerji üretimi ve metabolizmada yer alan mitokondriyal enzimlerde bir kofaktör olarak görev yapan, doğal olarak meydana gelen bir bileşiktir (Cadenas, 2001). Pek çok prokaryotik ve ökaryotik hücre tiplerinde bulunur. Lipoik asit (LA), 1937 yılında *Lactobasillus*'un gelişimi için gerekli olan, growth faktör denen patates ekstresinin bir bileşeni olarak bulunmustur (Bullock vd.,1954). 1951 yılında Reed ve arkadaşları 100 kg karaciğerden 30 miligram lipoik asit pütrifiye etmişlerdir (Morris vd., 1995). Takip eden yıllarda moleküler yapısı açığa kavuşturulmuş ve 1,2-ditiyolen-3 pantotenik asit olarak adlandırılmıştır (Streeper,

vd., 1997; Cadenas, 2001). Mitokondriyal kompleksleri bol olan hayvan ve bitki dokularında bol miktarda bulunur. Bitkiler içinde en fazla lipoik asit içerenler sırasıyla ıspanak, brokoli ve domatesdir. Hayvan dokuları içerisinde en fazla böbrek, kalp ve karaciğerde bulunur (Kramer 2001).



Şekil 2.3.4.1. Alfa-lipoik asit; dihidrolipoik asit kimyasal yapıları (Packer, vd.,2001)

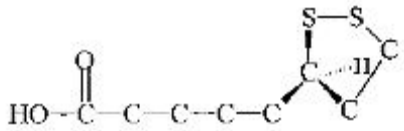
İki formu bulunmaktadır:

1-Okside lipoik asitte 6. ve 8. pozisyonlarda bulunan kükürtler kapalı bir halka meydana getirir.

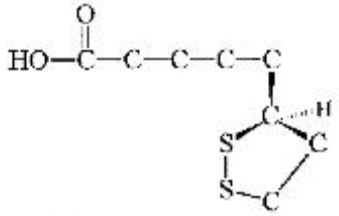
2-Lipoik asidin redükte şekli açık zincir şeklinde olup 6. ve 8. pozisyonda bulunan kükürtler sülfidril grubu halinde bulunmaktadır. Lipoik asidin redükte şekline dihidrolipoik asit (DHLA) adı verilmektedir. Lipoik asidin bu iki formu oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları ile birbirine dönüşebilmektedir (Gözükara, 1989). Lipid ve sulu ortamda çözünür oldukları için kolayca emilir ve hücrelere taşınarak, DHLA'ya indirgenir. Hem redükte hem de okside formlar biyolojik aktivite göstermesine rağmen dihidrolipoik asit biyolojik olarak daha aktif form olarak kabul edilmektedir (Bullock, vd., 1954).

Alfa lipoik asid sitrik asit siklusundaki multienzim dehidrogenaz kompleksinin (piruvat dehidrogenaz ve α ketoglutarat dehidrogenaz) kofaktörüdür. Alfa lipoik asidin iki ayrı izomerik konfigurasyonu vardır. R formu doğal, S formu ise sentetiktir (Goralska, vd., 2003).

Hem R hem de S formları izomerdir. R-enantiyomer S-enantiyomerden 28 defa daha hızlıdır (Aalt ve Haenen, 2002).



R- Lipoik Asit



S- Lipoik Asit

Şekil 2.3.4.2. Alfa Lipoik Asidin R ve S formlarının Kimyasal Yapıları (Cadenas 2001).

Alfa-Lipoik asitin çok toksik olan hidroksil ve nitrik oksit radikallerini, peroksi nitrit anyonunu, hidrojen peroksit ve hipokloröz asiti yakaladığı ve singlet oksijeni söndürdüğü bilinmektedir. Hem in vivo, hem de in vitro deneylerde lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği belirlenmiştir. Vücuttaki serbest radikal fazlalığında ortaya çıkan oksidatif stresin içinde bulunduğu durumlarda önemli tedavi potansiyeline sahip olduğu kanıtlanan α-lipoik asit, ulaşılması güç yararlı farmakolojik etkileri ile bilinen en güçlü antioksidan bileşiktir.

Kimyasal yapısı, 6. ve 8. karbonlan S-üyeli bir halka oluşturmak üzere bir disülfit köprüsü ile birleşmiş, sekiz-karbonlu doymuş yağ asidi şeklindedir. Uzun alkil zinciri sayesinde lipofilik membran kompartmanlannda, serbest karboksil grubu nedeniyle sulu fazda çözünebilmesi, bu maddeye daha fazla serbest radikal temizleme ve daha fazla bedensel maddeyi koruma özelliği kazandırır. Küçük yapılı olması nedeniyle hücre içinde ve hücre membranı düzeyinde etki gösterebilmesi, çift yönlü koruma sağlamaktadır. Membran

seviyesinde serbest radikal hücreye girmeden önce, herhangi bir serbest radikalin koruma mekanizmasının ilk basamağını geçme durumunda ise hücre içinde ona karşı koyar. Bu sayede, DNA'yı muhafaza eden çekirdeğin serbest radikallerden zarar görmesini engeller.

Lipoik asit, hidroksil radikali ve hipokloröz asidi temizler; ancak, süperoksit ve peroksil radikaline pek etkili değildir. Dihidrolipoik asit ise GSH'den daha güçlü bir redüktandır; hipokloröz asit, peroksil ve hidroksil radikallerini temizleyerek lipid peroksidasyonunu önler. Hem LA hem de DHLA, H_2O_2 ve singlet oksijene de etki eder (Packer, vd., 1995; Roy ve Packer, 1998; Coleman, vd., 2001). Orta düzeyde bir antioksidan olarak kabul edilen LA ve en iyi antioksidan olarak kabul edilen DHLA, Mn^{+2}, Cu^{+2}, Zn^{+2} ve Pb^{+2} gibi geçişli (transition) metallerle stabil kompleksler yaparak biyolojik sistemlerdeki ağır metalleri de yok ederler (Neal, vd., 1999; Navari-Izzo, vd.,2002). Ayrıca, DHLA, C ve E vitamini, GSH ve koenzim Q (Q10, ubikinon) gibi iyi bilinen bazı antioksidanlar, radikal veya okside formlarını indirgeyerek yenileyebilir (Buettner, 1993; Lu ve Liu, 2002).

Tablo 2.2 : α-Lipoik asit (LA) ve Dihidrolipoik asit (DHLA) Tarafından Yakalanan Reaktif Oksijen Türleri (Gürkan, 2004)

Oksidan	LA	DHLA
Süperoksit radikali	-	+
Hidrojen peroksit	+	+
Hidroksil radikali	+	+
Singlet oksijen	+	-
Peroksil radikali	-	+
Nitrikoksit radikali	+	+
Peroksinitrit	+	+
Hipokloröz asit	+	+

Lipoik asit ve onun redükte formu DHLA dokularda serbest halde bulunur. DHLA güçlü bir redüktandır ve böylece okside antioksidanları rejenere edebilir. Antioksidanlar, radikalleri uzaklaştırdıkları zaman kendileri radikal hale gelirler. DHLA direkt ve indirekt olarak askorbat, glutatyon, koenzim Q10 ve vitamin E'yi rejenere edebilir (Kramer, 2001). DHLA bütün antioksidanları redükte edebilir ve lipoamid reduktaz, glutatyon reduktaz ve tiyoredoksin reduktaz enzimlerini rejenere edebilir. Böylece lipoik asit ve DHLA antioksidan ağda merkezi bir görev alır. Lipoik asit suda çözünen ve membranda çözünen özelliklerin ikisine de sahip olduğundan lipid/su fazları arasındaki okside antioksidanların indirgenmesini olanaklı kılar (Busse vd.,1992; Podda vd.,1994; Han vd., 1997; Sen vd., 1997, 1999).

Lipoik asit bakteriden insana kadar olan tüm organizmalarda sentezlenir. İnsanlarda sentez yeri karaciğer ve diğer dokulardır (Biewenga, 1997). Ökaryotlarda lipoik asitin biyosentez yolu mitokondride bulunur. Bununla beraber bitkilerde biyosentez yolunun plastidlerde de bulunduğu hipotezi vardır (Yasuno ve Wada, 2002).

Lipoik asit oral verildiğinde % 93' den fazlası bağırsaktan emilir, karaciğerde metabolizmayla % 20-30 ilk geçiş etkisine uğrar. α-LA emilmesini takiben 1,2 ditiyolen halkasının indirgenmesiyle DHLA formuna indirgenir, sonradan S-metilasyona uğrayabilir. α-LA ve DHLA her ikisi de aynı zamanda β-oksidasyona uğrarlar. Hem sıçanlarda hem de insanlarda α-LA idrarla atılır, ana metaboliti 4,6 bismetilmerkaptoheksanoik asittir. Sıçanlarda oral verilen radyoaktif α-LA'nın yaklasık % 80'i idrarda bulunmuştur (Cremer vd., 2006).

Lipoik Asidin Etki Mekanizması

Araştırıcılar son yıllarda lipoik asidin serbest radikal hasarını uzaklaştıran vitamin E ve vitamin C'yi geri dönüştürdüğünü göstermişlerdir. Antioksidan döngüsünün ana bileşenlerinden biri vitamin E' dir. Bu vitamin membranlar ve yağ dokusundaki yüksek serbest radikal reaktivasyonunu durdurmak için çalışır (Liu, 2002). Lipoik asit aynı zamanda vitamin E'yi

rejenere eden vitamin C ve glutatyon ile birbirlerini etkileyerek membranları korur. (Packer vd., 1995). Lipid peroksit ve lipid alkoksil gibi yağlı serbest radikalleri yok etme işlemi sırasında vitamin E'nin kendisi de serbest radikal haline gelir. Vitamin E radikali vitamin C ile rejenere olur. Bu ise bir radikalden tekrar bir antioksidan meydana gelmesiyle sonuçlanır. Fakat bu işlemin sonunda vitamin C'nin istikrarlı olmayan formu olan yeni bir semikarbon radikali meydana gelir. Vitamin C tekrar glutatyon ile çevrilebilir. Bu noktada vitamin E, vitamin C ve glutatyon hücresel hasarı önleme ve serbest radikal kontrolü için birlikte uyum içinde çalışırlar. Bu aynı zamanda, antioksidan rejenerasyon döngüsünde sınırlandırıcı bir faktör olarak kaydedilen glutatyonun elde edilmesinde önemli bir basamaktır (Liu vd., 2002).

Lipoik Asidin Etkileri

1. Serbest Radikalleri Uzaklastırmak: Lipoik asit bilinen çok yönlü antioksidanlardan biridir. Yağ ve suda fonksiyon gösterebilen lipoik asit serbest oksijen, süperoksit, peroksit ve hidroksil radikalleri, hipoklorit ve peroksinitrik gibi geniş bir yelpazedeki serbest radikallerin nötralizasyonunu başarabilir (Biewenga vd., 1997).

2. Metal Kelasyonu: Vücudumuz için en tehlikeli şeylerden biri toksik metallerdir. Toksik metaller yıllar boyunca dokularımıza yerleşir ve sürekli vücudumuza zarar verir. Bir saç analizi kadmiyum, bakır ve aluminyum gibi toksik metallerin yüksek düzeylerine sahip olduğumuzu gösterir. Lipoik asit toksik metalleri yakalar, bağlar, onları nötralize eder ve vücuttan kolayca atılabilecekleri bir şekile getirir (Wolfson, 2000).

3. Antioksidan Rejenerasyonu: Serbest radikal ile nötralize edilen bir antioksidan özelliğini yitirir. Bununla beraber canlı sistemlerde antioksidanlar sıklıkla diğer antioksidanların yardımıyla rejenere olabilirler. Örneğin glutatyon vitamin C'yi rejenere edebilir. Vitamin C vitamin E'yi rejenere hale döndürebilir. Çok yönlü yapısı sayesinde lipoik asit glutatyonu, vitamin C, E ve mitokondriyal antioksidan koenzim Q' yu rejenere edebilir (Packer vd., 1995).

4. Moleküler Hasar Onarımı: Serbest radikal aktivite DNA, lipid ve proteinler gibi fizyolojik maddelerde hasar meydana getirir. Canlı organizmalar bu hasarların bazılarını tamir edecek bir kaç mekanizma geliştirmiştir. Lipoik asit okside olmuş moleküler hasarın tamirinde rol oynar (Kok ve Bercel, 1996).

5. Lipoik Asit ile Glikasyondan Yaşlanmanın Azalması: Glikasyon protein molekülleri ve glukoz arasında kimyasal bağların oluşumudur. Bu işlem yaşlanmanın ve özellikle diyabet ile birlikte olan birçok hastalığın etkilerine katkıda bulunur ve proteinlerin fizyolojik fonksiyonlarını bozar. Araştırıcılar albumine nonkovalent bağlarla bağlanan lipoik asidin glikasyona karşı proteinleri koruduğunu bulmuşlardır. Böylece lipoik asit hem antioksidan özellikler hem de antiglikasyon özellikleri ile bir antiaging gibi davranır (Packer, 1998).

6. Lipoik Asit Doğal Enerji Verici: Lipoik asit hücrenin enerji yapım yeri olan mitokondri için yakıt hazırlamaya yardım eder. Vücut lipoik asit olmaksızın enerji için şekeri kullanamaz ve lipoik asit vücudun ilk doğal enerji yoludur. Lipoik asit aynı zamanda yorgunluğun ana nedeni olan serbest radikallerin nötralizasyonu ile vücuda enerji verir (Shih, 1983).

Lipoik Asidin Klinikte Kullanımı

Lipoik asidin antioksidan etkilerinin geniş olması onu tedavi edici uygulamalar için güçlü bir aday yapar. Hayvan ve insan çalısmaları klinik kullanımları önermektedir (Wolfson, 2000).

1. Ateroskleroza Karşı Koruyucu Etkisi: Ateroskleroz; hayvanlarda arterlerde plakların oluşumu ile karakterizedir. Serbest radikaller arteriyel kolesterol plaklarında LDL (düşük yoğunluklu lipoproteinler) birikiminin oksidasyonu ile ateroskleroz meydana getirir. Lipoik asit

vitamin E'nin rejenarasyon döngüsünü destekler ve böylece vitamin E daha yüksek konsantrasyonlarda LDL'de etki gösterir (Shih, 1983).

2. Katarakta Karşı Koruyucu Etkisi: Gözün içi aköz bir ortamdır, vitamin E, betakaroten gibi yağda çözünen antioksidanlar fazla koruyucu değillerdir. Hayvan çalışmaları lipoik asidin katarakt oluşumuna karşı da güçlü bir koruyucu olduğunu göstermiştir. Katarakt gözün lensinde antioksidan aktivitenin azalmasıyla beraberdir ve lipoik asidin en önemli lens oksidanı olan glutatyonu rejenere ettiği bilinmektedir. Californiya Üniversitesi'nin bir sıçan çalışmasının sonuçları lipoik asidin 5 mg/kg dozda % 60 katarakt oluşumundan koruduğunu göstermiştir (Wolfson, 2000).

3. Radyasyona Karşı Koruyucu Etkisi: Lipoik asidin radyasyona maruz kalma ile meydana gelen serbest radikal hasarı azalttığını gösteren Çernobil radyasyon kurbanlarını içeren Rus çalışması çok ilginçtir. 16 çocuklu bir gruba 28 gün boyunca günde 400 mg lipoik asit verilmiş, 12 çocuklu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında radyoaktif izotopların idrarla atılması ve beyaz kan hücrelerinde serbest radikal aktivitesinde azalmalar görülmüştür (Wolfson, 2000).

4. AIDS Tedavisindeki Etkisi: Bilim adamları lipoik asidin HIV-1'in ve DNA'ya direk bağlanan diğer virüslerin replikasyonunu engelleyebildiğini bulmuşlardır . Packer ve Sen (1997) lipoik asidin, immun sistem görünümünü özellikle T lenfositleri düzelttiğini tespit etmişlerdir. Dr. Packer test tüp deneylerinde lipoik asidin AIDS (kazanılmıs immun yetmezlik sendromu) virüsünün replikasyonunu sağlayan genin aktivasyonunu tamamen engellediğini bulmuştur (Sen vd., 1997). Bir çalışmada AIDS'li 12 kişiye lipoik asit verilmiş, glutatyon düzeyleri % 100, vitamin C düzeyleri % 90, T4 hücreleri % 66 artmıştır ve oksidatif stres katılanların % 70' inde azalmıştır.

5. Hafıza ve Beyin Fonksiyonlarına Etkisi: Alman araştırıcılar lipoik asidin yaşlı farelerde uzun dönemli hafızada pozitif etkileri olduğunu bulmuşlardır. Rochester Universitesi medikal

merkezindeki araştırıcılar Parkinson ve Huntington hastalığı gibi kronik ve akut nörolojik bozuklukların tedavisinde olası bir role sahip olduğunu bildirmişlerdir (Packer vd., 1997).

6. İnme ve Kalp Krizinde Etkileri: Serbest radikallerin fazla miktarları iskemi veya travma ile yaralanan dokular yaratır. Kan pıhtısı, düşük oksijen seviyeleri ile iskemi meydana gelir (Packer, 1998). Lipoik asidin; inme ve kalp krizlerinde yetersiz oksijen sağlanmasına bağlı hasardan dokuları koruduğu gösterilmiştir. Bilim adamları lipoik asit ile tedavi edilen hayvanlarda ölüm hızının lipoik asit ile tedavi edilmeyenlerin yalnızca 1/3 kadar olduğunu bulmuşlardır.

7. Diyabet ve Diyabetik Nöropatinin Tedavisindeki Etkileri: Lipoik asit son zamanlarda diyabetin tedavisi ve katarakt, maskülar dejenerasyon ve ağrılı periferal sinir dejenerasyonu olan nöropatiyi içeren diyabet komplikasyonlarını önlemede Avrupa'da kullanılmaktadır. Çalışmalar lipoik asidin bu sinir disfonksiyon semptomlarının azalmasına yardım edebildiğini göstermektedir. Almanya'da yürütülen çift kor, plasebo kontrollü, randomize, çok merkezli bir çalısmada 63 periferal noropatili Tip II diyabet hastasının % 85' inde intravenöz günlük 600 mg lipoik asit infuze edildikten 3 hafta sonra semptomlarında belirgin azalma olmuştur (Wolfson, 2000).

8. Kansere Karşı Koruyucu Etkileri: Serbest radikaller ile hasarlanan DNA hücrenin normal yapısını değiştirir. Serbest radikallere maruz kalan hücreler mutasyona uğrar, kontrolsüz çoğalır hücre membranlarını, organlarını ve bağışıklık fonksiyonunu bozar böylece kanser meydana gelir. Lipoik asit antioksidan özellikleri ile kanser gelişiminin hızını azaltan bir rol oynayabilir. Lipoik asit aynı zamanda kanser başlamadan önce bir gün kanser meydana getirecek genetik programa sahip hücreleri durdurma potansiyeline de sahiptir (Shih, 1983). Ratta karaciğer tümör oluşumunda karsinojen metabolizma boyunca oksidatif stresin etkili olduğu bilinmektedir. Lipid peroksidasyon düzeyleri N-dietilnitrozamin verilmesinden 3 ile 24 saat sonra yükselmektedir (Şahin, 2008).

Alfa Lipoik Asitin Yararları

Alfa lipoik asidin birçok yararı vardır ve bunların en başındaki 10 tanesi aşağıda listelenmiştir (İnt. Kyn.2).

1. Alfa lipoik asit ALA'in vücudumuzun gıdalardan tükettiği karbonhidratlardan, yağlardan ve proteinlerden enerji üretmesinde B vitaminlerine yardımcıdır.

2. ALA hastanelerde karaciğeri etkileyen akut zehirlerin tedavisinde damar yoluyla kullanılır.

3. Alfa lipoik asit ürünleri diyabetik nöropati tedavisinde kullanılır.

4. Çalışmalar ALA takviyelerinin HIV, glokom ve karaciğer hastalıkları dahil çeşitli rahatsızlıkların tedavisinde de faydalı olduğunu göstermiştir.

5. Alfa lipoik asit diyabetlilerde sinir bağlantılı kalp hasarlarından kaynaklanan ani ölümleri önlemede yardımcı olur.

6. Alfa lipoik asit yararları yaşlanan erişkinlerde beyin işlevlerinin korunmasını da içerir ve aynı zamanda Alzheimer gibi hastalıklarda uzun süreli belleği de geliştirebilir.

7. ALA inmeyi takiben beyin hücrelerinin muhafazasına yardım eder.

8. Alfa lipoik asit bir antioksidan olarak vücudu kanserden korumada da yardımcı olabilir ve bu konudaki araştırmalar sürmektedir.

9. Karıncalanma veya uzuvlarında uyuşmalardan şikâyetçi olan herhangi birisi için, ALA sinirlere kan akışının artmasına yardımcı olabilir ve böylece bunları önleyebilir.

10. Alfa lipoik asitin yararlarından bir başkası, hepatit vakalarında ve diğer karaciğer hastalıklarında karaciğerin korunmasıdır. ALA karaciğeri zararlı hücre değişimlerinden korur ve toksinlerin vücuttan atılmasında yardımcı olur.

2.4. Myeloperoksidaz

2.4.1. Biyokimyasal yapısı

Myeloperoksidaz (MPO), memeli nötrofillerinin granüllerinde yer alan bir enzim olup, fagosite edilmiş bakterilerin öldürülmesinde önemli rol oynamaktadır. Enzimin I,II ve III olarak tanımlanmış üç tipi mevcuttur. Kristal yapısı X ışınlarıyla incelenmiş olup, her MPO molekülünün iki alt birimden oluşur ve iki uzun iki de kısa polipeptid zinciri vardır. MPO 1940'lı yıllarda Verdoperoksidaz olarak anılmakta iken sonradan myeloperoksidaz olarak isimlendirilmiştir. Enzimin total ağırlığının ortalama %3-4' ü karbonhidrattır (Miyasaki vd, 1986; Fenna,1987; Weis, 1989).

MPO I, II ve III birbirlerinden bağımsız olarak antibakteriyel mekanizmada rol oynayabilirler. En güçlü etki MPO I ile oluşmaktadır. Bu etkinin farklılığı MPO formlarının hedef hücrelere bağlanabilme güçlerinden kaynaklanmaktadır (Johnson, 1991).

MPO, H_2O_2 (Hidrojen peroksit) ile birlikte tiyosiyonat iyonların veya halojen (halit) iyonlardan (iyodit, bromit, klorit) birinin de beraber bulunduğu bir ortamda antibakteriyel etki (oksijene bağlı) göstermektedir. Halojenler etki sıralamasında, iyodür, bromür ve klorür olarak yer alırlar. En etkili kombinasyon MPO+ H_2O_2 +I üçlüsüdür. H_2O_2 ve diğer halojenlerin konsantrasyonlarındaki artış antibakteriyel etkiyi artırmaktadır. MPO'nun *Escherihia coli, Lactobacillus acidophilus, Staphylococcus aureus ve Actinobacillus actinomycetemcomitains* üzerine kesin bakterisid etkisi vardır (Lehler,1980; Miyasaki vd., 1986). H_2O_2'nin antibakteriyel mekanizmadaki rolü mikrobiyal metabolizma üzerine olan etkisidir. H_2O_2'in ayrıca tek başına da antibakteriyel etkisi vardır. Ortamdaki H_2O_2 ise, fagositoz yapan hücrelerden üretilip salınmaktadır (Marshall vd, 1995). Hücresel aktivasyon ve degranülasyon sırasında, MPO extraselüler aralığa ve fagositik vakuoller içerisine salgılanırlar (Nauseef, 1998; Winterbourn ve Vissers Ketle, 2000).

MPO, kemik iliğinde myeloid farklılaşma sırasında bir öncü olarak sentezlenir ve bunun işlenmesi PMNL'lerin dolaşıma katılmasından önce tamamlanır (Kawano vd, 1993; Zhao vd, 1996). Monositler, makrofajlara olgunlaşırken, MPO'ını yavaş yavaş kaybederler (Nakagawara vd, 1981; Locksley vd, 1987). Myeloperoksidaz (MPO), lökositlere ilaveten, hem karaciğerde kupfer hücrelerinden hem de beyinde hipokampusun piramidal nöronları, granül içeren nöronları ve mikroglialarından izole edilmiştir (Nagra vd., 1997; Brown vd, 2001).

2.4.2 Katalitik mekanizmalar ve in vivo substratları;

MPO, ayrıca laktoperoksidaz, eozinofil peroksidaz ve tiroid peroksidazı içeren memeli peroksidaz ailesine de aittir. MPO, pH 5.5 de optimum reaksiyon gösterir ancak bu enzim, geniş bir pH aralığında aktivite göstermektedir (Deby-Dupont, 1999). MPO-system adı verilen sistemin tamamı, MPO enzimi, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksitlenebilen kofaktörlerden ibarettir. Temel durumda demirin ferrik formunu taşıyan MPO [MPO Fe(III)], peroksidazların temel substratı hidrojen peroksit varlığında oksitlenmiş (okside) formuna dönüşür. H_2O_2 tarafından oksidasyon ile MPO bileşik I adlı kısa ömürlü redoks ara ürününe dönüştürülür. Bileşik I, halojenleri (klor bromür, iyod) veya pseudohalojenler gibi çeşitli substratları hızlı bir şekilde kolayca okside eder (Everse, 1998). Klorürün plazma gibi fizyolojik sıvılarda çok miktarda bulunduğu bilinmektedir, bu MPO'un ana fizyolojik substratını yansıtan klorür olarak biliniyor. Klorürün, hidrojen peroksit (H_2O_2) tarafından MPO-katalizli 2-elektronun oksidasyonu, hipokloröz asit (OCL) ile sonuçlanır. Oksidanların etkili bir şekilde klorlanmasının, nötrofillerin bakterisidal ve virusidal özellikleri açısından kritik olarak önemli olduğuna inanılmaktadır (Winterbourn, 1985; Ketle ve Van Dalen, 1997; Winterbourn ve Vissers Ketle, 2000).

MPO nun katalitik aktividen bağımsız, proinflamatuar özelliği de vardır. Nitrik oksit (NO) gibi antiinflamatuar molekülleri yok eden ve HOCL, tyrozil radikalleri veya NO_2 gibi pro-oksidan maddeleri sentezleyen MPO'nun katalitik olarak aktif bir protein olarak

davranmasına ek olarak, son zamanlarda bu enzimin katalitik özelliklerinden bağımsız olduğu kanıtlanmış hücre aktive edici özelliklerinin proinflamasyona yol açtığı gösterilmiştir(Lau vd, 2005).

MPO'nun, nötrofil aktivasyonuna merkezi olarak katıldığı bilinen CD11b/CD18 integrinlerine bağlanarak, nötrofillerin dış membranıyla birleştiği gösterilmiştir. MPO, CD11b/CD18 integrinlerine bağlanarak, süperoksit üretimi, degranülasyon ve integrin expresyonunun artmasına sağlayan intraselüler sinyal yollarının aktivasyonunu başlatır (Falk vd, 1990).

Myeloperoksidazın serumda artışının birçok hastalığın patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir. MPO'nın, inflamasyon ve kardiyovasküler hastalıklar arasında önemli bir rolü olduğu son zamanlarda yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir. Saldırgan patojenleri öldürmenin yanısıra, MPO'nın enzimatik reaksiyonundan ortaya çıkan oksidanlar endotel disfonksiyonuna, ateroskleroz, akut koroner sendrom gelişimi ve myokard infarktüsün gelişimine neden olmaktadır (Aratani vd, 2004). MPO' nın inflamasyon ve kardiyovasküler hastalıklar arasında önemli bir ilişkisi vardır. Aterosklerozun gidişatı süresince, hastalığın ilerlemesi döneminde lökosit MPO' nın artmasının belirlenmesi inflamasyonun olduğunu gösterir.

Kronik inflamasyonun kardiyovasküler hastalıklar, tip2 DM, Alzheimer hastalığı, nefropati, benign akciğer hastalıkları ve otoimmün hastalıkların patogenezinde temel rol oynadığı biliniyor. Plazma MPO' nın artışının belirlenmesi bu hastalıkların riskini gösteren bir bulgu olarak da kullanılabilir (Kaminska, 2005; Kostadinova vd, 2005).

2.5. Glikozaminoglikanlar (GAG)

Bağ dokunun ana maddesi, büyük ölçüde glikozaminoglikan (mukopolisakkarit) içerir; kondroitin sülfatlar ve diğer mukopolisakkaritler, bağ dokuda ya serbest ya da diğer proteinlere

bağlı olarak bulunurlar. Bağ dokuda en fazla bulunan glikozaminoglikanlar, hiyalüronik asit ve kondroitin sülfat polimerleridir.

Glikozaminoglikanlar (GAG), disakkaritlerin (amino şekerleri) karakteristik tekrarıyla oluşan linear polisakkaritlerdir. Disakkarit; Heksozamin: glukozamin veya galaktozamin Üronik asit: glukuronik asit veya iduronik asittir. GAG'lar şekerlerin çoğunda bulunan sülfat ve karboksil grupları nedeniyle negatif elektrik yüklüdür. Bu negatif yük suya yüksek ilgi oluşturarak jel şeklinde bir zemin maddesinin oluşmasına yol açar. Bu durum bakteri ve büyük moleküllerin hareketini kısıtlarken suda çözünebilen moleküllerin hızlı difüzyonuna izin verir

Glikozaminoglikanlar; yapılarındaki heksozaminlerin sülfatlı olup olmamasına göre;

*** Sülfatsız GAG:**

Hyaluronik asit (hiyaluron)

*** Sülfatlı GAG'lar:**

Kondroitin 4-sülfat

Kondroitin 6-sülfat

Dermatan sülfat

Keratan sülfat

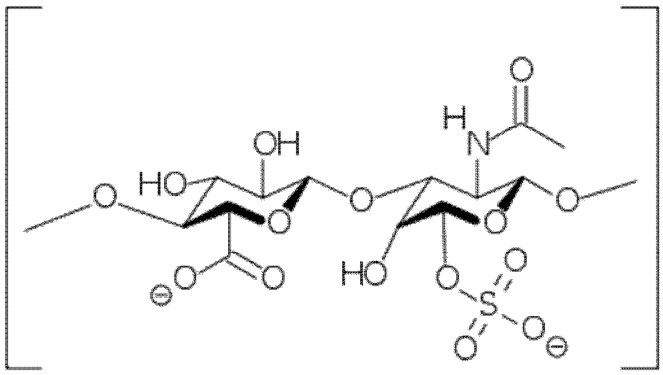
Heparan sülfat

Heparin

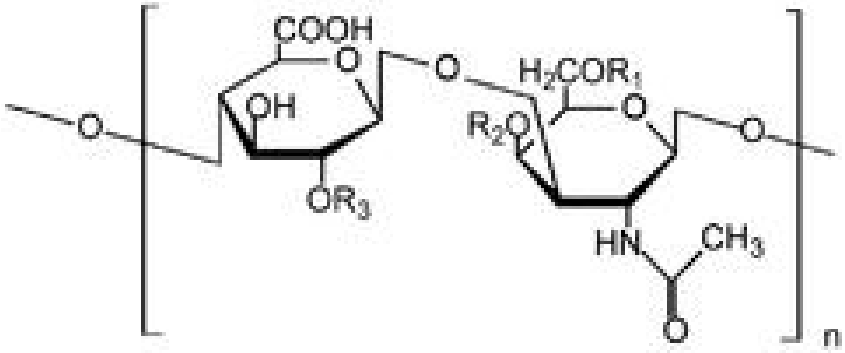
Hiyaluronik asitin akışkanlığı, eklemlerin sinoviyal sıvılarında karşı karşıya gelen kemiklerin, kaygan bir ortamda hareket etmesini sağlar. Dermatan sülfat; dermis, tendonlar, ligamentler, fibröz kıkırdak, kalp kapakları ve kan damarlarında (adventisya tabakasında) Tip I kollajen ile ilişkili olarak bulunur. Kondroitin sülfat; Tip II kollajenden zengin olan hyalin ve elastik kıkırdaklarda bulunur. Kondroitin-4-sülfat; kıkırdak, kemik, kornea, deri, notokorda ve kan damarlarında bulunur. Kondroitin-6-sülfat; Kıkırdak, göbek kordonundaki Wharton jeli,

deri ve kan damarlarında (media tabakasında) bulunur. Keratan sülfat; kornea, kıkırdak ve intervertebral disklerde bulunur. Heparan sülfat; başlıca Tip III kollajenin bulunduğu bazal laminalar, kan damarları, akciğer ve karaciğerde bulunur (int kyn.3).

Fibroblastlar, bağ dokusunun temel hücreleridir. Matrikste yer alan GAG'lar, kollagen ve elastinin çoğunu bu hücreler sentezler.



Şekil 2.5.1.Kondroitin sulfat (http://id.wikipedia.org/wiki/Kondroitin)



Şekil 2.5.2.Kondroitin-4-sulfat: R_1 = H; R_2 = SO_3H; R_3 = H. Kondroitin-6-sulfat: R_1 = SO_3H; R_2, R_3 = H. (http://id.wikipedia.org/wiki/Kondroitin)

2.6. Pestisitler

Günümüzde hızla artan dünya nüfusunun en önemli problemlerinden biri beslenme problemidir. Hızlı nüfus artışına rağmen günümüzde tarım topraklarının kısıtlı olması sonucunda, birim alandan en yüksek verimin alınması şart olarak ortaya çıkmaktadır. Bitki ve hayvanlara zarar veren canlı organizmalara karşı kullanılan kimyasal ilaçların tümüne pestisit adı verilmektedir. Günümüzde yaklaşık 1500 civarında pestisit etken maddesi mevcuttur (Anonim 1980). Tarımsal ilaçların kullanımı bir taraftan tarımsal üretimi artırırken diğer taraftan bilinçsiz ve hatalı kullanım sonucu doğrudan ya da dolaylı yollardan insan ve çevre sağlığı problemlerini de beraberinde getirirler. Pestisitler tavsiye edilen dozların üzerinde kullanıldıklarında, gereğinden fazla sayıda ilaçlama yapıldığında, gerekmediği halde birden fazla ilaç karıştırılarak kullanıldığında veya son ilaçlama ile hasat dönemi arasında bırakılması gereken süreye riayet edilmediği durumlarda gıda maddelerinde fazla miktarda kalıntı bırakabilirler. Yüksek dozda pestisit kalıntısı İçerim gıdalarla beslenen insanlarda ve çevredeki diğer canlılarda akut veya kronik zehirlenmelere neden olabildikleri gibi, özellikle bazı ürünlerde aroma ve kalite değişimleri meydana getirebilirler (Henning vd,1954).

Kimyasal maddeler, tarımda ve halk sağlığına zarar veren mikroorganizmalar ye diğer pestlerin kontrolünde yüzyıllardan beri kullanılmaktadırlar. Örneğin kükürt ilk kez fumigan olarak M.Ö. 1000 yıllarında Çin'liler tarafından kullanılmıştır. Ancak, pestisit özelliği gösteren kimyasal maddelerin (pestisit aktif maddesi) sentezi ve formülasyonlannın üretimi kimya endüstrisi devrimi ile birlikte başlamış ve zamanla büyük bir artış göstermiştir. Zamanımızda büyük bir kısmı organik sentetik kimyasal maddeler olmak üzere yaklaşık 1500 pestisit aktif maddesinin 2000 pest türüne karşı kullanıldığı kaydedilmiştir. Gelişmiş ülkelerde pestisit tüketiminin 1972 yılında 3 milyon; 1980 de 12 milyon ve 1990 da ise 50 milyon Amerikan dolarına ulaştığı bilinmektedir (Unido, 1983).

2.6.1.Pestisitlerin Sınıflandırılması

Pestisitler çok değişik şekillerde sınıflandırılabilirler. Örneğin, kullanıldıkları zararlılara göre, zararlılara etki şekillerine göre, etkili maddesine göre sınıflandırılmaktadırlar. Kullanıldıkları zararlı grubu dikkate alınarak, etkili maddelerine göre pestisitler şöyle sınıflandırılmıştır (Öztürk, 1990);

A) İNSEKTİSİDLER

1- Klorlanmış Hidrokarbonlar

2- Organik Fosfor

3- Karbamatlar

4- Sentetik Pretroid

5- Bakteriler

6- Diğerleri

B) AKARİSİDLER

1- Halojen ve Oks.

2- Amin ve Hidrazin Tür.

3- Dinitrofenol ve Est.

4- Kükürtlüler

5- Organik Kalay

6- Diğerleri

C) **FUNGUSİDLER**

a- Koruyucu Fungusidler

1- Bakırlılar

2- Kalaylılar

3- Kükürtlüler

4- Ditiyokarbomat

5- Fitalimidler

6- Nitro Bileşikleri

7- Diğerleri

b- Sistemik Fungusidler

1- Anilidler

2- Benzimidazoller

3- Morfolinler

4- Piperazinler

5- Pirimidler

6- Triazoller

7- Diğerleri

D) HERBİSİDLER

1- Fenoksi bileşik

2- Benzimidazol

3- Pikolinik Asitler

4- Klorlu Alifatik Ast.

5- Karbamatlar

6- Dinitroamin anilin

7- Anilidler

8- Üre Bileşikleri

9- Triazinler

10- Urasiller

11- Nitrofenol ve tür.

12- Diğerleri

Pestisitler uygulandıkları çevrede kalıcılıkları veya dayanıklılıklarına göre genellikle 3 grupta toplanırlar:

1- Kalıcı veya dayanıklı pestisitler,

2- Orta derecede kalıcı veya dayanıklı pestisitler,

3- Kalıcı olmayan veya zayıf derecede dayanıklı pestisitler.

Burada, kalıcılık veya dayanıklılık süresi, pestisitin uygulama yerinden genellikle %75-100 oranında uzaklaşması veya yarılanma ömrü için geçmesi gereken süreyi ifade eder. Kalıcılıkları yüksek olan OK bileşikler, uçuculuklarının az olması, kimyasal ve biyolojik olarak dayanıklı olmaları ve yağda çözünmeleri nedeniyle önem taşırlar. Kalıcılık, pestisitlerin çevre ve besin kirlenmesine yol açması açısından önemlidir (Kaya vd., 2002).

Pestisitler, Dünya Sağlık Örgütü tarafından (2002) zehirliliklerine göre de sınıflandırılırlar. Bu sınıflar:

1- Sınıf I a (çok zehirli- zararlı),

2- Sınıf I b (zehirli-zararlı),

3- Sınıf II (orta-derecede zehirli-zararlı),

4- Sınıf III (az zehirli- zararlı) bileşikler olarak dört sınıfta toplanmıştır

Tablo 2.3. Pestisitlerin Sağlık Üzerine Etkilerine Göre Sınıflandırılması

Karsinojen etkili pestisitler	Aldrin, Benomil, Captofol, Captan, Carbofuran, Klorotalonil, 2,4-D, Lindan, Tiram, Trifluralin, Zinep
Teratojen etkili Pestisitler	Aldrin, Benomil, Captofol, Captan, 2,4-D, Dinoseb, Diquat, Lindan, Maneb, MCPA, Paraquat, Propaklor, Tiram, Zineb
Mutajen etkili Pestisitler	Aldicarp, Aldrin, Aldrazin, Benomil, Captofol, Carbofuran, Klorfenvinfos, Cyanizin, Diklofluanid, Dimethoate, Disulfaton, Paraquat, Simazine, Tiram
Alerjen etkili Pestisitler	Benomil, Captofol, Captan, Klorotalonil, Lindan, Manep, Paraquat, Propaklor, Tiram, Zineb

(Vattem DA, Shetty K. Acrylamide in food: a model for mechanism of formation and its reduction. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 4:331-338,2003).

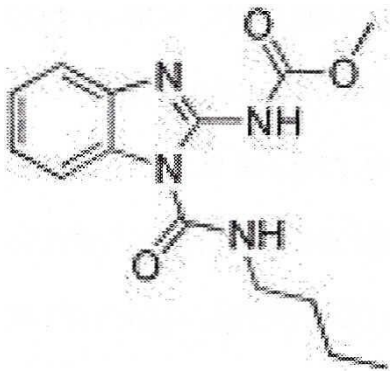
2.6.2.N-metil karbamatlar

Karbamatlar karbonik asitten türetilmektedir ve büyük çoğunluğu temas insektisitidir. Bunlar akut toksik etkileri bakımından organofosfatlılara benzemektedir. Etkileri büyük oranda kolinesteraz enziminin inhibisyonu ile ilişkilidir. Bu enzimin inhibisyonu kolayca tersinir durumdadır ve belirtiler erken dönemde ortaya çıkmaktadır.

N-metil karbamat pestisit etkileniminde kolinesteraz seviyesi tayinleri daha az fikir vericidir. Daha çok karbamilasyon meydana gelir ve kanın laboratuara taşınması sırasında kolayca reversibl olduğundan ortadan kalktığı için belirlenebilmesi güçtür. Antidotu atropindir. Toksik etkiye sahip ve yaygın olarak kullanılan karbamatlar; aldikarb, methomil, karbofuran, oksamil, metilizosiyanat, sevin, karbamil, dimetitan, propoksur ve landrin'dir (Güler ve Çobanoğlu, 1997).

2.6.3. Benomil

Benomil (Şekil 2.6.3.1), benzimidazol ailesine ait koyu renkli ve berrak olan sistemik bir fungusittir. Benomil fungusit olarak ilk kez 1968'de isimlendirilmiş ve uluslararası DuPont şirketi tarafından 1971 'de piyasaya sürülmüştür. Bu fungusit tarla ürünleri, meyveler, mantarlar ve çimlerdeki fungal hastalıkların önlenmesi için kullanılır. Aym zamanda sığır ve koyunlarda bazı mantarların neden olduğu toksik hastalıklarla mücadelede de kullanılır (Terse vd. 1993).



Şekil 2.6.3.1. : Benomil'in kimyasal yapısı (http://www.answers.com/topiclbenomyl).

Benomil memelilerde hızlı bir şekilde absorbe edilir, karaciğerde 2 farklı yol ile (hidroksilasyon ve hidroliz) metabolize edilerek idrar ve dışkı ile vücuttan dışarı atılır. Benomil'in hayvanlarda tespit edilen metabolitleri; benzimidazol 2-karbamata (MBC, karbendazim) ve 5-hidroksi-2-benzimidzole karbamat'tır (5HBC). Bu metabolitlerin vücut dokularında depo edilmediği gözlenmiştir (Gardiner vd., 1974).

Benomil'in kimliği:

Yaygın adı: Benomil

Ticari isimleri: Benlate, Benason, Fundazol, Benex, Agrosit

IUPAC kimyasal adı: Metil 1-[(bütilamino) karbonil]-lH- benzimidazol-2-karbamat

Moleküler formülü: $C_{14}H_{18}N_4O_3$

Moleküler ağırlığı: 290.3 g/mol

Fiziksel durumu: Renksiz kristalize

Stabilite: Sulu çözeltilerinde hızla hidrolize olurlar.

Çözünürlüğü: 20°C, pH 7 olan suda 3.8 mg/L

Dansite: 0.38 g/cm^3

3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışma, Trakya Üniversitesi "Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu" nun 18.02.2008 tarih ve 2008/02.10 nolu kararı ile etik kurul onayı almıştır. Çalışmada, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Biriminden temin edilen, 200-350 gr. ağırlığındaki ergin Wistar *albino* erkek sıçanlar kullanıldı. Bakım ve beslenmeleri T.Ü. Deney Hayvanları Biriminde gerçekleştirilen hayvanlar, deney süresi boyunca içilebilir çeşme suyu ve standart pellet yem ile beslenerek 21°C sıcaklıkta ve 12 saat gündüz 12 saat gece ışık periyodunda barındırıldı.

Deney grupları aşağıda belirtildiği gibi hazırlandı:

1. Grup* (n=10): *Kontrol Grubu

***2. Grup: Benomil Grubu* (n=10):** Beş hafta süreyle haftada bir kez olmak üzere intraperitoneal (IP) injeksiyon yoluyla, benomil (Cornell) 200 mg/kg'lık dozda (Banks ve Solkiman 1997) mısır yağı (1.5 ml/kg) içerisinde (Lim ve Miller 1996) çözülerek hayvanlara uygulandı.

***3. Grup: Benomil + a-Lipoik asid (LA) Grubu* (n=10):** Beş hafta süreyle haftada bir kez olmak üzere intraperitoneal (IP) injeksiyon yoluyla α-Lipoik asid (Fluka) 200 mg/kg'lık dozda (Manda vd,. 2007) serum fizyolojik (1.0 ml/kg) içerisinde (Campo vd., 2004) çözülerek hayvanlara uygulandı. Uygulamadan 30 dk. sonra (Rybak vd., 1999), benomil 200 mg/kg' lık dozda (Banks ve Solkiman, 1997) mısır yağı (1.5 ml/kg) içerisinde (Lim ve Miller, 1996) çözülerek uygulandı.

***4. Grup: Benomil + Kondroitin-4-Sülfat (C4S) Grubu* (n=10):** Beş hafta süreyle haftada bir kez olmak üzere intraperitoneal (IP) injeksiyon yoluyla kondroitin-4-Sülfat (Fluka) 25 mg/kg' lık dozda serum fizyolojik (1,0 ml/kg) içerisinde (Campo vd., 2004) çözülerek hayvanlara uygulandı. Uygulamadan 30 dk. sonra (Rybak vd., 1999), benomil 200 mg/kg' lık dozda (Banks ve Soliman 1997) mısır yağı (1.5 ml/kg) içerisinde (Lim ve Miller 1996) çözülerek uygulandı.

5. Grup: Benomil + ALA + C4S Grubu: Beş hafta süreyle haftada bir kez olmak üzere intraperitoneal (IP) injeksiyon yoluyla α-Lipoik asid (Fluka) 200 mg/kg' lık dozda (Manda vd., 2007) serum fizyolojik (1,0 ml/kg) içerisinde çözülerek hayvanlara uygulandı. Daha sonra kondroitin-4-Sülfat (Fluka) 25 mg/kg'lık dozda serum fizyolojik (1,0 ml/kg) içerisinde (Campo vd., 2004) çözülerek uygulandı. ALA ve C4S uygulamasından 30 dk. sonra (Rybak vd., 1999), benomil (Cornell) 200 mg/kg' lık dozda (Banks ve Soliman 1997) mısır yağı (1.5 ml/kg) içerisinde (Lim ve Miller, 1997) çözülerek uygulandı.

5 haftalık deney süresi sonunda kontrol ve deney gruplarındaki hayvanların vücut ağırlıkları ölçüldü. Rompun (5 mg/kg) ve ketasol(1 ml/kg) kullanımı ile anestezi altına alındıktan sonra karaciğer dokuları çıkartıldı. Çıkarılan dokuların total ağırlıkları alındı. Alınan parçaların bir bölümü enzimatik inceleme için -80^{o}C' de derin dondurucuya kaldırıldı, bir bölümü ise mikroskobik inceleme için fiksatife alındı.

Karaciğer hasarının değerlendirilmesi enzimatik ve histolojik olarak yapılmıştır. Karaciğer hasarının enzimatik değerlendirmesi için miyeloperoksidaz (MPO) aktivite ölçümü spektrofotometrik olarak yapılmıştır (Kiriş vd, 2005). Karaciğer dokusunda oluşabilecek fibrosiz değerlendirmesi ise Masson Trikrom boyama ile gerçekleştirilmiştir.

3.1.Enzimatik İnceleme:

Myeloperoksidaz aktivitesinin belirlenmesi için 50 mM K_2HPO_4 çözeltisi (pH:6) hazırlandı. Hazırlanan çözeltiye % 0,05 gr HETAB (Hekzadesiltrimetil-amonyum bromür) ilave edildi. Karaciğer doku örnekleri 0,5 gr olarak tartıldı. Örnekler 5 ml çözelti içine konarak 3-5 dk. homojenizatörde homojene edildi. Homojenizat 3 kez dondurulup çözdürüldü. 12000 rpm de 10 dk +4^{o}C' de santrifüj edildi. Dokulardan elde edilen süpernatantlar aktivite ölçümü için kullanıldı.

Enzim aktivitesini ölçmek için 100 ml 50 mM K_2HPO_4 (pH: 6) içine 0,4 g o-dianizidin 2HCl ilave edilip çözdürüldü. 170 µl H_2O_2 eklenerek karıştırıldı (substrat çözeltisi). Hazırlanan çözeltiden 800 µl, süpernatanttan 200 µl alınarak kuvarz tüpe pipetlendi. Spektrofotometre havaya karşı sıfırlandı. 0 dk. da ölçüm yapıldıktan sonra 460 nm dalga boyunda 5. dk da ölçüm alındı.

MPO birimi : ΔA/dakika/g doku olarak ifade edildi (Kiriş vd, 2005).

Hesaplama:

5.dak - 0.dak = ΔA

MPO aktivitesi = ΔA/dakika/g doku

3.2. Histolojik inceleme

Karaciğer doku hasarının histolojik olarak değerlendirilmesi için çıkarılan karaciğer dokuları Bouin fiksatifinde 24 saat fiske edildi. Alkol serilerinden (% 70, 80, 90, 96, 100) geçirilerek ksilolde şeffaflaştırıldı ve parafine gömüldü. Parafin bloklardan 5µm kalınlığında kesitler alınarak trikrom üçlü boyama uygulandı. Hazırlanan preparatların Olympus marka fotomikroskopta fotoğrafları çekilerek değerlendirildi.

Masson Yöntemi :

Weigert Hematoksilen'in hazırlanışı:

A ve B olmak üzere iki ayrı eriyik vardır. Boyaya başlamadan önce bunlardan eşit miktarda alınıp karıştırılır. 1-2 dk bekledikten sonra içine lamlar yerleştirilir.

A eriyiği: Hematoksilen 1 g

% 96'lık alkol 100 ml

B eriyiği: $FeCl_3$ 4 ml

HCl 1 ml

Distile su 95 ml

Fuksinli Ponso Boyasının hazırlanışı:

1. eriyik: Ponzo 3 g

Distile su 300 ml

2. eriyik: Asit fuksin 1g

Distile su 100 ml

Fuksinli Ponso Boyası:

I. çözelti: % 1'lik ponceauxylidine (1.eriyik) 50 ml

CH_3COOH 2-3 damla

2. çözelti: % 1'lik asit fuksin (2. eriyik) 25 ml

CH_3COOH 2-3 damla

1. ve 2. çözelti karıştırılarak fuksinli ponso boyası hazırlanır.

Fosfowolframik asit = Fosfotungstik asit

	% 5 lik	**% 1 lik**
Fosfowolframik asit	5 g	1 g
Distile su	100 ml	100 ml

Işık Yeşili

Işık Yeşili	2 g
CH_3COOH	3-4 damla
Distile su	100 ml

Boyama Yöntemi :

1. Kesitler parafinden arındırılıp suya indirildikten sonra Weigert'in Fe'li hematoksileninde 5-10 dk boyanır.

2. Çeşme suyunda 10 dk bırakılıp morartılır.

3. Fuksinli ponzo boyasında 1-3 dk boyanır.

4. Çeşme suyunda kısaca çalkalanır.

5. % 1'lik CH_3COOH'de 1-2 dk tutulur.

6. % 1'lik veya % 5'lik Fosfowolframik asit eriyiğinde 15 dk farklılaştırılır.

7. % 1'lik CH_3COOH'de 1-2 dk tutulur.

8. Işık Yeşili boyasında 1-5 dk boyanır**.**

9. Çeşme suyunda kısaca çalkalanır.

10. % 1'lik CH_3COOH'de 1-2 dk tutulur.

11. Suyu giderilir. Ksilollerden geçirildikten sonra kanada balsamı ile kapatılır.

Sonuç: Nukleuslar koyu kahverengi ya da siyah, bağ dokusu yeşil, sitoplazma kırmızı renkte boyanır. (int. Kyn 4)

3.3. İstatistiksel Analizler

Verilerin istatistiksel analizi *SPSS istatistik paket programı (versiyon 11.0)* kullanılarak yapıldı. Gruplar arasındaki farklılık için *Pair T test* uygulandı.

4. BULGULAR

Bir kontrol grubu ve dört deney grubu (benomil, benomil+lipoik asit, benomil+kondroitin4sülfat, benomil+lipoik asit+kondroitin4sülfat) halinde deneye alınan hayvanlardan benomil+LA grubuna ait bir, benomil+C4S grubuna ait iki ve benomil+LA+C4S grubuna ait dört hayvan deney süresinin içinde öldüler.

4.1. Vücut Ağırlıkları

Kontrol grubu ve deney gruplarındaki sıçanların ağırlıkları, 5 haftalık deney süresinin başında ve sonunda ölçüldü. Deney öncesi ve sonrası vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında benomil grubu dışındaki diğer dört grupta istatiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür. Benomil grubunda istatiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Karaciğer dokularının ağırlıklarında ise, gruplar arasında anlamlı bir değişiklik görülmemiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: Sıçanlarda; Benomil, lipoik asit, ve kondroitin 4 sülfatın vücut ve karaciğer ağırlıkları üzerine etkileri (Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir)

Gruplar	**Vücut Ağırlıkları (gr)**		**Karaciğer Ağırlığı**
	Deney başlangıcı	Deney sonu	
Kontrol	241,30±25,25	305,50±22,23*	12,03±0,92
Benomil	311,30±33,88	316,60±28,32	11,77±0,97
Benomil+LA	297,55±31,65	328,88±40,44**	11,36±0,95
Benomil+C4S	311,00±30,43	322,23±25,91**	10,87±4,37
Benomil+LA+C4S	298,00±23,40	339,50±19,47***	11,33±1,44

*P<0,005 , **P<0,01, ***P<0,02

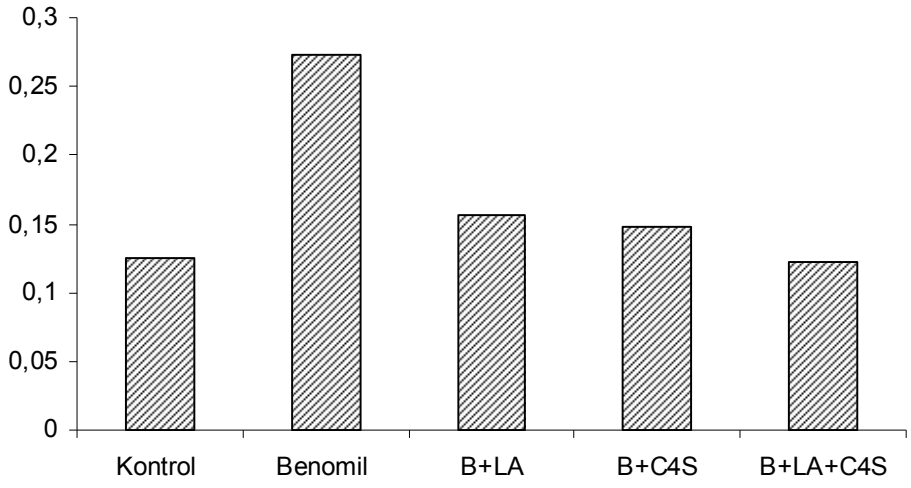
4.2. Enzimatik İnceleme:

Hepatik hücre hasarının belirlenmesi için karaciğerde myeloperoksidaz (MPO) enziminin aktivitesi ölçülmüş, sonuçlar tablo 4.2.1.'de ve şekil 4.2.1.'de gösterilmiştir. Tablo 4.2.1.'de görüleceği gibi, MPO enzim aktivitesinde, benomil grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında istatiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmektedir. Benomil grubu ile benomil + LA, benomil + C4S ve benomil+LA+C4S grupları karşılaştırıldığında ise, üç grupta da benomil grubuna göre istatiksel olarak anlamlı bir azalma saptanmıştır.

Tablo 4.2: Miyeloperoksidaz aktivitesi üzerinde benomil, lipoik asit ve kondroitin-4-sülfatın etkileri

Deney Grupları	***Miyeloperoksidaz (MPO) Değerleri (∆A/dakika/g doku)***
Kontrol	0.11
Benomil	0.27 ***
Benomil + Lipoik asit	0.15 **
Benomil + Kondroitin-4-sülfat	0.14 *
Benomil + Lipoik asit+ Kondroitin-4-sülfat	0.12 *

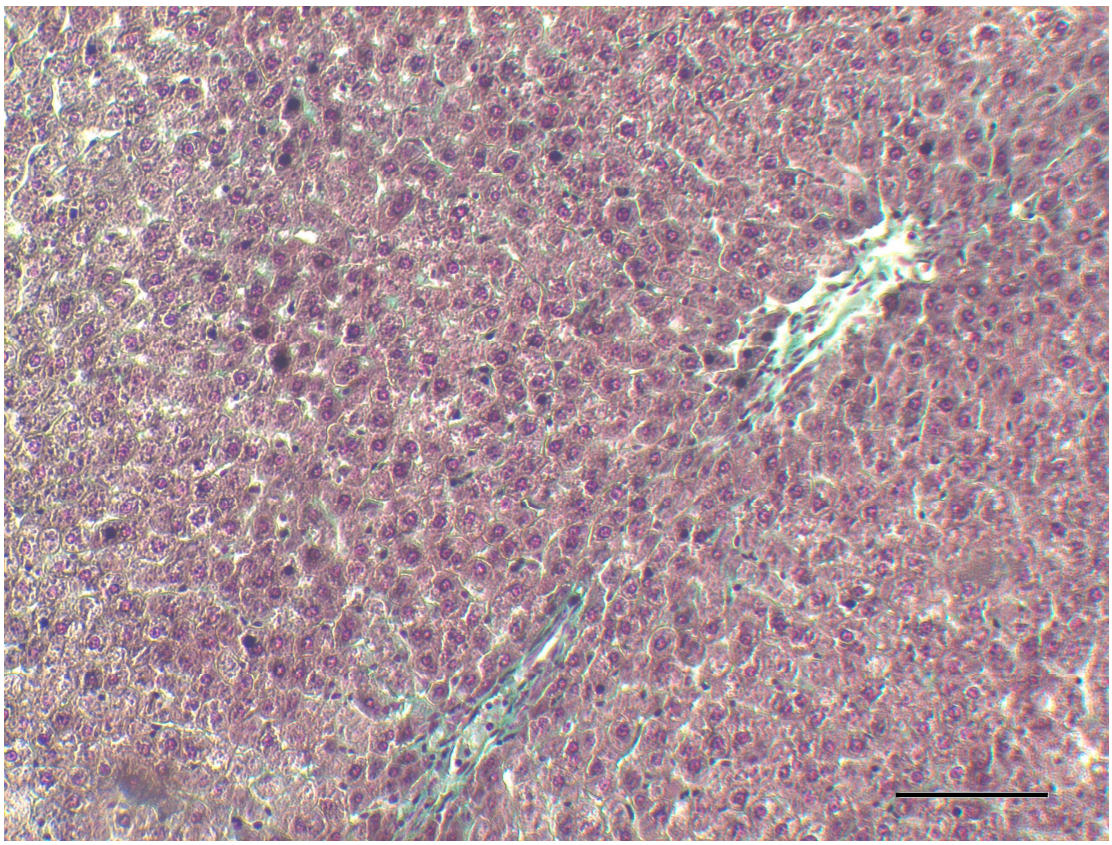
* $p< 0.05$, ** $p< 0.01$, *** $p< 0.001$



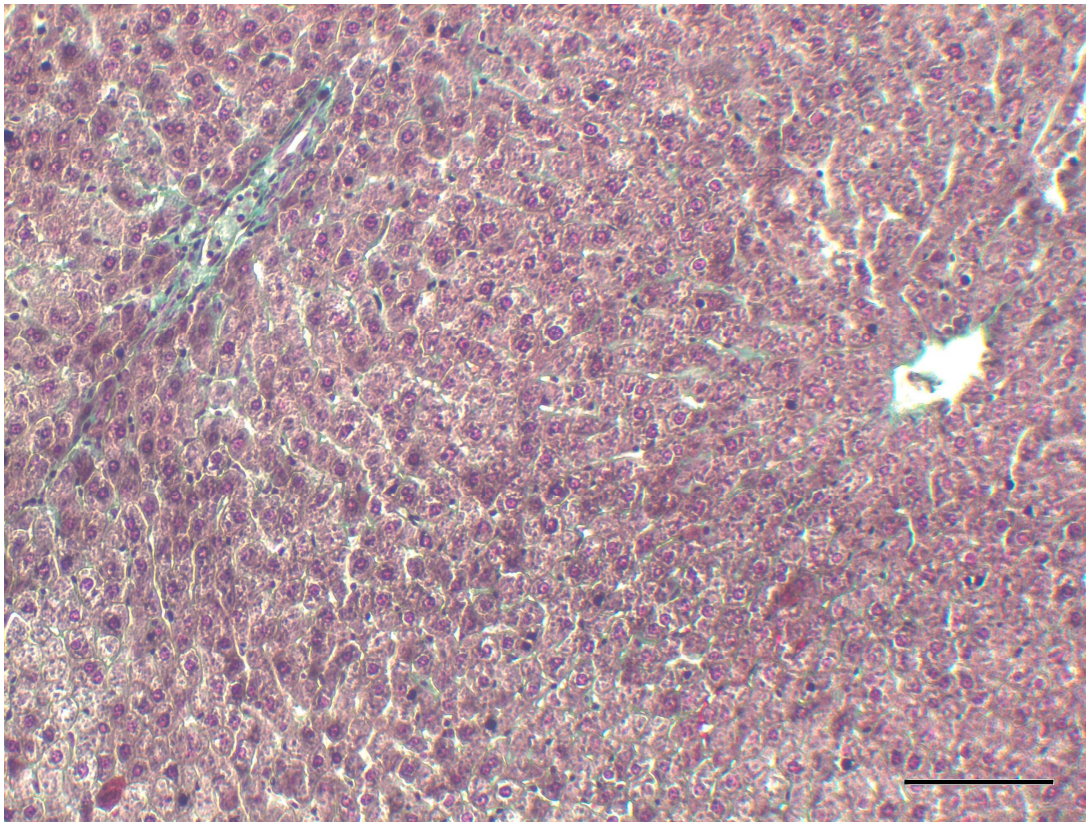
Şekil 4.2.1: Miyeloperoksidaz aktivitesi üzerinde benomil, lipoik asit ve kondroitin-4-sülfatın etkileri

4.3. Histolojik İnceleme:

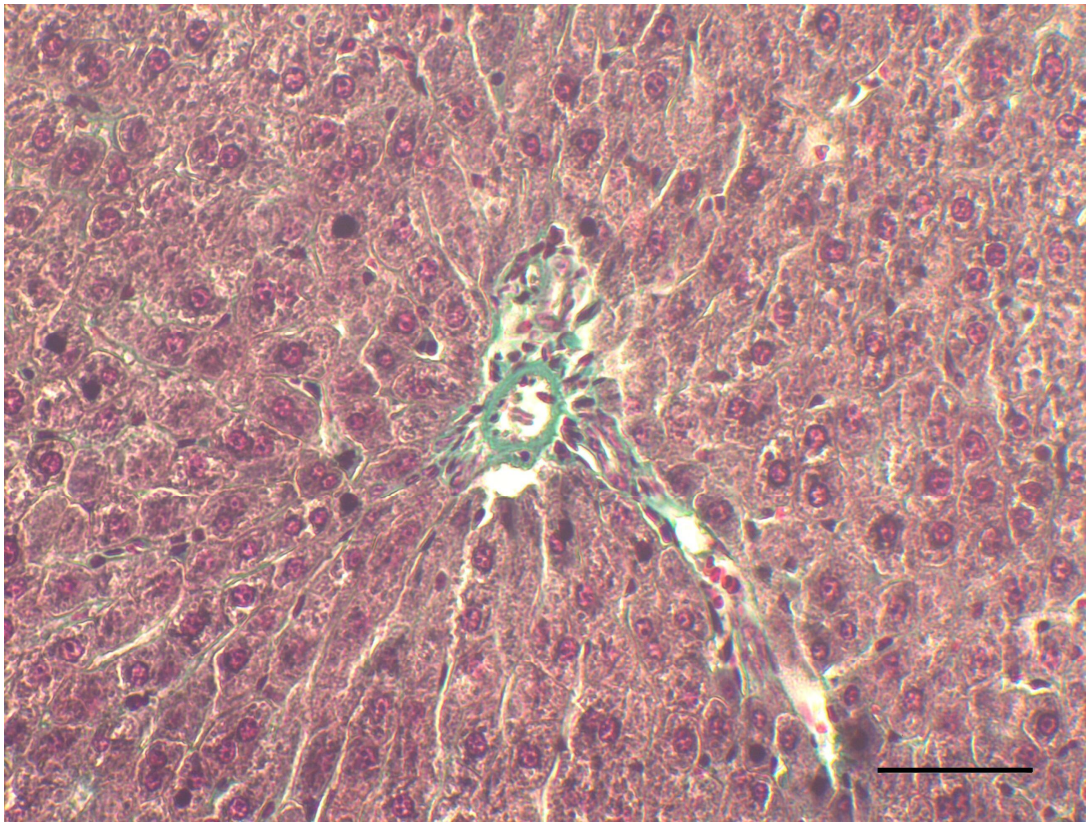
Benomil uygulanmış sıçanların karaciğer dokularında Masson Trikrom ile yapılan boyama sonucunda, kontrol grubuna oranla bağ dokuda (kollagen fibrillerde) belirgin bir artış gözlenmiştir (Şekil 4.3.5, Şekil 4.3.6, Şekil 4.3.7, Şekil 4.3.8). Lipoik asit (Şekil 4.3.9, Şekil 4.3.10, Şekil 4.3.11) ve kondroitin-4-sülfat (Şekil 4.3.12, Şekil 4.3.13, Şekil 4.3.14) uygulanmış hayvanlarda ise boyanmanın daha az olduğu görülmüştür. Bu azalma lipoik asit grubunda kondroitin-4-sülfat grubuna oranla daha azdır.



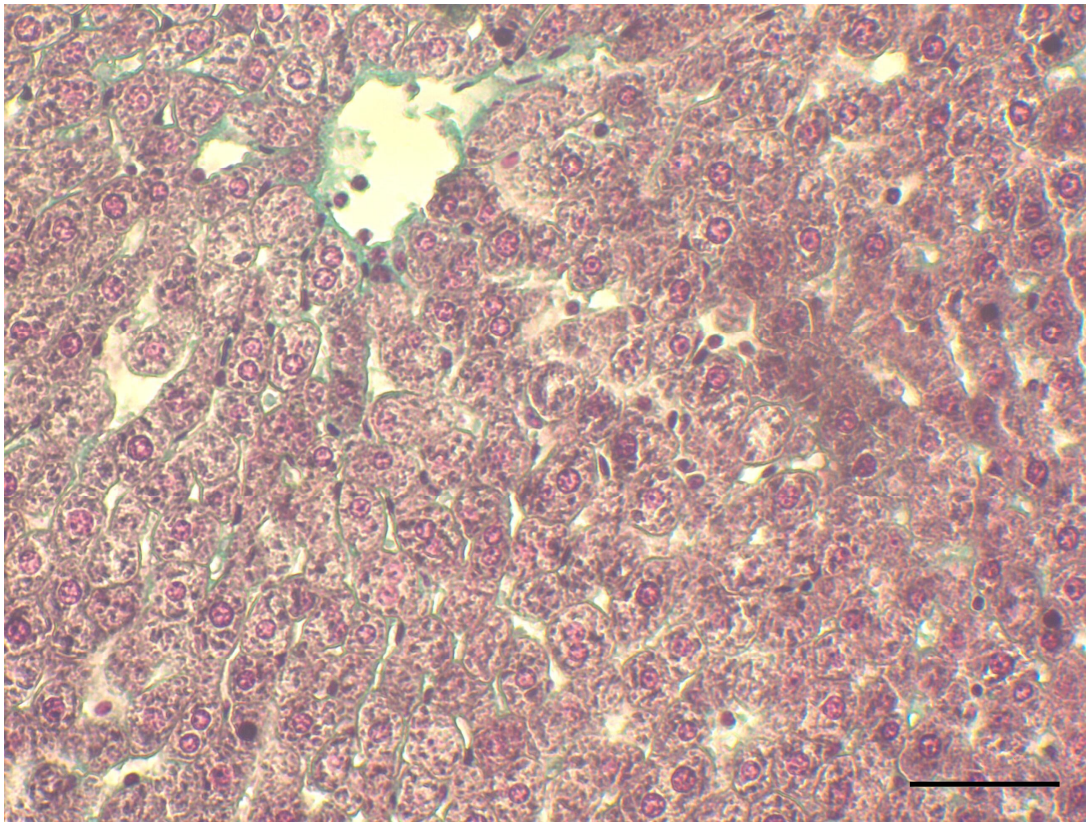
Şekil 4.3.1: Kontrol grubu (Masson trikrom) yeşil renkler : bağ doku. bar 100 mikron



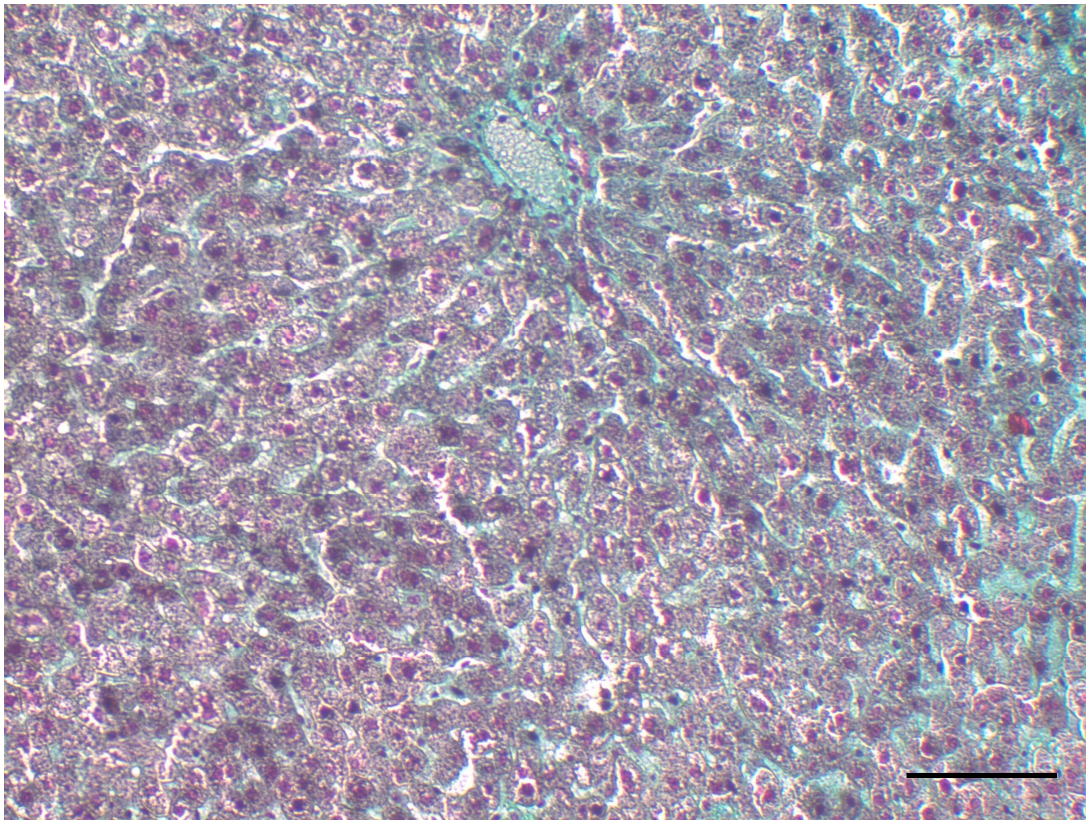
Şekil 4.3.2: Kontrol grubu (Masson trikrom) yeşil renkler: bağ doku, bar 100 mikron



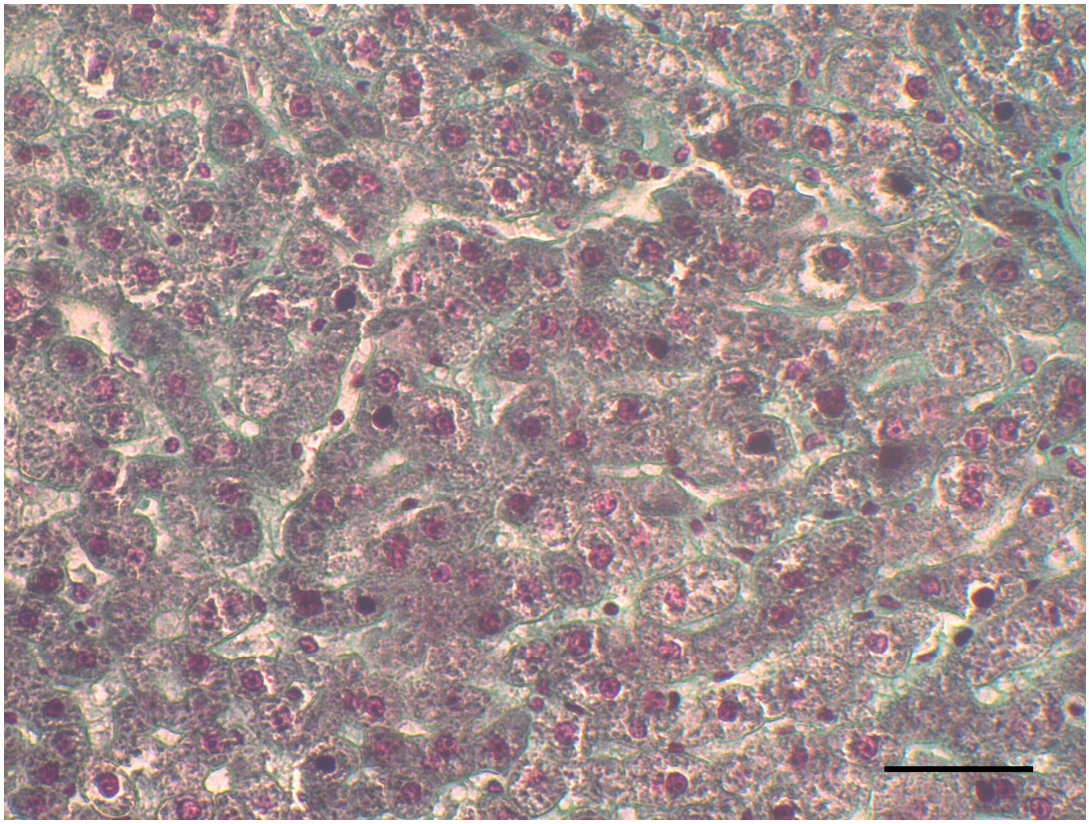
Şekil 4.3.3: Kontrol grubu (Masson trikrom) yeşil renkler : bağ doku, bar 50 mikron



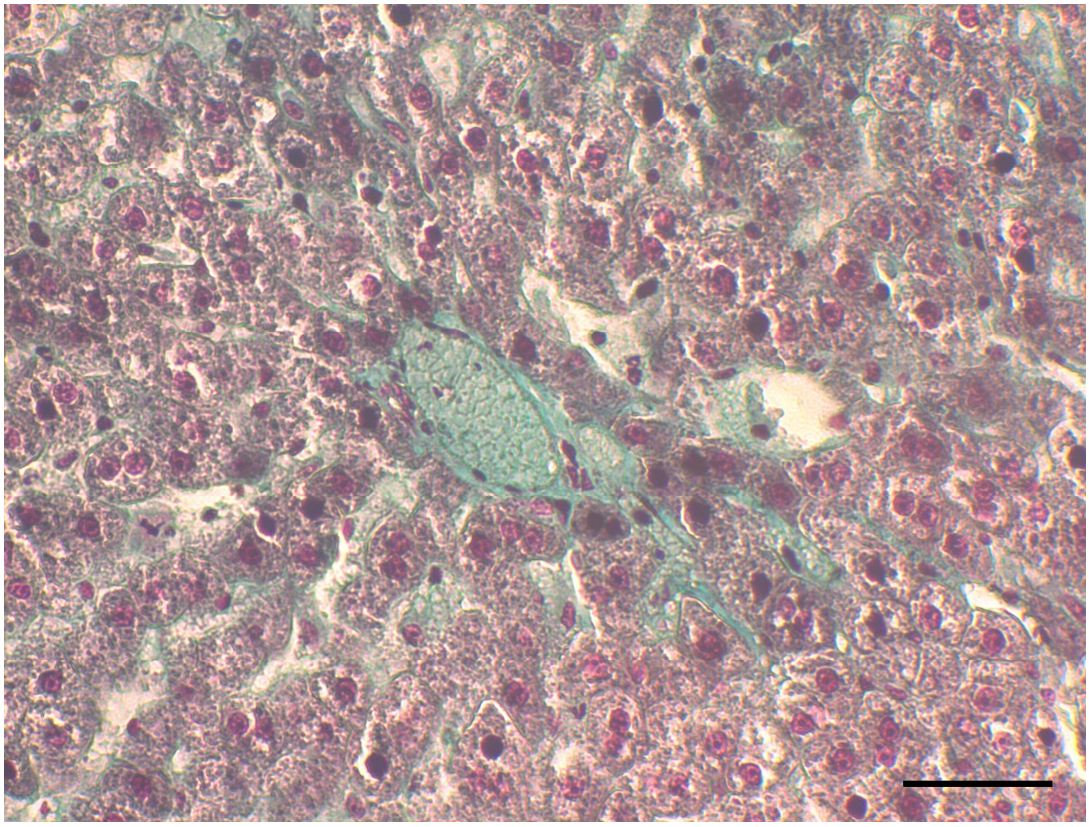
Şekil 4.3.4: Kontrol grubu (Masson trikrom) yeşil renkler: bağ doku, bar 50 mikron



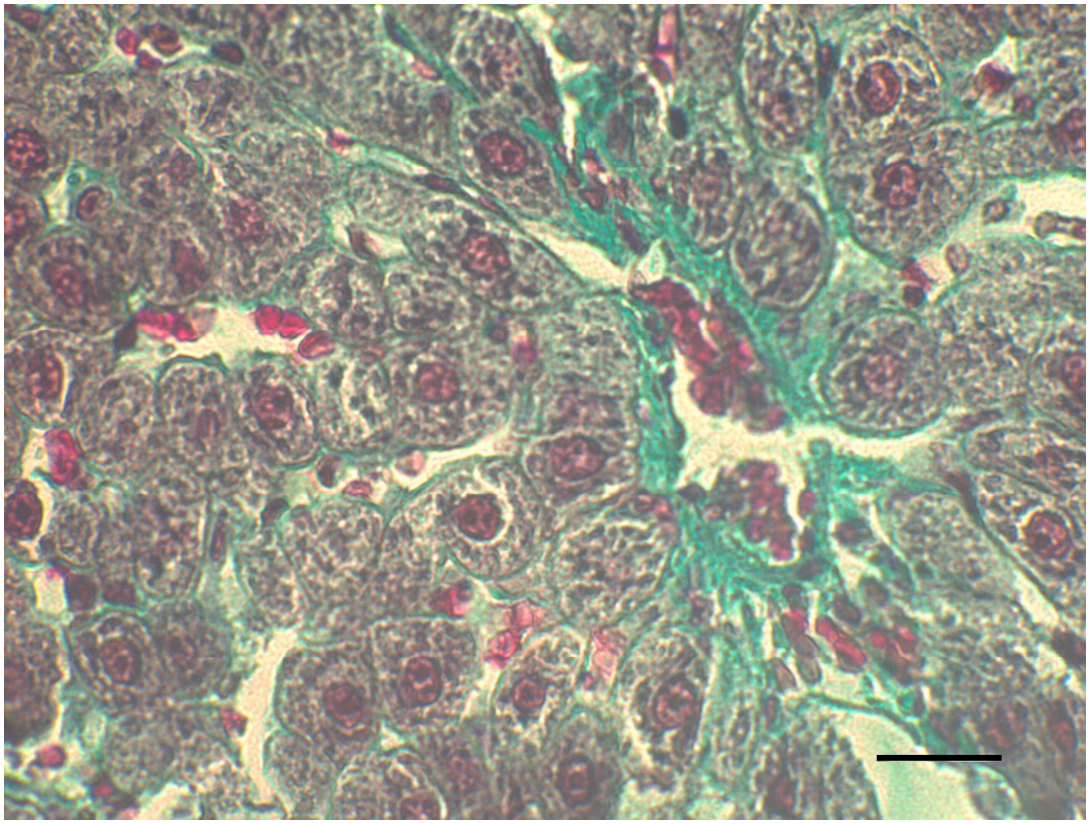
Şekil 4.3.5: Benomil grubu (Masson trikrom) yeşil renkler: bağ doku, bar 100 mikron



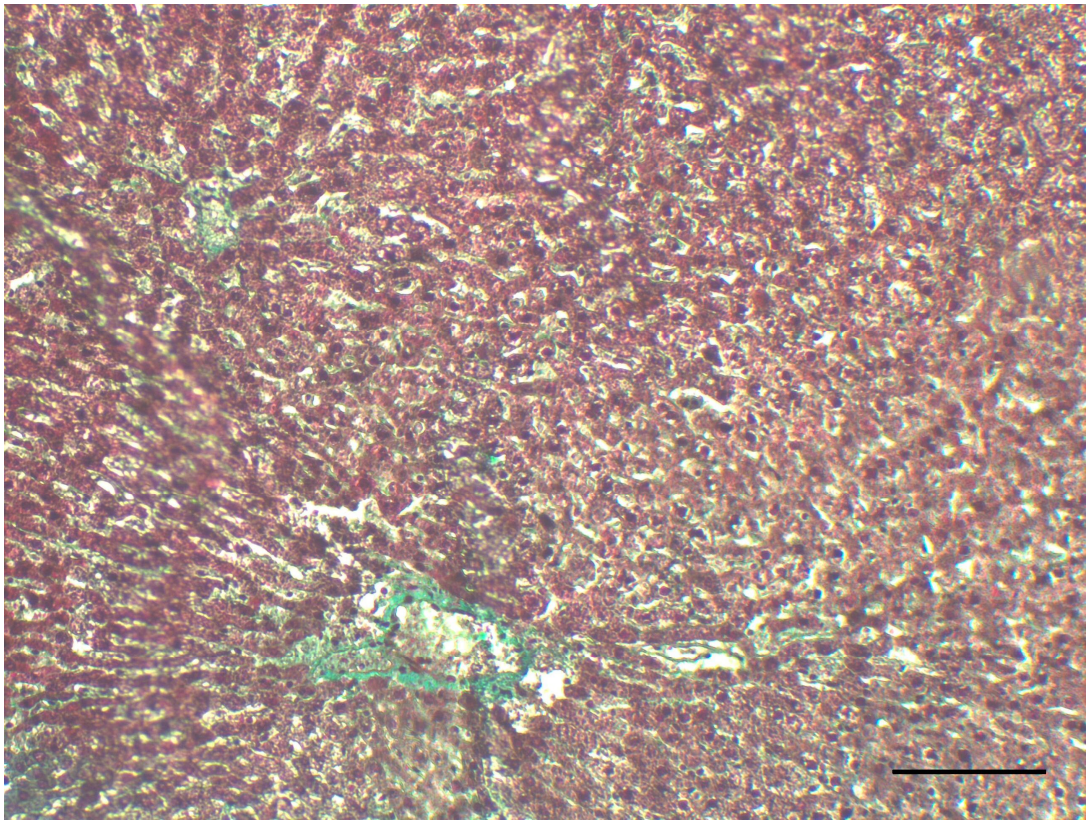
Şekil 4.3.6: Benomil grubu (Masson trikrom) yeşil renkler: bağ doku, bar 50 mikron



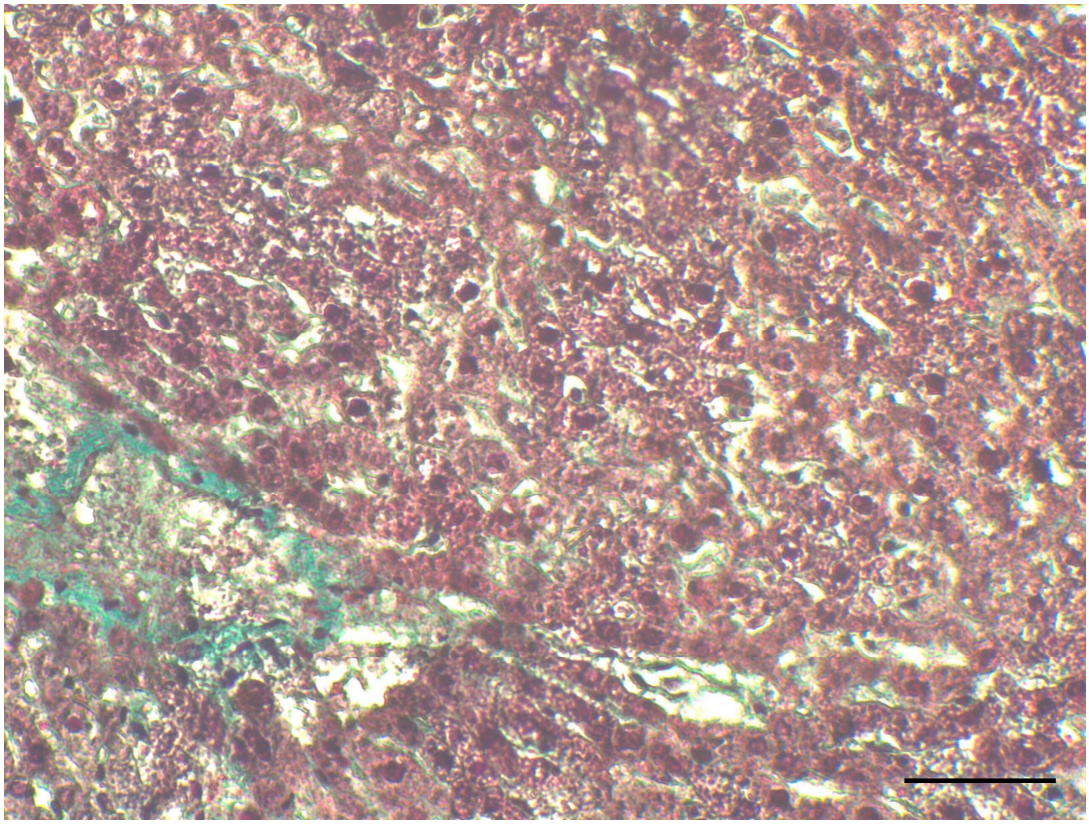
Şekil 4.3.7: Benomil grubu (Masson trikrom) yeşil renkler: bağ doku, bar 50 mikron



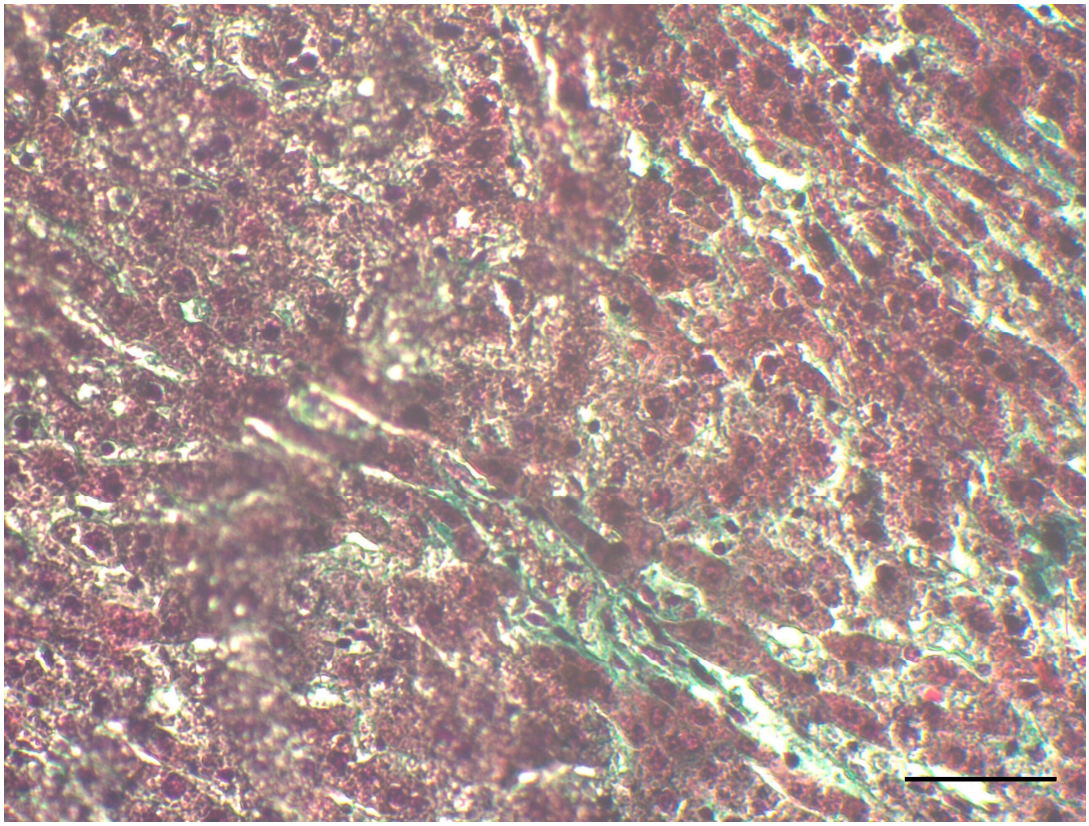
Şekil 4.3.8: Benomil grubu (Masson trikrom) yeşil renkler: bağ doku, bar 20 mikron



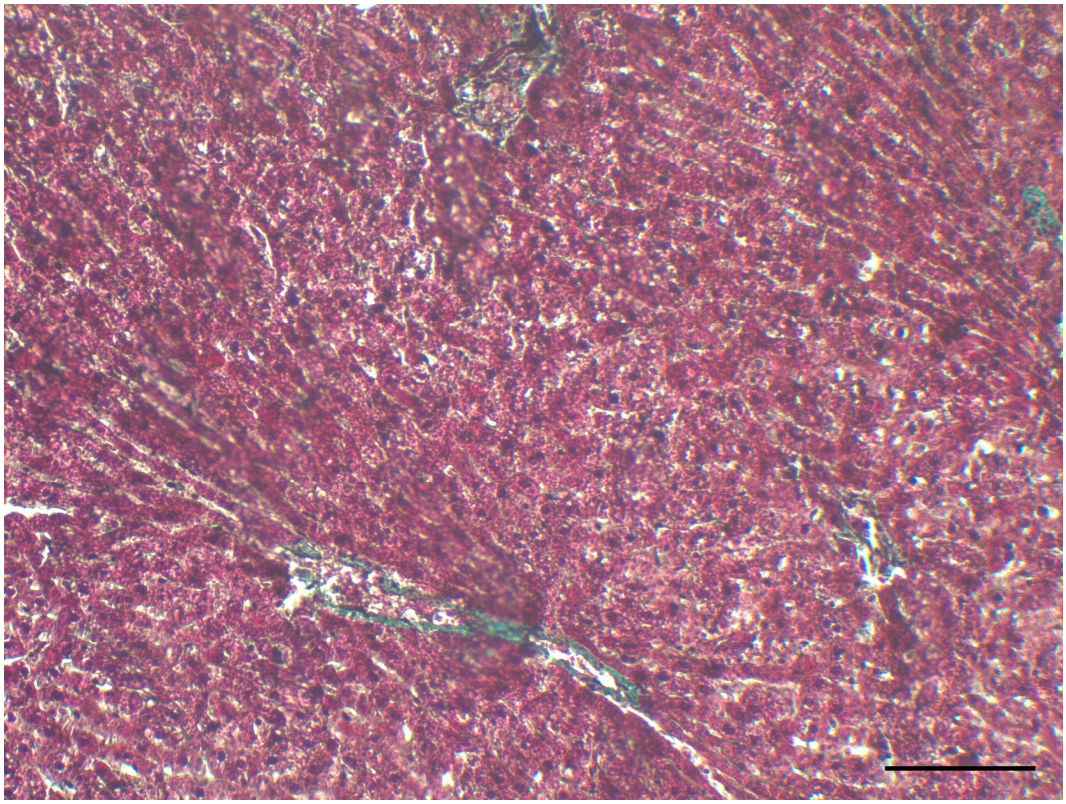
Şekil 4.3.9: Benomil+lipoik asit grubu (Masson trikrom) yeşil renkler : bağ doku, bar 100 mikron



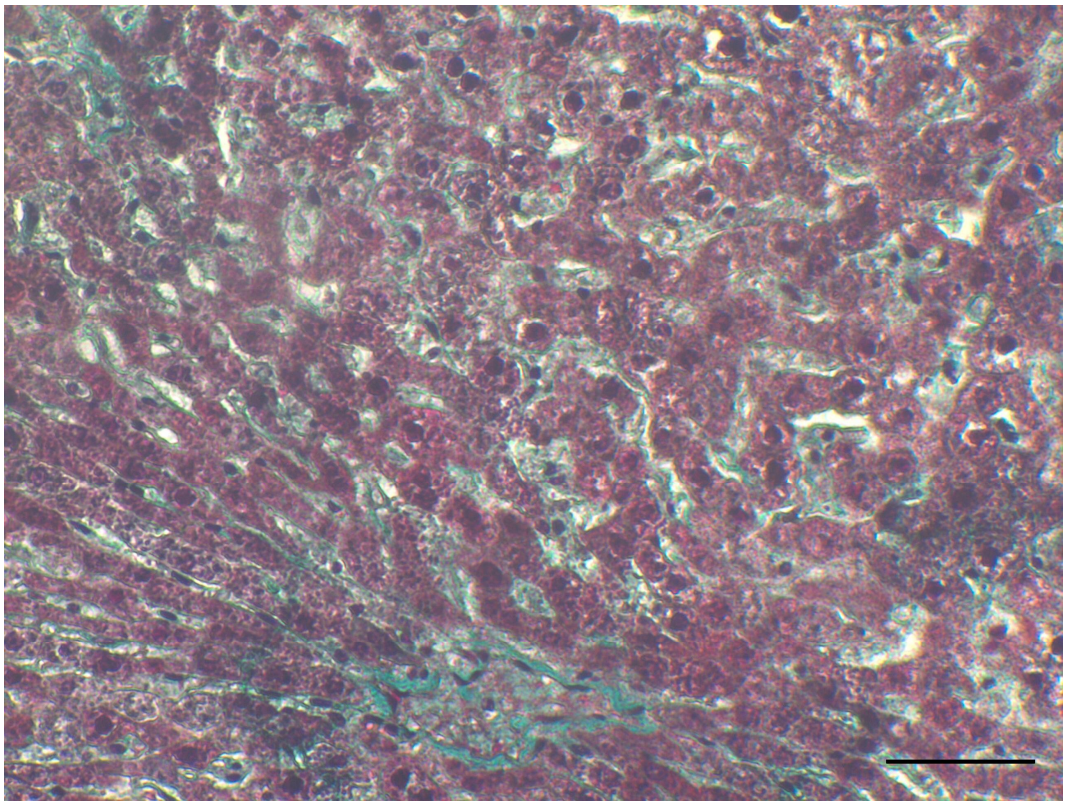
Şekil 4.3.10: Benomil+lipoik asit grubu (Masson trikrom) yeşil renkler: bağ doku, bar 50 mikron



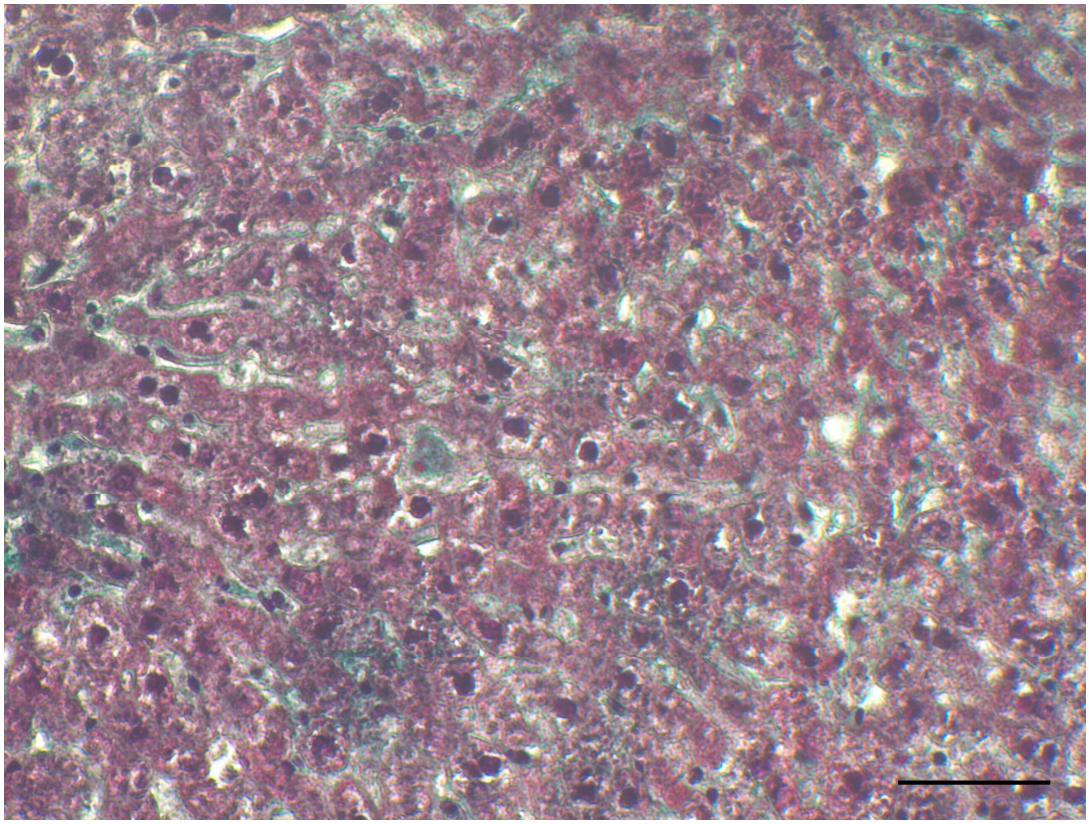
Şekil 4.3.11: Benomil+lipoik asit grubu(Masson trikrom) yeşil renkler: bağ doku, bar 50 mikron



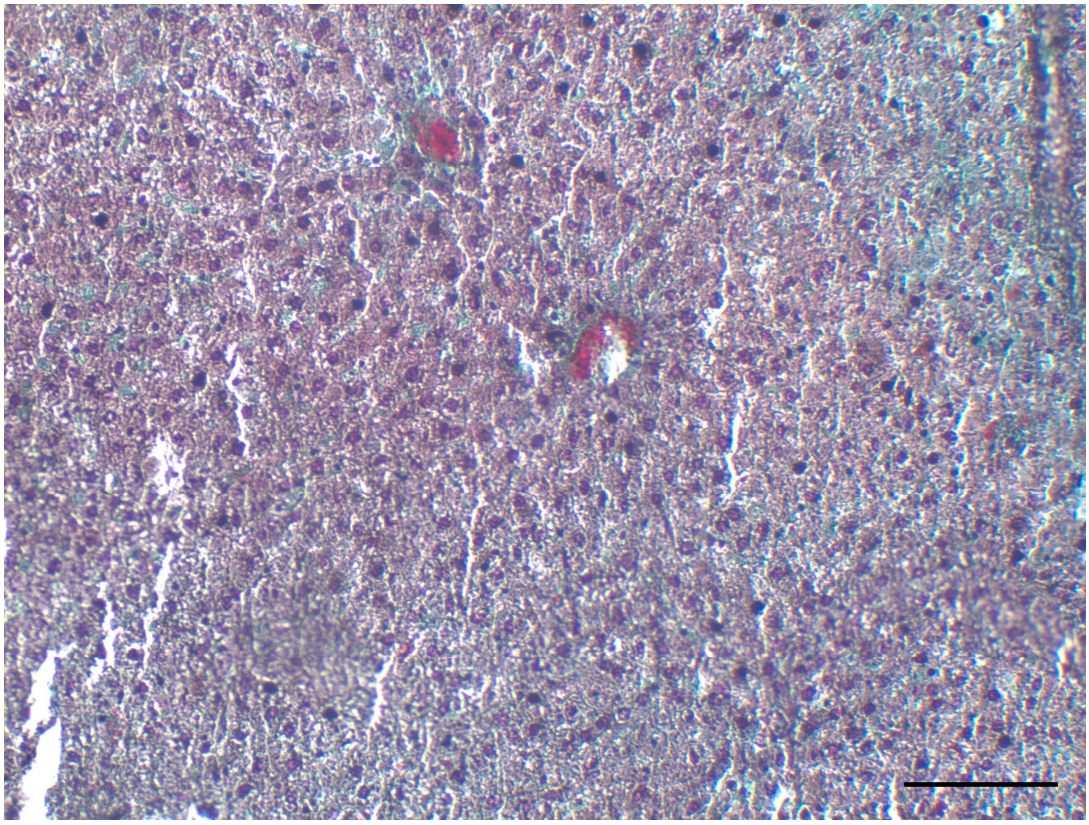
Şekil 4.3.12: Benomil+C4S grubu (Masson trikrom) yeşil renkler: bağ doku, bar 100 mikron



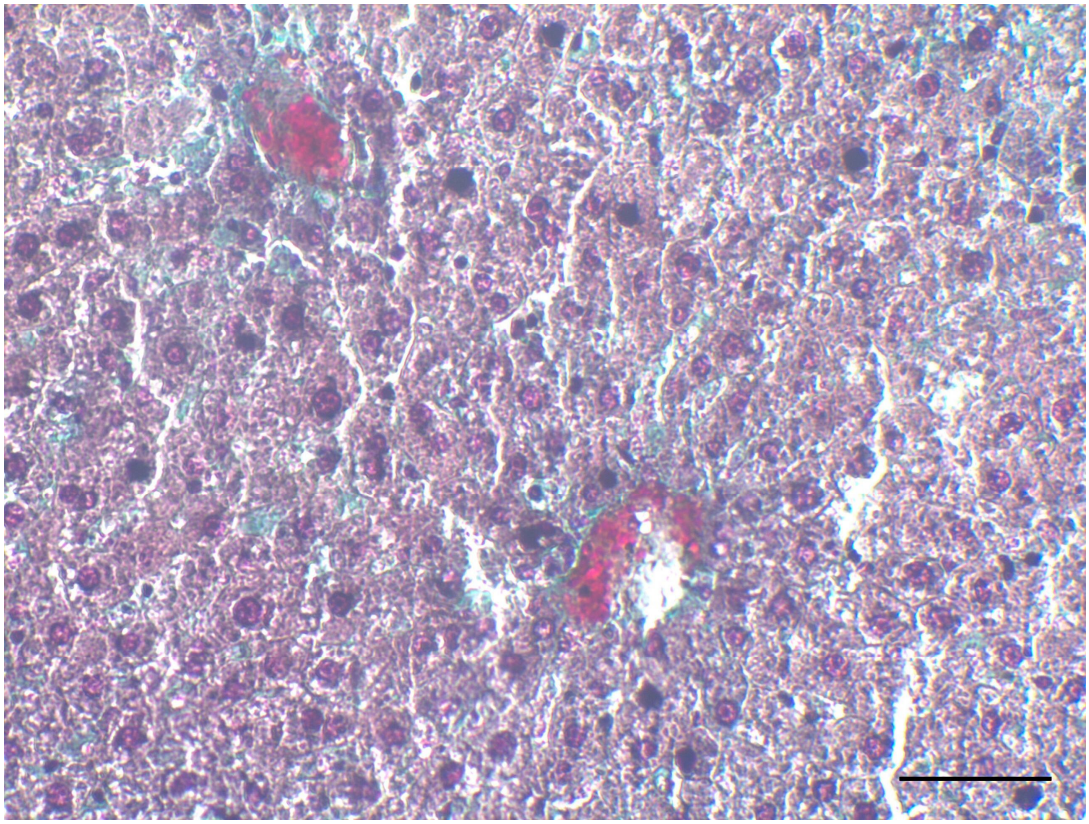
Şekil 4.3.13: Benomil+C4S grubu (Masson trikrom) yeşil renkler: bağ doku, bar 50 mikron



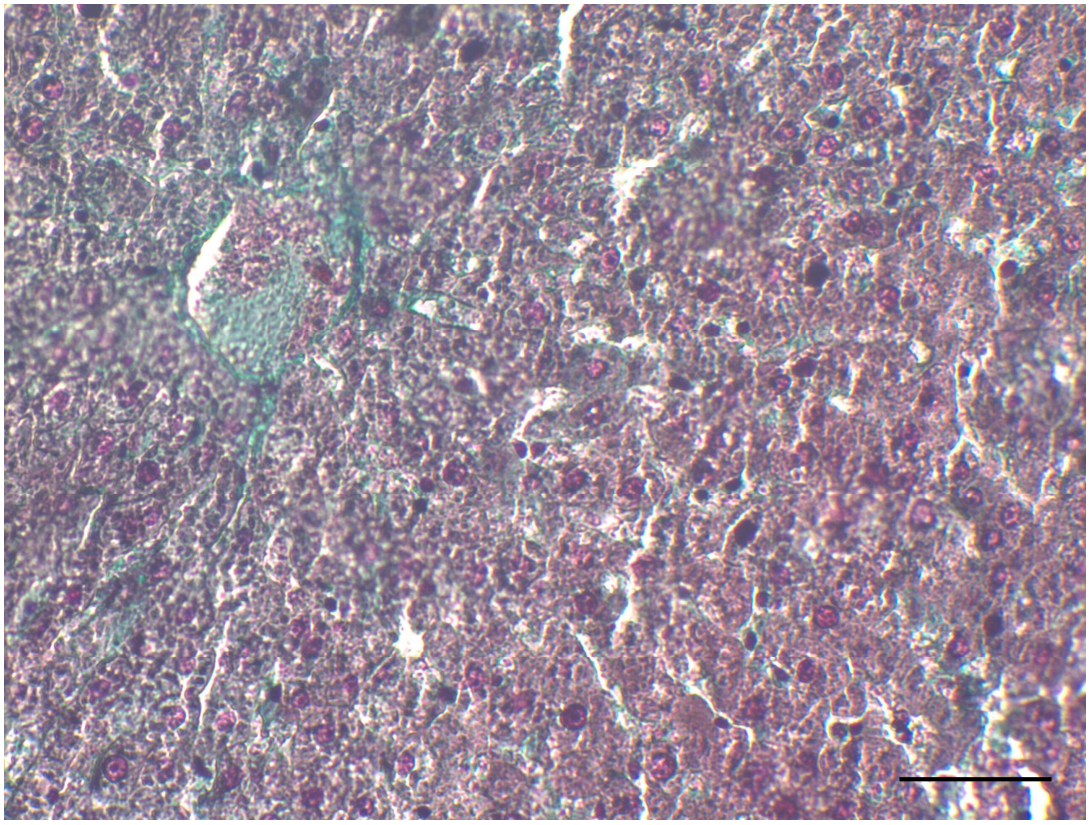
Şekil 4.3.14: Benomil+C4S grubu (Masson trikrom) yeşil renkler: bağ doku, bar 50 mikron



Şekil 4.3.15: Benomil+lipoik asit+C4S grubu (Masson trikrom) yeşil renkler: bağ doku, bar 100 mikron



Şekil 4.3.16: Benomil+lipoik asit+C4S grubu (Masson trikrom) yeşil renkler : bağ doku, bar 50 mikron



Şekil 4.3.17: Benomil+lipoik asit+C4S grubu (Masson trikrom) yeşil renkler: bağ doku, bar 50 mikron

5. TARTIŞMA

Besin maddelerinin üretimi, tüketimi ve depolanmaları sırasında, besin değerini bozan ve besinleri yok eden, zarar veren haşereleri, mikroorganizmaları ve diğer zararlıları (pestleri) yok etmek için kullanılan fiziksel, kimyasal veya biyolojik savaş maddelerine pestisitler denir. Ekonomik zehirler sınıfına giren pestisitler, kullanma yerlerine göre insektisitler (böceklere karşı), herbisitler (yabancı otlara karşı), fungusitler (mantarlara karşı), molusisitler (yumuşakçalara karşı), rodendisitler (kemiricilere karşı), akarasitler (uyuz böcekleri ve parazitlere karşı) ismini alırlar.

Tarım zararlıları ile mücadele etmek için çeşitli kimyasal maddeler, yüzyıllardan beri kullanılmaktadırlar. Örneğin kükürt ilk kez fumigan olarak M.Ö. 1000 yıllarında Çin'liler tarafından kullanılmıştır. Ancak, pestisit özelliği gösteren kimyasal maddelerin (pestisit aktif maddesi) sentezi ve formülasyonlannın üretimi kimya endüstrisi devrimi ile birlikte başlamış ve zamanla büyük bir artış göstermiştir. Zamanımızda büyük bir kısmı organik sentetik kimyasal maddeler olmak üzere yaklaşık 1500 pestisit aktif maddesinin 2000 pest türüne karşı kullanıldığı kaydedilmiştir.

Gelişmiş ülkelerde pestisit tüketiminin 1972 yılında 3 milyon; 1980 de 12 milyon ve 1990 da ise 50 milyon Amerikan dolarına ulaştığı bilinmektedir (Unido, 1983). 1930'lı yıllara kadar daha çok bitkisel kaynaklı (*Nicotiana tobacum, Strychnos nux vomica* gibi) veya anorganik (bakır sülfat, kurşun arsenit, bakır arsenit gibi) maddeler pestisit aktif maddesi olarak kullanılmıştır. 1930'lı yıllardan itibaren modern sentez kimyasındaki devrim ile birlikte alkil tiyosiyanat insektisitleri, ditiyokarbamat fungusitleri, etilen bromür, karbon sülfür fumiganları gibi çeşitli etken maddeler geliştirilmiştir. II. Dünya Savaşı başlannda ise çeşitli kimyasal maddeler (DDT, klorofenoksiasetik asit grubu maddeler gibi) deneysel olarak araştırılmaya başlanmıştır ve savaş sırasında bu aktiviteler sır olarak kalmıştır. II. Dünya Savaşından sonra tarımsal ilaçlarda çok hızlı bir gelişme olmuştur.

Bütün bu araştırma ve gelişmelerde en önemli hedef, pestisitin yok edilmesi istenen zararlıya karşı selektif (seçici) ve spesifik toksisite göstermesi, diğer canlılara (insan, bitki ve hayvanlar) minumum toksisite göstermesi olmuştur. Böylece ilk sentez edilen pestisit aktif maddelerinin ikinci ve üçüncü nesilleri olarak isimlendirilen daha güvenilir maddelerin sentezi yapılmıştır. Ancak her pestisitin bir dereceye kadar toksisitesi vardır ve sağlık açısından "tam güvenceli" bir pestisit yoktur. Bununla beraber, belirli koşullarda kullanıldıklarında riskleri azaltılabilir.

Pestisitler, kullanılmaları ile gerek halk sağlığı ve gerekse açlıkla savaşta besinlerin korunması bakımından ekonomik faydalar sağlamaktadırlar. Diğer taraftan geniş bir alanda bıraktıkları kalıntılarla su, toprak, hava ve besin kirlenmesine neden olarak, ekolojik sistemin dengesini bozmaktadırlar. Ayrıca bazıları selektif olarak kullanıldıkları canlı türü için toksik olurken (selektif toksik), bir kısmı da insanlar ve diğer memeli hayvanlara zarar verirler. Böylece de endüstride, yakın çevrede akut ve kronik zehirlenmelere neden olurlar. Pestisitlerin bu fayda zarar ilişkisini değerlendirmek ise oldukça güçtür.

Geniş spektrumlu karbamatlı bir fungusit olan benomil'in toksik etkileri ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. Bu araştırmalarda, genellikle benomil'in teratojenik (Cummings vd., 1990), sitogenetik (Dane ve Dalgıç, 2005), histopatolojik ve biyokimyasal (Balkan ve Aktaç, 2005; 2009) etkileri ile, erkek üreme sistemi üzerindeki etkileri (Lim ve Miller, 1996; Hess ve Nakai, 2000; Sorour ve Larink, 2001) çalışılmıştır. Ayrıca, benomil'in hücre membranları ile etkileşime girdiği (Suwalsky vd., 2000); lipid peroksidasyonuna neden olduğu (Banks ve Soliman, 1997) ve çeşitli antioksidanların sınırlı da olsa bir antioksidatif korumaya neden olabileceği (Banks ve Soliman, 1997; Min ve Kang, 2008) bildirilmiştir.

Vücudun en büyük organı olan karaciğer kimyasal maddelere karşı çok duyarlıdır. Çünkü yabancı kimyasal maddelerin biyotransformasyona uğradığı başlıca yer karaciğerdir.

Ayrıca bu maddeleri metabolize eden enzimlerin, sitokrom P-450 monooksijenaz sisteminin konsantrasyonu yüksektir. Bu nedenle ksenobiyotiklerin aktivasyonu ile oluşan birçok aktif metabolit burada hepatotoksik maddelere dönüşürler. Bu maddeler karaciğer bozukluklarının etiyolojisi ve patojenezisinde etken olurlar (Vural, 2005).

Normal metabolizma koşullarında reaktif oksijen türlerinin ve diğer serbest radikallerin sürekli oluşması normal fizyolojik fonksiyonlar ve hücresel redoks olayları için önemlidir. Oluşan radikaller vücuttaki antioksidan savunma sistemleri tarafından uzaklaştırılır. Organizmada serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma sistemi arasında bir denge söz konusudur. Çeşitli endojen ve eksojen faktörlerin etkisi ile serbest radikallerin aşırı düzeyde oluşması ve antioksidan savunmanın yetersiz kalması vücutta oksidatif hasara yol açar; nükleik asidler, proteinler ve çoklu doymamış yağ asidleri ile etkileşim sonucu hücrenin yapısı ve fonksiyonları zarar görür.

Oksidatif stres ve satellit hücre aktivasyonu kollagen sentezini artırarak karaciğer fibrozu gelişiminde etkilidir. Oksidatif stresin oluşabilmesi için ya serbest radikaller artmalı ya da antioksidan savunma mekanizmaları zayıflamalıdır. (Şentürk, 2004). Antioksidan savunma mekanizması zayıflarsa, bu serbest oksijen radikalleri organizmaya zararlı olabilmektedir. Tek bir elektronun oksijene ilave olmasıyla süperoksid anyon radikali oluşmaktadır. Oluşan bu süperoksid anyonu, süperoksit dismutaz ile hidrojen perokside dönüştürülür. Hidrojen peroksit, serbest radikal olmadığı halde yüksek konsantrasyonlarda toksik olabilir ve en toksik oksijen radikali olan hidroksil radikaline dönüşebilir (Şentürk, 2004). Lipid peroksidasyonu serbest oksijen radikalleri tarafından başlatılan ve zar yapısındaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu içeren kimyasal bir olaydır. Lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan kuvvetli oksitleyici bir radikalin zar yapısındaki doymamış yağ asidi zincirinin alfa-metilen gruplarındaki hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile başlar (Southorn, 1988).

Biyolojik sistemlerde bu serbest radikalin, hidroksil radikali olduğu kabul edilmektedir. Serbest radikaller ve reaksiyon ürünleri biyomoleküller, fagositler ve myofibroblastların aktivitelerini artırırlar ve karaciğerde fibroz oluşur. Bazı hayvan modellerinde antioksidanların kullanımı ile karaciğer fibrozunun azaldığı ve (Tahan vd., 2004) satellit hücrelerin aktivasyonlarının antioksidan etkisiyle bloke edildiği gösterilmiştir. Hücre kültürü ortamında, sıçan stellat ve kuppfer hücreleri fonksiyonlarına antioksidanların etkileri üzerinde yapılan bazı çalışmalarda, bu iki hücrenin düzenleyici fonksyonlarının aynı zamanda karaciğer hasarından da sorumlu olduğu ileri sürülmüştür (Kawada vd., 1998).

Organizmaların oksidatif savunma mekanizmalarını ekzojen kaynaklı antioksidanlar ile de destekleyebilecekleri günümüzde giderek önem kazanan bir konu olmaktadır. Özellikle bitkisel kaynaklı bazı maddelerin kuvvetli antioksidan özelliklerini gösteren çalışmalar hızla artmaktadır (Gülcü vd., 2008; Ayaz ve Alpsoy, 2007).

Son yıllarda, çeşitli dokularda oksidatif hasarlara karşı koruyucu etkiye sahip antioksidanlar arasında kondroitin-4-sülfat (C4S) ve α-lipoik asidin (ALA) önemi hızla artmaktadır (Ha ve Lee, 2003; Campo vd., 2004; Pires Das Neves vd., 2004; Sung vd., 2005; Çakatay, 2006; Gonzalez-Perez ve Gonzalez-Castaneda, 2006; Duenschede vd.,2007; Manda vd., 2007). Yapılan çalışmalarda, özellikle karaciğer dokusunda belirlenen hasarlarm çoğunun oksidatif stres yoluyla meydana geldiği belirtilmiştir (Hoek ve Pastorino 2002, Kaplowitz 2002).

Bu çalışmada, lipid peroksidasyonuna neden olduğu bilinen (Suwalsky vd., 2000) fungusit benomil ile oluşturulan karaciğer fibrozuna karşı α-lipoik asit ve C4S'ın tek başlarına ve birlikte uygulandıklarında oluşabilecek muhtemel koruyucu etkileri araştırıldı. Çeşitli kimyasal maddelerle oluşturulan karaciğer hasarının belirlenmesinde biyokimyasal ve histopatolojik olarak değişik parametreler kullanılmaktadır. Bu parametrelerden biri, dokudaki miyeloperoksidaz enziminin aktivitesinde görülen değişikliklerdir.

Myeloperoksidaz (MPO), memeli nötrofillerinin granüllerinde yer alan bir enzim olup, fagosite edilmiş bakterilerin öldürülmesinde önemli rol oynamaktadır. İnflamasyon alanlarında bulunan aktive olmuş polimorfonükleer lökositler ve monositlerden salınan myeloperoksidaz enzimi insan immün sistemi fonksiyonunda önemli bir rol oynar (Ketle, 1997; Klebanotf, 2005). Nötrofiller, sitoplazmada bulunan myeloperoksidaz (MPO) enziminin katalizlediği reaksiyonla güçlü oksidatif bir yapı olan hipokloridi oluştururlar (Hawkins vd., 2003).

$$H_2O_2 + Cl^- \xrightarrow{MPO} HOCl + OH^-$$

MPO, H_2O_2 ile birlikte tiyosiyonat iyonların veya halojen iyonlardan birinin de beraber bulunduğu bir ortamda antibakteriyel etki göstermektedir.

Karaciğer sirozunda oksidatif stresin biyolojik göstergesi olarak kanda myeloperoksidaz seviyelerini inceleyen bir çalışmada, sirotik hastalarda MPO düzeyinin, kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu bulunmuştur (Işıksal, 2003).Yine, birçok hastalıkta MPO düzeylerinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. (Malle vd. 1956-1967; Podrez vd., 2000; Reynolds vd., 1999).

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, yukarda belirtilen araştırmaların sonuçlarını destekler niteliktedir. Tablo 4.2.'den de görülebileceği gibi, benomil uygulanmış sıçanların karaciğer dokularında MPO aktivitesi istatistiksel olarak önemli düzeyde yükselmiştir. Bu sonuç da, benomilin karaciğer dokusunda hasara neden olduğunu göstermektedir.

Çeşitli nedenlerle karaciğerde üretilen ROS' nin, karaciğer hasarında önemli rolleri vardır. ROS, hepatosit nekrozu, apoptoz ve HSH aktivasyonuna katılmaktadır (Parola ve Robino, 2001; Wu ve Zern, 2000) Kronik karaciğer hastalıklarının ortaya çıkardığı en önemli

sorun hepatik fibrozdur. Karaciğerin büyük bir kısmını oluşturan parankimal dokunun, bağ doku ile yer değiştirmesi bu önemli organda yapı ve fonksiyon bozukluklarına yol açar. Fibröz sonucu sinüzoidlerin etrafında bir bağ doku yoğunlaşması oluşur ki bu vasküler difüzyonun bozulmasına neden olur ve sonuçta hepatik fonksiyon kaybı ortaya çıkar (Muriel 1998; Naziroğlu vd. 1999; Friedman, 2000; 2004; Iredale, 2001).

Çeşitli nedenlerle ortaya çıkan karaciğer hasarı sırasında HSH otokrin olarak üç önemli sitokin açığa çıkarır: TGF-β, IGF ve PDGF. Bunlar fibrojenik sitokinlerdir ve HSH lerin aktive olarak ECM ve kollagen sentezini arttırmasına neden olurlar. HSH lerin yoğun olarak salgıladıkları kollagen fibril ve ECM birikimleri, sinüzoidal endotel hücrelerinin porlarını kaybetmelerine yol açarlar. Bu da, kan ve hepatosit arasındaki madde alışverişini engeller ve hepatositlerde fonksiyon kaybına neden olur (Iredale, 2001; Senoo, 2004; Friedman, 2000; 2004).

Bu çalışmada da, karaciğer kesitlerine Masson trikrom boyama uygulanarak karaciğerdeki ECM ve kollagen artışı incelenmiştir. Benomil uygulanmış hayvanların karaciğerlerinde kontrol grubuna oranla, ECM ve sinüzoidal alanlarda boyanma daha yoğun olarak gözlenmiştir (Şekil 4.3.5, Şekil 4.3.6, Şekil 4.3.7, Şekil 4.3.8). Bu da, benomile bağlı olarak dokuda kollagen artışını göstermektedir.

Biyolojik bir antioksidan olan lipoik asidin, çeşitli kimyasalların neden olduğu oksidatif strese karşı birçok dokuda koruyucu olarak iş gördüğü araştırıcılar tarafından gösterilmiştir (Arivazhagan P. vd., 2001; Pires Das Neves vd., 2004; Sung vd., 2005; Duenschede vd., 2007). Sıçanlarda hepatik iskemi uygulamasından 90 dakika önce verilen lipoik asidin karaciğerde koruyucu etkisinin olduğunu belirtmişlerdir. Yine, bir başka çalışmada farelerde arsenit toksisitesine karşı lipoik aisdin karaciğer, böbrek ve testislerde koruyucu etki sağladığı gösterilmiştir (Pires Das Neves vd., 2004). Kondroitin-4-sülfat ile ilgili bazı çalışmalarda da, bu maddenin karaciğer toksisitesine karşı koruyucu olabileceği ileri sürülmüştür. (Ha ve Lee 2003),

CCl_4 in neden olduğu hepatotoksisitede CS ın karaciğer dokusunda inflamasyon ve sirozu önemli ölçüde engellediğini göstermişlerdir. Yine, bir başka araştırıcı grubu (Campo vd., 2004) CCl_4 in neden olduğu subkronik karaciğer fibrogenezinde C4S ın antioksidan ve antifibrojenik etkisini açıklamışlardır.

Bu çalışmada elde edilen bulgular yukarda verilen araştırmaların sonuçlarını desteklemektedir. Benomil uygulamasından 30 dakika önce LA ve C4S verilen hayvanların karaciğerlerinde Masson trikrom boyanmanın kontrol grubundaki boyanmadan farklı olmadığı görülmüştür (Şekil 4.3.15, Şekil 4.3.16, Şekil 4.3.17). Oysa sadece benomil uygulanmış hayvanların karaciğerlerinde boyanmanın daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.3.5, Şekil 4.3.6, Şekil 4.3.7, Şekil 4.3.8). Bu da, LA ve C4S nin benomile karşı antifibrojenik etkisini göstermektedir. LA ve C4S C4S nin antifibrojenik etkileri karşılaştırıldığında C4S nin daha etkili olduğu söylenebilir.

Sonuç olarak bu çalışma:

1) MPO aktivitesinin kontrol grubuna oranla benomil grubunda daha fazla olması benomilin, karaciğerde hasara neden olduğunu doğrulamıştır.
2) Benomil ile birlikte LA ve C4S uygulanmış hayvanların karaciğer MPO düzeylerinin kontrol grubu ile benzer olması, bu iki maddenin karaciğeri benomilin yaratabileceği hasarlara karşı koruduğunu göstermiştir.
3) Masson trikrom ile yapılan bağ doku incelemelerinde, benomilde boyanmanın daha yoğun olması, karaciğerde benomile bağlı olarak fibrosiz oluştuğunu göstermiştir.
4) Benomil ile birlikte LA ve C4S uyguamalarında ise, boyanmanın kontroldekine benzer olması, bu iki maddenin antifibrojenik etkiye sahip olduğunu göstermiştir.

6. KAYNAKLAR

Aaalt, B. and Haenen, G.R.M.M., 2002, "The toxicity of antioxidants and their metabolites'', *Environmental toxicology and Pharmacology*, 11,3-4,:251-258.

Abdel-Zahaer O. A., Abdel-Zahaer R. H., Mahmoud M. M., Farrag M. M. Y., 2008, The potential protective role of alpha-lipoic acid aganist acetaminophen-induced hepatic and renal damage. *Toxicology*, 243: 261-270.

Abuja PM, Albertini R. 2001, Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. Clin Chim Acta; 306**:** 1-17.

Akkuş İ. 1995, Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları. Konya.

Aktümsek, A. 2004, Anatomi ve Fizyoloji, 2. Baskı, 366-370, Nobel Yayınları, İstanbul.

Anonim 1980, 1. Ulusal Zirai Mücadele İlaçlan Simpozyumu. Zirai Mücadele ve Zirai Karatina Genel Müdürlüğü. Tarım ve Orman Bakanlığı Ankara.

Aratani Y, Kura F, Watanabe H, 2004, In vivo role of myeloperoxidase for the host defence. Infect Dis; 57: 515-115.

Arivazhagan P., Ramanathan K., Panneerslvam C. 2001, Effect of DL-α-lipoic acid on the status of lipid peroxidation and antioxidants in mitochondria of aged rats. *Journal of Nutritional Biochemistry* 12, 2-6.

Arrigo, A.P., 1999, Gene expression and the thiol redox state Free Radical Biology and Medicine, 27(9-10): 936-944.

Aruoma, O.I. 1998, Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *J. Am.Oil. Chem. Soc*. 75(2):199–212.

Ayaz E. Alpsoy H.C., 2007, Sarımsak (Allium sativum) ve geleneksel tedavide kullanımı. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 31(2):145-149.

Aytekin Y, Solakoğlu S. 2006, *Temel Histoloji*; 332-47.

Balkan S. Aktaç T. 2005, Studies on the liver functions in rats exposed to benomyl . *J. Biol. Science*, 5(5): 666-669.

Balkan S., 2010, Sıçanlarda Benomil toksisitesine karşı kondroitin-4-sülfat(C4S) ve α-lipoik asitin (LA) koruyucu etkileri Trakya Üniversitesi,Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.

Banks D., Solkiman R. I., 1997, Protective effects of antioxidants against benomyl-induced lipid peroxidation and glutathione depletion in rats. *Toxicology*, 116: 177-181.

Basaga HS, 1990, Biochemical aspects of free radicals. *Biochem Cell Biol*; 68: 989-98.

Bataller R, Brenner DA. 2005, Liver fibrosis. *J Clin Invest*;115: 209–31.

Bergendi, L., Benes, L., Durackov, Z., Ferencik, M., 1999, "Chemistry, physiology and pathology of free radicals''. *Life Sciences* 65: 1865-74.

Biewenga, G., Haenen, G.R., Bast, A., 1997, "The pharmacology of the antioxidant lipoic acid''. *Gen Pharmacy*, 29, pp. 315-331.

Bissell DM, Roll J. 1990; Connective tissue metabolism and hepatic fibrosis. Zakim D, Boyer TD (Ed.) Hepatology: A Textbook of Liver Disease. Philadelphia: W.B. Saunders. 454.

Bissel DM, Maher JJ. 1996, Hepatik fibrosis and cirrhosis. Zakim D, Boyer TD (Ed.) A Textbook of Liver Disease. Philadelphia: W.B.Sounders Company; 506.

Birvar K., Dergün Ç.1989, Topoğrafik Anatomi, 1. Baskı, 185-190, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Yayınları, İstanbul.

Blackbourne L. H., Antev J., Moore C. 2001, Anatomi (Çev.), 3. Baskı, 242-246, Palme Yayıncılık, Ankara .

Bolzan, D.A and Bianchi, N.O. 1997, Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in humanblood: influence of sex, age and cigarette smoking, *Clin. Biochem*. 30:6 449-454.

Boyunağa H, Celik C. 1996, Serbest radikaller ve hücresel denge. *Bilim Teknik Dergisi* 347: 98-100.

Brown KE, Brunt EM, Heinecke JW, 2001, Immunohistochemical detection of myeloperoxidase and its oxidation products in kupper cells of human liver. *Am J Pathol*; 159. 2081-2088.

Buettner GR. 1993, The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys*; 300:535-543.

Bullock, M.W., Brockamann, J.A., Patterson, E.L., Pierce, J.V., Macchi, M.E.,1954. " Proposed structures for protogen-A and protogen-B. *J.Am. Chem Soc''*. 76, pp. 1827-1828.

Busse, E., Zimmer, G., Schopohl, B., Kornhuber, B., 1992, "Influence of α-lipoic acid on intracellular glutathione in vitro and in vivo''. *Arzneim-Forsch/Drug Res*, 42, pp. 829-832.

Cadenas, E., 2001, "Handbook of antioxidants (2nd ed)''. Marcel Dekker Incorporated, Newyork, 23, 473p.

Campo G.M., Avenoso A., Campo S., D'Ascola A., Ferlazzo A.M., Calatroni A. 2004, The antioxidant and antifibrogenic effects of the glycosaminoglycans hyaluronic acid and chondroitin-4-sulphate in a subchronic rat model of carbon tetrachloride-induced liver fibrogenesis. *Chemico-Biological Interactions* 148:125–138.

Cheeseman, K.H., Slater, T.F., 1993, "An introduction to free radical biochemistry''. *British Medical Bulletin*, 49, pp. 481-493.

Clement B., Grimaud J. A., Campion J. P., Deugner Y., Guillouzo A. 1986, Cell Types Involved in Collagen and Fibronectin Production in Normal and Fibrotic Human Liver, *Hepatology*, 6, 225-234.

Coleman MD, Eason RC, Bailey CJ. 2001, The therapeutic use of lipoic acid in diabetes: a current perspective. *Environ Toxicol Pharmacol*;10:167-172.

Combettes L, Dumont M, Berthron B, Erlinger S, Claret M. 1988, Release of calcium from endoplasmic retikulum by bile acits in rat liver cells. *J Biol Chem*;263:2299-2303.

Condes-Lara M, Graff-Guerrero A, Vega-Riveroll L. 1999, Effects of Cypermethrin on the electroensefalograpic activity of therat: a model of chemically induced seizures. *NeurotoxicolTeratol*; 21:293-8.

Cremer, D.R., Rabeler, R., Roberts, A., Lynch, B., 2006, "Safety evaluation of α- lipoic acid (ALA)''. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 46, 1: 29-41.

Cummings A.M., Harris S.T., Rehnberg G.L. 1990, Effects of methyl benzimidazolecarbamate during early pregnancy in the rat. *Fundamental and Applied Toxicology,* 15: 528-535.

Çakatay U. 2006, Pro-oxidant actions of α-lipoic acid and dihydrolipoic acid. Med Hypotheses; 66(1):110-7.

Çelik A, Mazmanci B, Çamlıca Y, Çömelekoğlu U, Aşkin A. 2005, Evaluation of cytogenetic effects of lambda-cyhalothrinon Wistar rat bone marrow by gavage administration. *Ecotoxicol Environ*/61:128-33.

Dane F., Dalgıç Ö., 2005 ,The effects of fungucide benomyl (Benlate) on growth and mitosis in onion (Allium cepa L.) root apical meristem. Acta Biologica Hungarica. 56(1-2): 119-128.

Deby-Dupont GDC, Lamy M. 1999, Neutrophil myeloperoxidase revisited: it's role in health and disease.; 36: 500-513.

Diler Aslan., Tietz, 2005 ''Klinik Kimyada Temel İlkeler''. Beşinci Baskıdan Ceviri, Palme Yayıncılık, 748-60.

Duenschede F., Erbes K., Riegler N., Ewald P., Kircher A., Westermann S., Schad A., Miesmer I., Schöck S., Gockel I., Kiemer K.A., Junginger T. 2007, Protective effects of ischemic

preconditioning and application of lipoic acid prior to 90 min hepatic ischemia in a rat model. *World J Gastroenterol*. July 21;13(27):3692 -3698.

Evans, J., Goldfine, I.D., 2000, α-lipoic acid: a multifunctional antioxidant that improves insulin sensivity in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Tecnology&Therapeutics*. 2:401–13.

Everse J. 1998, The structure of heme proteins compounds I and II. some misconceptions. *Free Radic Med;* 24: 1338-1346.

Falk RJ, Terrell RS, Charles LA, Jenette JC. 1990, Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro. 87: 4115-4119.

Fenna RE, 1987, Crystallization and subunit structure of canine myeloperoxidase. *J Mol Biol*.; 196: 919-925.

Friedman SL, Roll FJ, Boyles J, Arenson DM, Bissell DM. 1989, Maintenance of differentiated phenotype of cultured rat hepatic lipocytes by basement membrane matrix. *J Biol Chem* 264:10756–62.

Friedman S.L 2000, Moleculer regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Bio Chem*. 275:2247-2250.

Friedman S.L. 2004,The cellular basis of hepatic fibrosis-mechanism and treatment strategies. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol. 1(2): 98-105.

Friedman SL. , 2007, Hepatic Fibrosis Jn: Schiff ER, Sorrell MF, Maddrey WC editors.Schiff's Diseases of the Liver, 10th Edition. Philadelphia: Lippincott Williams &Wilkins:395-418.

Gardiner J.A., Kırkland J.J., Klopping H.L. and Sherman H. 1974, Fate of benomyl in animal. J. *Agriculture Food Chemistry*,22:419-427.

Gonzalez-perez O., Gonzalez-Castaneda R.E., 2006, Therapeutic perspectives on the combination of α-lipoic acid and vitamin E.*Nutrition Research*, 26: 1-5.

Goralska, M., Dackor, R., Holley, B., McGahan, M.C., 2003, "Alpha lipoic acid changes iron uptake and storage in lens epiteial cells''. Exp Eye Res,76(2), pp. 241-8.

Gökpınar, S., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T., Durmaz, Y., 2006, Algal Antioksidanlar. E.U. *Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, 23(1/1): 85-89.52.

Gözükara, E.M., 1989, Biyokimya. İnonu Universitesi Tıp Fakultesi yayınları Malatya: 55,56,705,845-848.

Gutteridge JM, Halliwell B. 2000, Free radicals and antioxidants in the year. A historical look to the future. Ann N Y Acad Sci 2000; 899: 136-147.

Gülcü M., Demirci A.Ş., Güner K.G.,2008, Siyah üzüm;besin içeriği ve sağlık açısından önemi. *Türkiye 10. Gıda Kongresi*; 5: 179-182. Kongre Kitapçığı, Erzurum.

Güler Ç., Çobanoğlu Z., 1997, Pestisitler. *Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizisi* No: 52, Ankara.

Gürkan S.A, 2004, Heterosiklik yapıdaki bazı bileşiklerin sentezi, yapı aydınlatılması ve biyolojik etki çalışmaları Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi. Ankara.

Ha B. J. , Lee J. Y. 2003, The effect of chondroitin sulfate against CCl_4-induced hepatotoxicity. *Biol. Pharma. Bull*. 26(5):622-626.

Halliwell, B. 1997, Antioxidants and human disease: A general introduction. *Nutr. Rev*. 55 (1):44–52.

Halliwell B, Gutteridge JMC. 1999, Free Radicals in Biology and Medicine. 3rd ed. New York: Oxford.

Han, D., Handelman, G., Marcocci, L., Sen, C.K., Roy, S., Kobuchi, H., Flohe, L., Packer, L., 1997, "Lipoic acid increases de novo synthesis of cellular glutathione by improving cysteine utilization''. Biofactors, 6: 321-338.

Hatiboğlu M.T. 2004, Anatomi ve Fizyoloji, 14. Baskı, 32-36, Hatiboğlu Yayınevi, Ankara.

Hawkins CL, Pattison DI, Davies MJ. 2003, Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins. Amino Acids; 25: 259-74.

Henning, J.C., Davis, A. C., Robinson, W. B. 1954. Flavor and color evaluation of canning crops grown in soil treated with insecticides.J.of. Food Tech. 8,227.

Hess R.A., Nakai M., 2000, Histopathology of the male reproductive system induced by the fungicide benomyl. *Histol Histopathol*, 15: 207-224.

Hoek J.B. and Pastorino J.G., 2002, Ethanol, oxidative stres and cytokine-induced liver cellinjury. Alcohol, 27: 63-68.

Iredale J.P., 2001, Hepatic stallate cell behavior during resolution of liver injury. *Semin Liver Dis*; 21(3):427-436.

Işıksal F. 2003, Gastroenteroloji ve hepatoloji serum nitrit/nitrat ölçümünün klinik önemi. Gastroenterohepatoloji 14: 18-22.

Johnson NW. 1991, Creviculer fluid-based diagnostic tests. Cur Oppion Dent.; 1: 52-65-20

Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. 1993, Basic Histology. 7th Ed. Istanbul. Appleton & Lange,:380-94.

Junqueria LC, Carnerio J, Kelley RO. 1998, Basic Histology. Aytekin Y (Çev. Ed.) s.307-319, İstanbul, Barış Kitabevi.

Kaminska B. 2005, MAPK signalling pathways as molecular targets for antiinflamatory therapy from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochim Biophys Acta*; 1754: 253-62.

Kaplowitz N., 2002, Biochemical and cellular mechanisms of toxic liver injury. *Seminars Liver Disease,* 22:137-144.

Kaur, C. and Kapoor, H.C. 2001, Antioxidants in fruits and vegetables-the millennium's health, *International Journal of Food Science and Technology*, 36, 703-725.

Kawada N, Seki S, Inoue M, Kuroki T. 1998, Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin, and N-acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and Kupffer cells. *Hepatology*;27:1265-74.

Kawano S, Tatsuni E, Yoreda N, Nagata S, Yamaguci N. 1993, Supression of gene expression of myeloperoxidase (MPO) by gamma interferon (IFN-gamma) inHL60 cells. Lymphokine Cytokine Res 12: 85-81.

Kaya S, Pirinççi İ, Bilgili A. 1998, Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji. Medisan Yayın Serisi: 35, Ankara,: 222-355.

Kaya, S.; Pirinçci, İ.; Bilgili, A. 2002, *Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji*, 2. baskı,Medisan Yayın 385-402.

Ketle AJ, Van Dalen CJ. 1997, Peroxynitrite and myeloperoxidase leave the same footprint nitration. Redox Rep; 3: 257-258.

Kehrer JP. 1993, Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol*; 23:21-48.

Kılıçturgay K, Badur S (Ed.) ViralHepatit. İstanbul 2001;317.

Kiriş İ., Okutan H., Savaş Ç., Yönden Z., Delibaş N. 2005, The effect of Gadolinium chloride on renal injury in the model of experimental aortic ischemia-reperfusion.*Turkish J. Vasc.Surg*;14(2):13-18.

Klebanotf AJ. 2005, Myeloperoxidase: a key regulator of neutrophil oxidant production. Redox Rep 1997;3: 3-5, Klebanotf SJ. Myeloperoxidase: Friend and Foe, J Leukoc Biol.;77: 598- 625.

Kok, A., Berkel, W.J.H., 1996, "Lipoamid dehydrogenase'', In Patel, M., Roche, T.E., Harris R.A., "Alpha-keto acid dehydrogenase complexes''. Birkhauser: 53-67.

Kostadinova R, Wahli W, Michalik L. 2005, PPARs in disease: control mechanisms of inflamation. *Curr Med Chem* 12: 2995-3009.

Krahenbühl S, Talos C, Fischer S, Reichen J. 1994, Toxicity of bile acids on the electron transport chain of isolated rat liver mitochondria. *Hepatology*;19:471-479.

Kramer, K., 2001, "Nutra ceutials in Heath and Disease Prevention''. Marcel Dekker Incorporated, New York, 8, 113p.

Lau D, Mollnau H, Eiserich JP, Freeman BA, Daiber A, Gehling UM et al 2005, Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins; 102: 431-436.

Lee KS, Buck M, Houglum K, Chojkier M. 1995,Activation of hepatic stellate cells by TGF alpha and collagen type 1 is mediated by oxidative stres through c-myb expression. *J Clin Invest;*96:2461-8.

Lehler R. 1980, Neutrophils and host defence. Ann Int Med.; 109: 127-142.

Lim J. And Miller M. G. 1996, The role of the benomyl metaboliti carbendazim in benomyl testicular toxicity. *Toxicology, and Applied Pharmacology* 142: 401-410.

Liu, J., Atanma, H., Kuratsune, H., Ames, B.N., 2002, "Delaying brain mitochondrial decay and aging with mitochondrial antioxidants and metabolites''. *Ann NY Acad. Sci*, 959, pp. 133-166.

Locksley R.M, Nelson C.S, Frankhauser J.E, Klebanoff S.J, 1987, Loss of granule myeloperoxidase during in vitro culture of human monocytes correlates with decay in antiprotozoa activity. Am J Trop Med Hyg; 36, 541-548.

Lu C, Liu Y. 2002, Interactions of lipoic acid radical cations with vitamins C and E analogue and hydroxycinnamic acid derivatives. *Arch Biochem Biophys*;406:78-84.

Malle E, Buch T, Gröne H.J. 1956-1967, Myeloperoxidase in kidney disease. Kidney Int. 2003; 64: 160.

Manda K. ; Ueno M., Moritake T. Anzai K, 2007, α-lipoic acid attenuates x-irridations-induced oxidative stres in mice. . 23:129-137.

Marshall MV, Cancro LP, Fischman SL. 1995, Hydrogen peroxide: a review of its use in dentistiy. *J Periodontol*.; 66: 786-96.

Meister A. Glutathione, 1994, Ascorbate and cellular protection. Cancer Res Suppl; 954:1969-75.

Min E.Y., Kang J.C., 2008, Effect of waterborne benomyl on the hematological and antioxidant parameters of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 92: 138–143.

Miyasaki KT, Vilson ME, Genco RJ., 1986, Klinig of Actinobocillus actino mycetemcomitoans by the human neutrophil myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system. *Infect Immun*; 161-165.

Montilla P, Cruz A, Padillo FJ, Tunez I, Gasson F., 2001, Melatonin versus vitamin E as protective treatment against oxidative stress after extra-hepatic bile duct ligation in rats. J Pineal Res; 31:138-44.

Morris, T.W., Reed, K.E., Cronan, J.E., 1995, "Lipoic acid metabolism in Escherichia coli: the IpIA and libB genes define redundant pathways for ligation of lipoyl groups to apoprotein''. *J.Bacteriol*; 177, pp. 1-10.

Muriel P., 1998, Nitric oxide protection of rat liver from lipid peroxidation, collagen accumilation, and liver damage induced by carbon tetrachloride. *Biochemical Pharmacology*; 56:773-779.

Nagra R.M, Becher B, Tourtellotte W.W, Antel J.P, Gold D, Paladino T, 1997, Immunohistochemical and genetic evidence of myeloperoxidase involvement in multiple sclerosis. 78:97-107.

Nakagawara A, Nathan CF, Cohn ZA, 1981, Hydrogen peroxide metabolism in human monocytes during differentiation in vitro. *J Clin Invest*.; 68:1243-1252.

Nauseef WM. 1998, Insights into myeloperoxidase biosynthesis from its inherited deficiency. *J Mol Med;* 76: 668-661.

Navari-Izzo F,Quartacci MF.Sgherri C, 2002, Lipoic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species. *Plant Physiol Biochem* 40:463-470.

Naziroğlu M, Çay M, Üstündağ B, Aksakal M, Yekeler H. 1999, Protective effects of vitamin E on carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. *Cell Biochemistry and Function*; 17:253-259.

Neal R, Cooper K, Kellogg G, Gurer H, Ercal N. 1999. Effects of some sulfurcontaining antioxidants on leadexposed lenses. *Free Radic Biol Med*;26:239-243.

Öztürk, S.,1990. Tarım İlaçları. Hasad Yayıncılık. İstanbul.

Packer, L., 1994, "Antioxidant properties of lipoic acid and its therapeutic effects in prevention of diabetes complications and cataracts''. Am. NY. Acad. Sci, 738:. 257-264.

Packer, L., Witt, E., Tritschler, H.J., 1995, "α-Lipoic acid as a biological antioxidant''. Science Direct-Free Radical Biology & Medicine, 19(2), pp. 227-250.

Packer, L., 1998 "Alpha Lipoic acid : a metabolic antioxidant which regulates NF- kappa B signal transduction and protects against oxidative injury''. Drug. Metab. Rev, 30(2), pp. 245-275.

Packer L., Kraemer K., and Rimbach G., 2001, Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes, complications, *Nutrition*, 17(10): 888-895.

Parola M, Robino G. 2001, Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *J Hepatol*;35(2):297-306.

Pires Das Neves R.N. , Carvalho F. , Carvalho M., Fernandes E. , Soares E., Bastos M. L. and Pereira M. L. 2004, Protective activity of hisperidin and lipoic acid aganist sodium arsenite acute toxicity in mice. *Toxicologic Pthology*, 32:527-535.

Podda, M., Tritschler H.J., Ulrich H., Packer L., 1994, "α-Lipoic acid supplementation prevents symptoms of vitamin E deficiency''. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 204: 98-104.

Podrez EA, Abu-Soud HM, Hazen SL 2000, Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radic.Biol. Med*.; 28: 1717-1725. 163.

Powers SK, Leeuwenburgh C. 1999, Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity. Med Sci Sports Exerc; 31: 987-97.

Reynolds WF, Rhees J, Maciejewski D, Paladino T, Sieburg H, Maki RA, Masliah E. 1999, Myeloperoxidase polymorphism is associated with gender specific risk for Alzheimer' s disease. Exp Neurol.; 155: 31-41.

Rojkind M, Giambrone MA, Biempica L. 1979; Collagen types in normal and cirrhotic liver. *Gastroenterology* 76:710-9.

Roy S, Packer L. 1998, Redox regulation of cell functionsby alpha-lipoate: biochemical and molecular aspects. Biofactors; 8:17-21.

Rybak L. P, Hussin K, Whitworth C, Somani S. M. 1999, Dose depented protection by lipoik acid against cisplatin-induced ototoxicity in rats: antioxidant defense system. *Toxicological Sciences*, 47: 195-202.

Sadler TW. Langman's Medikal Embriyoloji 1993, Basaklar C (Çev. Ed.) s.230-231,Ankara, Palme Yayıncılık.

Schoneich C. 1999, Reactive oxygen species and biological aging:a mechanistic approach. Exp Geronto,34:19.

Sen, C.K., Roy, S., Han, D., Packer, L., 1997, "Regulation of cellular thiols on human lymphocytes by alpha-lipoic acid: a flow cytometric analysis''. Free Rad. Biol. Med, 22: 1241-1257.

Sen, C.K., Roy, S., Packer, L., 1999, "α-Lipoic acid: cell regulatory function and potential therapeutic implications''. San Diego; Academic Pres: 111- 119.

Senoo H. 2004 Structure and function of hepatic stellate cells. *Med Electron Microsc*; 37:3-15.

Shih, J.C.H., 1983, "Atherosclerosis in Japonese quail and the effect of lipoic acid''. *Fed. Proc*, 42: 2494-2497.

Shimizu I, Ma YR, Mizobuchi Y, Liu F, Miura T, Nakai Y, Yasuda M, Shiba M,Horie T, Amagaya S, Kawada N, Hori HH, ItoS. 1999; Effects of sho-saiko-to, a Japaneseherbal medicine, on hepatic fibrosis in rats. *Hepatology* 29:149-60.

Sies H, 1985. Oxidative Stress: Introductury Remarks In Oxidative Stress. London: Academic Pres:1-8.

Sivaprasad R., Nagaraj P., Varalakshmi P., 2004, Combined efficacies of lipoic acid and 2,3-dimercaptosuccinic acid against lead-induced lipid peroxidation in rat liver.

Skibska B., Jozefowicz-Okonkwo G., Goraca A. 2006 , Protective effects of early administration of alpha-lipoic acid against lipopolysaccharide-induced plasma lipid peroxidation. *Pharmacological Reports*, 58:399-404.

Sohol, RS. 1993, The free radical hypothesis of aging. An appraisal of the current status. Aging; 5:3-17. 4.

Sorg O. 2004, Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality C R Biologies; 327: 649-662.

Sorour J. and Larink O. 2001, Toxic effects of benomyl on the ultrastructure during spermatogensis of the erthworm Eisenia fetida. *Ecotoxicology and Enviromental Safety*, 50:180-188.

Southorn PA. 1988, Free radicals in medicine. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc;* 63:381-9.

Southorn, P.A. and Powi G.1993. Free radicals in medicine: chemical nature and biological reactions. *Mayo Clin Proc* 63:381-389.

Sung J.M., Won K., Ahn Y.S., Cho C, Koh Y.G., Moon S., Kim H.D., Lee S., Kang P.K., Jang Y.K., Park K.P. 2005, Protective Effect of α-lipoic acid in lipopolysaccaride-induced endoothelial fractalkine expression.Circ. Res. 97:880-890.

Suwasky M., Benites M., Norris B., Sotomayor P. 2000 , Toxic effects of the fungicide benomyl on cell membranes. *Comparative Biochemistry and Physiology* Part C 125: 111–119.

Streeper, R:S., Henriksen, E.J., Jacob, S., Hokama, J.Y., Donovan, L.F., Tritschler, H.J., 1997, "Differential effects of lipoic acid stereoisomers on glucose metabolism in insulin-resistant skeletal muscle''. *Am. J. Physiol,* 273:1 185-191.

Svegilati Baroni G, D'Ambrosio L,Ferretti G, Casini A, Di Sario A, Salzano R, Ridolfi F, Saccomanno S, Jezequel AM, Benedetti A. 1998,Fibrogenic effect of oxidative stresson rat hepatic stellate cells. *Hepatology;*27:720-6.

Şahin T., 2008, Subkronik Tiner İnhalasyonunun Ratlarda DNA Hasarı, Protein Oksidasyonu,Lipid Peroksidasyonu ile Bazı Biyokimyasal Parametrelerdeki Değişimleri ve

Bunlara α-Lipoikasitin Etkisinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi,Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

Şeftalioğlu A. 1998, Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi. 3. Baskı, Ankara: Tıp Teknik, 301-302.

Şenses SV, Özyazgan S, Akkan AG. 1999, Serbest oksijen radikalleri-I: Vücuttaki Antioksidan Sistemler. *Türk Aile Hek. Derg*; 3:5-11.

Şentürk H. 2004, Serbest radikal hasarının hepato bilier sistem hastalıklarındaki rolü. *Kocatepe Tıp Derg*; 5:1-8.

Tahan V, Ozaras R, Canbakan B, Uzun H, Aydin S, Yildirim B, Aytekin H, Ozbay G, Mert A, Senturk H. 2004, Melatonin reduces dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats. *J Pineal Res Sep*;37:78-84.

Terse P.S., Sawant S.G., and Dalvi R.R. 1993, Benomyl toxicity in chickens. Bull. Environ. Contam. *Toxicol*., 50:817-822.

Tolunay Ö. 2001, Kronik viral hepatit patolojisi.

Unido: 1983, Formulatiön of pesticides in developing countries, United Nations, New York.

Ulusu NN, Sahilli M, Avci A, Canbolat O, Ozansoy G, Ari N, Bali M, Stefek M, Stolc S, Gajdosik A, Karasu C. 2003, Pentose phosphate pathway, glutathione-dependent enzymes and antioxidant defense during oxidative stress in diabetic rodent brain and peripheral organs: effects of stobadine and vitamin E. Neurochem Res Jun; 28 (6): 815-23.

Urso ML, Clarkson PM. 2003, Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*; 189**:** 41-54.

Vattem DA, Shetty K. Acrylamide in food: a model for mechanism of formation and its reduction. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4:331-338,2003

Vural N. 2005, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No: 73 Toksikoloji

Weis SS. 1989, Tissue destruction by neutrophils. N Eng J Med.; 320: 365-376.

Winterbourn CC. 1985, Comparative reactivities of various biological compounds with myeloperoxidase-hydrogen peroxide–chloride, and similarity of the oxidant to hypochloride; 840: 204-210.

Winterbourn CC, Vissers Ketle AS. 2000 Myeloperoxidase. *Cur Opin Hematol*; 7: 58-53.

Wolfson David, N. D., 2000, "Lipoic acid: The universal antioxidant''. *Nutrition Science News*.

Wu J, Zern MA 2000. Hepatic stellate cells: a target for the treatment of liver fibrosis. *J Gastroenterol*;35(9):665-72.

Yalçın A. S. 1998, Antioksidanlar. *Klinik Gelişim II*, 342-346.

Yasuno, R., Wada H., 2002, "The biosynthetic pathway for lipoic acid is present in plastids and mitochondria in arabidopsis Thaliana''. FEBS Lett, 517: 110-114.

Yen, G. C. and J. Y. Wu, 1999, Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from Ganoderma tsugae. *Food Chem*., 65, 375-379.

Yoshikawa H. Fukuda T. Oyamada T. Yoshikawa T. 2002, Congenital Hepatic Fibrosis in a Newborn Calf, Vet. Pathol., 39, 143-145.

Zhao WG, Regmi A, Austin D, Brown JE, Racine M, Austin GE. 1996, Cis-elements in the promoter region of the human myeloperoxidase (MPO) gene. Leukemia; 10: 1089-1103

İnternet Kaynakları

İnt. Kyn 1)Gray H. Anatomy of The Human Body. http://www.bartleby.com/107/250.html

İnt. Kyn 2). 1.http://www.beslenmedestegi.com

İnt. Kyn. 3) www.hasankoc.net/yukle/histoloji_0.pdf

İnt. Kyn.4) file://E:\bağ doku boyaları\Stainsfile-Masson's Tricrome.htm

http://www.answer-my-healthquestion.info/images/how-to-detoxify-your-liver- l.jpg

http://www.bartleby.com/107/250.html

http:/ /www.drcemre.googlepages.com/k.catanomi3 - full.jpg

www.med-ed.virginia.edu/.../MMHndt_Liver.html

www.steteskop.net

www.medscape.com

www.tasl.org.tr./pdf/**salihakarca**.pdf

http://id.wikipedia.org/wiki/Kondroitin

http://www.answers.com/topiclbenomyl

7.ÖZGEÇMİŞ

24.08.1972 doğumluyum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Eskişehir'de okudum. Üniversite öğrenimimi Cumhuriyet Üniversitesinde tamamladım. Evli ve iki çocuk annesiyim. Anadolu Öğretmen Lisesi'nde Biyoloji Öğretmeni olarak görev yapmaktayım. Halen T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans programına devam etmekteyim.