T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DİKLOFENAK SODYUM KAYNAKLI OKSİDATİF STRESİN NEDEN OLDUĞU HEPATOTOKSİSİTE ÜZERİNE ALFA LİPOİK ASİDİN KORUYUCU ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TUĞBA ERKMEN

DANIŞMAN
YARD. DOÇ. DR. FAHRETTİN AKYÜZ

2017

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DİKLOFENAK SODYUM KAYNAKLI OKSİDATİF STRESİN NEDEN OLDUĞU HEPATOTOKSİSİTE ÜZERİNE ALFA LİPOİK ASİDİN KORUYUCU ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TUĞBA ERKMEN

DANIŞMAN
YARD. DOÇ. DR. FAHRETTİN AKYÜZ

KABUL VE ONAY SAYFASI

Tuğba ERKMEN'in Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı "**Diklofenak Sodyum Kaynaklı Oksidatif Stresin Neden Olduğu Hepatotoksisite Üzerine Alfa Lipoik Asidin Koruyucu Etkisi**" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirerek **"KABUL"** edilmiştir.

21.08.17

Üye : Prof. Dr. Güngör KANBAK

Üye : Prof. Dr. Özkan ALATAŞ

Üye : Prof. Dr. Sema USLU

Üye : Doç. Dr. Filiz ÖZDEMİR

Üye : Yard. Doç. Dr. Fahrettin AKYÜZ

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 08../09../2017 tarih ve ..1138./..5530.. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof Dr. Hasan Veysi GÜNEŞ
Enstitü Müdürü

Özet

Diklofenak analjezik, antipiretik ve antiinflamatuvar etkilerinden dolayı dünyada reçeteli ve reçetesiz olarak en çok kullanılan nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlardan biridir. Yaygın kullanımı sebebiyle diklofenak kaynaklı idiyosenkratik hepatotoksisite vakaları sıkça görülebilmektedir. Lipoik asit, sülfidril grupları sayesinde oksidatif strese karşı korunmayı sağlayan doğal bir antioksidandır. Çalışmamızda, yetişkin sıçanlarda akut diklofenak ile indüklenen oksidatif stres kaynaklı karaciğer hasarına karşı lipoik asidin koruyucu ve tedavi edici etkisini ve transsülfürasyon yolağının bu mekanizmadaki rolünü incelemeyi amaçladık.

Çalışmamız sadece taşıyıcı çözeltiyi (%5 DMSO) intraperitonal (ip) yolla uyguladığımız kontrol grubu, lipoik asit (25mg/kg/gün, ip) uyguladığımız LA grubu, diklofenak (200mg/kg, ip) uyguladığımız DF grubu, diklofenak (200mg/kg, ip) ile indüklenen karaciğer hasarına karşı lipoik asidin (25mg/kg/gün, ip) koruyucu etkisini incelediğimiz LA+DF grubu ve yine diklofenak (200mg/kg, ip) ile indüklenen karaciğer hasarına karşı lipoik asidin (25mg/kg/gün, ip) tedavi edici etkisini incelediğimiz DF+LA grubu olmak üzere beş gruptan oluşan, beş gün süren bir deney modelini içermektedir. 6. gün gruplardaki tüm hayvanlar anestezi altında ekssanguinasyon (kanatma veya yüksek miktarda kan alma) yöntemiyle sakrifiye edildi ve laboratuvarlarımızda serumda aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), alkalen fosfataz (ALP), total bilirubin (T.Bil), direkt bilirubin (D.Bil) ve karaciğer dokusunda malondialdehit (MDA), katalaz (CAT), glutatyon (GSH), homosistein (Hcy) düzeyleri ölçüldü. Ayrıca karaciğer dokusunun histolojik incelemeleri de gerçekleştirilmiştir.

Sonuçlarımız, diklofenak uygulanması sonucu karaciğer hasarında önemli klinik belirteçler olan serum AST, ALT, T.Bil, D.Bil düzeylerindeki artışın hepatik MDA düzeylerindeki artış ile paralel olduğunu; buna karşılık hepatik GSH ve CAT düzeylerinde düşüş yaşandığını göstermektedir. Bu tablo diklofenak kaynaklı oksidatif stresin neden olduğu karaciğer hasarından söz etmemize olanak sağlamaktadır. Lipoik asidin gelişen hasara karşı koruyucu etkisini incelediğimiz LA+DF grubunda ise AST, ALT, T.Bil, D.Bil, MDA değerlerinin DF grubuna göre belirgin bir şekilde düştüğünü ve Hcy düzeylerindeki azalmayla birlikte GSH seviyelerinin belirgin bir şekilde yükseldiğini gözlemledik. Ayrıca CAT aktiviteleri, kontrol grubu düzeylerine ulaşarak iyileşme göstermiştir. Elde ettiğimiz histolojik bulgular da biyokimyasal bulgularımızla örtüşmektedir. DF+LA grubunda, biyokimyasal ve histolojik olarak belirgin bir iyileşme gözlenmemiştir.

Çalışmamız, diklofenak kaynaklı oksidatif stresin neden olduğu karaciğer hasarına karşı lipoik asidin antioksidan özelliği ve homosisteinden transsülfürasyon yolağı aracılığıyla GSH sentezini indüklemesi sebebiyle hepatoprotektif etkilerinin olabileceğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Diklofenak, karaciğer hasarı, lipoik asit, homosistein, glutatyon.

Summary

Diclofenac is one of the most commonly used nonsteroidal antiinflammatory drugs in the world both as prescription and over the counter due to its analgesic, antipyretic and antiinflammatory effects. Diclofenac-induced idiosyncratic hepatotoxicity cases can be seen frequently because of its widespread use. Lipoic acid is a natural antioxidant that protects against oxidative stress thanks to its sulfhydryl groups. In our study, we aimed to investigate the protective and therapeutic effect of lipoic acid on adult rats against acute diclofenac-caused oxidative stress induced liver damage and the role of transsulfuration pathway in this mechanism.

Our study is a five days lenght study model which consists of control group which we administered intraperitoneally (ip) only vechile solution (%5 DMSO), LA group which we administered lipoic acid (25mg/kg/day, ip), DF group which we administered diclofenac (200mg/kg, ip), LA+DF group which we examined the protective effect of lipoic acid (25mg/kg/day, ip) against diclofenac (200mg/kg, ip) induced liver injury and DF+LA group which we examined the therapeutic effect of lipoic acid (25mg/kg/day, ip) against diclofenac (200mg/kg, ip) induced liver injury.

On day 6, all animals in the groups were sacrificed by exsanguination (bleeding or high blood sampling) under anesthesia and in our laboratories, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), total bilirubin (T.Bil), direct bilirubin (D.Bil) were measured on serum and malondialdehyde (MDA), catalase (CAT), glutathione (GSH), homocysteine (Hcy) levels were measured on liver tissue.

Our results indicate that, after diclofenac administration, the increase in serum AST, ALT, T.Bil, D.Bil levels, which are important clinical markers in liver injury, is paralleled by an increase in hepatic MDA levels; whereas there is a decrease in hepatic GSH and CAT levels. This view allows us to talk about liver damage caused by diclofenac induced oxidative stress. In the LA+DF group in which we examined the protective effect of lipoic acid against diclofenac induced liver injury, we observed a significant decrease in AST, ALT, ALP, T.Bil, D.Bil, MDA values and a significant increase in GSH levels with the decrease in Hcy levels according to DF group. Besides, CAT activities improved by reaching the control group levels. The histological findings we obtained are also consistent with our biochemical findings. No significant biochemical and histologic improvement was observed in the DF+LA group.

Our study has shown the lipoic acid's hepatoprotective effects against diclofenac caused oxidative stress induced liver injury due to its antioxidant property and ability to stimulate GSH synthesis from homocysteine via the transsulfuration pathway.

Key words: Diclofenac, liver injury, lipoic acid, glutathione, homocysteine.

İçindekiler

Özet ..... **iii**
Summary ..... **v**
İçindekiler ..... **vii**
Tablo Dizini ..... **ix**
Şekil Dizini ..... **x**
Simge ve Kısaltmalar Dizini ..... **xi**
1. GİRİŞ VE AMAÇ **1**
2. GENEL BİLGİLER **3**
2.1 KARACİĞER 3
2.1.1 Karaciğerin Fonksiyonları 3
2.2.Hepatotoksisite 4
2.3.Diklofenak 6
2.3.1 Diklofenak metabolizması ve farmakolojisi 6
2.3.2 Diklofenak İndüklü Hepatotoksisite 8
2.4 Lipoik asit 11
2.4. Serbest Radikaller 14
2.4.1 Süperoksit Anyonu 15
2.4.2 Hidrojen Peroksit 16
2.4.3 Hidroksil radikalleri 16
2.4.4 Singlet oksijen 17
2.4.5 Lipid Peroksid 17
2.4.6 Diğer serbest radikaller 18
2.4.7 Serbest Radikallerin Organizmaya Etkileri 18
2.5. Antioksidan Savunma Sistemleri 19
2.5.1 Endojen Antioksidanlar 19
2.5.1.1 Enzimatik Endojen Antioksidanlar 19
Süperoksid dismutaz 19
Katalaz 19
Glutatyon Peroksidaz 20
Glutatyon Redüktaz 21
2.5.1.2 Non Enzimatik Endojen Antioksidanlar 21
Glutatyon 21
2.5.2 Eksojenik Antioksidanlar 23
2.5.3.Homosistein 23
3- GEREÇ VE YÖNTEMLER **25**
3.1. Gereç 25
3.1.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Bakımı 25
3.1.2. Doz ve Deney Grupları 25
3.1.2.1. Maddelerin Hazırlanması 26
3.1.3. Deney Hayvanlarından Örneklerin Alınması 27
3.2. Yöntemler 27
3.2.1 Serum ALT, AST, ALP, T ve D. Bil ölçümü 27

3.2.1.1. ALT ölçüm prensibi 27
3.2.1.2. AST ölçüm prensibi 28
3.2.1.3. ALP ölçüm prensibi 28
3.2.1.4. Total Bilirubin (T. Bil) ölçüm prensibi 28
3.2.1.5. Direkt Bilirubin (D.Bil) ölçüm prensibi 29
3.2.2. Dokuda Total protein tayini 29
3.2.3 Dokuda Katalaz (CAT) aktivitesinin tayini 31
3.2.4. Dokuda MDA tayini 32
3.2.5 Dokuda GSH düzeylerinin tayini 35
3.2.6 Dokuda homosistein düzeylerinin tayini 37
3.2.7 Karaciğer dokusu histolojik preperatların hazırlanması 39
3.2.8 İstatistiksel analiz 39
4. BULGULAR 40
4.1 Serum Bulguları 40
4.1.1 Serum AST bulguları 40
4.1.2 Serum ALT bulguları 41
4.1.3 Serum ALP bulguları 43
4.1.4 Serum total bilirubin bulguları 44
4.1.5 Serum direkt bilirubin bulguları 46
4.2 Doku Bulguları 47
4.2.1 Doku CAT aktivitesi bulguları 47
4.2.2 Doku MDA bulguları 49
4.2.3 Doku GSH bulguları 50
4.2.4 Doku homosistein bulguları 52
4.3 Karaciğer Histoloji Bulguları 53
5- TARTIŞMA 60
6- SONUÇ VE ÖNERİLER 71
KAYNAKLAR DİZİNİ 72

Tablo Dizini

Tablo.1. Reaktif oksijen türlerinin sınıflandırılması (Kohen & Nyska, 2002) . 15
Tablo 3.1 Deney grupları ve uygulanacak işlemler 26
Tablo 3.2 Total protein tayini deney protokolü 30
Tablo 3.3 CAT tayini deney protokolü 32
Tablo 3.4 MDA tayini deney protokolü 34
Tablo3.5 GSH tayini deney protokolü 36
Tablo 4.1. Serum AST düzeyleri 40
Tablo 4.2. Serum ALT düzeyleri 42
Tablo 4.3. Serum ALP Düzeyleri 43
Tablo 4.5. Serum D. Bil Düzeyleri 46
Tablo 4.6. Karaciğer Doku CAT Aktivite Düzeyleri 48
Tablo 4.7. Karaciğer Doku MDA Düzeyleri 49
Tablo 4.8 Karaciğer Doku GSH Düzeyleri 51
Tablo 4.9. Karaciğer Doku Homosistein Düzeyleri 52
Tablo 4.10 Histolojik skorlama 58

Şekil Dizini

Şekil 2. 1 Diklofenak Sodyum 6
Şekil 2. 2 Diklofenağın major faz1 metabolitleri 7
Şekil 2. 3 4'-OH diklofenak açil glukronid oluşumu. 7
Şekil 2. 4. 4'-OH ve 5-OH diklofenaktan potansiyel reaktif metabolit olan p-benzokinonimin ve akabinde S-glutatyonilasyonun gerçekleşmesi 8
Şekil 2. 5 Faz 1 metabolitleri olan 4'-OH ve 5-OH diklofenağın tekrar oksidasyonuyla tiyol reaktif p-benzokinonimin metabolitlerinin oluşumu 9
Şekil 2. 6 Benzokinon bileşiklerinden reaktif oksijen türlerinin oluşumu 10
Şekil 2. 7 Lipoik asit 11
Şekil 2. 8 Lipoik asidin enantiyomerleri 12
Şekil 2. 9 LA metabolizasyonu sonucu oluşan başlıca metabolitler 13
Şekil 2. 10 Tiyol gruplarının serbest radikallerle etkileşimleri sonucu tiyil radikallerinin oluşumu 14
Şekil 2. 11 Glutatyonun açık formülü 21
Şekil 2. 12 Metiyonin, homosistein ve sistein açık formülleri 23
Şekil 2. 13 Karaciğerde transsülfürasyon, transmetilasyon ve GSH sentezi yolakları 24
Şekil 3. 1 Total protein standart grafiği 30
Şekil 3. 2 MDA standart grafiği 35
Şekil 3. 3 GSH standart grafiği 37
Şekil 4. 1 Serum AST düzeyleri 41
Şekil 4. 2 Serum ALT düzeyleri. 42
Şekil 4. 3 Serum ALP Düzeyleri 44
Şekil 4. 4 Serum T.Bil Düzeyleri 45
Şekil 4. 5 Serum D.Bil Düzeyleri. 47
Şekil 4. 6 Doku CAT Aktivite Düzeyleri. 48
Şekil 4. 7 Doku MDA Düzeyleri. 50
Şekil 4. 8 Doku GSH Düzeyleri. 51
Şekil 4. 9 Doku Hcy Düzeyleri 53
Şekil 4. 10 K grubu 54
Şekil 4. 11 LA grubu 54
Şekil 4. 13 DF grubu 55
Şekil 4. 12 DF grubu 55
Şekil 4. 14 DF grubu 56
Şekil 4. 15 LA+DF grubu 56
Şekil 4. 16 DF+LA grubu 57

Simge ve Kısaltmalar Dizini

AdoMet : S-Adenozil Metiyonin
AdoHcy : S-Adenozil Homosistein
ALP : Alkalen Fosfataz
ALT : Alanin Aminotransferaz
AST : Aspartat Amino Transferaz
BSA : Sığır Serum Albumini
CAT : Katalaz
CYP450 : Sitokrom P 450
D.Bil : Direkt Bilirubin
DF : Diklofenak
DHLA : Dihidrolipoik asit
DTNB : 5,5'-Ditiyobis – 2 nitro benzoik asit
EDTA : Etilen diamin tetra asetik asit
ELİSA : Enzime Bağlı İmmunosorbent Yöntem
GPx : Glutatyon peroksidaz
GR : Glutatyon redüktaz
GSH : Glutatyon
GSSG : Okside Glutatyonu
Hcy : Homosistein
THF : Tetrahidrofolat
IGF-1 : İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
İKKH : İlaç Kaynaklı Karaciğer Hasarı
ip : İntraperitonal
LA : Lipoik Asit
LDH : Laktat dehidrojenaz
LOOH : Lipid peroksit
MDA : Malondialdehit
NAD^+ : Nikotinamid adenin dinükleotid
NADH : Redükte nikotinamid adenin dinükleotid
NADP : Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NADPH : Redükte nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NSAİİ : Nonsteroidal Antiinflamatuvar İlaçlar
SDS : Sodyum Dodesil Sülfat
SOD : Süperoksid Dismutaz
T.Bil : Total Bilirubin
TBA : Tiyobarbitürik Asit
MS : Metiyonin sentaz
CSE : Gama sistatyonaz enzimi
CBS : Sistayonin beta sentaz
GCL : Gama glutamil sistein ligaz
H_2O_2 : Hidrojen peroksit radikali
$O_2^{\cdot -}$: Süperoksit anyonu
$OH^{\cdot}$: Hidroksil radikali
$O_2^{\cdot -2}$: Peroksit radikali
$^1O_2$: Singlet oksijen
$RS^{\cdot}$: Tiyil radikalleri

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Karaciğer sindirim yoluyla alınan bütün maddelerin vücuda giriş kapısı olması nedeniyle büyük oranda toksik olabilecek maddelere maruz kalmaktadır. Ayrıca vücudun biyokimyasal mekanizmalarının temelini oluşturması ve pek çok yabancı maddenin vücuttan atılımı için gerekli olan kimyasal dönüşümlerin karaciğerde yapılması, bu organın birçok metabolitle karşı karşıya kalmasına neden olmaktadır (Amin & Hamza, 2005; Dilek, 2003; Lee, 2003).

Hepatik hasarların başlıca nedeni, ilaçların yol açtığı toksisitedir. İlaçlar veya aktif metabolitleri hepatik homeostazı bozarak ve gen ekspresyonuna etki ederek hepatik disfonksiyona neden olurlar (Ingawale, Mandlik, & Naik, 2014).

Diklofenak (DF), 1973 yılında geliştirilmiş olan analjezik, antiinflamatuvar, antipiretik etkileri bulunan fenilasetik asit türevi olup; nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) grubuna dahildir. Diklofenak romatoid artrid, ankilosan spondilit, rejeneratif eklem hastalıkları gibi inflamatuvar hastalıkların tedavisinde ve minör cerrahi girişimler, travma, dismenore, migren gibi durumlardan kaynaklı ağrının kontrolünde kullanılır (Baravalia, Vaghasiya, & Chanda, 2011; Brogden, Heel, Pakes, Speight, & Avery, 1980).

NSAİİ, antiinflamatuvar özelliklerinden dolayı romatolojik hastalıkların tedavisinde önemli bir rol oynamakla birlikte, analjezik ve antipiretik etkilerinden dolayı da reçeteli veya reçetesiz olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Baravalia vd., 2011).

Diğer NSAİİ gibi, uzun dönem diklofenak kullanımı asemptomatik, karaciğer fonksiyon testlerinde reversibl yükselmelere neden olan belirgin karaciğer toksisitelerine yol açmaktadır. Diklofenak maruziyeti sonucu gelişen ciddi hepatotoksisite vaka yüzdesinin düşük olmasına karşın, dünyada en çok reçete edilen NSAİİ arasında olduğu göz önüne alındığında yüksek sayıda hepatik vakanın var olduğu anlaşılmaktadır. Bu nedenle diklofenak kaynaklı hepatotoksisteye karşı koruyucu ve tedavi edici protokollerin geliştirilmesi önem taşımaktadır(Food & Administration, 2014).

Toksisite mekanizması henüz aydınlatılamamış olup, diklofenağın peroksidazlar tarafından katalizlenen oksidasyonu sonucu oluşan nitroksit veya katyon radikalleri ile diklofenağın 4'-OH ve 5-OH metabolitlerinden oluşan p-benzokinonimin türevlerinin oksidatif strese yol açarak toksisitede rol oynadığı öne sürülmüştür (Boelsterli, 2003).

4'-OH diklofenak ve 5-OH diklofenak metabolitleri, p-benzokinonimine dönüşebilmektedir. Kinoniminler, tiyol reaktivitesine sahip olan elektrofilik gruplar olup; proteinlerin veya nonprotein yapıların sülfidril grupları ile kovalent bağ oluşturmaktadır. Ayrıca kinoniminler redoks siklusunda yer

alarak oksidatif strese yol açmaktadır. Oluşan oksidatif stresin ve makromoleküllerin kovalent modifikasyonunun hepatotoksisiteye yol açtığı savunulmaktadır (Boelsterli, 2003).

Lipoik asit (LA), hücrenin hem lipofilik hem de hidrofilik kısımlarında serbest radikal süpürme etkisine sahip olan doğal olarak diyetlerle alınabilen metabolik antioksidandır. Yapılan çalışmalarda, lipoik asitin vitamin A, vitamin C ve intraselüler redükte glutatyon (GSH) gibi endojen antioksidanların rejenerasyonunu da indüklediği öne sürülmüştür (Abdel-Zaher, Abdel-Hady, Mahmoud, & Farrag, 2008).

Hücrede glutatyon sentezinin %50'si homosistein kaynaklı olup; transsülfürasyon yolağı üzerinden gerçekleşmektedir. Homosisteinin transsülfürasyon yoluyla glutatyon oluşumunun redoks reaksiyonlarından etkilendiği rapor edilmiştir. Bu yolakta prooksidanların glutatyon sentezini arttırdığı savunulurken; antioksidanların ise metiyonin sentezine doğru reaksiyona yön verdiği savunulmaktadır (Vitvitsky vd., 2003).

LA'nın karaciğer glutatyon düzeylerini arttırdığına dair bulgular çalışmalar tarafından desteklenmektedir. LA'nın antioksidan özelliğinin yanında prooksidan özelliğinin de bulunduğu ve böylelikle glutatyon sentezini indüklediği, yapılan çalışmalar tarafından öne sürülmüştür (Moini, Packer, & Saris, 2002; Shay, Moreau, Smith, Smith, & Hagen, 2009).

Bu çalışmada, LA'nın antioksidan özelliğinin ve homosisteinden transsülfürasyon yolağı aracılığı ile glutatyon sentezine etkisinin, bir NSAİİ olan diklofenak kaynaklı oksidatif stresin neden olduğu hepatotoksisite üzerine koruyucu etkisi incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 KARACİĞER

Karaciğer, deriden sonra vücudun en büyük organı olup; uzunluğu 20-25 cm, genişliği 12-14 cm, yüksekliği ise 15-16 cm'dir Aynı zamanda vücudun en büyük salgı bezi olan karaciğer; oldukça esnek, yumuşak, kırmızı-kahverengi renkte bir organdır (Arifoglu, 2016).

2.1.1 Karaciğerin Fonksiyonları

Karaciğer, vücutta dolaşan kanın bileşimini ayarlayan en önemli organdır. Sindirim kanalının absorbsiyon yüzeyinden alınan kanın tümü, hepatik portal sistemle karaciğere gelir. Karaciğer hücreleri bu kanı hepatik venlerle sistemik dolaşıma aktarmadan önce absorbe edilmiş besinlerin fazlasını alırlar, depolarlar ve uzaklaştırırlar(Hall, 2015; Özçelik, 2012).

Karbonhidrat metabolizması

Karaciğer, kan glukoz konsantrasyonunun yaklaşık 90 mg/dl seviyesinde tutulmasını sağlar. Vücut kan glukoz düzeyi yükseldiği zaman, bu glukozun bir kısmı glikojene çevrilerek karaciğerde depolanır (glikojenez). Kan glukoz düzeyi düştüğü zaman karaciğerdeki glikojen glukoza parçalanır (glikojenoliz) ve kana glukoz verilir. Karaciğer aynı zamanda glikoneojenez olayının gerçekleştiği yerdir(Kutchai, 2008).

Yağ metabolizması

Lipogenezin önemli kısmı karaciğerde gerçekleşir, yine kolesterol, fosfolipid ve lipoprotein sentezi de burada meydana gelir.

Açlık durumlarında fazla miktardaki asetil-KoA karaciğerde keton cisimlerine dönüştürülür.

Karaciğer, dolaşımdaki yağ asitleri, triaçilgliserol ve kolesterol seviyelerini ayarlar. Bunların fazlalığına ve azlığına göre biyokimyasal yolakları kontrol ederek, depolar veya serbestleştirir (Hall, 2015; Kenneth & Carol, 2007; Martini F, 2006; Widmaier, Raff, & Strang, 2006).

Protein metabolizması

Karaciğer plazma lipoproteinleri, albumin, globulinler, fibrinojenler ve kanın pıhtılaşmasında görevli diğer proteinler de dahil olmak üzere çoğu plazma proteinlerinin sentezlendiği yerdir (Kenneth & Carol, 2007; Kutchai, 2008).

Karaciğerde yoğun olarak gerçekleşen deaminasyon reaksiyonları sonucu oluşan toksik özellikteki amonyağın üreye dönüşümü yine karaciğerde gerçekleşir. Ayrıca karaciğer, transaminasyon reaksiyonları ile esansiyel olmayan amino asitlerin sentezini de gerçekleştirir (Kenneth & Carol, 2007; Martini F, 2006; Özçelik, 2012; Pocock & Richards, 2009).

Safra yapımı ve sekresyonu

Karaciğer hücreleri, yağların sindirimi ve emiliminde görev alan safrayı salgılar. Safra; su, sodyum bikarbonat, safra tuzları, safra pigmentler, kolesterol, musin, lesitin ve bilirubinden meydana gelmiştir (Pocock & Richards, 2009).

Karaciğer, sentezlediği safra tuzları ve lesitin sayesinde yağların emülsifiye edilmesini ve sindirimini sağlar. Ayrıca bikarbonat gibi iyonlar içeren sıvı sayesinde duedenumdaki asidin nötralize edilmesine yardımcı olur (Hall, 2015; Kenneth & Carol, 2007; Martini F, 2006; Pocock & Richards, 2009).

Karaciğerin Diğer Görevleri:

Yağda çözünen vitaminler (A,D,E,K), vitamin B_{12} karaciğerde depolanmaktadır. Ayrıca demir, ferritine çevrilerek karaciğerde protein-demir kompleksi halinde depo edilmektedir (Hall, 2015; Kenneth & Carol, 2007; Martini F, 2006; Özçelik, 2012; Widmaier vd., 2006).

Karaciğer, fibrinolitik faktörlerin hem sentezinden hem de yıkımından sorumludur (Hall, 2015; Özçelik, 2012; Widmaier vd., 2006).

Karaciğer epinefrin, norepinefrin, insülin, tiroid hormonları, steroid hormonları ve kortikosteroidlerin absorbsiyonunun ve geri dönüşümünün sağlandığı primer bölgedir. Ayrıca büyüme hormonuna yanıt olarak, insülin benzeri büyüme faktörünü (IGF-1) salgılar (Martini F, 2006).

Nötralizasyon işlemi, bileşiklerin kimyasal yapısının değiştirilerek inaktif ve kolayca atılabilecek hale getirilmeleri ile gerçekleşir. Ksenobiyotiklerin nötralizasyonundan sorumlu ana organ karaciğerdir (Pocock & Richards, 2009).

2.2.Hepatotoksisite

Karaciğer sindirim yoluyla alınan bütün maddelerin vücuda giriş kapısı olması nedeniyle büyük oranda toksik olabilecek maddelere maruz kalmaktadır. Ayrıca vücudun biyokimyasal mekanizmalarının temelini oluşturması ve pek çok yabancı maddenin vücuttan atılımı için gerekli olan kimyasal dönüşümlerin karaciğerde yapılması, bu organın birçok metabolite karşı karşıya kalmasına neden olmaktadır (Amin & Hamza, 2005; Dilek, 2003; Lee, 2003).

Karaciğer hasarı, serum alanin aminotransferaz (ALT) veya konjuge bilirubin (D.Bil) veya kombine olarak aspartat amino transferaz (AST), alkalen fosfataz (ALP) ve total bilirubin (T.Bil) seviyelerinde azami değerin iki katından daha fazla yükselişi ile tanımlanmış; bunlardan herhangi birinin sağlanması karaciğer hasarının göstergesi olarak kabul edilmiştir. Karaciğer hasarı, ALT seviyelerindeki artışın baskın olduğu hepatoselüler hasar ve ilk olarak serum ALP seviyelerinin artış gösterdiği kolestatik hasar olarak iki ayrı kategoride incelenmektedir (Navarro & Senior, 2006).

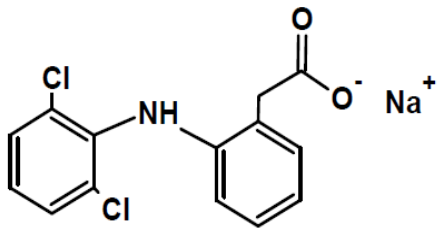
Hepatotoksisiteye neden olan ajanlar ilaçlar, doğal toksik ajanlar, vitaminler ve kimyasal ajanlar olarak sayılabilir. İlaçlara bağlı ölümlerin ve ilaçların piyasadan çekilmesinin en önemli sebebi ilaçlara bağlı karaciğer hastalıklarıdır. İlaç kaynaklı hepatotoksisite, intrinsik ve idiyosenkratik olmak üzere iki alt başlıkta incelenmektedir. İntrinsik toksisite doza bağımlı olarak gelişirken, idiyosenkratik toksisite sadece toplumun belli bir kesiminde dozdan bağımsız olarak görülmektedir. Bu nedenle intrinsik toksisite öngörülebilirken; idiyosenkratik toksisite farklı başlangıç zamanlarına sahip olduğundan herzaman tahmin edilememektedir (Kaplowitz, 2005; Roth & Ganey, 2010).

İlaç kaynaklı karaciğer hastalıkları, akut hepatik nekroz, kronik hepatit ve vasküler hasardan safra kanalcıklarının hasarı ve neoplazmaya kadar geniş bir spektrumu kapsamaktadır. Model, diagnostik açıdan yardımcı olmasa da, hasarın mekanizmasının ve prognozunun anlaşılması açısından yararlı olabilir. Birçok farklı ilaç kaynaklı hepatotoksisite mekanizması tanımlanmıştır: ilacın ve aktif metabolitlerinin meydana getirdiği reaktif oksijen türlerinin oksidatif strese yol açması ve bu aktif metabolitlerin hücre proteinlerine kovalent bağlanması sonucu hücre membranının hasarlanması ve hücre ölümü ve/veya yeni eklentilerin oluşması ve vücut tarafından immünolojik hedef olarak algılanması sonucu immünolojik reaksiyonların oluşumu; ilaç metabolizmasının hücresel yolaklarının inhibisyonu; hücre içi aktin filament veya transport kanal bozukluklarının neden olduğu anormal safra akışı sonucu kolestaz ve sarılık oluşumu; tümör nekroz faktör ve fas yolakları aracılığıyla apoptoz; oksidatif stres sonucu mitokondriyal fonksiyonların inhibisyonu ve lipid peroksidasyonu, yağ birikimi ve hücre ölümü bunlardan bazılarıdır (Bissell, Gores, Laskin, & Hoofnagle, 2001; Pandit, Sachdeva, & Bafna, 2012; Willis, Kendall, Flinn, Thornhill, & Welling, 1979).

Rapor edilen vakaların seyrekliği göz önüne alındığında, ilaca bağlı hepatotoksisite klinik çalışmalarda görülemese de, kullanıma sunulmasından sonra yüksek kitleye ulaşmakta ve bu nadir toksik etkiler meydana çıkabilmektedir (Dereci & Akçam, 2015; Dilek, 2003; Navarro & Senior, 2006).

2.3.Diklofenak

Diklofenak (DF), 1973 yılında geliştirilmiş olan analjezik, antiinflamatuvar, antipiretik bir fenilasetik asit türevi olup; nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) sınıfındandır (**Şekil.1)** Diklofenak romatoid artrid, ankilosan spondilit, rejeneratif eklem hastalıkları gibi inflamatuvar hastalıkların tedavisinde ve minör cerrahi girişimler, travma, dismenore, migren gibi durumlardan kaynaklı ağrının kontrolünde kullanılır (Baravalia vd., 2011; Brogden vd., 1980).



Diklofenak Sodyum
(sodyum;2-[2-(2,6-dikloroanilino)fenil]asetat)

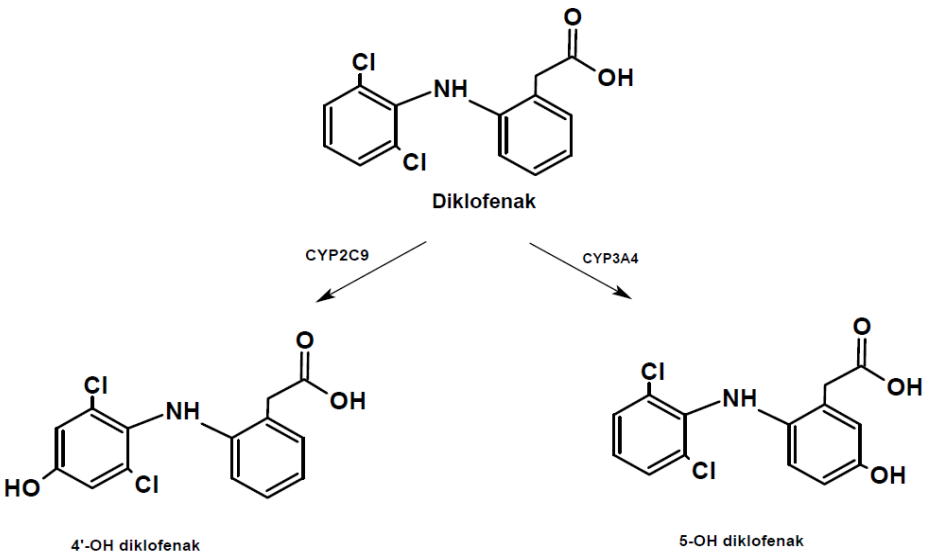
Şekil 2. 1 Diklofenak Sodyum (Galati, Tafazoli, Sabzevari, Chan, & O'Brien, 2002)

2.3.1 Diklofenak metabolizması ve farmakolojisi

Diklofenak (sodyum tuzu Ma = 318,1) lipofilik ve zayıf asidik (pKa:4; p:13,4) bir bileşiktir. Diklofenak, ilk olarak reaktif glukronit metabolitlerinin oluşumunda substrat olan karboksilik asit kısmıyla bir fenilasetik asit türevidir. İkinci olarak, oksidoredüktif stres oluşumuna neden olan sekonder aminin yer aldığı difenilamin iskeletine sahiptir(Boelsterli, 2003).

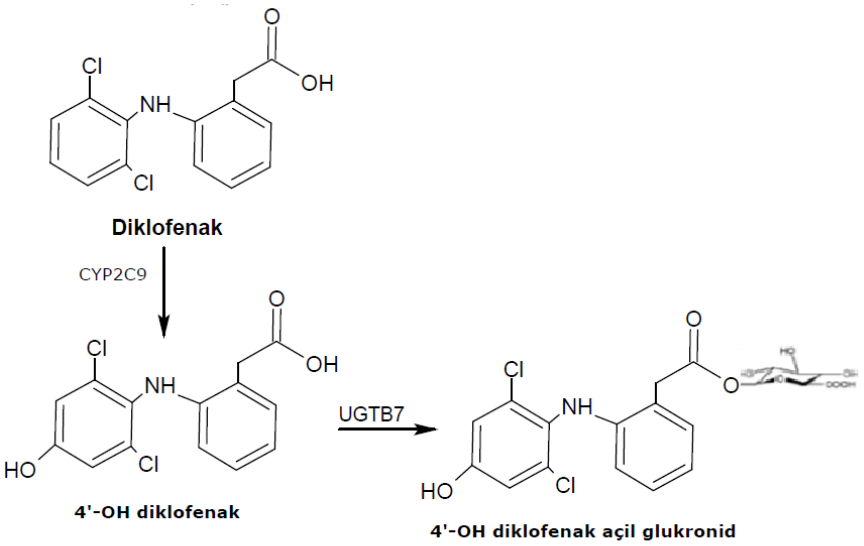
In vivo ortamda, diklofenak diğer tüm NSAİİ gibi asidik özelliğinden dolayı %99,7 gibi bir oranda plazma proteinlerine (özellikle de albumine) bağlanır. İlk geçiş etkisi nedeniyle de alınan diklofenağın %60 ı kan dolaşımına geçmektedir. Yarılanma ömrü ($T_{1/2}$) 1,8 saattir. Maksimal plazma konsatrasyonuna 1,5-2 saat sonrasında ulaşılır (Altman, Bosch, Brune, Patrignani, & Young, 2015; Boelsterli, 2003; Emea, 2003; Willis vd., 1979).

Diklofenak, karaciğerde CYP2C9 'un katalizlediği halka hidroksilasyonuna uğrayarak başlıca oksidatif metabolit olan 4'-OH diklofenağı oluşturmaktadır. Ayrıca CYP3A4'ün katalizlemesiyle 5-OH diklofenak metaboliti ile metoksilli, monohidroksilli veya dihidroksilli metabolitler de oluşmaktadır (**Şekil 2.2**). Daha da önemlisi, 4'-OH ve 5-OH diklofenak, halka sistemin herhangi birinden oksidasyona uğrayarak, oksidatif strese yol açan benzokinoniminlere dönüşebilirler (Boelsterli, 2003; Galati vd., 2002).



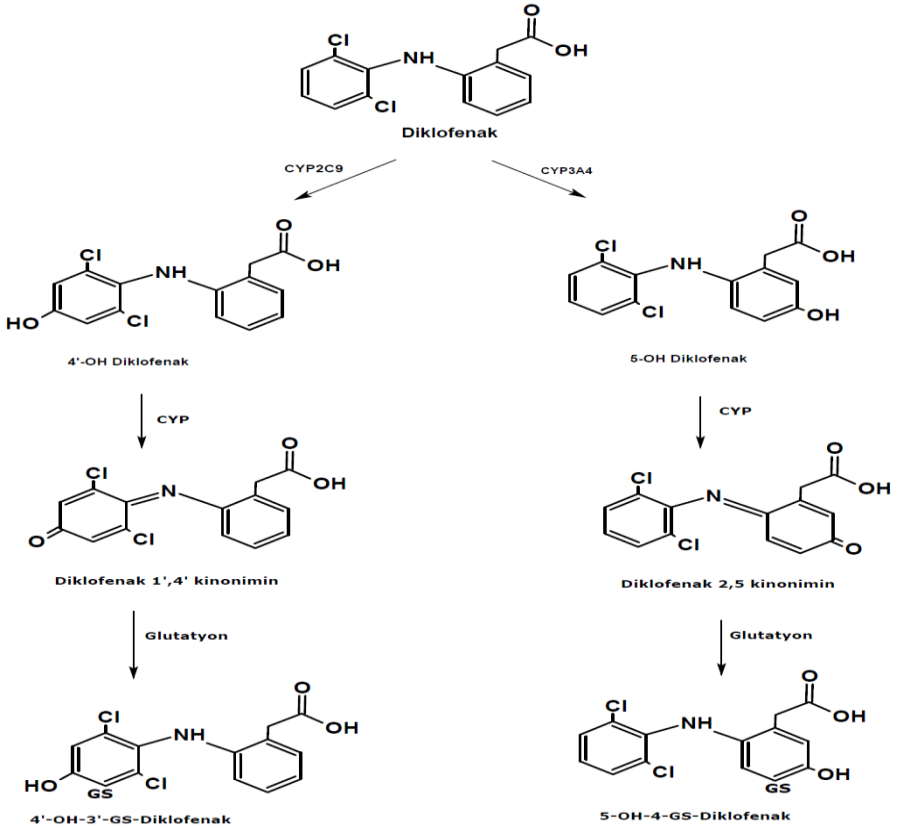
Şekil 2. 2 Diklofenağın major faz1 metabolitleri (Boelsterli, 2003)

Faz 1 metabolitleri, faz 2 reaksiyonlarıyla glukronid ve sülfat konjugatlarına dönüştürülmektedir. Faz 2 reaksiyonlarında ana yolak, diklofenak açil glukronidin meydana geldiği glukronidasyon yolağıdır **(Şekil 2.3)**. (Boelsterli, 2003; Ponsoda, Bort, Jover, Gomez-Lechon, & Castell, 1995).



Şekil 2. 3 4'-OH diklofenak açil glukronid oluşumu. Diklofenağın CYP2C9 aracılı hidroksilasyonu sonucu faz 1 metaboliti 4'-OH diklofenak oluşumunun ardından faz2 reaksiyonları kapsamında glukronid konjugasyonu sonucu 4'-OH diklofenak açil glukronid oluşumu şekilde gösterilmiştir. Bu yolakta faz 2 metabolizması, faz1 metabolizması tarafından da izlenebilir (Boelsterli, 2003).

Ayrıca oksidatif metabolitler glutatyon varlığında S- glutatyonilasyon reaksiyonları sonucu sülfat konjugatları da oluşturmaktadır (**Şekil 2.4**). Bu konjugatlar üriner metabolitlere dönüşerek %65 oranında idrarla atılırken, %35 oranında da safrayla atılmaktadır (Altman, Bosch, Brune, Patrignani, ve Young, 2015; Boelsterli, 2003; Tang vd., 1999).



Şekil **2. 4**. 4'-OH ve 5-OH diklofenaktan potansiyel reaktif metabolit olan p-benzokinonimin ve akabinde S-glutatyonilasyonun gerçekleşmesi gösterilmektedir(Tang vd., 1999).

Diklofenak, yemeklerle birlikte de alınabilmekte olup, erişkinlere başlangıçta günde üç kez 25-50 mg dozunda ağızdan verilerek daha sonra azaltılabilmektedir. Diklofenak, intramusküler olarak 75 mg dozunda günde 1-2 kez injekte edilebilmektedir. Çocuklarda günlük dozu 1-3 mg/kg'dır (Adadıoglu İ, 2010).

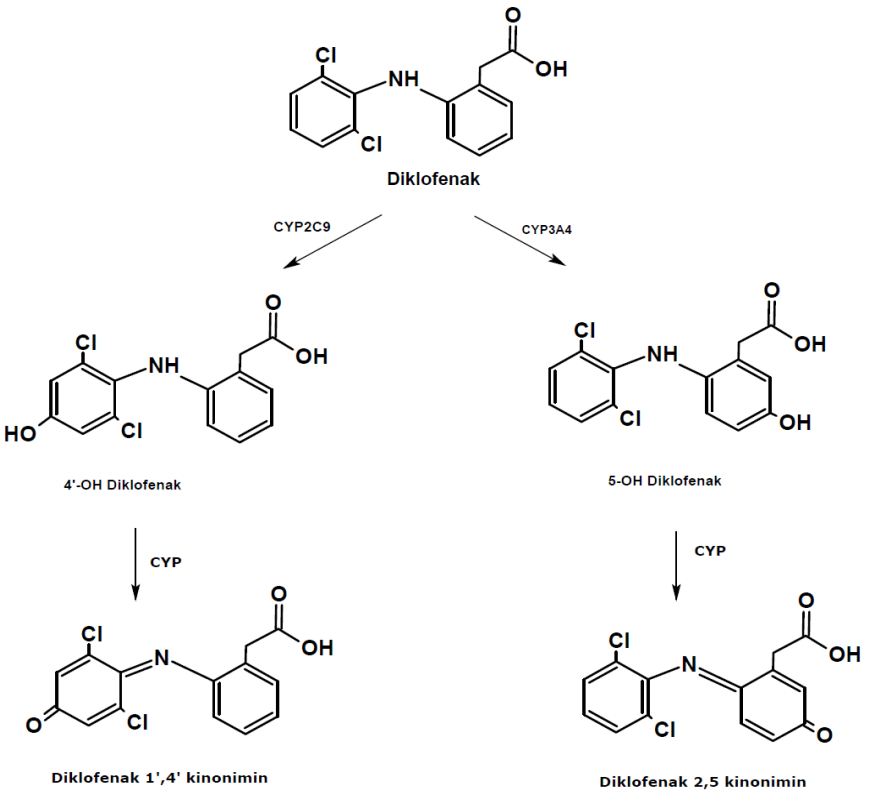
2.3.2 Diklofenak İndüklü Hepatotoksisite

Diklofenak, çoğu NSAİİ gibi duyarlı bireylerde idiyosenkratik hepatotoksisiteye yol açmaktadır. Çoğunlukla genetik özellikler nedeniyle olmakla birlikte; altta yatan hastalıklar, beslenme statüsü, polimedikasyon, hücresel stres veya enfeksiyon sebebiyle duyarlılık gelişen bazı bireylerde

meydana gelen özgün bir mekanizmaya sahip öngörülemeyen toksisiteye idiyosenkratik toksisite denilmektedir (Boelsterli, 2003; Kaplowitz, 2005).

İdiyosenkratik reaksiyonlar görünüm olarak tüm bireylerde aynı olabilir fakat form olarak çok düşük dozlara tepki verebilecek kadar duyarlı bir hale bürünmüştür. Bu nedenle aynı ilaç bazı insanlarda idiyosenkratik hepatotoksisiteye neden olurken, deneysel çalışmalarda kullanılan hayvan modellerinde ancak çok yüksek dozlarda toksisiteye ulaşılabilmektedir (Boelsterli, 2003).

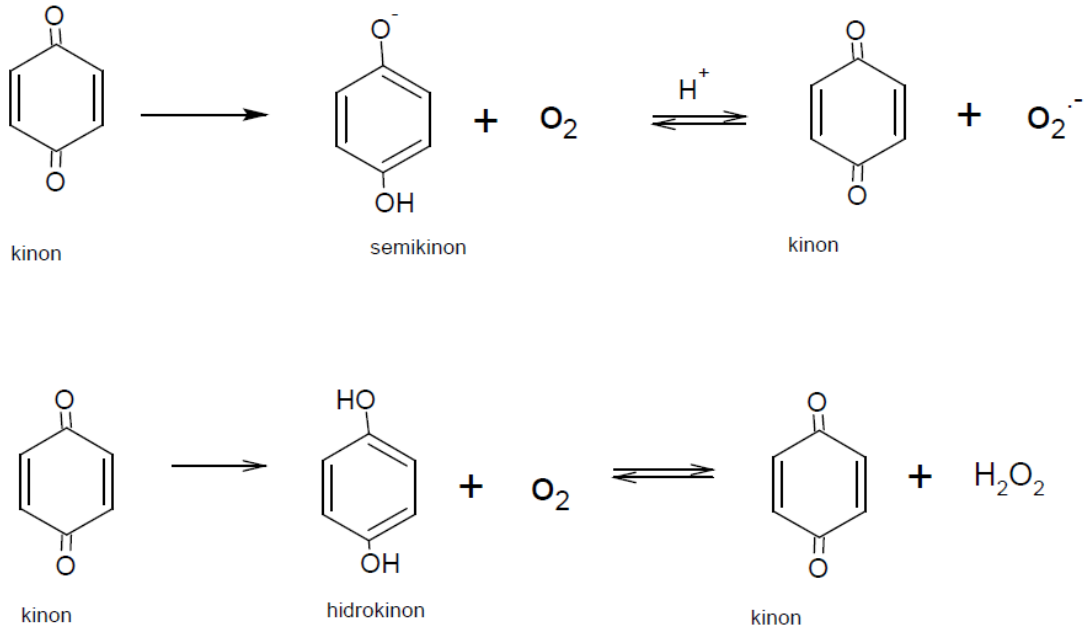
Toksisite mekanizması henüz aydınlatılamamış olup, yapılan in vivo ve in vitro çalışmalar, diklofenağın sitokrom 450 aracılığıyla gerçekleşen metabolizasyonu sonucu oluşan 4'-OH diklofenak ve 5-OH diklofenak metabolitlerinin oksidasyonuyla meydana gelen p-benzokinoniminlerin toksisitede rol oynadığına dair güçlü kanıtlar sunmuşlardır (Boelsterli, 2003; Cantoni vd., 2003) (**Şekil 2.5**).



Şekil 2. 5 Faz 1 metabolitleri olan 4'-OH ve 5-OH diklofenağın tekrar oksidasyonuyla tiyol reaktif p-benzokinonimin metabolitlerinin oluşumu gösterilmektedir (Tang vd., 1999).

Benzokinoniminler, tiyol reaktivitesine sahip olan elektrofilik gruplar olup; proteinlerin veya non-protein yapıların sülfidril grupları ile kovalent bağlar oluşturmaktadır. Redoks siklusuna girip $OH^{\cdot}$ radikali gibi reaktif

oksijen türlerinin oluşumuna yol açarak oksidatif strese neden olmaktadırlar (Powis, 1987) (**Şekil 2.6**[1]).



Şekil 2. 6 Benzokinon bileşiklerinden reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve enzimatik antioksidanların özellikle de katalazın bu oluşumu önleyici rolü gösterilmektedir.

Benzokinoniminlerin elektrofilik özellikleri nedeniyle GSH'ı alkillemesiyle hücresel GSH rezervuarlarının tükenmesi sonucu ivme kazanan önemli hücresel proteinlerin kovalent modifikasyonlarının ve benzokinoniminlerin redoks siklusu sonucu meydana gelen reaktif oksijen türlerinin oluşturduğu oksidatif stresin hepatoselüler nekroza neden olan sinyalizasyon yolaklarının aktivasyonuna neden olduğu belirtilmektedir. Ayrıca oksidatif stres kaynaklı mitokondriyal permeabilite geçiş porunun açılmasıyla membran

[1] Şekil 2.6 powis ve arkadaşlarının makalesinde yer alan bilgilerden yararlanılarak hazırlanmıştır(Powis, 1987).

potansiyelinin tamamen düşmesi ve hepatositlerde bulunan mitokondrilerin çoğunun hasar görmesi nedeniyle enerji üretiminin durması sonucu da nekrozun indüklendiği düşünülmektedir (Boelsterli, 2003; Powis, 1987; Tang, Stearns, Bandiera, Zhang, Raab, Braun, Dean, Pang, Leung, Doss, vd., 1999).

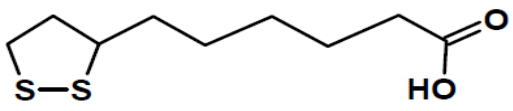
Diklofenağın peroksidazlar tarafından katalizlenen oksidasyonu sonucu oluşan nitroksit veya katyon radikallerinin de oksidatif strese ve mitokondriyal hasara neden olduğuna dair farklı bir mekanizma daha mevcut olup, in vitro ve in vivo çalışmalarca yeteri kadar desteklenememiştir. Ayrıca diklofenağın glukronidasyon reaksiyonları sonucu oluşan açilglukronitlerin protein reaktif ara ürünler olan izoglukronidlerin oluşumunda rol oynadıkları ve bu elektrofilik izoglukronitlerin proteinlerin kovalent modifikasyonuna yol açtıkları da düşünülmektedir (Boelsterli, 2003).

Deneysel veriler, idiyosenkratik hepatotoksisite görülen bireylerin hepatobiliyer kompartımanlarında reaktif metabolit oluşumunda artış olduğunu göstermektedir. Biyoaktivasyon enzimlerini kodlayan genlerde veya gen ekspresyonlarındaki kalıtsal anomaliler gibi genetik faktörler veya altta yatan hastalıklar, beslenme statüsü, polimedikasyon, hücresel stres veya enfeksiyon gibi epigenetik faktörler hepatotoksisiteye yol açan yolakları güçlendirerek veya detoksifikasyon yolaklarını engelleyerek bireyin hepatotoksisiteye karşı duyarlı hale gelmesine yol açmaktadır (Boelsterli, 2002).

İlaç advers reaksiyonları genellikle akut hepatoselüler hasar ile ilişkili olarak serum transaminazların yükselmesi, serum alkalen fosfataz düzeylerinde hafif yükselme ve değişken sarılık şeklinde görülmektedir (Kaplowitz, 2005).

2.4 Lipoik asit

Lipoik asit (LA), (1,2 ditiyolan-3-pentanoik asit), iki sülfidril grubu sayesinde oksidatif strese karşı korunmayı sağlayan doğal bir ditiyol bileşiğidir (**Şekil 2.7**). Birçok prokaryotik ve ökaryotik mikroorganizmada bulunduğu gibi, çeşitli bitki ve hayvan dokularında da bulunmaktadır (Shay vd., 2009; Teichert, Hermann, Ruus, & Preiss, 2003).



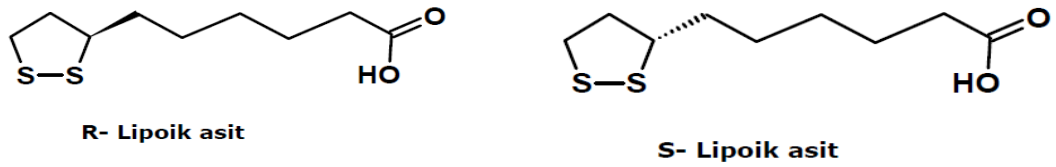
Lipoik asit (1,2 ditiyolan-3-pentanoik asit)

Şekil 2. 7 Lipoik asit (Navari-Izzo, Quartacci, ve Sgherri, 2002)

Çalışmalara göre ıspanak, brokoli, domates, kuşkonmaz, patates, buğday LA'nın diyetsel kaynaklarını oluşturmaktadır (Abdel-Zaher vd., 2008; Moini vd., 2002; Navari-Izzo, Quartacci, & Sgherri, 2002; Shay vd., 2009).

LA, vücudumuzda mitokondride oktanoik asitten enzimatik sentezi gerçekleştirilen doğal bir bileşik olup, mitokondriyal alfa-ketoasit dehidrogenaz enzimi için gerekli bir kofaktördür ve bu nedenle mitokondriyal enerji metabolizmasında önemli rol oynamaktadır (Navari-Izzo, Quartacci, & Sgherri, 2002; Shay vd., 2009)

LA'nın kiral bir merkeze sahip olmasından dolayı iki enantiyomeri bulunmaktadır (**Şekil 2.8**) (Shay vd., 2009).



R- Lipoik asit

S- Lipoik asit

Şekil 2. 8 Lipoik asidin enantiyomerleri (Shay vd., 2009)

Yapılan çalışmalara göre, dışarıdan alınan lipoik asit absorbe edilip; dokulara transport edilir ve dihidrolipoik aside (DHLA) indirgenir. Mitokondriyal dihidrolipoamid dehidrogenaz ve sitozolik glutatyon redüktaz enzimleri LA'nın DHLA'ya indirgenmesini sağlamaktadır (Biewenga, Haenen, & Bast, 1997; Moini vd., 2002).

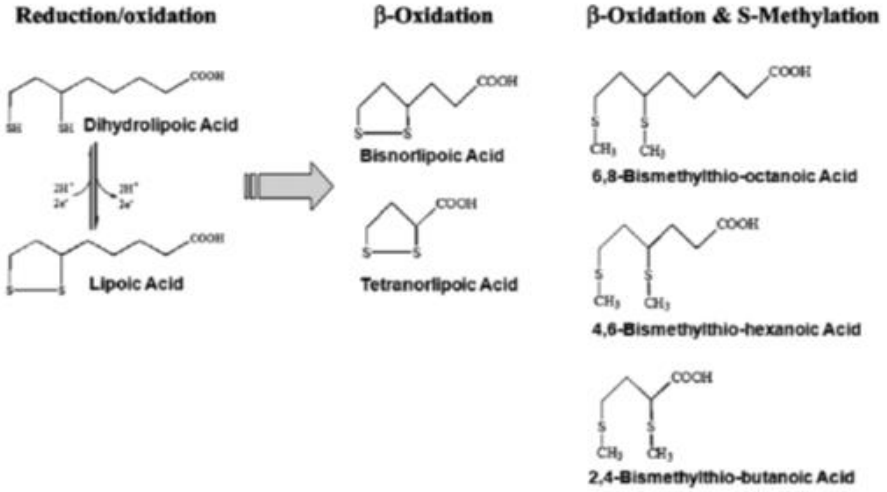
Güncel klinik çalışmalar rasemik LA'nın vücuda alınmasından sonra gastrointestinal sistemden hızlıca absorbe edilerek, maksimum plazma konsantrasyonuna 0,8 sa sonrasında ulaştığını göstermektedir (Teichert, Hermann, Ruus, ve Preiss, 2003).

LA'nın intestinal absorbsiyonundan monokarboksilat taşıyıcısının sorumlu olduğu düşünülmektedir. Ek olarak yapılan in vitro çalışmalarla LA'nın, sodyum (Na^+) bağımlı multivitamin taşıyıcısının da substratı olduğu ve böylelikle hem gastrointestinal alınımının hem de kandan dokulara transportunun sağlandığı belirtilmiştir. Karmaşık tutulum ve dağılım sistemlerinin karakterizasyonu, LA absorbsiyonunun birçok faktörle (substrat yarışması, transkripsiyonal, translasyonal ve posttranslasyonal düzenleme mekanizmaları gibi) ilişkili olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, LA'nın biyoyararlanımı birçok taşıyıcı proteine bağlıdır (Shay vd., 2009).

LA'nın hızlı bir şekilde gastrointestinal absorbsiyonu ve dokulara dağılımı gerçekleşmektedir. LA geçici olarak öncelikle karaciğer, kalp ve iskelet kaslarında birikmekte, bununla beraber diğer dokularda da bulunmaktadır. Ayrıca yapılan bazı çalışmalar sonucu LA'nın kan beyin bariyerini de geçtiği belirtilmektedir (Shay vd., 2009).

Ratlarda LA, valerik asit yan zincirinden beta oksidasyona uğrayarak metabolize edilir. Beta hidroksi bisnorlipoik asit, bisnorlipoik asit ve

tetranorlipoik asit tanımlanan major metabolitlerdir. Dolaşıma geçen bu metabolitler 1,2-ditiyolan halkasından redüksiyona ve akabinde S-metilasyona uğrayarak başta idrarla olmak üzere hızlı bir şekilde vücuttan atılmaktadır (**Şekil 2.9**) (Moini vd., 2002; Shay vd., 2009).



Şekil 2. 9 LA metabolizasyonu sonucu oluşan başlıca metabolitler (Shay vd., 2009)

LA, karboksilik asit yan zincirinin beta oksidasyonu ve ditiyolan yapısının S-metilasyonu yoluyla karaciğerde uğradığı geniş çaplı ilk geçiş etkisi nedeniyle düşük biyoyararlanım göstermektedir. Aynı şekilde kısa yarı ömrü (<1sa) LA'nın karaciğerde ve periferal dokularda yüksek oranda elimine edildiğinin göstergesidir (Patel & Packer, 2008).

LA'nın sıçanlar için LD50 dozu 2000mg/kg olarak belirlenmiştir. İnsanlarda LA'nın doza bağlı advers etkilerinin belirlenmesi için yapılan klinik araştırmalarda ise, kısa süreli 2400 mg/gün LA alınımı sonucu plesabo grubuna göre herhangi bir advers etkiye rastlanmamıştır. Altı ay boyunca 1800mg LA'nın oral olarak alınmasıyla gerçekleşen bir başka klinik çalışmada da yine plesabo grubuna göre herhangi bir advers etki görülmemiştir (Maritim, Sanders, & Watkins, 2003; Shay vd., 2009).

LA, reaktif oksijen türlerini temizleme, metal iyonlarıyla şelat oluşturma, endojen ve eksojen antioksidanların rejenerasyonlarını sağlama özelliklerine sahiptir. LA'nın bilinen antioksidan aktivitesinin yanında sinyal iletimi sürecinde de önemli rol oynayarak doku hasarının önlenmesinde görev aldığı yapılan çalışmalar sonucunda bildirilmiştir (Bast & Haenen, 2003; Fei vd., 2016; Shay vd., 2009).

LA, antioksidanlar arasında çok önemlidir çünkü antioksidan özelliğini hem yükseltgenmiş (LA) formunda hem de indirgenmiş (DHLA) formunda,

hem sitozol gibi hidrofilik ortamlarda hem de hücre membranları gibi hidrofobik alanlarda devam ettirmektedir (Abdel-Zaher vd., 2008; Moini vd., 2002; Navari-Izzo, Quartacci, & Sgherri, 2002; Shay vd., 2009).

Sıçanlar üzerinde yapılan deneysel çalışmalar sonucu LA'nın antioksidan özelliğinin görüldüğü doz aralığı 25-100 mg/kg olarak belirlenmiştir(Moini vd., 2002).

LA, antioksidan özelliği gereği serbest radikallerle etkileşimi esnasında tek elektron oksidasyonuyla tiyil ($RS\cdot$) radikallerini oluşturmaktadır **(Şekil 2.10)**. Oluşan bu radikallerin reaktivitesi genellikle ihmal edilmektedir; fakat aslında tiyollerin koruyucu ve iyileştirici etkilerinin sağlanmasında $RS\cdot$ radikallerinin kimyasal özelliklerinin de önemli rol oynadığı belirtilmektedir. $RS\cdot$ radikallerinin hızlı ve etkili bir şekilde uzaklaştırılması, antioksidan reaksiyon dengesini bozmakta ve dolayısıyla redoks duyarlı hücre sinyalizasyon mekanizmalarının uyarılmasında önemli rol oynamaktadır (Moini vd., 2002; Vertuani, Angusti, & Manfredini, 2004).

$$(\text{Radical})\cdot + \text{RSH} \rightleftharpoons \text{radical–H} + \text{RS}\cdot$$

Şekil 2. 10 Tiyol gruplarının serbest radikallerle etkileşimleri sonucu tiyil radikallerinin oluşumu(Wardman ve von Sonntag, 1995) .

Yapılan çalışmalar, LA'nın endojen antioksidanların sentezini indükleyerek ve/veya antioksidan enzim aktivitelerini arttırarak hücresel antioksidan savunmayı gerçekleştirdiğini rapor etmiştir. Bu alanda gerçekleştirilen çok sayıdaki çalışma, LA'nın özellikle önemli endojen antioksidan olan glutatyon (GSH) seviyelerini arttırıcı yönde etkisinin olduğunu belirtmektedir(Shay vd., 2009).

Oral alınımının ardından geçici hücresel birikimi ve mikromolar düzeyindeki konsantrasyonu, LA ve DHLA'nın sitokiyometrik temelli potent antioksidan özelliğini açıklamakta yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle, direkt antioksidan etkisinin yanında LA'nın hücresel redoks durumunu değiştirerek sinyalizasyon kaskadını harekete geçirip GSH'ın sentezini stimüle ettiği düşünülmektedir (Petersen Shay, Moreau, Smith, & Hagen, 2008; Shay vd., 2009).

2.4. Serbest Radikaller

Atomik yada moleküler yapılarında bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron taşıyan türlere serbest radikal denir (Bayr, 2005; Çavdar, Sifil, & Çamsarı, 1997).

Biyolojik sistemde bulunun radikallerden bazıları şunlardır: hidrojen (H^+), süperoksit ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil ($OH^\bullet$), hidrojen peroksit radikali (H_2O_2), nitrikoksit (NO) singlet oksijen ($^1O_2$), lipid peroksit (LOOH) (Vishal Tandon MD, 2005).

Oksijen, maddelere transfer edilerek enerji eldesi ve ksenobiyotiklerin detoksifiye edilmesi için gereklidir. Canlı organizmalarda, aerobik koşullar altında tüketilen oksijenin %90'ından fazlası elektron transport zincir sistemindeki sitokrom oksidazlar aracılığı ile son elektron akseptörü olarak işlev görmekte ve daha stabil bir bileşik olan suya dönüştürülmektedir. Bu reaksiyon süreci tek elektron redüksiyonu serisi şeklinde devam ettiğinden dolayı, reaktif oksijen türleri oluşmaktadır. Reaktif oksijen türleri, radikal ve nonradikal olarak ikiye ayrılmaktadır (**Tablo.1**) (Lushchak, 2014; Vishal Tandon MD, 2005).

Tablo.1. Reaktif oksijen türlerinin sınıflandırılması (Kohen & Nyska, 2002)

Name	Symbol
Oxygen radicals	
Oxygen (bi-radical)	$O_2^{\cdot\cdot}$
Superoxide ion	$O_2^{\cdot-}$
Hydroxyl	$OH^{\cdot}$
Peroxyl	$ROO^{\cdot}$
Alkoxyl	$RO^{\cdot}$
Nitric oxide	$NO^{\cdot}$
Nonradical oxygen derivatives	
Hydrogen peroxide	H_2O_2
(Organic peroxide)	ROOH
Hypochlorous acid	HOCL
Ozone	O_3
Aldehydes	HCOR
Singlet oxygen	$^1O_2$
Peroxynitrite	ONOOH

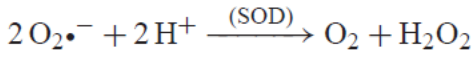
Fizyolojik oksidasyon reaksiyonları ve kaçınılmaz ikincil reaksiyonlar dışında yiyeceklerin içerisindeki birçok madde de oksidan özellikte veya oksidan prekürsörü olabilmektedir. Yine ilaçların metabolizasyonu sonucunda, toksik özellikte reaktif metabolitler oluşabilmektedir. Ayrıca havayı kirletici maddeler, sigara dumanı, güneşten gelen ultraviyole ışınlarının deriden absorbsiyonu da çeşitli oksidanların oluşumuna neden olmaktadır. Organizma, stabil olmayan bu durumlara antioksidan savunma sistemi sayesinde istenmeyen reaksiyonları önleyerek ve hasarlı molekül ve dokuların iyileştirilmesini sağlayarak adapte olmasına rağmen önlenemeyen az miktardaki hasarlı dokular birikerek uzun dönemde zararlı olabilmektedir (Sorg, 2004).

2.4.1 Süperoksit Anyonu

Kimyasal ve enzimatik süreçler sonucu yaygın olarak oluşan reaktif oksijen türüdür. Mitokondrideki ETC (elektron transport sistemi)den -özellikle de koenzim Q dan- kaçan elektronlar moleküler oksijenle etkileşime girerek

süperoksit anyonlarının oluşumuna neden olurlar. Direk toksisite oluşturabildiği gibi diğer reaktik oksijen türlerine dönüşerek indirekt şekilde de hasar meydana getirebilmektedir(Franco, Sánchez-Olea, Reyes-Reyes, & Panayiotidis, 2009; Valko vd., 2007; Vishal Tandon MD, 2005).

Süperoksit radikallerinin ($O_2^{\cdot -}$) süperoksit dismutaz enzimi tarafından (SOD) dismutasyonu sonucu hidrojen peroksit oluşur (Vishal-Tandon, Gupta, ve Tandon, 2005).

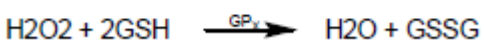


2.4.2 Hidrojen Peroksit

Membrana kolaylıkla penetre olabilmesi ve göreceli olarak yüksek konsantrasyonlarda (10 μM) hücre hasarına yol açmaları nedeniyle radikal olmamalarına rağmen reaktif oksijen metabolitlerinden kabul edilirler (Kohen & Nyska, 2002).

Oluşan hidrojen peroksit (H_2O_2) katalaz enzimi ve glutatyon bağımlı peroksidaz (GPx) gibi çeşitli peroksidazlar tarafından tarafından indirgenmektedir:





2.4.3 Hidroksil radikalleri

Hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$), hidroksit iyonunun nötral formudur. $OH^{\cdot}$ radikali, yüksek reaktiviteye ve çok kısa yarılanma ömrüne sahip olması (10^{-9}sn) nedeniyle tehlikelidir. Bu nedenle de in vivo olarak üretildiğinde yakın çevre ile etkileşime girmektedir (Valko vd., 2007).

H_2O_2 indirgeyici ajan olarak Fe^{2+} veya Cu^{2+}'nın yer aldığı fenton reaksiyonu ile $OH^{\cdot}$ radikaline dönüşebilmektedir. Ek olarak, Haber Weiss reaksiyonları sonucu da $OH^{\cdot}$ radikalleri oluşabilmektedir (Franco, Sánchez-Olea, Reyes-Reyes, & Panayiotidis, 2009; Valko vd., 2007).



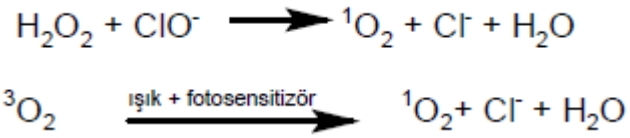


DNA' ya yakın bölgelerde hidroksil radikalinin üretimi sonucu pürin ve pirimidinlerde modifikasyonlara ve zincir kırılmalarına neden olabilmektedir. Ayrıca mikrozomal mitokondrial membranda ve hücre membranında lipid peroksidasyonuna neden olabilir (Vishal Tandon MD, 2005).

2.4.4 Singlet oksijen

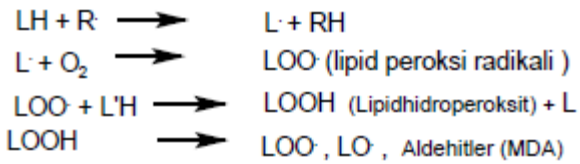
Siglet oksijen ($^1O_2$), bir serbest radikal olmayıp dış orbitaldeki elektronun zıt spine yerleşmesiyle oluşur (Vishal Tandon MD, 2005).

$^1O_2$ peroksidazlar ve lipoksijenazların yer aldığı reaktif oksijen türlerinin arasında gerçekleşen reaksiyonlar sonucu oluşabilmektedir. Ayrıca ışık, oksijen veya konjenital eritropoietik porfiriada olduğu gibi porfirin gibi fotosensitizanlar da singlet oksijet üretimine neden olurlar (Sorg, 2004).



2.4.5 Lipid Peroksid

Çoklu doymamış yağ asidlerinin radikaller tarafından oksidasyonu sonucu yağ asidi radikalleri meydana gelip, bu yapıya hızlıca oksijenlerin eklenmesiyle oluşan bileşik başka çoklu doymamış yağ asidlerinin oksidasyonuna neden olarak lipid hidroperoksidlerin oluşumuna yol açar. Lipid hidroperoksidler ise lipid peroksil, lipid alkoksil ve aldehidler (örneğin malondialdehit, MDA) gibi daha reaktif radikal türlerine parçalanabilmektedir. Çoklu doymamış yağ asidlerinin oksidatif tahribatına lipid peroksidasyonu adı verilir. MDA lipid peroksidasyonunun son ürünü olup; bilimsel alanda oksidatif stres belirteci olarak dünya çapında kabul görmüştür. Bu metabolik ara ürünler membran yapısına direkt olarak zarar verebildikleri gibi DNA, RNA, proteinler ve enzimler gibi gibi hücresel yapılara dolaylı şekilde de zarar verebilmektedir (Vishal Tandon MD, 2005).



2.4.6 Diğer serbest radikaller

Nitrik oksit, eşlenmemiş bir elektrona sahip küçük bir moleküldür. Biyolojik dokularda spesifik nitrik oksit sentaz (EC 1. 14. 13. 39) tarafından argininin sitrülline dönüşümü sırasında oluşmaktadır (Morrell, 2008).

Nitrik oksit türlerinin aşırı üretimi nitrosatif strese yol açar. Nitrozatif stres nitrozilasyon reaksiyonlarına yol açarak protein yapısını bozar ve normal fonksiyonlarını inhibe eder (Morrell, 2008).

Serbest oksijen radikallerinin etkisiyle oluşan karbon merkezli radikaller, alkoksil radikalleri, peroksil radikalleri, tiyil radikalleri diğer önemli reaktif oksijen radikallerindendir(Vishal Tandon MD, 2005).

2.4.7 Serbest Radikallerin Organizmaya Etkileri

Sürekli olarak endojen ve eksojen kaynaklı reaktif oksijen türlerinin akışı, hücre kompartımanlarında birikimli bir oksidatif hasara ve hücresel fonksiyonlarda bozulmalara neden olur. Hücrede oksidatif strese karşı en savunmasız hedefler enzimler, lipid membranlar ve DNA'dır (Kohen & Nyska, 2002).

Oksidatif stres, lipid peroksidasyonu adı verilen reaksiyonlar ile doymamış yağ asitlerini polar lipid peroksitlerine dönüştürerek hücresel biyomembranların radikal kaynaklı hasarına neden olmaktadırlar. Lipid peroksidasyonu, membrana bağlı reseptör veya enzimleri inaktive ederek, membran akışkanlığını bozarak, sitozolik içeriğin sızmasına neden olarak normal hücre fonksiyonlarını bozabilmektedir. Ayrıca lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA'nın mutajenik ve karsinojenik etkilerinin olduğu bildirilmiştir (Deavall, Martin, Horner, & Roberts, 2012; Kohen & Nyska, 2002).

Fosfatazlar, kinazlar, transkripsiyon faktörleri ve metabolik enzimler gibi proteinler oksidasyona duyarlı olup; protein oksidasyonu hücre sinyalizasyonuna, hücre yapısına ve enzimatik süreçlere direkt etki ederek hücresel homeostasiyi etkileyebilmektedir. Proteinlerin yan zincirlerindeki aminoasit kalıntıları, özellikle de sistein ve metiyonin kalıntıları, reaktif oksijen türleri (veya reaktif nitrojen türleri) ile oksidasyona duyarlıdır (Deavall vd., 2012; Valko vd., 2007).

Yüksek konsantrasyonlardaki NSAİİ, oksidatif strese yol açmaktadır. İlaç indüklü oksidatif stres ilk olarak kurtarma yolaklarına yardımcı olmakta; fakat uzun süreli oksidatif stres mitokondriyal hasara, apoptoz ve/veya nekroza neden olmaktadır (Boelsterli, 2003; Galati vd., 2002).

2.5. Antioksidan Savunma Sistemleri

Reaktif oksijen türleri, normal hücresel metabolizma sonucu oluşmaktadır. Belli konsantrasyonlara kadar fizyolojik fonksiyonlarda görev alırlarken; yüksek konsantrasyonlarda lipidler, proteinler ve DNA gibi çeşitli hücre bileşenlerinde olumsuz modifikasyonlara neden olmaktadırlar. Oksidanlar/antioksidanlar arasındaki oranın oksidanlar yönünde artış göstermesi, oksidatif stres olarak adlandırılmaktadır(Bayr, 2005; Birben, Sahiner, Sackesen, Erzurum, & Kalayci, 2012).

2.5.1 Endojen Antioksidanlar

Endojen antioksidanlar, enzimatik ve non enzimatik antioksidanlar olmak üzere iki kategoride incelenmektedir.

2.5.1.1 Enzimatik Endojen Antioksidanlar

Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbohidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidanlar ve bu olaya antioksidan savunma denir. Antioksidanlar reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engelleyerek veya diğer biyomoleküller ile etkileşmeden önce reaktif oksijen türlerini süpürerek, oksidatif hasarı minimize ederler (Close H, 2006; Çavdar vd., 1997).

Süperoksid dismutaz

Süperoksit dismutaz (SOD; EC1.15.1.1) metalloenzim sınıfından olup, süperoksit radikal anyonlarının hidrojen peroksit ve oksijene dismutasyonunu katalizlemektedir. (Bergendi, Beneš, Ďuračková, & Ferenčik, 1999; Fattman, Schaefer, & Oury, 2003; Grune, 2005).

$$O_2^{\bullet -} + O_2^{\bullet -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Katalaz

Katalaz (CAT, EC1.11.1.6) hidrojen peroksidin su ve oksijene dismutasyonunu katalizlemektedir. Hayvan hücrelerinde temel olarak peroksizomlarda ve sitoplazmada lokalizedir. Mitokondri ve endoplazmik retikulum az miktarda CAT içermektedir. Bu nedenle de hücre içi H_2O_2 peroksizomlara diffüze olamazlarsa elimine edilemezler(Grune, 2005; Limón-Pacheco & Gonsebatt, 2009).CAT enzimleri, fiziksel ve biyokimyasal

özelliklerine göre üç gruba ayrılmıştır. Peroksidatif aktivitesi artmış olan grup katalaz-peroksidazlar olarak adlandırılmaktadır. Aktif bölgesinde mangan içeren diğer bir grup ise non-hem katalazlar olarak adlandırılmaktadır. Üçüncü grup gerçek katalazlar yani tek fonksiyonlu hem katalazlardır. Katalaz-peroksidazlar prokaryotlarda yaygın olarak görülebilmekteyken, bazı ökaryotlarda da bulunabilmektedir. Mn-katalazlar, sadece prokaryotlarda tespit edilmiş olup, gerçek katalazlar ökaryotlarda bol miktarda bulunduğu gibi, birçok prokaryotta da bulunmaktadır (Grune, 2005; Kohen & Nyska, 2002).

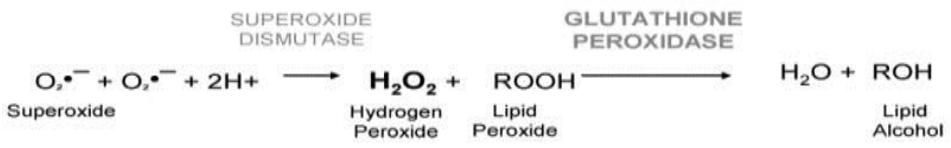
Enzim dört protein alt biriminden oluşup, her alt birim aktif bölgesinde bir hem, ferriprotoporfirin IX, içermekte olup; iç kısımda lokalize olan bu bölgeye geçişin dar bir geçitten sağlanması enzimin yalnızca az miktarlarda substrat için kullanılabileceğini açıklamaktadır. Her alt ünite dört ayrı yapısal ünite içermektedir: N-terminal kol (ilk 70 aminoasidi içerir), beta fıçı domenleri, domen bağları (sargı domeni, kalıntı 380-438), alfa- helikal domen. Katalazın küçük alt ünitesi ayrıca 150 kalıntı içren C- terminal bölgesi de içermektedir. İnsanlarda bulunan katalazda her alt üniteye bir redükte nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) molekülü bağlıdır (Grune, 2005; Kirkman & Gaetani, 2007).

Dismutasyon reaksiyonunun son ürünü olan H_2O_2 katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi peroksidaz ailesinin diğer üyeleri tarafından uzaklaştırılır. Katalazın Km değeri çok yüksek olup, yüksek konsantrasyonlardaki H_2O_2 yi uzaklaştırmaktadır. Glutatyon peroksidazın H_2O_2 ye affinitesi katalazdan daha fazladır. H_2O_2 iki molekül su ve bir molekül O_2 atomunun açığa çıktığı katalaz aracılı reaksiyonla uzaklaştırılmaktadır (Bayr, 2005; Kohen & Nyska, 2002; Percy, 1984).

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{Catalase}} 2H_2O + O_2$$

Glutatyon Peroksidaz

Glutatyon peroksidaz (GPx, EC 1.11.1.9), indirgeyici olarak glutatyonu (GSH) kullanarak H2O2 'nin veya organik peroksitlerin suya veya uygun alkollere dönüşümünü katalizlemektedir (Brigelius-Flohé & Maiorino, 2013; Espinoza vd., 2008).



Glutatyon Redüktaz

Glutatyon redüktaz (GR,EC 1.6.4.2) oksidize glutatyonu (GSSG) redükte glutatyona (GSH) indirgeyen; eş zamanlı olarak da NADPH oksidasyonunu gerçekleştiren flavin enzimdir. Aşağıdaki eşitlikte de görüldüğü gibi bu enzimin fonksiyonu redükte glutatyonun devamlılığını sağlamaktır (Chang, van der Hoeven, & Haddox, 1978).

$$GSSG + NADPH + H^+ \xleftrightarrow{GR} 2GSH + NADP^+$$

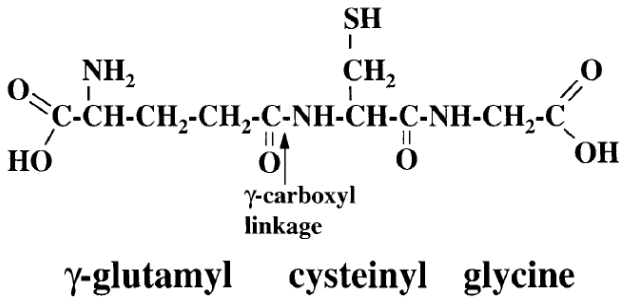
2.5.1.2 Non Enzimatik Endojen Antioksidanlar

Glutatyon α,β,γ-tokoferol (Vitamin E), β-karoten, askorbik asit, ürik asit, sistein, seruloplazmin, transferin, laktoferrin, miyoglobin, ferritin, albümin, bilirubin, melatonin, hemoglobin, metionin, laktoferrin non enzimatik endojen antioksidanlardandır.

Glutatyon

Glutatyon (GSH) glutamat, sistein ve glisini içeren; glutamat ve sistein arasında olağandışı bir gama peptid bağı bulunduran bir tripeptiddir (Anderson, 1998)**(Şekil 2.11)**.

GSH, birçok memeli ve prokaryotik organizmada bulunmakta olup, hücre içinde en çok bulunan düşük molekül ağırlıklı tiyoldür (0,2-10mM). Hücre içinde, NADPH-bağımlı glutatyon disülfid redüktaz enzimi sayesinde tiyol formunda tutulmaktadır (Anderson, 1998; Wu, Fang, Yang, Lupton, & Turner, 2004).



Şekil 2. 11 Glutatyonun açık formülü (Lu, 2009)

GSH, hücre içi antioksidan savunmada önemli rol oynamaktadır. GSH, serbest radikalleri direk olarak veya enzimatik reaksiyonlarla indirekt olarak etkili bir şekilde temizlemektedir. Bu reaksiyonlarda GSH oksidize formu olan GSSG'ye dönüşmekte, daha sonra NADPH-bağımlı glutatyon redüktaz ile tekrar indirgenerek eski haline dönmektedir. GSH/GSSG hücrenin antioksidan kapasitesini belirleyen ana redoks çiftidir. Ayrıca selenyum içeren bir enzim olan glutatyon peroksidazın H_2O_2 ve diğer peroksidleri redüksiyonu GSH-bağımlı olarak gerçekleşmektedir (Vitvitsky vd., 2003; Wu vd., 2004).

Oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarındaki indirgeyici özelliğine ek olarak, proteinlerin kovalent modifikasyonunda, lipofilik ksenobiyotiklerinin konjugasyonunda ve atılımında rol oynamaktadır. Bu nedenle GSH, zararlı maddelerin detoksifikasyonunu gerçekleştirmesi açısından da büyük öneme sahiptir (Anderson, 1998; Wu vd., 2004).

Karaciğer, GSH'ın büyük miktarda sentezinin gerçekleştiği ve aynı zamanda GSH'ın en fazla kullanıldığı yerdir. Bunun yanında plazma GSH düzeyleri de büyük oranda karaciğerden kaynaklanmaktadır. Hemen hemen tüm memeli dokularda bulunduğu belirtilen GSH'ın ana biyosentez yeri olan karaciğerde 5-10mM, diğer dokularda ise 1-2mM düzeylerinde bulunduğu yapılan çalışmalar sonucunda bildirilmiştir (Wu vd., 2004).

GSH tüm memeli hücrelerinde, hücrelerin kendi aminoasit prekürsörlerinin kullanıldığı ATP bağımlı iki reaksiyonlu bir yolak ile sentezlenir. Bu yolakta ilk olarak gama-glutamil sistein ligaz (GCL) aracılığıyla birer molekül glutamat ve sisteinden gama-glutamil sistein oluşmaktadır. Yolağın ikinci reaksiyonunda ise, bileşiğe glisinin ilavesiyle GSH sentetaz aracılı tripeptid oluşumu gerçekleşmektedir. Bu yolak hemen hemen tüm hücrelerde bulunmakta olup, karaciğer GSH'ın ana üreticisi ve taşıyıcısıdır (Anderson, 1998; Wu vd., 2004).

$$\text{L-Glu} + \text{L-Cys} + \text{ATP} \Leftrightarrow \text{L-}\gamma\text{-Glu} - \text{L-Cys} + \text{ADP} + \text{Pi}$$

$$\text{L-}\gamma\text{-Glu-Cys} + \text{Gly} + \text{ATP} \Leftrightarrow \text{GSH} + \text{ADP} + \text{Pi}$$

Hücre içi aminoasit seviyeleri dokuya, beslenme durumuna ve türlere göre farklı olmasına rağmen; L- sistein düzeyleri aslında belirgin bir şekilde L-glutamat ve glisin düzeylerinden düşüktür. L-sistein GSH sentezinin kısıtlayıcı substratıdır çünkü sadece küçük bir L- sistein havuzu metabolik olarak aktif ve çok daha büyük olan GSH havuzunu muhafaza edebilmek için kullanılabilir durumdadır(Griffith, 1999).

Karaciğerde, homosisteinden sistein sentezinin gerçekleştiği transsülfürasyon yolağı aracılığıyla sistein alınımı arttırılarak hücre içi GSH sentezi desteklenmektedir. Yapılan çalışmalar, hepatik GSH sentezinde kullanılan sisteinin yaklaşık %50'sinin homosistein kaynaklı olduğunu göstermektedir(Selhub, 1999; Vitvitsky vd., 2003).

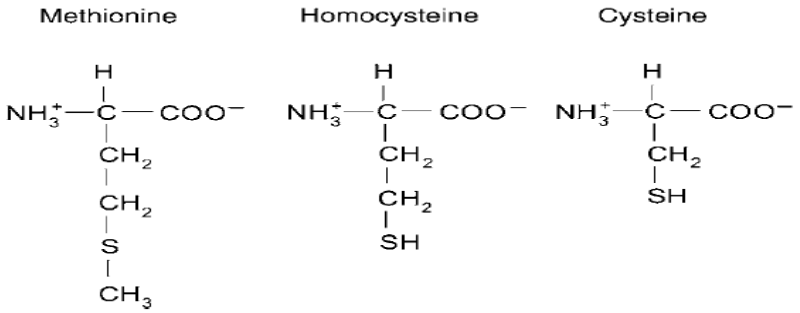
GSH, GSH konjugatları ve az miktarda GSSG membrana doğru taşınarak membrana bağlı gama glutamil transpeptidaz ve dipeptidazlar tarafından hücre dışında yıkıma uğramaktadırlar. Söz konusu enzimlerin aracılığıyla aminoasit varlığında transpeptidizasyon reksiyonları meydana gelir ve gama-glutamil aminoasitler oluşur. Oluşan gama glutamil aminoasitler, gama glutamil siklotransferazlarla 5-oksoproline ve karşılık gelen aminoasitlere dönüşürler. 5-oksoprolinler de daha sonra glutamata dönüştürülmektedir. Böylelikle, GSH'ın yıkılımı sonucu oluşan aminoasit gruplarından tekrar yaralanılmaktadır(Griffith, 1999; Selhub, 1999).

2.5.2 Eksojenik Antioksidanlar

Vitamin C, vitamin E, karetenoidler, çinko, selenyum, polifenolik asitler, flavonlar önemli eksojen antioksidanlardandır (Bouayed ve Bohn, 2010).

2.5.3.Homosistein

Canlı organizmalarda homosistein, iki sülfür içeren aminoasit olan sistein ve metiyoninin metabolik yolaklarında ara üründür. Homosistein, sistein yapısına ek olarak yan zincirinde bir metilen (-CH_2) grubu taşımakta olup; metyoninin yapısından ise bir metil (-CH_3) grubu eksiktir (**Şekil 2.12**) (Ganguly ve Alam, 2015; Jakubowski, 2014).



Şekil 2. 12 Metiyonin, homosistein ve sistein açık formülleri (Masella & Mazza, 2009)

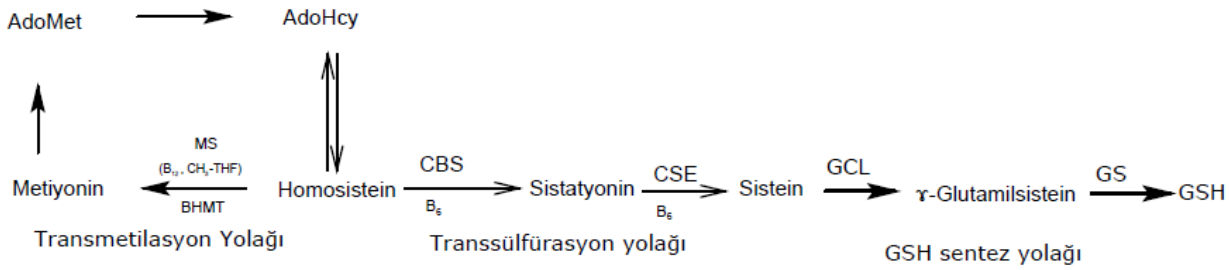
Metiyonin ve sistein özel aminoasit kodonlarına göre sentezlenebilen aminoasitler iken, homosisteinin spesifik kodonları bulunmamaktadır. Bu nedenle de homosistein, nonprotein aminoasit grubunda yer almaktadır (Jakubowski, 2014).

Metiyonin, sekiz esansiyel aminoasitten biri olup, insan vücudunda homosisteinin tek kaynağıdır. Metiyonin, vücuttaki her hücrede iki ana yolak ile metabolize edilmektedir. Birincil olarak ribozomal biyosentez esnasında yeni proteinler oluşturmak üzere metabolize edilmektedir. İkinci olarak,

poliamin biyosentezinde propil grubu sağlayan ve biyolojik metilasyon reaksiyonlarında da metil grubu donörü olan S-Adenozilmetyonin (AdoMet / SAM) oluşturmak için kullanılmaktadır. Metiyoninin, AdoMet oluşturmak üzere kullanılması sonucunda homosistein oluşumu görülmektedir. AdoMet, metil grubunu akseptör grubuna transfer ettiğinde, S-adenozilhomosistein (AdoHcy) oluşmaktadır. AdoHcy, AdoMet'in aksine birçok transmetilasyon reaksiyonunun inhibisyonunda rol oynar. AdoHcy'nin enzimatik hidroliz reaksiyonu sonucu homosistein oluşmaktadır. Bu reaksiyon, insan ve hayvan vücudu için homosisteinin oluşum kaynağıdır (Graham, Refsum, Rosenberg, & Ueland, 2012; Stabler, Sekhar, Allen, O'neill, & White, 2009).

Homosistein düzeyleri, remetilasyon ve transsülfürasyon yolakları ile düzenlenmektedir. Remetilasyon yolağında homosistein, metiyonin sentaz (MS) aracılığıyla metiyonine dönüşmektedir. Transsülfürasyon yolağında ise, homosistein sistatyonin beta sentaz (CBS) enzimi aracılığıyla serin ile kondanse olarak sistatyonini meydana getirmektedir. Oluşan sistatyonin, gama sistatyonaz (CSE) enziminin katalizlediği hidroliz reaksiyonu sonucunda sistein ve ketobütirat oluşturmaktadır. MS enzimi aracılı remetilasyon vücutta her organda gerçekleşirken; CBS tarafından gerçekleştirilen transsülfürasyon yolağı karaciğerde ve böbrekte bulunmaktadır (Bolander-Gouaille, 2002; Selhub, 1999).

Transsülfürasyon yolağı, karaciğerde GSH havuzlarının nicel olarak korunmasında önemli rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalar, karaciğerin glutatyon sentezinde gerekli olan sisteinin yaklaşık %50'sinin homosistein kaynaklı olduğunu göstermektedir (**Şekil 2.13**) (Selhub, 1999; Vitvitsky vd., 2003).



Şekil 2. 13 Karaciğerde transsülfürasyon, transmetilasyon ve GSH sentezi yolakları. Remetilasyon yolağında MS enzimi vitamin B12 ve 5,10 metiltetrahidrofolata (CH3-THF) gereksinim duymaktadır. Transsülfürasyon yolağında ise B6 vitaminine gereksinim duyulmaktadır(Vitvitsky, Mosharov, Tritt, Ataullakhanov, & Banerjee, 2003).

İki homosistein kavşak enzimi olan MS ve CBS in vitro koşullarda redoks (indirgenme yükseltgenme) değişimlerine karşı duyarlılık göstermekte ve böylelikle glutatyon sentezini modüle etmektedir. Vitvitsky ve ark. reaktif türlerin hücresel redoks durumundaki değişikliklere neden olması sonucu

transsülfürasyon yolağı boyunca akışın ve GSH sentezinin indüklendiğini belirtmektedir (Vitvitsky vd., 2003).

3- GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Gereç

Bu çalışma, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ) Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarlarında ve ESOGÜ Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde (TICAM) gerçekleştirilmiştir.

3.1.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Bakımı

Çalışma protokolü oluşturulduktan sonra ESOGÜ Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulundan onay (539/2016) alındı. Çalışmada deney hayvanı olarak ESOGÜ TICAM'dan temin edilen Spraque Dawley türü 350-400g ağırlığında 40 adet erkek sıçan kullanıldı. Çalışma başında deney hayvanlarının tartımları alınarak doz ayarı yapıldı. Deney hayvanları deney süresince 12; 12 aydınlık/ karanlık ışıklandırması olan, uygun havalandırmaya sahip, sıcaklığı (22± 2°C) ve nemi (%45- 50) otomatik olarak ayarlanmış odalarda, polikarbonat şeffaf kafeslerde, herhangi bir su ve yem kısıtlaması yapılmaksızın standart sıçan yemi ile beslenerek, temizlik kurallarına uygun bir şekilde yaşatılmış ve deney süresince hayvanlar günlük olarak kontrol edilmiştir.

3.1.2. Doz ve Deney Grupları

Çalışmamızda kullandığımız 4 aylık 350-400g ağırlığındaki Spraque-Dawley sıçanlar 5 gruba ayrıldı ve her grupta 8 tane sıçan olacak şekilde rastgele dağıtıldı. Çalışma grupları Tablo 3.1' de gösterilmiştir.

Tablo 3.1 Deney grupları ve uygulanacak işlemler

Gruplar	Uygulanan İşlemler
Kontrol Grubu (K)	5 gün boyunca taşıyıcı çözelti olan %5 lik DMSO 2ml hacminde intraperitonal olarak verildi.
Lipoik asit Grubu (LA)	4 gün boyunca 25mg/kg lipoik asit, 5.gün %5 lik DMSO çözeltisi 2ml hacminde intraperitonal yolla verildi.
Diklofenak Grubu (DF)	4 gün boyunca %5 lik DMSO çözeltisi, 5. gün 200mg/kg tek doz diklofenak 2ml hacminde intraperitonal yolla verildi.
Lipoik Asit + Diklofenak Grubu (LA + DF)	4 gün boyunca 25mg/kg/gün lipoik asit, 5.gün 200mg/kg tek doz diklofenak 2ml hacminde verildi.
Diklofenak + Lipoik Asit Grubu (DF+LA)	1.gün tek doz 200mg/kg diklofenak, ardından 4 gün boyunca 25mg/kg/gün lipoik asit 2ml hacminde intraperitonal yolla verildi.

Çalışmamızda, LA+DF grubunda diklofenak kaynaklı oksidatif stresin neden olduğu hepatotoksisiteye karşı lipoik asidin koruyucu etkisi incelenmiştir. LA+DF grubumuzda ise diklofenak kaynaklı oksidatif stresin neden olduğu hepatotoksisiteye karşı lipoik asidin tedavi edici etkisi incelenmiştir.

Çalışma kapsamında tüm gruplardaki sıçanlar 5 gün boyunca standart sıçan yemi ve içme suyu ile beslendiler.

3.1.2.1. Uygulanacak Maddelerin Hazırlanması

Diklofenak uygulanması

Diklofenak sodyum (Across 445250100, China) dozu 200 mg/kg va (vücut ağırlığı) olacak şekilde %5 lik DMSO çözeltisi içinde çözülerek hazırlandı ve 2ml hacminde intraperitonal yolla verildi (Hargus JS ve ark., 1994).

Lipoik asit uygulanması

Alfa lipoik asit (Sigma T5625, Germany), dozu 25 mg/kg va olacak şekilde %5 DMSO çözeltisi içerisinde çözülüp, taze hazırlanarak ve pH ayarı yapılarak (pH:7,4) 2ml hacminde intraperitonal olarak verildi (Suh JH ve ark., 2004).

3.1.3. Deney Hayvanlarından Örneklerin Alınması

Deney prosedürüne göre yapılacak son enjeksiyondan 24 saat sonra (6. gün) örnek alım zamanı olarak belirlendi ve tüm çalışma grupları sakrifiye edildi. Deney sonunda intraperitonal olarak ketamin (50mg/kg) ve ksilazin (10mg/kg) uygulanan sıçanların serum örnekleri için kardiyak yolla kanları alınarak ekssanguinasyon (kanatma veya yüksek miktarda kan alma) yöntemiyle sakrifiye edilerek karaciğerleri çıkartıldı. Kan örnekleri, separasyon tüplerinde 20 dakika bekletildikten sonra 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve elde edilen serum, alanin amino transferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), alkalen fosfataz (ALP), Total bilirubin (T. Bil) ve direkt bilirubin (D.Bil) ölçümleri için kullanıldı. Alınan karaciğer dokusunun belirli bir kısmı glutatyon (GSH), malondialdehit (MDA), katalaz (CAT), homosistein (Hcy), total protein düzeylerinin ölçülmesinde kullanılırken, diğer kısmı ise histolojik incelemeler için kullanılmıştır. Histokimyasal görüntüleme için ayrılan karaciğer örnekleri %10 formaldehit çözeltisi içerisine alındı. Biyokimyasal analizler için ayrılan karaciğer örnekleri, -80°C' de saklandı.

3.2. Yöntemler

3.2.1 Serum ALT, AST, ALP, T ve D. Bil ölçümü

Çalışmamızdaki serumda ölçülen biyokimyasal değişkenler Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Biyokimya laboratuvarında çalışıldı. Alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), alkalen fosfataz (ALP), total ve direkt bilirubin (T. ve D. Bil) ölçümleri için Roche Modular otoanalizörle uyumlu kantitatif test kitleri kullanıldı.

3.2.1.1. ALT ölçüm prensibi

Alanin aminotransferaz tarafından katalizlenen reaksiyon ile artan piruvatın, laktat dehidrogenazın (LDH) katalizlediği reaksiyon ile laktata dönüşümü esnasında NADH da oksitlenerek NAD^+'ye dönüşür. Piruvatın oluşum hızı, ALT aktivitesindeki artış ile direkt orantılı olduğundan, NADH miktarındaki azalma fotometrik olarak ölçülür.

$$\text{L-Alanin + 2-oksoglutarat} \xrightarrow{\text{ALT}} \text{piruvat + L-glutamat}$$

$$\text{Piruvat + NADH + } H^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{L-laktat + } NAD^+$$

3.2.1.2. AST ölçüm prensibi

Numunedeki AST, L-aspartat ve 2-oksoglutarat arasında bir amino grubu taşınarak oksaloasetat ve L-glutamat oluşmasını katalize eder. Ardından oksaloasetat, malat dehidrojenazın (MDH) varlığında NADH ile reaksiyona girerek NAD^+ oluşturur.

$$\text{L-Aspartat + 2-oksoglutarat} \xrightarrow{\text{AST}} \text{Oksaloasetat + L-glutamat}$$

$$\text{Oksaloasetat + NADH + } H^+ \xrightarrow{\text{MDH}} \text{L-malat + } NAD^+$$

NADH oksidasyonunun hızı katalitik AST aktivitesiyle doğru orantılıdır. Absorbanstaki azalmanın ölçülmesiyle tayin edilir.

3.2.1.3. ALP ölçüm prensibi

p-nitrofenil fosfat, magnezyum ve çinko iyonları varlığında ALP tarafından hidrolize edilir ve fosfat ile p-nitrofenol ürünleri oluşur. ALP aktivitesi ile orantılı olarak üretilen p-nitrofenol, kolorimetrik olarak ölçülür. Absorbanstaki artış ölçülerek tayin edilir.

$$\text{p-nitrofenil fosfat + H2O} \xrightarrow{\text{ALP}} \text{fosfat + p-nitrofenol}$$

3.2.1.4. Total Bilirubin (T. Bil) ölçüm prensibi

Kolorimetrik diazo yöntemi

Uygun kimyasallar varlığında total bilirubin, güçlü bir asidik ortamda hızlı bir şekilde 3,5-diklorofenil diazonyum ile birleşir.

asit

Bilirubin + 3,5-DPD ⟶ azobilirubin

Oluşan kırmızı azo boyanın renk şiddeti total bilirubin ile doğru orantılıdır ve fotometrik olarak ölçülür.

3.2.1.5. Direkt Bilirubin (D.Bil) ölçüm prensibi

Diazo yöntemi

Konjuge bilirubin (direkt bilirubin), asit tamponunda 3,5-Diklorofenil diazonyum tuzu ile direkt olarak reaksiyona girerek kırmızı renkli azobilirubini oluşturur.

$$\text{Bilirubin} + \text{3,5-DPD} \xrightarrow{\text{asit}} \text{azobilirubin}$$

Oluşan kırmızı azo boyanın renk şiddeti direkt (konjuge) bilirubin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve fotometrik olarak ölçülür.

3.2.2. Dokuda Total protein tayini

Prensip

Doku örneklerinde total protein düzeyi Gornall ve ark. tarafından bildirilen Biüret yöntemine göre yapılmıştır (Gornall, Bardawill, & David, 1949). Bu yöntem, alkali koşullar altında Cu^{+2} iyonlarının peptid bağını oluşturan azot atomu ile mavi-mor renkli kompleks oluşturması esasına dayanmaktadır. Oluşan renkli kompleksin absorbansı spektrofotometrik olarak 545 nm dalga boyunda ölçülmektedir. Standart olarak bovin serum albumin kullanılmıştır.

Çözeltiler

Biüret reaktifi: 1,5g bakır(2)sülfat**,** 6 g sodyum potasyum tartatarat 300ml 2,5 N NaOH çözeltisisinde çözdürüldü. Daha sonra çözelti distile suyla 1 L'ye tamamlandı.

Deney protokolü

Kör, numune ve standart tüpleri, tabloda bellirtildiği gibi hazırlandıktan sonra karanlık ortamda 15 dk bekletildi (Tablo 3.2).

Tablo 3.2 Total protein tayini deney protokolü

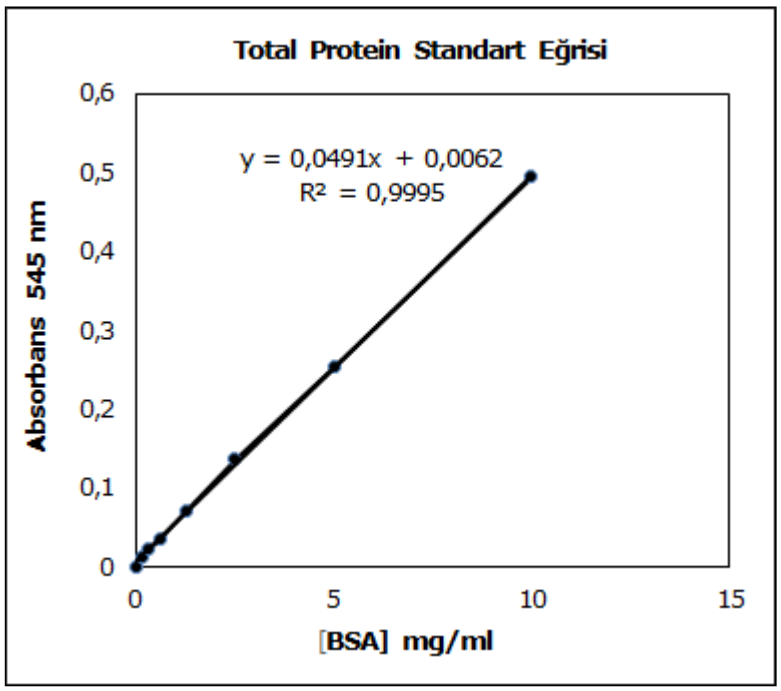
	KÖR	NUMUNE	STANDART
Homojenat	-	50 µL	-
Standart	-	-	50 µL
Distile su	50 µL	-	-
Biüret çözeltisi	1,25ml	1,25 ml	1,25 ml

Örneklerin absorbansları, spektrofotometrede 545 nm'de köre karşı okutularak elde edildi.

Hesaplama

Biüret standardı olarak 20mg/ml sığır serum albumin (BSA) çözeltisinden seri dilüsyon metoduyla 10 mg/ml; 5 mg/ml; 2,5 mg/ml; 1,25 mg/ml; 0,625 mg/ml; 0,312 mg/ml; 0,156 mg/ml konsantrasyonları elde edilmiştir. Elde edilen çözeltiler tabloda belirtildiği üzere kör ve numune tüplerine uygulanan aşamalara tabi tutulmuştur. İşlemler sonucunda ölçülen absorbanslarla konsantrasyon değerleri Microsoft Office Excel programı kullanılıp grafiğe geçirilerek standart grafiği elde edilmiştir.

Örneklerin konsantrasyonları, standart grafiği kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 3. 1 Total protein standart grafiği

3.2.3 Dokuda Katalaz (CAT) aktivitesinin tayini

Prensip

Katalaz (CAT), vücutta antioksidan savunma sisteminde yer alıp; H_2O_2 yıkılımını katalize etmektedir. CAT aktivite ölçümü için Beutler'in yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır. CAT enzim aktivitesi, H_2O_2'nin 230 nm'de verdiği maksimum absorbans değerinden yararlanılarak, CAT aktivitesine bağlı olarak zamanla absorbanstaki düşüş ile spektrofotometrik olarak ölçülmektedir (Beutler, 1986b).

$$2\,H_2O_2 \xrightarrow{CAT} 2\,H_2O + O_2$$

Doku homojenatının hazırlanması

Derin dondurucudan (-80°C) çıkarılan karaciğer dokuları, homojenizatör kullanılarak 1 g dokuya 10ml 0,1 M fosfat tamponu (pH:7,4) eklenmesi ile 15000 devirde 1 dk homojenize edildi.
Homojenatlar, 4°C de 4000 g de 20 dk santrifüj edildi ve süpernatantlar alındı.

Çözeltiler

Tris-EDTA-HCl çözeltisi (pH 8,0):12,1g Tris; 0,186g EDTA tartılarak 40ml distile suda çözüldü.
2M HCl çözeltisiyle pH 8'e ayarlandı ve daha sonra son çözelti distile suyla 100ml ye tamamlandı.
2M HCl hazırlamak için 16,6ml HCl distile suyla 100ml ye tamamlandı.

10mM H_2O_2 çözeltisi :172 µL H2O2 alındı ve distile suyla 200ml'ye tamamlandı.

Deney protokolü

Tablo 3.3 CAT tayini deney protokolü

	KÖR	NUMUNE
Tris+EDTA+HCl	100 µL	100 µL
H2O2	-	1800 µL
Distile su	1900 µL	60 µL
37° C 'de 10 dk inkübasyon		
Numune	-	40 µL

Yukarıdaki gibi hazırlanan tüpler su banyosunda 37°C de 10dk inkübe edildi. 3ml hacimli quvartz küvetlere 40 µL , 1/40 oranında seyreltilmiş olan homojenat üzerine, numune tüplerindeki karışım eklenip, 230 nm'de 5dk süre boyunca absorbansı ölçüldü. H_2O_2 azaldığından yavaş yavaş absorbansta düşüş gözlendi.

230 nm'de dakikada bir ölçüm yapılarak 5 dk boyunca absorbans değerleri kaydedildi.

Hesaplama

$$\textbf{Katalaz aktivitesi (U/L)} = \frac{(\Delta OD \times Vt)}{(0,071 \times V\text{ö})}$$

ΔOD= Zamana Göre Absorbans Değişimi

Vt = Toplam Hacim

Vö = Örnek Hacmi

0,071 = H_2O_2 nin 230 nm'deki mM ekstinksiyon katsayısı

Aktivite hesaplamasında 1/40 oranında dilüsyon yapmamız nedeniyle sonuç dilüsyon katsayısı ile çarpılmıştır.

$$\textbf{Spesifik Katalaz Aktivitesi (U/mg protein)} = \frac{\textbf{Katalaz aktivitesi}}{\textbf{Total protein miktarı}}$$

3.2.4. Dokuda malondialdehit (MDA) tayini

Prensip

Malondialdehit (MDA) lipid peroksidasyonunun sekonder bir ürünü olup, lipitlere ait peroksidasyonun belirlenmesinde yaygın olarak kabul gören önemli bir parametredir. Doku homojenatında MDA düzeyi Ohkawa ve ark.'nın bildirdiği yönteme göre yapılmıştır (Ohkawa, Ohishi, & Yagi, 1979). Bu yönteme göre; MDA'nın aerobik şartlarda pH 3,5 te tiyobarbitürik asit (TBA) ile 95°C'de inkübasyonu sonucu pembe renkli bir kompleks oluşmakta ve bu kompleks spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda ölçülmektedir.

Doku homojenatının hazırlanması

1g doku üzerine 9ml %1,15 lik pH=7 KCl çözeltisi doku üzerine eklendi. 15000 devirde 1dk süreyle buz üzerinde homojenize edildi. Daha sonra 3500 rpm de 10 dk santrifüj edilerek süpernatant alındı.

Çözeltiler

%8,1 Sodyum dodesil sülfat(SDS): 8,1 g SDS bir miktar distile suda çözülerek son hacim 100ml'ye tamamlandı. Taze hazırlandı.

%20 Asetat çözeltisi (pH: 3,5)

20ml asetik asite (H_2SO_4) 100ml'ye yaklaşık distile su ilave edilip; konsantre NaOH ile pH 3,5 e ayarlandıktan sonra son hacim 100ml'ye tamamlandı.

%0,8 Tiyobarbitürik asit (TBA) : 0,8 g TBA, bir miktar distile suda çözündükten sonra pH 5,5-7 arasında olacak şekilde pH ayarı NaOH ile yapıldı ve distile suyla 100ml' ye tamamlandı. Taze hazırlandı.

Deney Protokolü

Kör, standart ve numune tüpleri, tabloda gösterildiği gibi kapaklı tüpler içerisine hazırlandı (Tablo 3.4).

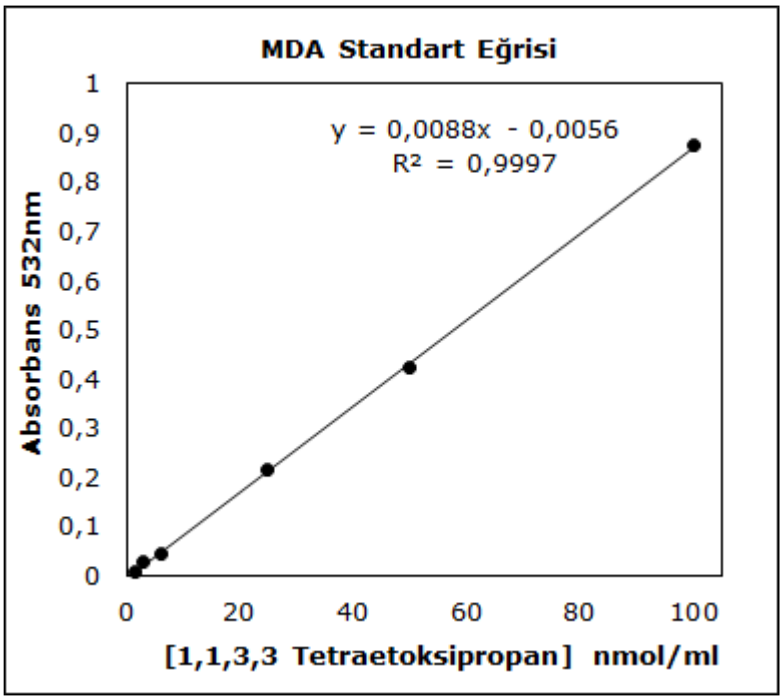
Tablo 3.4 MDA tayini deney protokolü

	KÖR	NUMUNE	STANDART
Homojenat	**-**	0,2ml	-
Standart	**-**	-	0,2ml
SDS	0,2ml	0,2ml	0,2ml
Asetik asit	1,5ml	1,5ml	1,5ml
TBA	1,5ml	1,5ml	1,5ml
Distile su	0,8ml	0,6ml	0,6ml

Hazırlanan tüpler 95°C de 60dk inkübasyona bırakıldı.
İnkübasyon sonrası musluk suyunda soğutuldu ve karıştırıldı.
Plastik tüplere aktarıldı.
4000 rpm de 10dk santrifüj edildi.
Spektrofotometrede 532nm'de köre karşı absorbans değeri kaydedildi.

Hesaplama

Standart olarak 1,1,3,3 tetraetoksipropan 100nmol/ml konsantrasyonunda hazırlanmış ve seri dilüsyon metoduyla 50 nmol/ml; 25 nmol/ml; 12,5 nmol/ml; 6,25 nmol/ml; 3,125 nmol/ml; 1,562 nmol/ml konsantrasyonları elde edilmiştir. Tabloda belirtildiği üzere kör ve numune tüplerine uygulanan tüm aşamalar, standart tüplerine de uygulanmıştır. Elde edilen konsantrasyonlara karşılık gelen absorbans değerleri ölçülerek kalibrasyon grafiği elde edildi. Örneklerin konsantrasyonları, standart grafiği kullanılarak hesaplandı.



Şekil 3. 2 MDA standart grafiği

Karaciğer MDA düzeyleri, aynı homojenatta ölçülen total protein düzeylerine oranlanarak nmol/ mg protein olarak verildi.

3.2.5 Dokuda glutatyon (GSH) düzeylerinin tayini

Prensip

Doku örneklerindeki glutatyon GSH düzeylerinin ölçümü, hafif alkali ortamda GSH'ın sülfidril grubu 5,5'-ditiyo-bis-2-nitrobenzoik asitle (DTNB, Ellman reaktifi) reaksiyona girmesiyle oluşan sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asidin (TNB) absorbansının 412 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile GSH konsantrasyonunun belirlenmesi esasına dayanmaktadır (Beutler, 1986).

Doku homojenatının hazırlanması:

-80 °C de dondurulmuş olan karaciğer dokuları homojenizatör kullanılarak 1/10 oranında soğuk 0.1 M Fosfat tamponu (pH: 7.4) ile homojenize edildi. Doku homojenatları 4000x g'de ve 4°C'de 20 dakika süre ile santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi.

Çözeltiler:

Çöktürme çözeltisi: 1,67 g metafosforik asit, 0,2 g EDTA, 30 g NaCl bir miktar distile su içinde çözülerek son hacim distile suyla 100 mL'ye tamamlandı.

% 1'lik Sodyum sitrat çözeltisi: 1 g sodyum sitrat distile suda çözülerek 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözelti belirtme reaktifi hazırlanırken kullanıldı.

Belirtme reaktifi: 40 mg 5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) % 1'lik sodyum sitrat çözeltisinde çözülerek, yine bu çözeltiyle 100 mL'ye tamamlandı.

0,3 M Sekonder sodyum fosfat çözeltisi: 0.3 M Na_2HPO_4 çözeltisi hazırlandı.

Glutatyon standart çözeltisi: 100mg/100mL olarak hazırlanan glutatyon stok çözeltisinden seri dilüsyon yöntemiyle farklı konsantrasyonlarda standartlar hazırlandı.

Deney protokolü

Homojenat santrifüj edildikten sonra deney tüplerine 0,5 ml süpernatant alındıktan sonra üzerine 0,75 ml çöktürme çözeltisi ilave edilip karıştırıldıktan sonra 4000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Numune tüpleri, elde edilen süpernatanttan 0,5 ml alınarak üzerine tabloda belirtildiği gibi sekonder fosfat çözeltisi (2ml) ve DTNB (1,5ml) eklenerek hazırlandı. Kör ve standart tüpleri de tabloda belirtildiği şekilde hazırlanarak, tüpler iyice karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi (Tablo 3.5).

Tablo3.5 GSH tayini deney protokolü

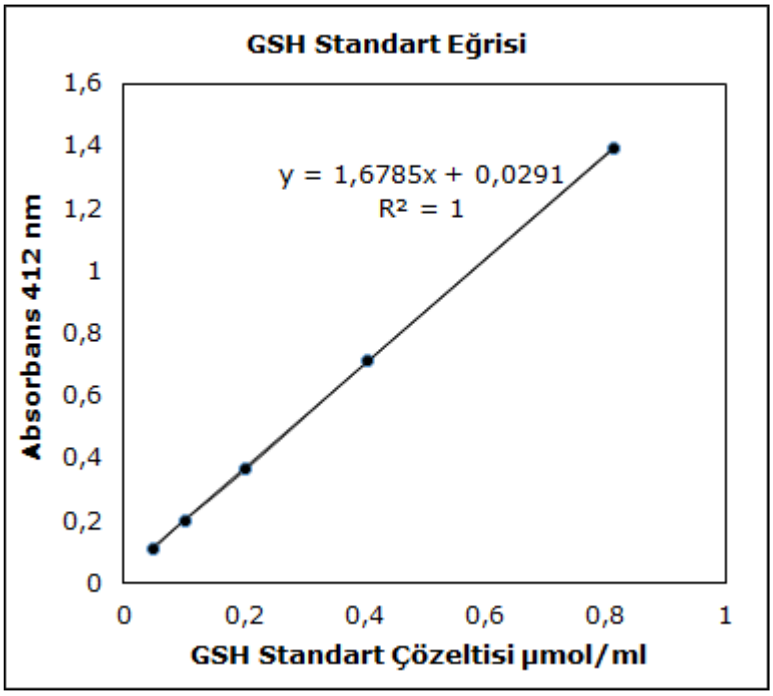
0,5ml süpernatant + 0,75 ml çöktürme çözeltisi eklenir.			
Doku homojenatları 4000 rpm de 15 dk santrifüjlenir.			
	NUMUNE	**KÖR**	**STANDART**
Süpernatant	0,5 ml	**-**	**-**
Standart GSH çözeltisi	**-**	-	0,5ml
Distile su	**-**	0,5ml	-
Sekonder sodyum fosfat	2ml	2ml	2ml
DTNB	1,5ml	1,5ml	1,5ml
Vortekslendikten sonra 25°C de 5 dk inkübe edilir.			

Örneklerin absorbansları spektrofotometrede köre karşı 412 nm'de okutularak kaydedildi.

Hesaplama

Standart glutatyon çözeltisinden seri dilüsyon metoduyla 0,8 µmol/ml; 0,4 µmol/ml; 0,2 µmol/ml ; 0,1 µmol/ml ; 0,05 µmol/ml konsantrasyonları elde edildi. Tabloda belirtildiği üzere kör ve numune tüplerine uygulanan tüm aşamalar, standart tüplerine de uygulandıktan sonra elde edilen absorbanslar ile Microsoft Office Excel programı kullanılarak standart kalibrasyon grafiği hazırlandı. Örneklerin konsantrasyonları, standart grafiği kullanılarak hesaplandı.

Doku glutatyon düzeyleri, aynı homojenatta ölçülen total protein düzeylerine oranlanarak nmol/mg protein olarak verilmiştir.



Şekil 3. 3 GSH standart grafiği

3.2.6 Dokuda homosistein düzeylerinin tayini

Prensip

Bu analiz, çift antikorlu sandviç enzime bağlı immünosorbent yöntemi (ELİSA) içeren immünolojik ve kantitatif bir test tekniğidir. Kit, homosisteine özgü antikorlarla kaplı mikroplaka içermektedir. Standart ve numuneler kuyucuklara pipetlenerek içerisindeki homosistein bu sabit antikorlar tarafından bağlanır. Bağlanmayan maddelerin uzaklaştırılmasından sonra, homosistein antikoruna özgü biyotin konjugatı kuyucuklara eklenir. Yıkama işlemi sonrası, avidin ile konjuge edilmiş horse radish peroksidaz kuyucuklara ilave edilir. Ardından yapılan yıkama sonrası, substrat çözeltisinin kuyucuklara eklenmesiyle başlangıçta bağlanmış olan homosistein konsantrasyonuna göre renk oluşur. Renk değişimi sabitlenir ve renk koyuluğuna göre ölçüm yapılır.

Doku homojenatının hazırlanması

100 mg doku 1ml fosfat tamponu içerisinde homojenize edildi ve bir gece boyunca -20 C de beklendi. İki kez tekrar edilen dondur çözdür döngüsünden sonra homojenatlar 5000 g de 5 dakika 2-8°C de santrifüj edildi. Süpernatant alındı ve 1/100 oranında seyreltilip, bir an önce çalışıldı.

Deney prosedürü

- Kimyasallar, numuneler ve standartlar protokole göre hazırlandı.
- 100 µL standart veya numune kuyucuklara eklendi ve 2 saat boyunca 37°C de inkübe edildi.
- Kuyucukların içerisi boşaltıldı; fakat yıkanmadı.
- 100µl biyotin antikoru her bir kuyucuğa eklendi ve 1 saat boyunca 37°C de inkübe edildi.
- Aspirasyon ve 3 defa yıkama gerçekleştirildi.
- 100 µL HPR- avidin herbir kuyucuğa eklendi ve 1 saat boyunca 37°C de inkübe edildi.
- Aspirasyon ve 5 defa yıkama gerçekleştirildi.
- 90 µL TMB substratı kuyucuklara eklendi ve ışıktan korunarak 15dk boyunca 37°C de inkübe edildi.
- 50 µL stop solüsyonu kuyucuklara eklendi ve 5 dk içerisinde 450nm'de okutuldu.

Hesaplama

Elde edilen strandart grafiği denklemine göre konsantrasyonlar otomatik olarak hesaplandı ve bulunan konsantrasyonlar örneklerin yaş doku ağırlığına oranlandı. Sonuçlar, mmol/mg yaş doku olarak verildi.

3.2.7 Karaciğer dokusu histolojik preperatların hazırlanması

Deney hayvanları ketamin ve ksilazin anestezik maddesi verilerek uyutuldular ve ardından sakrifiye edildiler. Karaciğer örnekleri deney hayvanlarından alınır alınmaz otoliz olmaması için daha önceden hazırlanmış %10luk formalin fiksatifi içine alındı. 48 saat bu fiksatifte fiksasyonları sağlandıktan sonra örnekler 3-4 saat çeşme suyu altında yıkandı. Ardından dokudaki fazla suyun gitmesi (dehidratasyon) ve dokunun sertleşmesi için sırasıyla %70-%80-%90-%96I-%96II olacak şekilde dereceli alkol serilerine alındılar. Bu alkollerde 30-45'er dakika tutulan dokular alkol aşamasının ardından ksilol içine alındılar. 2 ayrı ksilolda 20'şer dakika tutulan karaciğer örnekleri şeffaflanmalarının ardından parafin içine alındılar. Sırasıyla parafin I, parafin II, parafin III olacak şekilde 3 ayrı parafin aşamasında 1'er saat olacak şekilde tutuldular. Karaciğer örnekleri parafinizasyonlarının ardından ısıtıcı üzerindeki ısıtılmış demir kasetlere gömülerek bloklandılar ve mikrotomda bloklardan 3-5 mikronluk kesitler alınarak rutin olarak mikroskopta incelemek amacıyla Hematoksilen-Eozin boyasıyla boyandılar. Dokular Olympus BH-2 ışık mikroskop altında incelenerek fotoğraflandılar.

Skorlamada;
0 (sıfır): Hasar yok
1 (bir) : Az hasar
2 (iki) : Orta hasar
3 (üç) : Şiddetli hasar olarak değerlendirilmiştir.

3.2.8 İstatistiksel analiz

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 20.0 paket programı kullanıldı. Gruplar arasında değişkenler açısından fark olup olmadığını analiz etmek için öncelikle dağılımların normal dağılıma uygunlukları analiz edildi. Parametrik verilerin normal dağılıp dağılmadığı Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testleri kullanılarak değerlendirildi. Normal dağılım gösteren verilerin karşılaştırılmaları Tek Yönlü Varyans Analiz (Oneway ANOVA) testi ve grupların çoklu karşılaştırılmalarında TUKEY HSD testi kullanılmıştır. Veriler, ortalama±standart sapma (ss) olarak verildi. $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 Serum Bulguları

4.1.1 Serum AST bulguları

Serum AST enzim aktiviteleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde DF, LA+DF ve DF+LA grubunda kontrol grubuna göre ileri derecede önemli ($p<0,001$) düzeyde artış bulunmuştur.

LA grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli fark ($p>0,05$) bulunmadı.

LA+DF ve DF+LA grubu AST aktivitelerinde, DF grubuna göre ileri derecede önemli ($p<0,001$) düzeyde azalma görülmüştür.

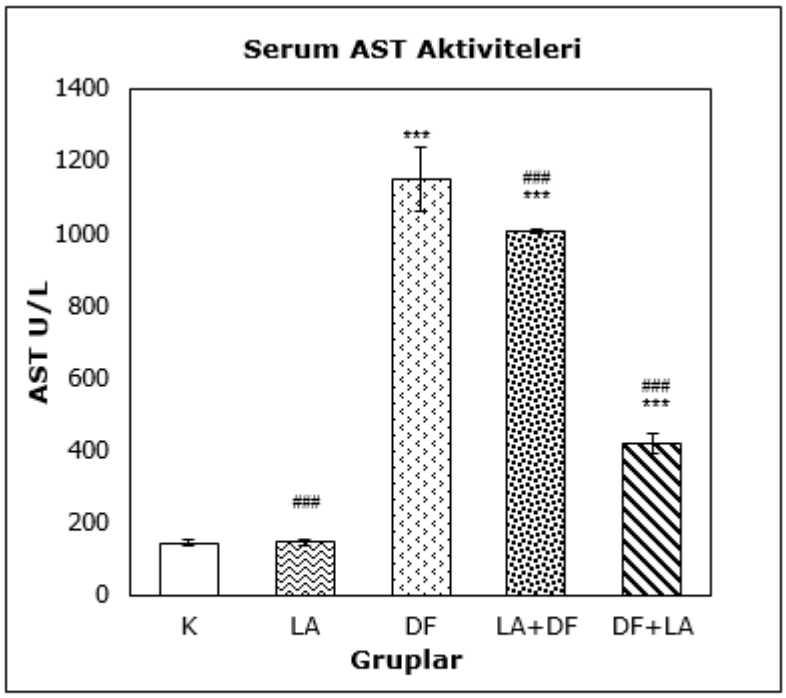
LA grubuna göre DF, LA+DF ve DF+LA grubu AST aktivitelerinde ileri derecede önemli ($p<0,001$) düzeyde artış gözlemlenmiştir.

AST seviyelerinde LA+DF grubunda, DF+LA grubuna göre ileri derecede önemli ($p<0,001$) düzeyde azalma görülmüştür (Tablo 4.1, Şekil 4.1).

Tablo 4.1. Serum AST aktiviteleri

Gruplar	N	Serum AST Aktiviteleri (U/L)
Kontrol Grubu (K)	8	143,0 ±9,75
Lipoik asit Grubu (LA)	8	144,88 ±7,61$^{###}$
Diklofenak Grubu (DF)	8	1151,13± 87,81***
Lipoik asit ve Diklofenak Grubu (LA+DF)	8	1005,13± 3,52***,###
Diklofenak ve Lipoik asit Grubu (DF+LA)	8	418,25 ±29,31***,###

Verilerin karşılaştırılmaları Oneway ANOVA testi ve grupların çoklu karşılaştırılmalarında TUKEY HSD testi kullanılmıştır.
İstatistiksel sonuçlar ortalama ± standart sapma (ss) olarak verildi.



Şekil 4. 1 Serum AST Aktiviteleri
*** : Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0,001
: DF grubu ile karşılaştırıldığında p<0,001

4.1.2 Serum ALT bulguları

Serum ALT enzim aktiviteleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde DF ve LA+DF grubunda kontrol grubuna göre ileri derecede önemli (p<0,001) düzeyde; DF+LA gruplarında çok önemli (p<0,01) düzeyde artış bulunmuştur.

LA grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli fark (p>0,05) bulunmadı.

LA+DF ve DF+LA grubu ALT aktivitelerinde, DF grubuna göre ileri derecede önemli (p<0,001) düzeyde azalma görülmüştür.

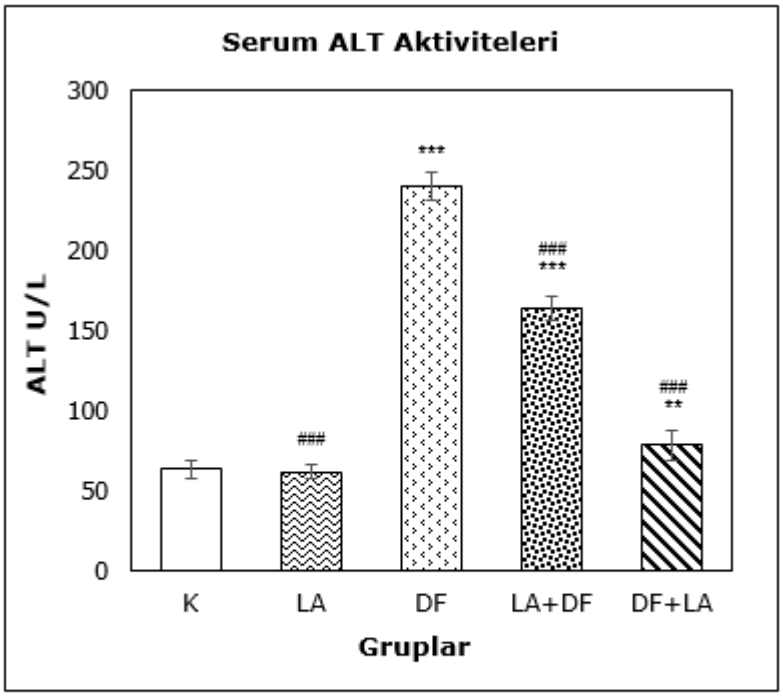
LA grubuna göre DF, LA+DF grubu ALT aktivitelerinde ileri derecede önemli (p<0,001) düzeyde, DF+LA grubu ALT aktivitelerinde ise çok önemli (p<0,01) düzeyde artış gözlenmiştir.

DF+LA grubu ALT aktivitesinde, LA+DF grubuna göre ileri derecede önemli (p<0,001) düzeyde azalma görülmüştür (Tablo 4.2, Şekil 4.2).

Tablo 4.2. Serum ALT aktiviteleri

Gruplar	N	Serum ALT Aktiviteleri (U/L)
K	8	63,25± 5,55
LA	8	61,88± 4,16$^{###}$
DF	8	240,25± 8,83***
LA+DF	8	163,75± 7,30***,###
DF+LA	8	78,5± 9,72***,###

Verilerin karşılaştırılmaları Oneway ANOVA testi ve grupların çoklu karşılaştırılmalarında TUKEY HSD testi kullanılmıştır.
İstatistiksel sonuçlar ortalama ± standart sapma (ss) olarak verildi.



Şekil 4. 2 Serum ALT Aktiviteleri
** : Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0,01
*** : Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0,001
###: DF grubu ile karşılaştırıldığında p<0,001

4.1.3 Serum ALP bulguları

Serum ALP enzim aktiviteleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde DF, LA+DF ve DF+LA grubunda kontrol grubuna göre artış olmasına rağmen istatistiksel olarak önemli fark ($p>0,05$) bulunmadı.

LA grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli fark ($p>0,05$) bulunmadı.

LA+DF grubu ALP aktivitesinde, DF grubuna göre ileri derecede önemli ($p<0,001$) düzeyde azalma görülmüştür. DF+LA grubu ALP aktivitesi ile DF grubu ALP aktivitesi arasında önemli bir fark gözlenmemiştir.

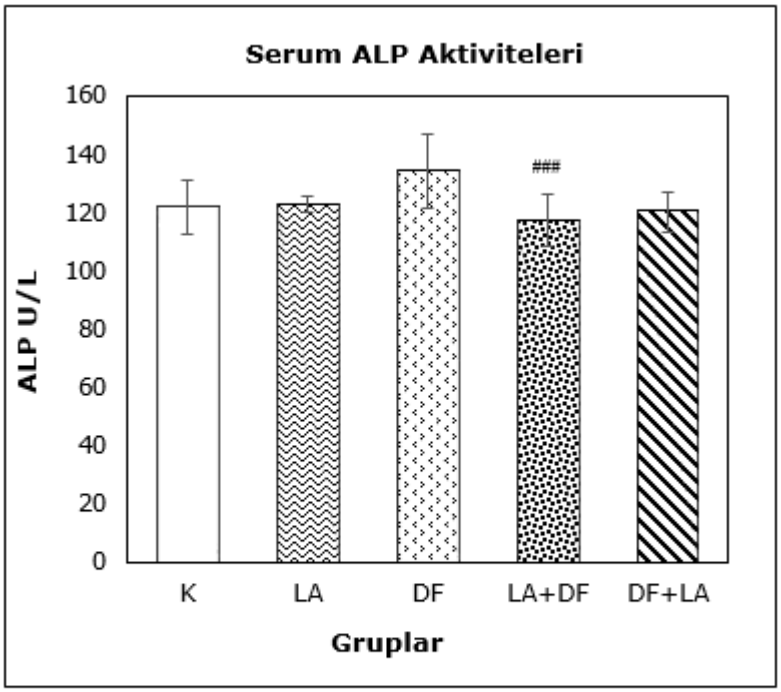
ALA grubuna göre DF, LA+DF ve DF+LA grubu ALP aktivitelerinde artış olmasına rağmen istatistiksel olarak önemli fark ($p>0,05$) bulunmadı.

ALP aktivitesinde DF+LA grubunda, LA+DF grubuna göre azalma olmasına rağmen istatistiksel olarak önemli fark ($p>0,05$) bulunmadı (Tablo 4.3, Şekil 4.3).

Tablo 4.3. Serum ALP aktiviteleri

Gruplar	N	Serum ALP Aktiviteleri (U/L)
K	8	121,75± 9,19
LA	8	122,88± 3,04
DF	8	132,88± 12,46
LA+DF	8	112,25± 9,15$^{\#\#\#}$
DF+LA	8	120,38± 6,80

Verilerin karşılaştırılmaları Oneway Anova Testi ve grupların çoklu karşılaştırılmalarında Tukey Hsd Testi kullanılmıştır.
İstatistiksel sonuçlar ortalama ± standart sapma (ss) olarak verildi.



Şekil 4. 3 Serum ALP Aktiviteleri
###: DF grubu ile karşılaştırıldığında p<0,001

4.1.4 Serum total bilirubin bulguları

Serum T.Bil seviyeleri, istatistiksel olarak değerlendirildiğinde DF, DF+LA ve LA+DF gruplarında kontrol grubuna göre ileri derecede önemli (p<0,001) düzeyde artış bulunmuştur.

LA grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli fark (p>0,05) bulunmadı.

LA+DF T.Bil seviyelerinde, DF grubuna göre ileri derecede önemli (p<0,001) düzeyde azalma olmakla birlikte, DF+LA grubu T.Bil seviyelerinde, DF grubuna göre önemli düzeyde (p<0,05) artış görülmüştür.

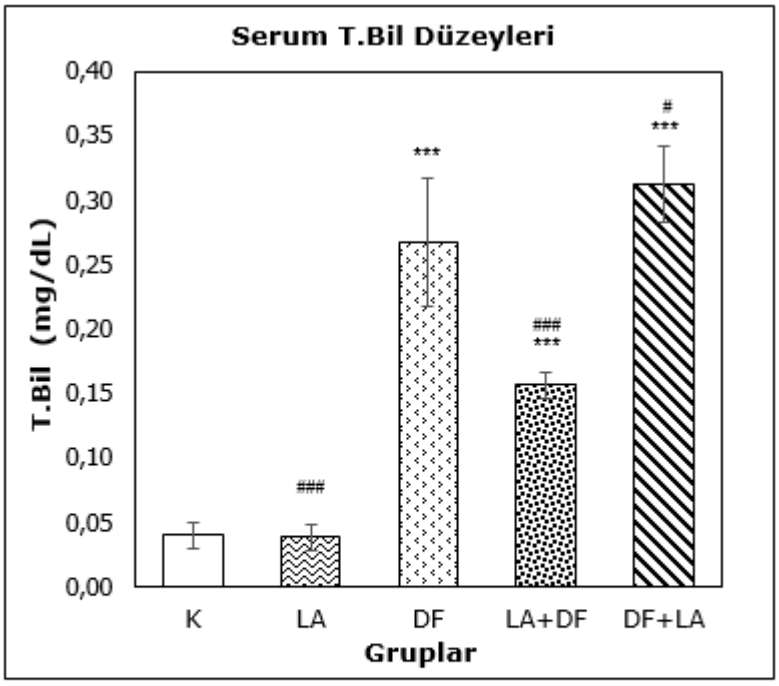
LA grubuna göre DF, LA+DF ve DF+LA grubu T.Bil seviyelerinde ileri derecede önemli (p<0,001) düzeyde artış gözlemlenmiştir.

T.Bil seviyelerinde LA+DF grubunda, DF+LA grubuna göre ileri derecede önemli (p<0,001) düzeyde azalma görülmüştür (Tablo 4.4, Şekil 4.4).

Tablo 4.4 . Serum T.Bil seviyeleri

Gruplar	N	Serum T.Bil Düzeyleri (mg/dl)
K	8	0,04±0,01
LA	8	0,04±0,01$^{###}$
DF	8	0,27±0,05***
LA+DF	8	0,16±0,01***,###
DF+LA	8	0,31±0,03***,#

Verilerin karşılaştırılmaları Oneway ANOVA testi ve grupların çoklu karşılaştırılmalarında TUKEY HSD testi kullanılmıştır.
İstatistiksel sonuçlar ortalama ± standart sapma (ss) olarak verildi.



Şekil 4. 4 Serum T.Bil Düzeyleri
*** : Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0,001
# : DF grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05
: DF grubu ile karşılaştırıldığında p<0,001

4.1.5 Serum direkt bilirubin bulguları

Serum D.Bil seviyeleri, istatistiksel olarak değerlendirildiğinde DF, LA+DF ve DF+LA gruplarında, kontrol grubuna göre ileri derecede önemli ($p<0,001$) düzeyde artış gözlenmiştir.

LA grubu D. Bil seviyelerinde, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli fark ($p>0,05$) bulunamamıştır.

LA+DF D. Bil seviyelerinde, DF grubuna göre ileri derecede önemli ($p<0,001$) düzeyde azalma olmakla birlikte, DF+LA grubu D. Bil seviyelerinde, DF grubuna göre ileri derecede önemli ($p<0,001$) düzeyde artış görülmüştür.

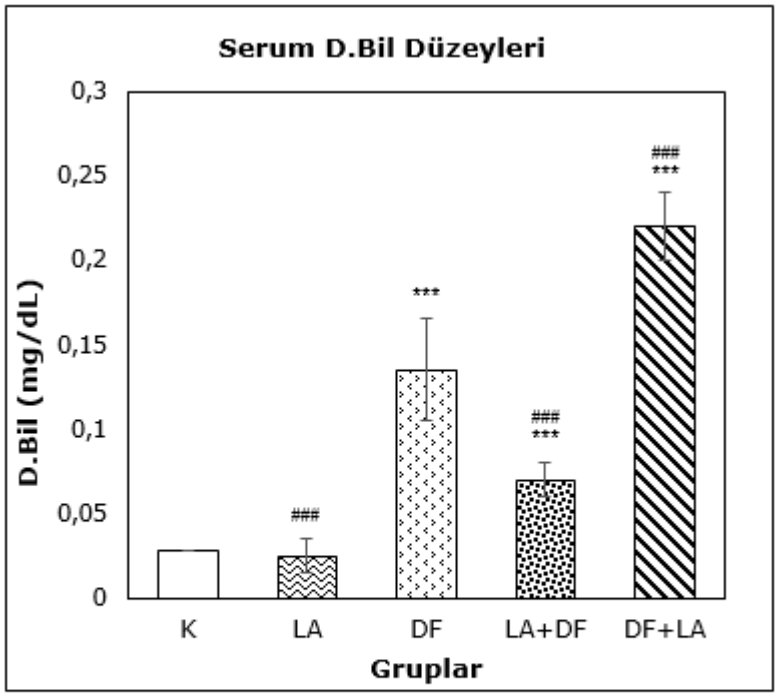
LA grubuna göre DF, LA+DF ve DF+LA grubu D. Bil seviyelerinde ileri derecede önemli ($p<0,001$) düzeyde artış gözlemlenmiştir.

D. Bil seviyesi LA+DF grubunda, DF+LA grubuna göre ileri derecede önemli ($p<0,001$) düzeyde azalma görülmüştür (Tablo 4.5, Şekil 4.5).

Tablo 4.5. Serum D. Bil düzeyleri

Gruplar	N	Serum D. Bil Düzeyleri (mg/dl)
K	8	0,03±0,00
LA	8	0,03±0,01$^{\#\#\#}$
DF	8	0,14±0,03***
LA+DF	8	0,07±0,01***,$^{\#\#\#}$
DF+LA	8	0,22±0,02***,$^{\#\#\#}$

Verilerin karşılaştırılmaları Oneway ANOVA testi ve grupların çoklu karşılaştırılmalarında TUKEY HSD testi kullanılmıştır.
İstatistiksel sonuçlar ortalama ± standart sapma (ss) olarak verildi.



Şekil 4. 5 Serum D.Bil Düzeyleri
*** : Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0,001
###: DF grubu ile karşılaştırıldığında p<0,001

4.2 Doku Bulguları

4.2.1 Karaciğer dokusu CAT aktivitesi bulguları

Doku CAT enzim aktiviteleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde DF grubunda kontrol grubuna göre önemli ileri derecede önemli (p<0,001) düzeyde düşüş gözlenmiştir.

Doku CAT enzim aktiviteleri DF+LA grubunda kontrol grubuna göre ileri derecede önemli (p<0,001) düzeyde düşüş gözlenmiş olup; LA+DF grubunda kontrol grubuna göre fark gözlenmemiştir.

LA grubu CAT enzim aktivitelerinde, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli fark (p>0,05) bulunamamıştır.

LA+DF grubu CAT aktivitelerinde, DF grubuna göre yükselme olmasına rağmen istatiksel olarak anlamlı değildir.

DF+LA grubu CAT aktiviteleri, DF grubuna göre ileri derecede önemli (p<0,001) düzeyde azalma göstermektedir.

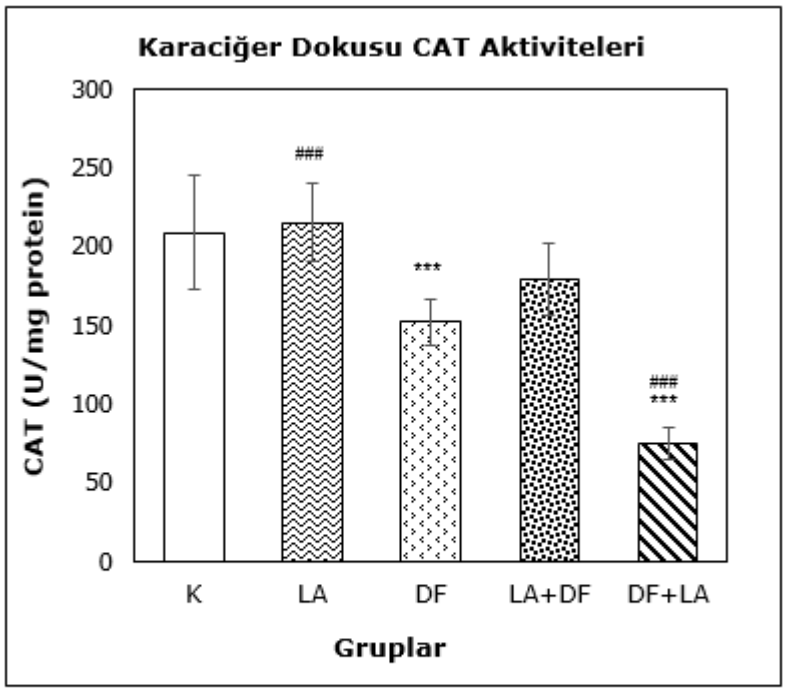
LA grubunda, DF ve DF+LA grubu CAT aktivitelerine göre ileri derecede önemli (p<0,001) düzeyde; LA+DF grubu CAT aktivitelerine göre ise önemli (p<0,05) düzeyde artış görülmektedir.

LA+DF grubunun CAT aktivitelerinde, DF+LA grubuna göre ileri derecede önemli (p<0,001) düzeyde artış görülmüştür(Tablo 4.6, Şekil 4.6).

Tablo 4.6. Karaciğer Doku CAT Aktivite Düzeyleri

Gruplar	N	Karaciğer Doku CAT Aktivite Düzeyleri (U/mg protein)
K	8	209,38± 36,12$^{###}$
LA	8	215,64± 24,44***
DF	8	152,66± 14,63
LA+DF	8	179,57± 22,81
DF+LA	8	74,85± 10,45***,$^{###}$

Verilerin karşılaştırılmaları Oneway ANOVA testi ve grupların çoklu karşılaştırılmalarında TAMHANE testi kullanılmıştır.
İstatistiksel sonuçlar ortalama
± standart sapma (ss) olarak verildi.



Şekil 4. 6 Doku CAT Aktiviteleri
*** : Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0,001
###: DF grubu ile karşılaştırıldığında p<0,001

4.2.2 Karaciğer dokusu MDA bulguları

Doku MDA seviyeleri, istatistiksel olarak değerlendirildiğinde DF grubunda kontrol grubuna göre çok önemli ($p<0,01$) düzeyde artış bulunmuştur.

LA+DF grubu doku MDA seviyelerinde, kontrol grubuna göre önemli ($p<0,05$) düzeyde düşüş görülmüştür.

DF+LA grubu doku MDA seviyelerinde, kontrol grubuna göre çok önemli ($p<0,01$) düzeyde artış bulunmuştur.

LA grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli fark ($p>0,05$) bulunmadı.

DF grubuna göre LA+DF grubu MDA seviyelerinde ileri derecede önemli ($p<0,001$) düzeyde azalma görülmüştür. DF grubu ile DF+LA grubu MDA seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

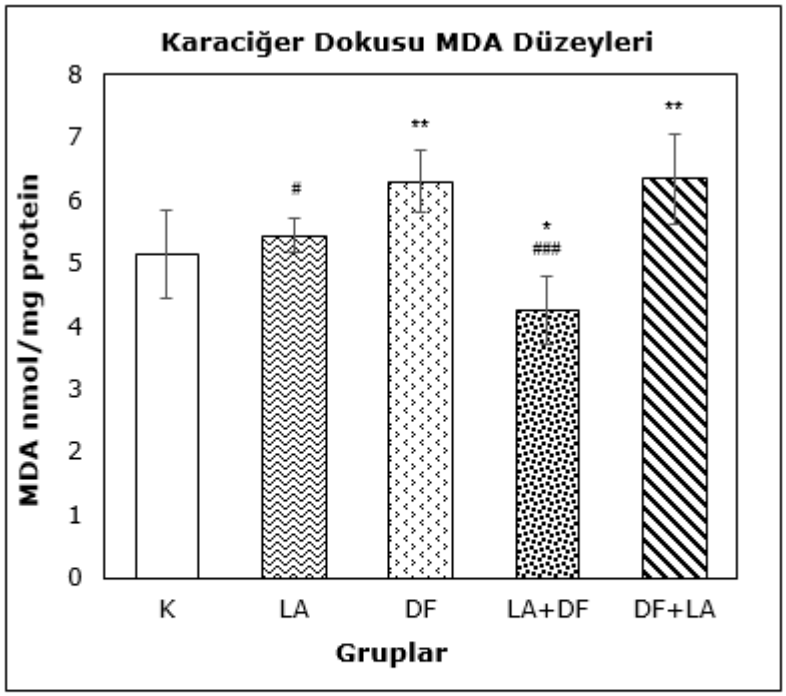
LA grubuna göre DF ve DF+LA grubu MDA seviyelerinde önemli ($p<0,05$) düzeyde artış gözlenmiş olup; LA+DF grubu MDA seviyelerinde ise çok önemli ($p<0,01$) düzeyde azalma görülmüştür.

LA+DF grubu MDA seviyelerinde, DF+LA grubuna göre ileri derecede önemli ($p<0,001$) düzeyde azalma görülmüştür(Tablo 4.7, Şekil 4.7).

Tablo 4.7. Karaciğer Doku MDA Düzeyleri

Gruplar	N	Karaciğer Dokusu MDA Düzeyleri (nmol/mg protein)
K	8	5,14± 0,69
LA	8	5,45± 0,26$^{\#}$
DF	8	6,30±0,49**
LA+DF	8	4,26± 0,53*$^{, \#\#\#}$
DF+LA	8	6,35± 0,71**

Verilerin karşılaştırılmaları Oneway ANOVA testi ve grupların çoklu karşılaştırılmalarında TUKEY testi kullanılmıştır. İstatistiksel sonuçlar ortalama ± standart sapma (ss) olarak verildi.



Şekil 4. 7 Doku MDA Düzeyleri
* : Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05
** : Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0,01
# : DF grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05
: DF grubu ile karşılaştırıldığında p<0,001

4.2.3 Karaciğer dokusu GSH bulguları

Doku GSH seviyeleri, istatistiksel olarak değerlendirildiğinde DF grubunda kontrol grubuna göre önemli (p<0,05) düzeyde düşüş gözlenmiştir.

LA+DF grubunun doku GSH seviyelerinde, kontrol grubuna göre çok önemli (p<0,01) düzeyde artış bulunmuştur.

DF+LA grubu ile kontrol grubu doku GSH seviyeleri arasında göre anlamlı bir fark gözlenmemiştir (p>0,05) .

LA grubu GSH seviyelerinde, kontrol grubuna göre önemli (p<0,05) düzeyde artış gözlemlenmiştir.

DF grubuna göre LA, LA+DF ve DF+LA GSH seviyelerinde ileri derecede önemli (p<0,001) düzeyde artış görülmüştür.

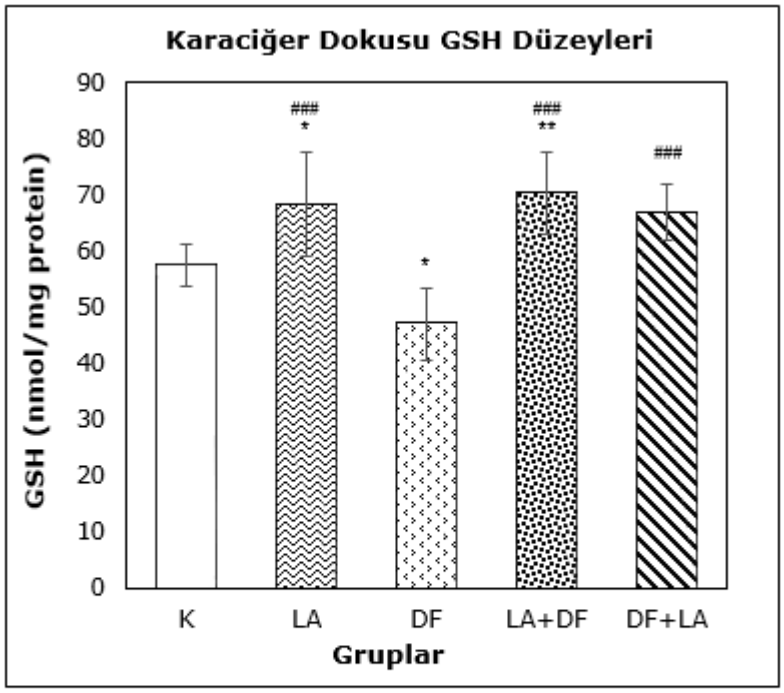
LA grubuna göre LA+DF ve DF+LA GSH seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı fark (p>0,05) bulunamadı.

LA+DF grubu GSH seviyelerinde, DF+LA grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark (p>0,05) bulunamadı (Tablo 4.8, Şekil 4.8).

Tablo 4.8 Karaciğer Dokusu GSH Düzeyleri

Gruplar	N	Karaciğer Dokusu GSH Düzeyleri (nmol/mg protein)
K	8	57,44±3,76
LA	8	68,36±9,15*, ###
DF	8	47,11±6,48*
LA+DF	8	70,45±7,34**, ###
DF+LA	8	63,64±5,28###

Verilerin karşılaştırılmaları Oneway ANOVA testi ve grupların çoklu karşılaştırılmalarında TUKEY testi kullanılmıştır.
İstatistiksel sonuçlar ortalama ± standart sapma (ss) olarak verildi.



Şekil 4. 8 Doku GSH Düzeyleri
* : Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05
** : Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0,01
###: DF grubu ile karşılaştırıldığında p<0,001

4.2.4 Karaciğer dokusu homosistein bulguları

Doku homosistein seviyeleri, istatistiksel olarak değerlendirildiğinde DF grubunda kontrol grubuna göre ileri derecede önemli ($p<0,001$) düzeyde düşüş bulunmuştur.

LA+DF ve DF+LA grubu doku homosistein seviyelerinde, kontrol grubuna göre ileri derecede önemli ($p<0,001$) düzeyde düşüş gözlenmiştir.

LA grubu homosistein seviyelerinde, kontrol grubuna göre önemli ($p<0,05$) düzeyde düşüş gözlenmiştir.

DF grubuna göre DF+LA homosistein seviyelerinde ileri derecede önemli ($p<0,001$) düzeyde, LA+DF grubu homosistein seviyelerinde ise çok önemli düzeyde ($p<0,01$) azalma görülmüştür.

LA grubuna göre LA+DF ve DF+LA grubu homosistein seviyelerinde ileri derecede önemli ($p<0,001$) düzeyde artış gözlenmiştir.

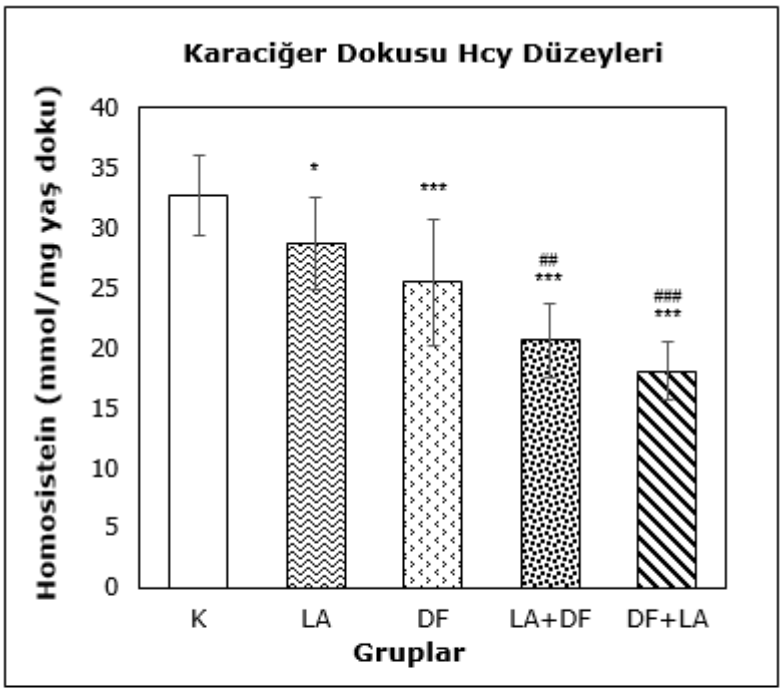
DF grubu ile LA grubu homosistein seviyeleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

DF+LA ile LA+DF grubu homosistein seviyeleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$) (Tablo 4.9, Şekil 4.9).

Tablo 4.9. Karaciğer Dokusu Homosistein Düzeyleri

Gruplar	N	Karaciğer Dokusu Hcy Düzeyleri (mmol/mg yaş doku)
K	8	32,72±3,48
LA	8	28,71± 2,06*
DF	8	25,50±1,47***
LA+DF	8	20,65±1,98***, ##
DF+LA	8	18,07± 2,19***, ###

Verilerin karşılaştırılmaları Oneway ANOVA testi ve grupların çoklu karşılaştırılmalarında TUKEY testi kullanılmıştır.
İstatistiksel sonuçlar ortalama ± standart sapma (ss) olarak verildi



Şekil 4. 9 Doku Hcy Düzeyleri

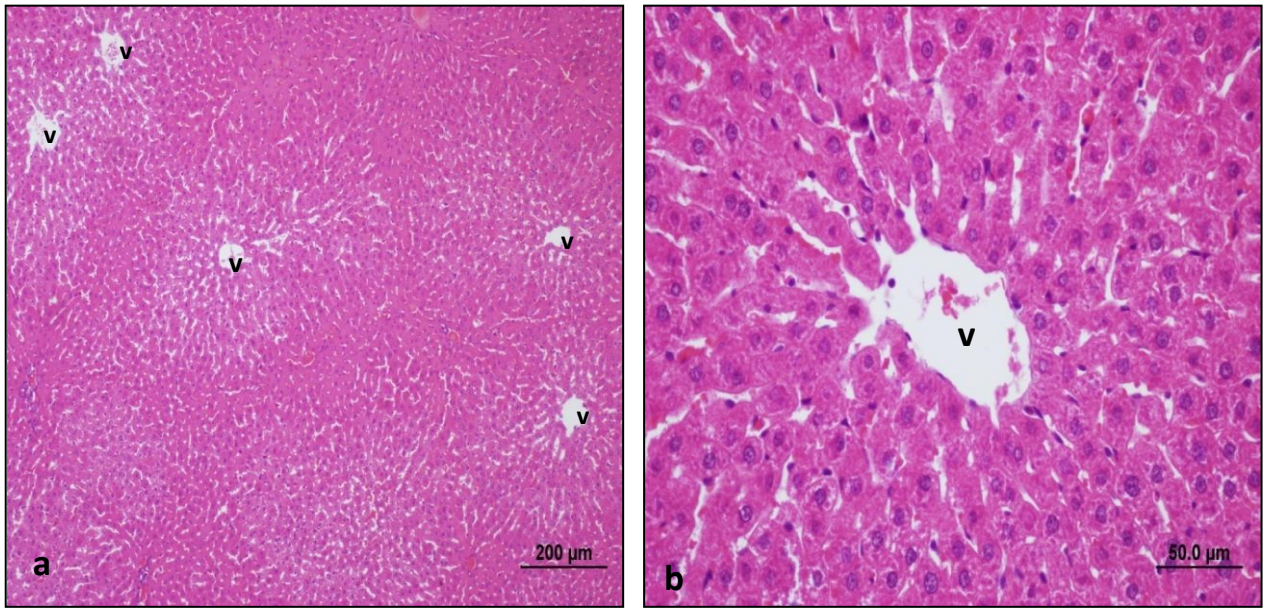
* : Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05

*** : Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0,001

: DF grubu ile karşılaştırıldığında p<0,01

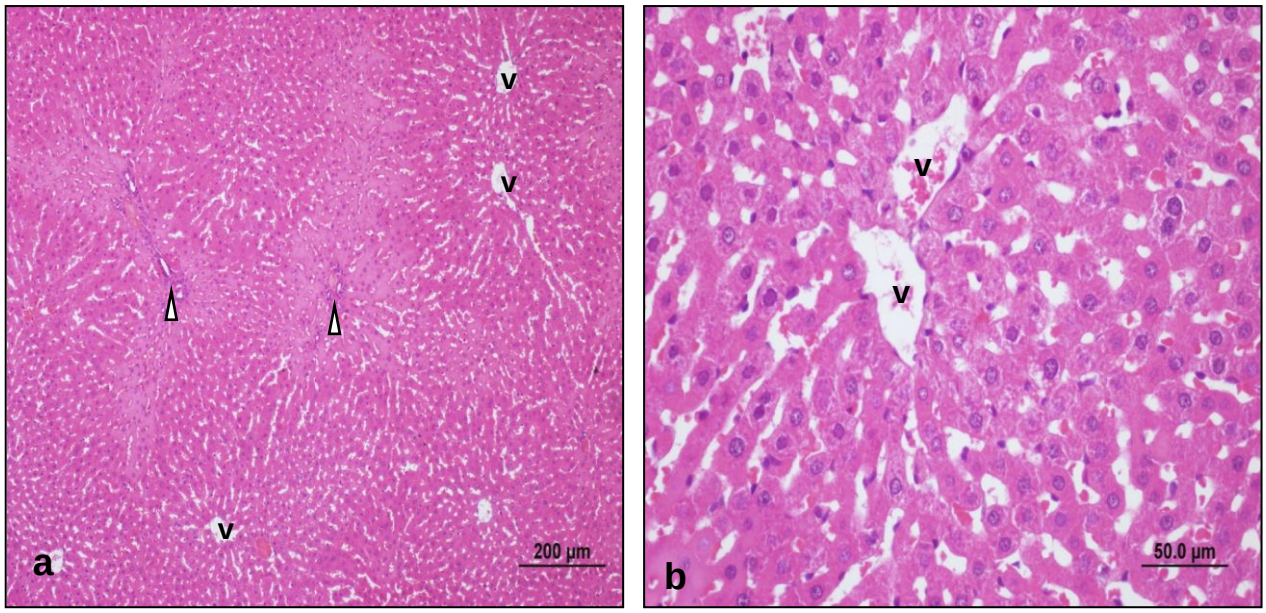
###: DF grubu ile karşılaştırıldığında p<0,001

4.3 Karaciğer Histoloji Bulguları



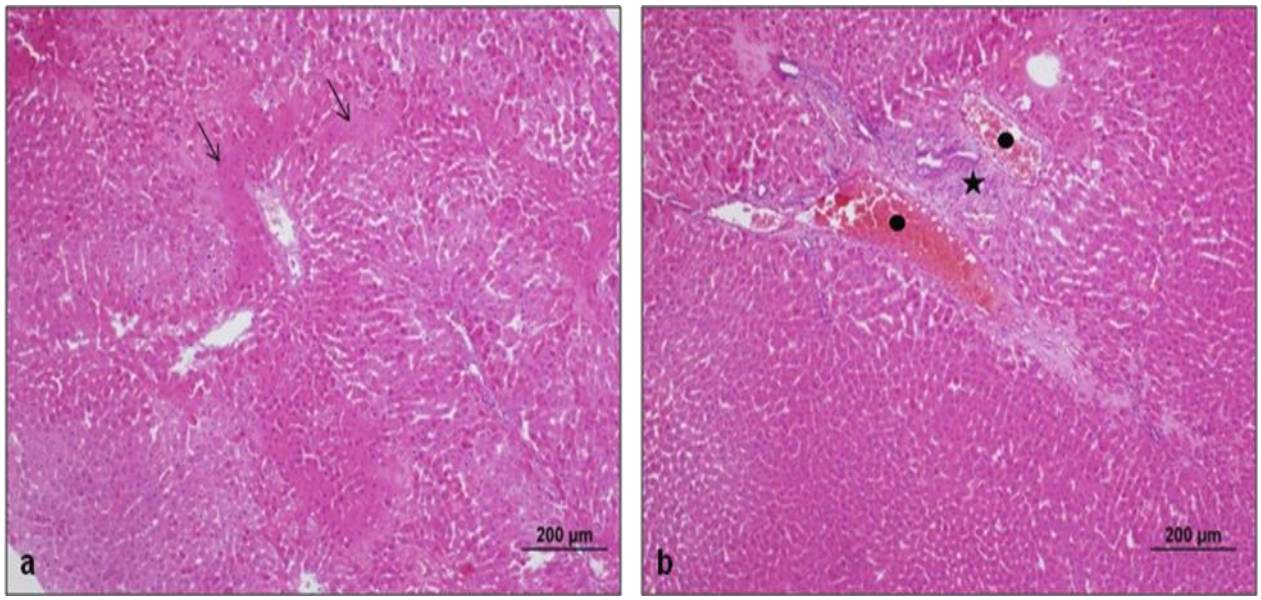
Şekil 4. 1 Kontrol grubu

Kontrol (K) grubu: Hepatosit hücreleri, sinüzoidal yapıları ve portal alan yapıları ile normal histolojik yapıdaki karaciğer (a,b) (v: vena sentralis, (scale bar:200µm (X10), scale bar:50.0µm (X40), HE).



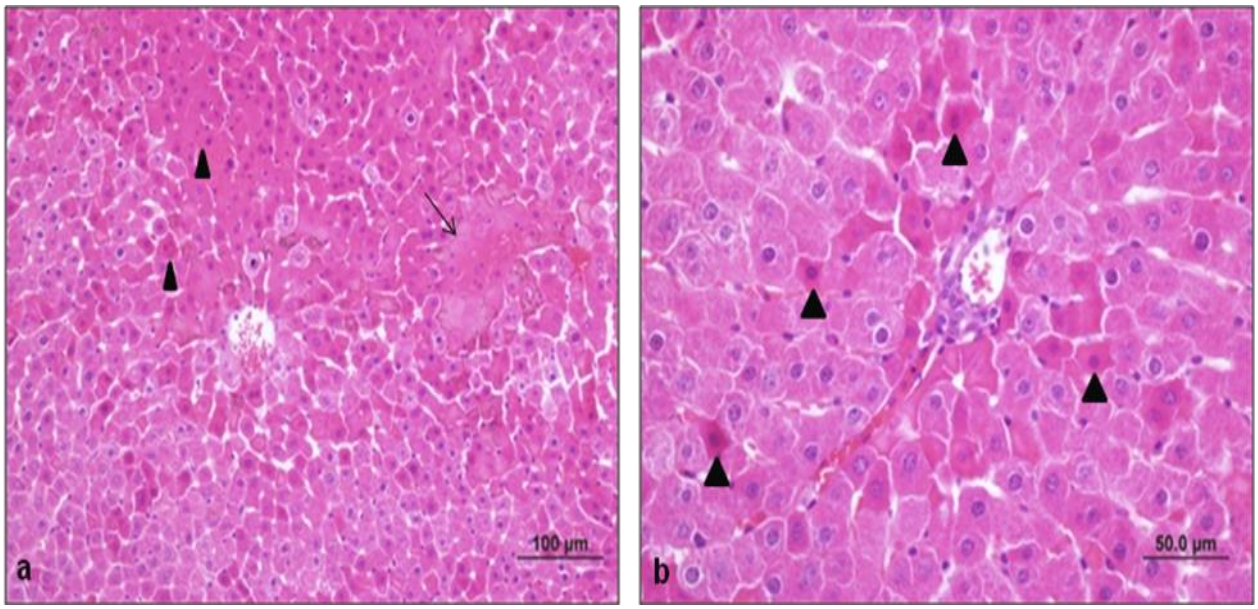
Şekil 4. 2 LA grubu

LA grubu: Hepatosit hücreleri, sinüzoidal yapıları ve portal alan (►) yapıları ile normal histolojik yapıdaki karaciğer (a,b) (v: vena sentralis, (scale bar:200µm (X10), scale bar:50.0µm (X40), HE).



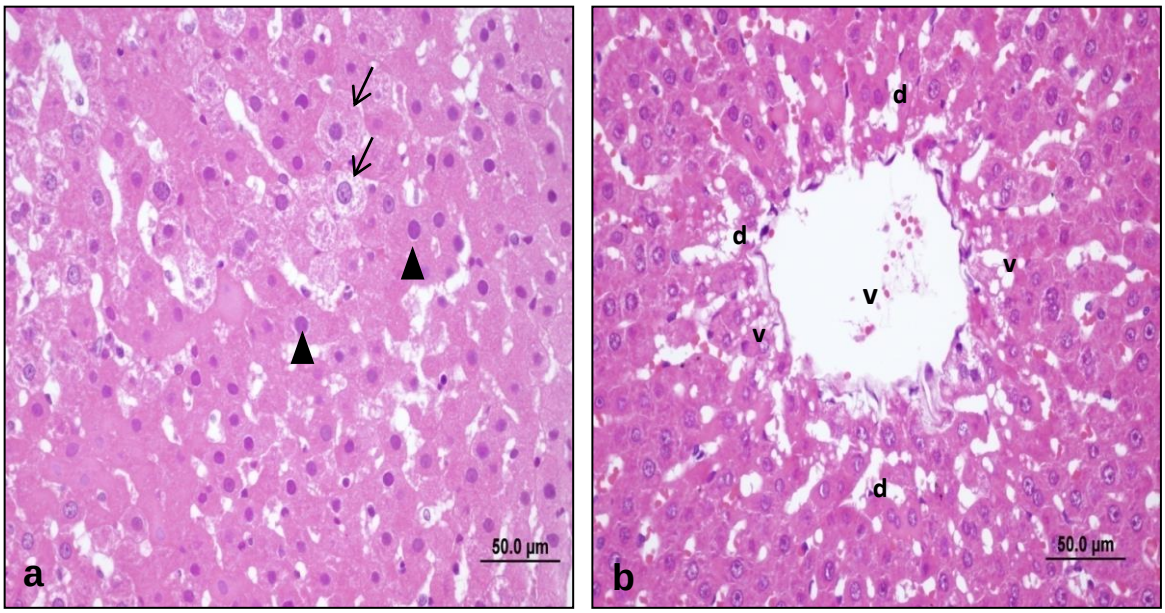
Şekil 4. 12 DF grubu

DF grubu: Karaciğerin ışık mikroskobik incelenmesinde farklı büyültmelerde karaciğerde yoğun hasar görülmekte. Parankim dokuda asimetrik hücresel dizilim, nekrotik hücre odakları (→) ve portal alanda hücresel infiltrasyon (*) ile vasküler kongesyon görülmekte (●) (a,b) (scale bar:200µm (X10).



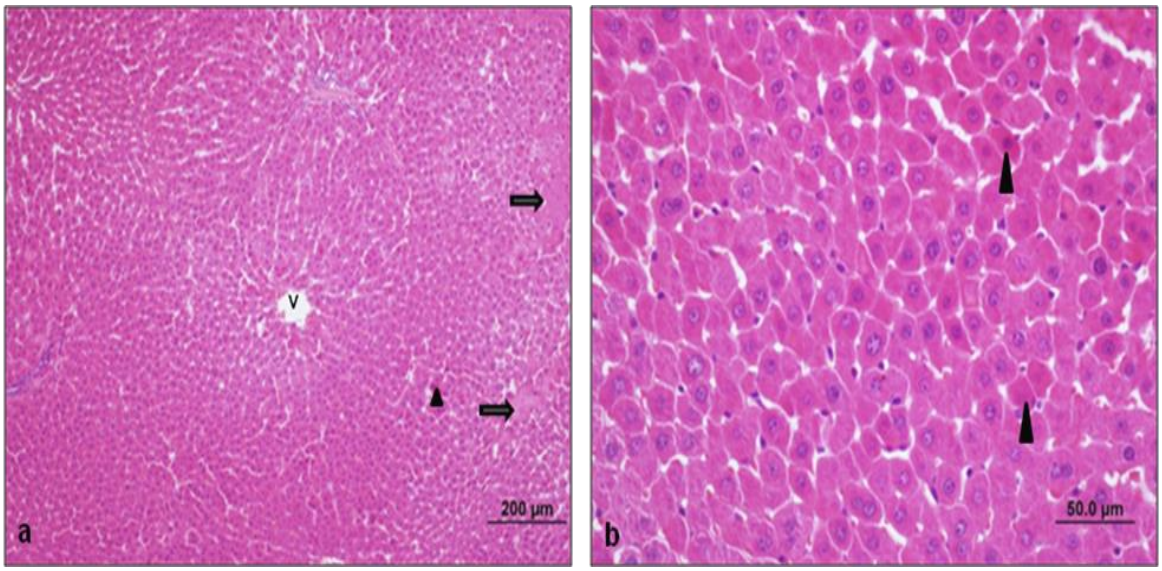
Şekil 4. 13 DF grubu

DF grubu: Karaciğerin ışık mikroskobik incelenmesinde farklı büyültmelerde karaciğerde yoğun hasar görülmekte. Parankim dokuda piknotik nükleuslu eozinofilik sitoplazmalı nekrotik hücreler (►) ve nekrotik hücre odakları (→) dikkat çekmekte (a,b), (scale bar:100µm (X20), scale bar:50.0µm (X40), HE).



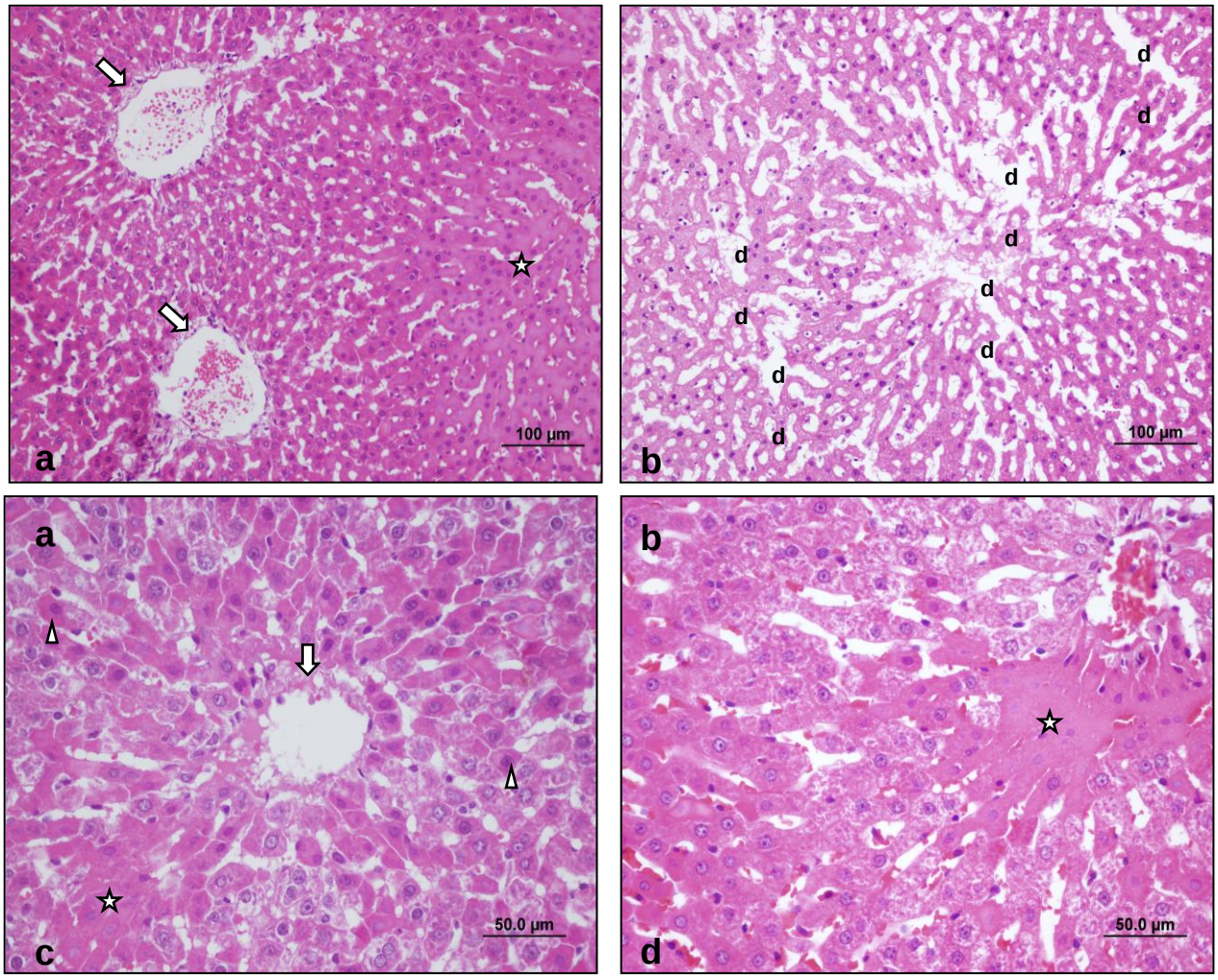
Şekil 4. 3 DF grubu

DF grubu: Karaciğerin ışık mikroskobik incelemesinde farklı büyültmelerde karaciğerde yoğun hasar görülmekte. Parankim dokuda asimetrik nükleuslu hücre yapıları (►) ve hipertrofik hücreler (→), perisantral hücrelerde vakuolizasyon (va) ve sinüzoidal dilatasyon (d) görülmekte (a,b), (v: vena sentralis), (scale bar:50.0µm (X40), HE).



Şekil 4. 4 LA+DF grubu

LA+DF grubu: Karaciğerin ışık mikroskobik incelemesinde farklı büyültmelerde karaciğerde az sayıda nekrotik hücre (►) ve azalmış nekrotik hücre odakları dışında (→), hepatosit hücreleri, sinüzoidal yapılar ve portal alan yapıları ile normale yakın histolojik yapıdaki karaciğer (a,b) (v: vena sentralis) (scale bar:200µm (X10), scale bar:50.0µm (X40), HE).



Şekil 4. 5 DF+LA grubu

DF+LA grubu: Karaciğerin ışık mikroskobik incelemesinde farklı büyültmelerde karaciğerde yoğun hasar görülmekte. Parankim dokuda perisantral vakuolizasyon (→), nekrotik hücre odakları (*), piknotik nükleuslu eozinofilik sitoplazmalı nekrotik hücreler (►) ve sinüzoidal dilatasyon (d) görülmekte (a-b), (scale bar:100µm (X20), scale bar:50.0µm (X40), HE).

Tablo 4.10 histolojik skorlama

	Hücresel Hasar	Nekrotik Hücre Odakları	Hücresel İnfiltrasyon	Sinüzoidal Dilatasyon	Kongesyon
K.1	1	0	0	1	0
K.2	0	0	0	0	0
K.3	1	0	1	0	0
K.4	0	0	0	0	0
K.5	0	0	0	0	0
K.6	0	0	0	0	0
K.7	1	0	0	0	0
K.8	0	0	0	0	0
LA.1	0	0	0	0	0
LA.2	1	0	1	0	0
LA.3	0	0	0	0	0
LA.4	0	0	0	1	0
LA.5	0	0	0	0	0
LA.6	1	0	0	0	0
LA.7	0	0	0	0	0
LA.8	0	0	1	0	0
DF.1	3	2	3	2	2
DF.2	3	2	3	2	3
DF.3	2	3	3	3	3
DF.4	2	2	2	2	3
DF.5	2	3	2	3	2
DF.6	3	3	3	2	2
DF.7	3	2	2	2	2
DF.8	3	2	2	2	2
LA+DF.1	1	0	1	0	0
LA+DF.2	1	0	1	0	1
LA+DF.3	0	1	1	1	0
LA+DF.4	1	0	0	1	0
LA+DF.5	1	0	1	0	0
LA+DF.6	0	1	0	0	0
LA+DF.7	0	0	0	0	1
LA+DF.8	3	1	1	0	0
DF+LA.1	2	2	2	2	3
DF+LA.2	2	2	2	2	2
DF+LA.3	3	2	3	2	2
DF+LA.4	2	3	2	2	3
DF+LA.5	2	2	2	3	2
DF+LA.6	2	2	3	2	2
DF+LA.7	2	2	2	2	2
DF+LA.8	3	2	2	2	2

Skorlamada;
Hasar yok 0
Az hasar 1
Orta hasar 2
Şiddetli hasar 3 olarak değerlendirilmiştir.

Histolojik bulgular

Histolojik görüntüleme ve skorlama tablosuna göre sonuçlarımız aşağıdaki gibidir:

K grubu: K grubuna ait deney hayvanlarından alınan karaciğer örneklerinin ışık mikroskobik değerlendirmelerinde parankim dokusu hepatosit hücreleri, sinüzoidal yapıları ve portal alan yapıları ile normal histolojik yapıda gözlendi.

LA grubu: LA grubuna ait deney hayvanlarından alınan karaciğer örneklerinin ışık mikroskobik değerlendirmelerinde parankim dokusu hepatosit hücreleri, sinüzoidal yapıları ve portal alan yapıları ile normal histolojik yapıda gözlendi.

DF grubu: DF grubuna ait deney hayvanlarından alınan karaciğer örneklerinin ışık mikroskobik değerlendirmelerinde karaciğerde yoğun hasar görüldü. Parankim dokuda asimetrik hücresel dizilim, nekrotik hücre odakları ve portal alanda hücresel infiltrasyon ile vasküler kongesyon görüldü. Ayrıca parankim dokuda piknotik nükleuslu eozinofilik sitoplazmalı nekrotik hücreler, asimetrik nükleuslu hücre yapıları, hipertrofik hücreler, perisantral hücrelerde vakuolizasyon ve sinüzoidal dilatasyon dikkat çekti.

LA+DF grubu: LA+DF grubuna ait deney hayvanlarından alınan karaciğer örneklerinin ışık mikroskobik değerlendirmelerinde DF grubuna oranla azalmış hasar dikkat çekti. Bununla birlikte az sayıda nekrotik hücre ve kısmi nekrotik hücre odakları görüldü. Karaciğer genel olarak değerlendirildiğinde karaciğer yapısının korunduğu gözlendi.

DF+LA grubu: DF+LA grubuna ait deney hayvanlarından alınan karaciğer örneklerinin ışık mikroskobik değerlendirmelerinde DF grubuna oranla daha az olmakla birlikte yine de hasarın devam ettiği görüldü. Parankim dokuda perisantral vakuolizasyon, nekrotik hücre odakları, piknotik nükleuslu eozinofilik sitoplazmalı nekrotik hücreler ve sinüzoidal dilatasyon dikkat çekti.

5- TARTIŞMA

Karaciğer sindirim yoluyla alınan tüm maddelerin vücuda giriş kapısıdır. Alınan maddelerin biyotransformasyonları da burada gerçekleştiğinden, karaciğerin potansiyel toksik maddelere maruziyet riski oldukça fazladır. Yapılan çalışmalarda, ilaç kaynaklı karaciğer hasarının (İKKH) yaygın olarak görüldüğü belirtilmiş ve İKKH'nin karaciğer yetmezliğinin ve dolayısıyla karaciğer nakillerinin ana nedeni olduğu rapor edilmiştir (Amin & Hamza, 2005; Lee, 2003; Russmann, Kullak-Ublick, & Grattagliano, 2009).

İKKH vakalarının çoğunda söz konusu ilacın bırakılması ve genel destek tedavisi uygulanmasının dışında etkili bir tedavi protokolü bulunmamaktadır; çünkü ilaç kaynaklı hepatotoksisite tek bir hastalık olarak düşünülememektedir. Bu durum, bazı hepatotoksisite vakalarının öngörülebilir olmasının yanında, bazılarının ise idiyosenkratik doğaları nedeniyle karakteristik bir hasar modeli oluşturmasından kaynaklanmaktadır. Çoğunlukla genetik özellikler nedeniyle olmakla beraber altta yatan hastalıklar, beslenme statüsü, polimedikasyon, hücresel stres veya enfeksiyon gibi faktörler sebebiyle duyarlılık gelişen bazı bireylerde meydana gelen özgün bir mekanizmaya sahip öngörülemeyen toksisiteye idiyosenkratik toksisite denilmektedir (Navarro & Senior, 2006).

Diklofenak, 1973 yılında geliştirilmiş olan analjezik, antiinflamatuvar, antipiretik bir fenilasetik asit türevi olup; nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar sınıfındandır. Diklofenak romatoid artrid, ankilosan spondilit, rejeneratif eklem hastalıkları gibi inflamatuvar hastalıkların tedavisinde ve minör cerrahi girişimler, travma, dismenore, migren gibi durumlardan kaynaklı ağrının kontrolünde kullanılmaktadır (Baravalia vd., 2011; Brogden vd., 1980).

Diklofenak, diğer nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar gibi duyarlı bireylerde idiyosenkratik hepatotoksisiteye yol açmaktadır. Diklofenak kaynaklı ciddi hepatotoksisite vaka yüzdesinin düşük olmasına karşın, dünyada en çok reçete edilen nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlardan biri olduğu göz önüne alındığında yüksek sayıda hepatik vakanın var olduğu anlaşılmaktadır (Altman vd., 2015; Food & Administration, 2014).

Diklofenak kaynaklı hepatotoksisite mekanizması henüz aydınlatılamamış olup, yapılan in vivo ve in vitro çalışmalar 4'-OH diklofenak ve 5-OH diklofenak metabolitlerinin sekonder oksidasyonu sonucu meydana gelen benzokinoniminlerin toksisitede rol oynadığına dair güçlü kanıtlar sunmuşlardır. Benzokinoniminler, tiyol-reaktif elektrofilik gruplar olup, esansiyel proteinlerin tiyol veya amin gruplarının alkilasyonuna neden olabilmektedir. Bu reaktif ara ürünlerin detoksifikasyonu sürecinde yer alan glutatyon (GSH) ile konjugasyonları sonucunda hücresel GSH rezervuarlarının tükenmesi nedeniyle savunmasız hale gelen esansiyel proteinlerin kovalent modifikasyonları, çeşitli hücre içi fonksiyonel bozukluklara neden olabilmektedir. Ayrıca benzokinoniminler, redoks siklusuna girerek hidrojen peroksidin (H_2O_2) sitotoksik düzeylere ulaşmasına ve akabinde hidroksil ($OH^{\cdot}$)

radikallerinin oluşumuna yol açarak, prooksidan antioksidan dengesinin bozulmasıyla oksidatif strese neden olmaktadır(Boelsterli, 2003; Cantoni vd., 2003; Tang, Stearns, Bandiera, Zhang, Raab, Braun, Dean, Pang, Leung, ve Doss, 1999).

Elektrofilik benzokinoniminlerin GSH ile konjugasyonları sonucu hücresel GSH havuzlarının tükenmesiyle ivme kazanan önemli hücresel proteinlerin kovalent modifikasyonlarının ve yine benzokinoniminlerin redoks siklusu sonucu oluşturduğu oksidatif stresin yol açtığı hasarın, hepatoselüler nekroza neden olan sinyalizasyon yolaklarını aktive ettiği düşünülmektedir (Boelsterli, 2003; O'brien, 1991; Powis, 1987).

Lipoik asit, etkili bir doğal antioksidan olup; süperoksit anyonu ($O_{2^{\cdot}}^{-}$), $OH^{\cdot}$ ve peroksit radikali ($O_{2^{\cdot}}^{-2}$) gibi çeşitli reaktif oksijen türlerini temizleme, metal iyonlarıyla şelat oluşturma, endojen ve eksojen antioksidanların rejenerasyonlarını sağlama özelliklerine sahiptir. Lipoik asidin bilinen antioksidan aktivitesine ek olarak, sinyal iletimi sürecinde de önemli rol oynarak doku hasarının önlenmesinde etkili olduğu belirtilmektedir(Moini vd., 2002; Shay vd., 2009).

Moringa oleifera, Curcuma longa, Woodfordia fruticosa gibi bazı bitki ekstraktlarının antioksidan özelliklerinin diklofenak maruziyeti sonucu oluşan hepatotoksisiteye karşı iyileştirici ve koruyucu etkileri çalışılmış olup; çalışmamızda, özgün olarak diklofenak kaynaklı akut karaciğer hasarına karşı lipoik asidin koruyucu ve tedavi edici etkisi incelenmiştir (Baravalia vd., 2011; Hamza, 2007).

Karaciğer hasarının önemli parametreleri olan aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), alkalen fosfataz (ALP), total bilirubin (T.Bil) ve direkt bilirubin (D.bil) karaciğer hastalığının teşhisi, seyri ve tedaviye yanıtı hakkında bilgi veren önemli rutin karaciğer testlerindendir (Özçelik, 2012; Tolman ve Rej, 2005). Mevcut çalışmamızda da, diklofenak nedeniyle gelişen karaciğer hasarını değerlendirmek için AST, ALT, ALP , T.Bil ve D.Bil parametreleri kullanılmıştır.

AST enzimi (E.C 2.6.1.1) kalpte, karaciğerde, iskelet kasında, böbreklerde ve alyuvarlarda bulunurken; ALT (E.C 2.6.1.2) başlıca karaciğerde olmak üzere, iskelet kasında ve böbreklerde de düşük konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Transaminazlar hepatositlerde yüksek miktarda bulunduklarından, ilaç kaynaklı hepatotoksisite, akut hepatitis, siroz, akut ve kronik karaciğer yetmezliği gibi karaciğer hastalıklarında hasarlı hepatositlerden kana sızarak plazma aktivitelerinde artışa neden olurlar (Giannini, Testa, & Savarino, 2005).

ALP enzimi (E.C 3.1.3.1) hemen hemen tüm dokularda bulunmakla birlikte özellikle barsak epitelinde, böbrek tübüllerinde, kemikte (osteoblastlarda), karaciğerde ve plasentada yüksek konsantrasyonlara ulaşmaktadır. Hepatit ve siroz gibi hepatoselüler hasarı içeren karaciğer hastalıklarında hasarlı hücrelerden kana sızması nedeniyle serum ALP enzim

aktivitelerinde hafif yükselmeler görülebilmektedir (Giannini vd., 2005; Özerol, 2017; Tolman ve Rej, 2005).

Çalışmamızda, serum AST ve ALT aktiviteleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde DF grubunda kontrol grubuna göre belirgin bir artış görülmektedir. Serum ALP enzim aktivitelerinde ise, DF grubunda kontrol grubuna göre artış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Amin ve arkadaşlarının yaptıkları deneysel bir çalışmada, sıçanlara intraperitonal olarak 200mg/kg tek doz diklofenak uygulanmasından 24 saat sonra ölçülen AST ve ALT aktivitelerinde anlamlı yükselmelerin gözlendiği rapor edilmiştir(Amin & Hamza, 2005).

Baravalia ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği deneysel bir çalışmada 50mg/kg diklofenak uygulanması sonucu serum AST, ALT ve ALP aktivitelerinde belirgin yükselmelerin gözlendiği belirtilmiş ve mevcut veriler histolojik bulgularla birlikte ele alınıp karaciğer hasarının geliştiği sonucuna varılmıştır (Baravalia vd., 2011).

Karaciğer hasar belirteçleri olan AST, ALT aktivitelerinde artış ve nekrozu içeren histolojik bulgularımız varlığında çalışmamızda, tek doz 200mg/kg diklofenak uygulanmasıyla literatürde de belirtildiği gibi karaciğer hasarının meydana geldiğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda LA+DF grubu serum AST, ALT ve ALP aktivitelerinde, kontrol grubu düzeylerine ulaşılamamakla birlikte; DF grubuna göre anlamlı düşüşler gözlenmiştir.

Abdel-Zaher ve arkadaşları, bir çalışmalarında sıçanlara 7 gün boyunca 750mg/kg parasetamol uygulayarak hepatotoksisite modeli oluşturmuş ve toksisite sonucu serum AST, ALT, ALP aktiviteleriyle serum bilirubin düzeylerinde artış gözlemişlerdir. Çalışmada tedavi amacıyla 7 gün boyunca parasetamol ile eş zamanlı olarak 25mg/kg/gün lipoik asit uygulanmıştır. Deney sonucunda, tedavi grubunda parasetamol grubuna göre serum AST, ALT ve ALP aktivitelerinde ve bilirubin düzeylerinde anlamlı azalmalar görüldüğü rapor edilmiştir. Böylelikle lipoik asidin (25mg/kg) parasetamol indüklü karaciğer hasarına karşı tedavi edici etkisinin bulunduğu belirtilmiştir (Abdel-Zaher, Abdel-Hady, Mahmoud, & Farrag, 2008).

Fei ve arkadaşları, bir çalışmalarında oluşturdukları Concanavalin A kullanımının neden olduğu hepatotoksisite modeline karşı lipoik asidin koruyucu etkisini araştırmak amacıyla farelere 4 gün boyunca lipoik asit ön tedavisi uygulamışlardır. Çalışma sonucunda, lipoik asit ön tedavi grubu AST ve ALT enzim aktivitelerinin toksin grubuna göre önemli düzeyde azaldığını belirtmişlerdir. Böylelikle, lipoik asidin Concanavalin A kaynaklı karaciğer hasarına karşı koruyucu bir ajan olarak kullanılabileceği sonucuna ulaşmışlardır. (Fei vd., 2016).

Mevcut biyokimyasal ve histolojik sonuçlardan yola çıkarak, LA+DF grubunda lipoik asit ön tedavisinin diklofenak kaynaklı hepatotoksisiteye karşı koruyucu etkisinin olduğunu düşünmekteyiz.

DF+LA grubu serum AST ve ALT aktiviteleri kontrol düzeylerine ulaşamamış; fakat DF grubu serum AST ve ALT aktivitelerine göre anlamlı şekilde azalmıştır. ALP aktiviteleri ile kontrol grubu ve DF grubu ALP enzim aktiviteleri arasında bir fark gözlenmemiştir.

Al-Ghamdi ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada, CCl_4–indüklü karaciğer hasarı modelinde, serum AST ve ALT düzeylerinin kontrol grubuna göre azaldığı rapor edilmiştir. Karaciğer hasarı varlığında gerçekleşen bu azalmanın, hasarın yoğunluğu sonucu enzim sentezinin bozulmasından kaynaklandığı belirtilmiştir (Al-Ghamdi, 2003).

Elde ettiğimiz verileri, mevcut histolojik bulgularla değerlendirdiğimizde DF+LA grubumuzda, DF uygulandıktan sonraki 4 gün boyunca yapılan lipoik asit tedavisinin dozu nedeniyle yetersiz kaldığını düşünmekteyiz. Bu grupta yeterli iyileşme görülmemesi nedeniyle hasarın ileriki süreçteki etkisi de gözlenmiştir. Bu süreç zarfında, diklofenak toksisitesi sonucu meydana gelen hasarın hepatositlerin sentez fonksiyonunu da olumsuz etkilemesi nedeniyle serum AST ve ALT enzim aktivitelerinde düşüş yaşanmış olabilir.

Bilirubin, hemoglobinin retikuloendotelyal sistemle katabolizması sonucu oluşan bir üründür. Karaciğerde bilirubinin glukronik asitle konjugasyonu gerçekleşmekte ve daha sonra konjuge bilirubinin safraya atılımı sağlanmaktadır (Giannini vd., 2005; Tolman ve Rej, 2005).

Çalışmamızda, DF grubu serum T.Bil ve D.Bil seviyelerinin kontrol grubuna göre önemli düzeyde arttığı gözlenmiştir. LA+DF grubu serum T.Bil ve D.Bil düzeyleri kontrol grubu düzeylerine erişememekle birlikte; DF grubuna göre önemli düzeyde azalmıştır. DF+LA grubu T. ve D. Bil seviyelerinde ise DF grubuna göre önemli düzeyde artış görülmüştür.

Banks ve arkadaşlarının derlediği bir çalışmada yer alan diklofenak kaynaklı hepatotoksisite vakalarında, diklofenak alan hastaların AST, ALT, ALP aktivitelerinde ve serum total bilirubin düzeylerinde anlamlı artışlar olduğu kaydedilmiştir (Banks, Zimmerman, Ishak, & Harter, 1995).

Giridharan ve arkadaşları, sıçanlara 2 gün boyunca diklofenak (50mg/kg/gün) uyguladıklarında, bu grubun serum T.Bil ve D.Bil düzeylerinde kontrol grubuna göre belirgin artışlar gözlemlemişlerdir. Bunun yanında diklofenak grubu serum AST, ALT ve ALP aktivitelerinde de görülen anlamlı artışlar sonucunda, diklofenak kaynaklı karaciğer hasarının varlığından söz edilmiştir (Giridharan ve Sabina, 2017).

İlaç advers reaksiyonları, genellikle akut hepatosellüler hasar ile ilişkili olarak serum transaminazların yükselmesi, serum ALP düzeylerinde hafif yükselme ve değişken sarılık şeklinde görülmektedir(Kaplowitz, 2005).

Çalışmamızda diklofenak kaynaklı karaciğer hasarı, serum transaminaz aktivitelerinde belirgin yükselmeleri ve hiperbilirubinemiyi içeren bir tablo oluşturmuştur. Bu nedenle, meydana gelen hepatotoksisitenin hepatoselüler hasar kaynaklı olduğunu düşünmekteyiz.

Bulgularımız doğrultusunda, DF grubunda oluşan hepatik hasar sonucunda konjuge bilirubinin safraya atılımının gerçekleştirilememesi nedeniyle direkt ve total bilirubin seviyelerinde artış meydana gelmiş olabilir.

Armağan ve arkadaşlarının metotreksat kaynaklı oksidatif stresin neden olduğu karaciğer hasarını inceledikleri bir çalışmalarında hepatotoksisite sonucu yükselen D.Bil düzeylerinin, metotreksat uygulanmasından 4 gün önce başlanan ve tek doz metotreksat uygulanmasıyla 6 gün daha sürdürülen 100mg/kg/gün lipoik asit tedavisinin sonucunda düştüğünü rapor etmişlerdir (Armagan vd., 2015).

LA+DF grubumuzda serum T.Bil ve D.Bil düzeylerinin DF grubuna göre önemli düzeyde azalması, lipoik asit ön tedavisinin toksisitenin hafiflemesini sağladığının diğer bir göstergesi olabilir.

DF+LA grubumuzda oluşan karaciğer hasarının geri döndürülmesinde LA dozunun yetersiz kaldığını, bu sebeple hepatositlerin birçok enzimi sentezleyemediği gibi, bilirubin metabolizmasına dair görevlerini de gerçekleştiremediğini düşünmekteyiz.

Glutatyon, organizmayı reaktif oksijen türlerine karşı savunmada önemli rol oynayan etkili bir endojen antioksidandır. Hepatotoksisiteye yol açtığı düşünülen diklofenak metaboliti p-benzokinoniminler, glutatyonla konjugasyona uğrayarak etkisiz hale getirilebilmektedir. İdiyosenkratik toksisitenin doğası gereği, genetik veya epigenetik faktörler nedeniyle aktif benzokinonimin metabolitlerinde artış meydana gelebilmekte ve artan aktif metabolitlerin GSH ile konjugasyonu sonucu karaciğer GSH depolarının tükenmesi, önemli hücresel makromoleküllerin aktif metabolitlere ve bu metabolitlerin meydana getirdiği reaktif oksijen türlerine karşı savunmasız kalmasına sebep olmaktadır. Bu nedenle hücre içi GSH düzeyleri, diklofenak kaynaklı karaciğer hasarının gelişmesinde veya önlenmesinde önemli bir role sahiptir (Boelsterli, 2003; Powis, 1987; Tang, Stearns, Bandiera, Zhang, Raab, Braun, Dean, Pang, Leung, Doss, vd., 1999).

Giridharan ve arkadaşlarının diklofenak toksisitesi (50mg/kg) üzerine yaptıkları deneysel bir çalışmada hepatik GSH düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı rapor edilmiştir (Giridharan ve Sabina, 2017).

Baravalia ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada ise, toplamda 5 günlük deney protokolünde iki gün süreyle sıçanlara 50mg/kg diklofenak uygulanmış ve çalışma sonunda karaciğer GSH düzeylerinin azaldığı gözlenmiştir(Baravalia vd., 2011).

Çalışmamızda da literatürle uyumlu bir şekilde, DF grubu hepatik GSH düzeyleri, kontrol ve LA gruplarına göre anlamlı düzeyde azalmıştır (Baravalia vd., 2011; Giridharan ve Sabina, 2017). Diklofenak metabolizmasının toksik metabolitleri olan benzokinoniminlerin GSH ile konjugasyonu sonucu DF grubu hepatik GSH düzeyleri azalmış olabilir.

Çalışmamızda LA grubunda, kontrol grubuna göre GSH seviyeleri istatiksel olarak anlamlı bir artış göstermektedir. Yine koruyucu olarak lipoik asit uygulanan LA+DF hepatik GSH düzeyleri, DF grubuna göre anlamlı artış

göstererek kontrol grubundan daha yüksek seviyelere ulaşmıştır. DF+LA grubu GSH düzeyleri DF grubuna göre artış göstermiş ve kontrol grubu GSH düzeylerine ulaşmıştır. Koruyucu etkinin araştırıldığı LA+DF hepatik GSH düzeyleri ile tedavi edici etkinin araştırıldığı DF+LA grubu GSH düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Han ve arkadaşlarının yaptığı deneysel bir çalışmada, insan ve sıçan hücre hatları lipoik asit ile muamele edilmiş ve çalışmanın sonucunda GSH düzeylerinin önemli düzeyde arttığı belirtilmiştir. Bu çalışmada, lipoik asidin metabolik redüksiyonu ile oluşan dihidrolipoik asidin sistinin sisteine dönüşümünü sağlayarak GSH sentezini indüklediği öne sürülmüştür (Han vd., 1997).

Shila ve arkadaşları, yapmış oldukları bir çalışmada sıçan beyninde oluşturdukları arsenik toksisitesi üzerine lipoik asidin tedavi edici etkisini incelemişlerdir. Deney sonucunda, arsenik maruziyeti nedeniyle azalan GSH düzeylerinin lipoik asit uygulamasıyla iyileştirildiği gözlenmiştir. Bu çalışmada, lipoik asidin antioksidan özelliği nedeniyle glutatyona alternatif sülfidril nükleofili gibi davranıp reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonunu sağlayarak ve glutatyonun oksidasyonunu engelleyerek düzeylerini koruduğu öne sürülmüştür (Shila, Subathra, Devi, ve Panneerselvam, 2005).

Elde ettiğimiz sonuçlara göre LA, LA+DF ve DF+LA gruplarında lipoik asit alınımının hepatik GSH sentezini indüklediğini düşünmekteyiz.

Hepatik GSH düzeylerinin artışıyla, oksidatif strese yol açan diklofenak metabolitleri olan benzokinoniminler, S-glutatyonilasyon reaksiyonuyla toksik özellik göstermeyen üriner metabolit olan merkaptürik asit bileşiklerine dönüşmüş ve böylelikle, serbest kinonimin metabolitlerinin azalmasıyla karaciğer hasarı hafiflemiş olabilir.

Lipidler, oksidatif stres için önemli hedef biyomoleküllerdir. MDA lipid peroksidasyonunun son ürünü olup; bilimsel alanda oksidatif stres belirteci olarak dünya çapında kabul görmüştür. MDA düzeylerindeki artış, toplam antioksidan kapasitenin düşmesi ve reaktif oksijen türlerinin oluşumunda artış ile karakterize oksidatif stresin bir sonucudur (Del Rio, Stewart, & Pellegrini, 2005; Hamza, 2007).

Alqasoumi ve arkadaşları ile Hamza ve arkadaşlarının yaptıkları deneysel çalışmalarda, toksin kontrol grubundaki sıçanlara tek doz 150mg/kg diklofenak verilmiş ve 24 saat sonunda hepatik MDA düzeylerinin kontrol düzeylerine göre anlamlı bir şekilde yüksek olduğu belirtilmiştir (Alqasoumi, Yusufoglu, Farraj, & Alam, 2011; Hamza, 2007).

Çalışmamızda, DF grubu hepatik MDA düzeylerinde, kontrol grubuna göre belirgin artışlar gözlenmiştir. DF uygulamasıyla oluşan aktif metabolitler, redoks siklusuna girerek serbest radikal oluşumuna yol açmış olabilir. Ayrıca bu tiyol-reaktif metabolitlerin GSH ile konjugasyonları sonucu GSH seviyeleri azalmış ve prooksidan-antioksidan düzeyleri arasındaki dengenin bozulmasıyla oksidatif stres meydana gelmiş olabilir. Oksidatif

stresin lipid peroksidasyonunu indüklemesi sonucu DF grubu MDA düzeylerinin yükseldiğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda LA+DF grubu MDA düzeyleri DF grubuna göre belirgin bir şekilde azalmış; hatta kontrol grubu MDA düzeylerinden daha düşük seviyelere ulaşmıştır. DF+LA grubu MDA seviyeleri ise, kontrol grubuna göre belirgin bir artış göstermiş ve DF grubu MDA düzeyleriyle aralarında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Dadhania ve arkadaşlarının sıçanlara metotreksat uygulayarak oksidatif stres oluşturdukları deneysel çalışmada metotreksata karşı koruyucu olarak 25mg/kg lipoik asit uygulanan grubun MDA seviyelerinde, sadece metotreksat uygulanan gruba göre anlamlı seviyede düşüş gözlenmiştir (Dadhania, Tripathi, Vikram, Ramarao, & Jena, 2010).

Anandakumar ve arkadaşlarının adriamisin kaynaklı karaciğer hasarı üzerine yaptıkları bir çalışmada, lipoik asidin koruyucu etkisi araştırılmış ve adriamisin öncesi lipoik asit uygulanan gruplarda karaciğer hasarının ve paralel olarak doku MDA düzeylerinin önemli düzeyde azaldığı rapor edilmiştir. Lipoik asidin antioksidan özelliği sebebiyle serbest radikalleri süpürerek oksidatif stresi azalttığı ve böylelikle de MDA oluşumunu önemli düzeyde azalttığı belirtilmiştir (Anandakumar, Malarkodi, Sivaprasad, & Saravanan, 2007; Navari-Izzo, Quartacci, & Sgherri, 2002).

Çalışmamızda LA+DF grubu MDA düzeylerindeki azalma, lipoik asidin $O_2^{\cdot -}$, $OH^{\cdot}$ ve $O_2^{-2\cdot}$ radikallerini süpürücü etkisiyle ve vücutta bulunan diğer antioksidanların sentezini ve/veya rejenerasyonlarını arttırarak oksidatif stresi azaltmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Diğer taraftan, DF+LA grubunda meydana gelen MDA düzeylerindeki yükselmenin karaciğerde diklofenak maruziyeti sonucu gelişen yoğun hasarın üzerine lipoik asidin tedavi edici dozunun yetersiz kalmasından dolayı meydana geldiğini düşünmekteyiz.

Katalaz, hidrojen peroksidin su ve oksijene dismutasyonunu katalizleyerek oksidatif strese karşı savunma mekanizmasında önemli rol oynayan antioksidan enzimlerden biridir (Özerol, 2017).

Hamza ve arkadaşlarının sıçanlara tek doz diklofenak (150 mg/kg) uygulayarak gerçekleştirdikleri akut hepatik hasar modelinde, hepatik CAT aktivitelerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı bildirilmiştir. CAT aktivitelerinde yaşanan bu düşüşün, diklofenak maruziyetiyle gelişen oksidatif stresin antioksidan kapasiteyi azaltması dolayısıyla gerçekleştiği belirtilmiştir (Hamza, 2007).

Huang ve arkadaşlarının farelere 14 gün boyunca 50mg/kg diklofenak uygulayarak karaciğer hasarı oluşturdukları deneysel çalışmalarında, sadece diklofenak uygulanan grupta hepatik katalaz aktivitesinin düştüğü rapor edilmiştir. Katalaz aktivitesindeki düşüşün, reaktif oksijen türlerindeki artış sonucunda meydana geldiği öne sürülmüştür (Huang vd., 2016).

Çalışmamızda, DF grubunda kontrol grubuna göre CAT aktivitelerinde istatiksel olarak anlamlı bir düşüş görülmüştür. CAT aktivitelerindeki bu

azalma, yüksek düzeylere ulaşan benzokinoniminlerin direkt etkisiyle ve/veya akabinde gerçekleşen redüksiyonları sonucu meydana gelen reaktif oksijen türlerinin enzimlerin inaktivasyonuna yol açmasından kaynaklanmış olabilir.

Çalışmamızda, lipoik asit ön tedavisinin gerçekleştiği LA+DF grubu CAT aktivitelerinde, diklofenak uygulanması sonucu kontrol grubundaki normal CAT aktivite seviyelerine göre istatistiksel bir değişiklik gözlenmemiştir.

Saad ve arkadaşları, sıçanlara izoniazid ve rifampisin uygulayarak oluşturdukları karaciğer hasarına karşı lipoik asidin (20mg/kg i.p) tedavi edici etkisini araştırmışlardır. Deney sonucunda lipoik asit ile tedavi edilen sıçanların hepatik katalaz aktivitelerinin sadece izoniazid ve rifampisin uygulanan gruba göre anlamlı şekilde yükseldiği rapor edilmiştir (Saad, El-Gowilly, Sherhaa, & Bistawroos, 2010).

Lipoik asidin reaktif oksijen türlerini temizlemesi ve GSH sentezini indüklemesi sonucu oksidatif stresin azalmasıyla LA+DF grubunda önemli bir antioksidan enzim olan CAT enziminin aktivitesi korunmuş olabilir.

Çalışmamızda DF+LA grubu CAT aktiviteleri, kontrol grubu CAT aktivitelerine göre olduğu gibi; DF grubu CAT aktivitelerine göre de belirgin bir şekilde düşük bulunmuştur. DF+LA grubu CAT aktivitelerinde meydana gelen bu düşüş, diklofenak kaynaklı hepatoselüler hasarın indüklenmesinden 24 saat sonra başlanan lipoik asit tedavi dozunun yetersiz olması ve/veya zamanlaması nedeniyle etkili bir tedavinin gerçekleşmemesinden kaynaklanmış olabilir. Ayrıca bu grupta diklofenak uygulanmasının ardından 120 saat sonra gerçekleşen sakrifikasyon sonrasında ölçüm alındığından, hasarın uzun dönem etkileri sonucu CAT aktivitelerindeki azalma DF grubuna göre istatistiksel açıdan daha belirgin hale gelmiş olabilir.

Homosistein, karaciğerde transsülfürasyon yolağı ile GSH sentezini gerçekleştirip, mevcut hepatik GSH havuzunun %50'sini sağlayarak antioksidan savunma sistemine önemli katkı sağlamaktadır (Vitvitsky vd., 2003).

Çalışmamızda, DF grubu homosistein düzeylerinin, kontrol grubu homosistein düzeylerine göre azaldığı gözlenmiştir.

James ve arkadaşları, gerçekleştirdikleri klinik bir çalışma sonucunda otizmli bireylerde oksidatif stres sonucu S-adenozil homosistein hidrolaz enziminin adenozin birikimiyle aktivitesinin azaldığını ve bu nedenle homosistein sentezinin dolayısıyla da serum homosistein düzeylerinin azaldığını rapor etmişlerdir (James vd., 2004).

DF grubunda meydana gelen belirgin oksidatif stres nedeniyle S-adenozil homosistein hidrolaz enziminin inaktivasyonuyla homosistein sentezinin azalması sonucu hepatik homosistein seviyeleri azalmış olabilir.

Çalışmamızda LA, LA+DF ve DF+LA gruplarında homosistein düzeyleri, kontrol grubu homosistein düzeylerine göre anlamlı bir düşüş göstermektedir. Yine LA+DF ve DF+LA grubu homosistein düzeyleri, DF grubuyla karşılaştırıldığında belirgin bir düşüş göstermektedir. LA+DF ve

DF+LA grubu homosistein düzeyleri arasında ise, istatiksel olarak bir fark gözlenmemiştir.

Mosharov ve arkadaşlarının insan hepatoma hücre hattı üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmada, prooksidan varlığında homosisteinden transsülfürasyon yolağıyla glutatyon sentezinde ve GSH seviyelerinde anlamlı bir artışın olduğu rapor edilmiştir (Mosharov, Cranford, & Banerjee, 2000).

Vitvitsky ve arkadaşlarının insan karaciğer hücre hattında gerçekleştirdikleri bir çalışmada, karaciğerde glutatyon sentezinin yaklaşık %50'sinin sağlandığı transsülfürasyon yolağı aracılı homosisteinden glutatyon oluşumunun redoks reaksiyonlarından etkilendiği savı desteklenmiştir. Bu yolakta prooksidanların glutatyon sentezini arttırdığı savunulmaktadır (Vitvitsky vd., 2003).

Lipoik asidin antioksidan özelliğinin yanında prooksidan özelliğinin bulunduğu ve böylelikle glutatyon sentezini indüklediği yapılan çalışmalar tarafından belirtilmektedir (Moini vd., 2002; Shay vd., 2009).

Kontrol ve DF gruplarına göre, LA ve LA+DF grubu homosistein düzeylerindeki düşüşün ve GSH düzeylerindeki artışın, lipoik asidin antioksidan aktivitesi esnasında meydana getirdiği tiyil radikalleriyle bağlantılı olduğunu düşünmekteyiz. Tiyil radikallerinin tiyollere redüksiyonunun sağlanmasıyla hücre içi redoks durumu değişmiş olabilir. Bu durum sonucunda, reaktif oksijen türleri sinyalizasyon kaskadının uyarılmasıyla redoks değişimlere duyarlı transmetilasyon yolağı enzimlerinden metiyonin sentazın (MS) inhibisyonu gerçekleşirken, transsülfürasyon yolağı enzimlerinden sistatyonin beta sentazın (CBS) indüklenmesi sonucu transsülfürasyon yolağı aracılı homosisteinden sistein oluşumu artmış ve sistein kullanımının artmasıyla GSH sentezi ivme kazanmış olabilir.

DF+LA grubunda, belirgin oksidatif stres varlığında S-adenozil homosistein hidrolaz enziminin inhibisyonu sonucu homosistein sentezi azalmış olabilir. Bu grupta da lipoik asit alımı sonucu oluşan tiyil radikallerinin sinyalizasyon kaskadını uyarmasıyla homosisteinden transsülfürasyon yolağı aracılı sistein sentezinde ve dolayısıyla GSH sentezinde artış meydana gelmiş olabilir. GSH seviyelerinde, DF grubu GSH seviyelerine göre gerçekleşen yükselmenin oluşan hasarı geri döndürmede yetersiz kaldığını, bu nedenle de histolojik ve biyokimyasal olarak LA+DF grubunda gözlenen iyileşme kadar etki sağlanamadığını düşünmekteyiz.

Histolojik bulgularımıza göre, DF grubunda karaciğerde yoğun hasar görüldü. Parankim dokuda asimetrik hücresel dizilim, nekrotik hücre odakları ve portal alanda hücresel infiltrasyon ile vasküler kongesyon görüldü. Ayrıca parankim dokuda piknotik nükleuslu eozinofilik sitoplazmalı nekrotik hücreler, asimetrik nükleuslu hücre yapıları, hipertrofik hücreler, perisantral hücrelerde vakuolizasyon ve sinüzoidal dilatasyon dikkat çekti. Elde ettiğimiz histolojik bulgular, diklofenağın karaciğer üzerinde toksik etkilerinin olduğunu desteklemektedir.

LA+DF grubunda hücre hasarı bulguları, DF grubuna göre değerlendirildiğinde önemli düzeyde azalma gözlenmiştir. Kontrol grubuna göre ise, az sayıda nekrotik hücre gözlemlenmiş olup; hücresel dejenerasyonun kısmi oluşumu söz konusudur. LA+DF grubunun histolojik sonuçları biyokimyasal sonuçlarla paralel olarak, diklofenak kaynaklı karaciğer hasarı üzerinde lipoik asidin koruyucu etkisini destekler niteliktedir.

DF+LA grubunda hücre hasarı bulguları, DF grubuna göre değerlendirildiğinde parankim dokuda perisantral vakuolizasyon, nekrotik hücre odakları, piknotik nükleuslu eozinofilik sitoplazmalı nekrotik hücreler ve sinüzoidal dilatasyon görülmüş olup; DF grubuna göre azalmakla birlikte hasarın devam ettiği gözlemlenmiştir. DF+LA grubunun histolojik sonuçları biyokimyasal sonuçlarla paralel olarak, diklofenak kaynaklı karaciğer hasarı üzerinde lipoik asidin 25mg/kg/gün olarak uygulanan tedavi dozunun hasarı geri döndürmede yetersiz kaldığını göstermektedir.

Sonuçlarımız ve literatürler dahilinde, diklofenağın sitokrom P450 aracılığıyla gerçekleşen oksidatif metabolizması sonucu oluşan 4'-OH diklofenak ve 5-OH diklofenak metabolitlerinden benzokinonimin gibi reaktif bileşenler oluşmaktadır. Oluşan reaktif metabolitlerin, önemli endojen antioksidan olan GSH düzeylerini düşürerek ve redoks siklusuyla H_2O_2 , $O_{2^{\cdot}}^{-}$, $OH^{\cdot}$ gibi serbest radikallerin oluşumunu arttırarak oksidatif strese yol açtığı düşünülmektedir. Oksidatif stresin lipid peroksidasyonuna, enzimlerin inaktivasyonuna ve DNA hasarına yol açtığı bilinmektedir. Çalışmamızda da meydana gelen oksidatif stres, CAT gibi önemli antioksidan enzim aktivitelerinde azalmaya ve lipid peroksidasyonunu indükleyerek MDA düzeylerinde artışa neden olmuştur.

Elektrofilik benzokinoniminlerin GSH ile konjugasyonu sonucu, hücresel GSH havuzlarının tükenmesiyle ivme kazanan önemli hücresel proteinlerin kovalent modifikasyonlarının ve benzokinoniminlerin redoks siklusu sonucu meydana gelen reaktif oksijen türlerinin oluşturduğu oksidatif stresin hepatoselüler nekroza neden olan sinyalizasyon yolaklarının aktivasyonuna neden olduğu savı da biyokimyasal ve histolojik bulgularımızla örtüşmektedir.

Lipoik asit, antioksidan özelliğini gerçekleştirirken meydana getirdiği tiyil radikalleriyle hücresel antioksidan dengesini etkileyerek reaktif oksijen türleri sinyalizasyon kaskadını harekete geçirmiş ve böylelikle redoks duyarlı transsülfürasyon yolağını uyarmış olabilir. Hepatik transsülfürasyon yolağının uyarılmasıyla homosisteinden glutatyon sentezi indüklenerek hepatik GSH düzeylerinin arttığını düşünmekteyiz.

Diklofenak, dünyada en çok kullanılan nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlardan biridir ve bu nedenle diklofenak kaynaklı potansiyel hepatotoksisite vakalarına karşı önlem alınması önem arz etmektedir. Çevresel ve genetik faktörler nedeniyle özellikle duyarlı bireylerde görülen toksik reaktif ara ürünlerin oluşumunda artış veya antioksidan savunma sistemindeki yetersizlik sonucu diklofenak kaynaklı idiyosenkratik hepatotoksisite görülmektedir. Çalışmamız, lipoik asidin antioksidan özelliği ve karaciğerde

GSH açısından önem arz eden bir yolak olan transsülfürasyon yolağı aracılığıyla homosisteinden GSH sentezini indüklemesi nedeniyle diklofenak kaynaklı hepatotoksisiteye karşı koruyucu ajan olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

6- SONUÇ VE ÖNERİLER

Diklofenak kaynaklı deneysel karaciğer hasarı modeline karşı lipoik asidin koruyucu ve tedavi edici etkisine dair sonuçlar aşağıda belirtilmiştir.

Sağlıklı sıçanlara uyguladığımız lipoik asit, karaciğer üzerinde herhangi bir toksisiteye yol açmamıştır.

Yüksek doz diklofenak maruziyeti sonucu reaktif metabolitler olan benzokinoniminlerin GSH ile konjugasyonu sonucu hepatik GSH düzeylerinde azalma ve bu aktif metabolitlerin redoks siklusuyla oluşan reaktif oksijen türlerinin birikmesi ile CAT gibi önemli antioksidan enzim aktivitelerinde düşüş nedeniyle oksidatif stres meydana gelmiştir. Oksidatif stres nedeniyle gelişen lipid peroksidasyonu sonucu doku MDA düzeylerinde artış gözlenmiştir.

Lipoik asit, antioksidan özelliğini gerçekleştirmesi esnasında meydana getirdiği tiyil radikalleri sebebiyle, organizmada hafif bir hasara yol açarak sinyalizasyon mekanizmasını devreye sokup, homosisteinden transsülfürasyon yolağı aracılığıyla sistein oluşumu indükleyerek hepatik GSH sentezini arttırmıştır.

Lipoik asit $O_2^{\cdot -}$, $OH^{\cdot}$ ve $O_2^{-2\cdot}$ radikallerini temizlemesi ve GSH düzeylerini arttırmasıyla oksidatif stresi azaltarak ve dolayısıyla oksidatif stres sonucu meydana gelen lipid peroksidasyonunun ürünleri olan MDA ve 4-hidroksinonenal gibi toksik ürünlerin oluşumunu engelleyerek protein sentezinin ve enzim aktivitelerinin inhibisyonunu önlemiş ve organizmanın oksidatif strese karşı savunma mekanizmasında önemli rolü olan CAT enziminin aktivitesini de arttırmıştır.

Çalışmamızda kontrol ve LA grupları histopatolojik olarak değerlendirildiğinde, karaciğer hasarına dair bugulara rastlanmamıştır. DF grubunda kontrol grubuna göre yoğun nekrotik hasar gözlenmiştir. Lipoik asidin koruyucu olarak uygulandığı LA+DF grubunda, DF grubuna göre belirgin bir iyileşme görülmüş; kontrol grubuna göre ise nekrotik bulgular hafif düzeyde oluşmuştur. Tedavi edici olarak lipoik asidin uygulandığı DF+LA grubunda ise, DF grubuna göre nispeten azalmakla birlikte, nekrotik bölgelerin halen belirgin olduğu görülmüştür.

Diklofenak kaynaklı karaciğer hasarına karşı koruyucu ve tedavi edici etkisini araştırdığımız lipoik asit, uygulanan dozda herhangi bir hepatotoksisiteye neden olmadan koruyucu etki göstermiş; ancak dozaj ve zamanlama nedeniyle belirgin bir tedavi edici etki sağlamamıştır.

Diklofenak maruziyeti sonucu indüklenen oksidatif stres kaynaklı karaciğer hasarının azaltılmasında çeşitli doz aralıkları ve uygulama süreleri belirlenmiş lipoik asidin koruyucu ve tedavi edici etkisini araştıran in vivo hayvan çalışmaları, hücre kültürü çalışmaları ve moleküler çalışmaların yapılmasının klinik açıdan yararlı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Abdel-Zaher, A. O., Abdel-Hady, R. H., Mahmoud, M. M., & Farrag, M. M. (2008). The potential protective role of alpha-lipoic acid against acetaminophen-induced hepatic and renal damage. Toxicology, 243(3), 261-270.

Adadıoglu, İ. (2010). Metamizol, Diklofenak Sodyum Ve Parasetamol'ün Ratlarda Deneysel Olarak Oluşturulan Organofosfat Zehirlenmesi Üzerine Etkileri. Doktora Tezi , Afyon Kocatepe Ünivevrsitesi Tıp Fakültesi, Afyon .

Al-Ghamdi, M. S. (2003). Protective effect of Nigella sativa seeds against carbon tetrachloride-induced liver damage. The American journal of Chinese medicine, 31(05), 721-728.

Close, H., Hagerman, A. (2006). *Oxidative Stress and Aging* (A. E. H. Helaine M. Alessio Ed.). USA: Imperial College Press.

Alqasoumi, S., Yusufoglu, H., Farraj, A., & Alam, A. (2011). Effect of 6-shogaol and 6-gingerol on diclofenac sodium induced liver injury. International Journal of Pharmacology, 7(8), 868-873.

Altman, R., Bosch, B., Brune, K., Patrignani, P., & Young, C. (2015). Advances in NSAID Development: Evolution of Diclofenac Products Using Pharmaceutical Technology. Drugs, 75(8), 859-877. doi:10.1007/s40265-015-0392-z

Amin, A., & Hamza, A. A. (2005). Oxidative stress mediates drug-induced hepatotoxicity in rats: a possible role of DNA fragmentation. Toxicology, 208(3), 367-375.

Anandakumar, P. P., Malarkodi, S. P., Sivaprasad, T. R., & Saravanan, G. D. (2007). Antioxidant DL-alpha lipoic acid as an attenuator of adriamycin induced hepatotoxicity in rat model. Indian Journal of Experimental Biology, 45, 1045-1049.

Anderson, M. E. (1998). Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. Chemico-Biological Interactions, 111–112, 1-14. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0009-2797(97)00146-4

Arifoglu, Y. (2016). *Her Yönüyle Anatomi* (s.315-328). Ankara: Istanbul Kitabevi.

Armagan, I., Bayram, D., Candan, I. A., Yigit, A., Celik, E., Armagan, H. H., & Uğuz, A. C. (2015). Effects of pentoxifylline and alpha lipoic acid on methotrexate-induced damage in liver and kidney of rats. Environmental toxicology and pharmacology, 39(3), 1122-1131.

Banks, A. T., Zimmerman, H. J., Ishak, K. G., & Harter, J. G. (1995). Diclofenac-associated hepatotoxicity: analysis of 180 cases reported to the Food and Drug Administration as adverse reactions. Hepatology, 22(3), 820-827.

Baravalia, Y., Vaghasiya, Y., & Chanda, S. (2011). Hepatoprotective effect of Woodfordia fruticosa Kurz flowers on diclofenac sodium induced liver toxicity in rats. Asian Pacific journal of tropical medicine, 4(5), 342-346.

Bast, A., & Haenen, G. R. (2003). Lipoic acid: a multifunctional antioxidant. Biofactors, 17(1-4), 207-213.

Bayr, H. (2005). Reactive oxygen species. Critical care medicine, 33(12), S498-S501.

Bergendi, L., Beneš, L., Ďuračková, Z., & Ferenčik, M. (1999). Chemistry, physiology and pathology of free radicals. Life Sciences, 65(18–19), 1865-1874. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0024-3205(99)00439-7

Beutler, E. (1986a). Red cell metabolism: a manual of biochemical methods. Livingson, NY, 60-69.

Beutler, E. (1986b). Red cell metabolism: a manual of biochemical methods Livingson, NY, 3, 72.

Biewenga, G. P., Haenen, G. R. M. M., & Bast, A. (1997). The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. General Pharmacology: The Vascular System, 29(3), 315-331. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0306-3623(96)00474-0

Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. World Allergy Organization Journal, 5(1), 9.

Bissell, D. M., Gores, G. J., Laskin, D. L., & Hoofnagle, J. H. (2001). Drug-induced liver injury: Mechanisms and test systems. Hepatology, 33(4), 1009-1013.

Boelsterli, U. A. (2002). Mechanisms of NSAID-induced hepatotoxicity. Drug Safety, 25(9), 633-648.

Boelsterli, U. A. (2003). Diclofenac-induced liver injury: a paradigm of idiosyncratic drug toxicity. Toxicology and Applied Pharmacology, 192(3), 307-322.

Bolander-Gouaille, C. (2002). *Focus on Homocysteine and the Vitamins Involved in its metabolism* (s. 14-18) Springer Science & Business Media.

Bouayed, J., & Bohn, T. (2010). Exogenous antioxidants—Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 3(4), 228-237. doi:10.4161/oxim.3.4.12858

Brigelius-Flohé, R., & Maiorino, M. (2013). Glutathione peroxidases. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1830(5), 3289-3303.

Brogden, R., Heel, R., Pakes, G., Speight, T. M., & Avery, G. (1980). Diclofenac sodium: a review of its pharmacological properties and therapeutic use in rheumatic diseases and pain of varying origin. Drugs, 20(1), 24-48.

Cantoni, L., Valaperta, R., Ponsoda, X., Castell, J. V., Barelli, D., Rizzardini, M., Villa, P. (2003). Induction of hepatic heme oxygenase-1 by diclofenac in rodents: role of oxidative stress and cytochrome P-450 activity. Journal of hepatology, 38(6), 776-783.

Chang, J., van der Hoeven, L. H., & Haddox, C. (1978). Glutathione reductase in the red blood cells. Annals of Clinical & Laboratory Science, 8(1), 23-29.

Close H, H. A. (2006). *Oxidative Stress and Aging* (A. E. H. Helaine M. Alessio Ed.), (s.1-8) USA: Imperial College Press.

Çavdar, C., Sifil, A., & Çamsarı, T. (1997). Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi, 3, 92-95.

Dadhania, V., Tripathi, D., Vikram, A., Ramarao, P., & Jena, G. (2010). Intervention of α-lipoic acid ameliorates methotrexate-induced oxidative stress and genotoxicity: a study in rat intestine. Chemico-Biological Interactions, 183(1), 85-97.

Deavall, D. G., Martin, E. A., Horner, J. M., & Roberts, R. (2012). Drug-induced oxidative stress and toxicity. Journal of toxicology, 2012.

Del Rio, D., Stewart, A. J., & Pellegrini, N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, 15(4), 316-328. doi:http://doi.org/10.1016/j.numecd.2005.05.003

Dereci, S., & Akçam, M. (2015). Çocukluk Çağında İlaçlara ve Bitkisel Ürünlere Bağlı Gelişen Hepatotoksisite. SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi, 34-41.

Dilek, O. N. (2003). *Karaciğer* cilt: II. (s.349-359). Afyon:Afyon Kocatepe Üniversitesi.

Emea. (2003). Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP), 2-9.

Espinoza, S. E., Guo, H., Fedarko, N., DeZern, A., Fried, L. P., Xue, Q.-L., Walston, J. D. (2008). Glutathione Peroxidase Enzyme Activity in Aging. The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences, 63(5), 505-509.

Fattman, C. L., Schaefer, L. M., & Oury, T. D. (2003). Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. Free Radical Biology and Medicine, 35(3), 236-256.

Fei, M., Xie, Q., Zou, Y., He, R., Zhang, Y., Wang, J., Deng, X. (2016). Alpha-lipoic acid protects mice against concanavalin A-induced hepatitis by modulating cytokine secretion and reducing reactive oxygen species generation. International immunopharmacology, 35, 53-60.

Food, & Administration, D. (2014). FDA briefing document: Joint meeting of the arthritis advisory committee and the drug safety and risk management advisory committee, February 10-11, 2014.

Food, & Administration, D. Rockville, MD. (2009). Guidance for industry drug-induced liver injury: premarketing clinical evaluation, 3-4.

Franco, R., Sánchez-Olea, R., Reyes-Reyes, E. M., & Panayiotidis, M. I. (2009). Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 674(1–2), 3-22. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.11.012

Galati, G., Tafazoli, S., Sabzevari, O., Chan, T. S., & O'Brien, P. J. (2002). Idiosyncratic NSAID drug induced oxidative stress. Chemico-Biological Interactions, 142(1), 25-41.

Ganguly, P., & Alam, S. F. (2015). Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. Nutrition Journal, 14, 6. doi:10.1186/1475-2891-14-6

Giannini, E. G., Testa, R., & Savarino, V. (2005). Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. Canadian medical association journal, 172(3), 367-379.

Giridharan, R., & Sabina, E. P. (2017). Suppressive effect of Spirulina fusiformis on diclofenac-induced hepato-renal injury and gastrointestinal ulcer in Wistar albino rats: a biochemical and histological approach. Biomedicine & Pharmacotherapy, 88, 11-18.

Gornall, A. G., Bardawill, C. J., & David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. Journal of biological chemistry, 177(2), 751-766.

Graham, I., Refsum, H., Rosenberg, I. H., & Ueland, P. M. (2012). Homocysteine metabolism: from basic science to clinical medicine (Vol. 196): Springer Science & Business Media.

Griffith, O. W. (1999). Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. Free Radical Biology and Medicine, 27(9–10), 922-935. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00176-8

Grune, T. (2005). Oxidants and antioxidant defense systems (Vol. 2): Springer Science & Business Media.

Hall, J. E. (2015). Guyton and Hall textbook of medical physiology: Elsevier Health Sciences.

Hamza, A. A. (2007). Curcuma longa, Glycyrrhiza glabra and Moringa oleifera ameliorate diclofenac-induced hepatoxicity in rats. Am J Pharmacol Toxicol, 2(2), 80-88.

Han, D., Handelman, G., Marcocci, L., Sen, C. K., Roy, S., Kobuchi, H., Packer, L. (1997). Lipoic acid increases de novo synthesis of cellular glutathione by improving cystine utilization. Biofactors, 6(3), 321-338.

Huang, J., Nguyen, V., Tang, X., Wei, J., Lin, X., Lai, Z., Huang, R. (2016). Protection from diclofenac-induced liver injury by Yulangsan polysaccharide in a mouse model. Journal of Ethnopharmacology, 193, 207-213. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.08.012

Ingawale, D. K., Mandlik, S. K., & Naik, S. R. (2014). Models of hepatotoxicity and the underlying cellular, biochemical and immunological mechanism (s): a critical discussion. Environmental toxicology and pharmacology, 37(1), 118-133.

Jakubowski, H. (2014). Homocysteine in protein structure/function and human disease: Springer, 7-11.

James, S. J., Cutler, P., Melnyk, S., Jernigan, S., Janak, L., Gaylor, D. W., & Neubrander, J. A. (2004). Metabolic biomarkers of increased oxidative stress and impaired methylation capacity in children with autism. The American journal of clinical nutrition, 80(6), 1611-1617.

Kaplowitz, N. (2005). Idiosyncratic drug hepatotoxicity. Nature Reviews Drug Discovery, 4(6), 489-499.

Kenneth, S. S., & Carol, M. (2007). Anatomy and physiology: The unity of form and function. In (4 ed., s 1020-1021). Newyork: McGraw-Hill.

Kirkman, H. N., & Gaetani, G. F. (2007). Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. Trends in Biochemical Sciences, 32(1), 44-50. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2006.11.003

Kohen, R., & Nyska, A. (2002). Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. Toxicologic Pathology, 30(6), 620-650. doi:10.1080/01926230290166724

Kutchai, H. (2008). *Physiology* (Berne R, Levy M, Koeppen B, & S. B Eds.), (s.585-592), Philedelphia: Mosby.

Lee, W. M. (2003). Drug-induced hepatotoxicity. New England Journal of Medicine, 349(5), 474-485.

Limón-Pacheco, J., & Gonsebatt, M. E. (2009). The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 674(1–2), 137-147. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.09.015

Lu, S. C. (2009). Regulation of glutathione synthesis. Molecular Aspects of Medicine, 30(1–2), 42-59. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2008.05.005

Lushchak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. Chemico-Biological Interactions, 224, 164-175. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.016

Maritim, A., Sanders, R., & Watkins, J. r. (2003). Effects of α-lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. The Journal of nutritional biochemistry, 14(5), 288-294.

Martini F, O. W. (2006). Fundamentals of Anatomy & Physiology (L. Berriman Ed. 7th. ed.). San Francisco: Daryl Fox, 890-894.

Masella, R., & Mazza, G. (2009). Glutathione and sulfur amino acids in human health and disease: John Wiley & Sons, 4-11.

Moini, H., Packer, L., & Saris, N.-E. L. (2002). Antioxidant and Prooxidant Activities of α-Lipoic Acid and Dihydrolipoic Acid. Toxicology and Applied Pharmacology, 182(1) 84-90. doi:http://dx.doi.org/10.1006/taap.2002.9437

Morrell, C. N. (2008). Reactive oxygen species: Finding the right balance. Circulation research, 103(6)571-572. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.184325

Mosharov, E., Cranford, M. R., & Banerjee, R. (2000). The quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by the transsulfuration pathway and its regulation by redox changes. Biochemistry, 39(42), 13005-13011.

Navari-Izzo, F., Quartacci, M. F., & Sgherri, C. (2002). Lipoic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species. Plant Physiology and Biochemistry, 40(6–8), 463-470. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0981-9428(02)01407-9

Navarro, V. J., & Senior, J. R. (2006). Drug-related hepatotoxicity. New England Journal of Medicine, 354(7), 731-739.

O'brien, P. (1991). Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. Chemico-Biological Interactions, 80(1), 1-41.

Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical biochemistry, 95(2), 351-358.

Özçelik, E. (2012). Kitosan ve Blueberry'nin Asetaminofen Aracılı Karaciğer Toksisitesi Üzerine Etkileri. (Doktora Tezi, s5-10),Osmangazi University, Eskişehir.

Özerol, E. (2017). *Sorularla Konu Anlatımlı Tıbbi Biyokimya*. İstanbul: Nobel,

Pandit, A., Sachdeva, T., & Bafna, P. (2012). Drug-induced hepatotoxicity: A review.

Patel, M. S., & Packer, L. (2008). Lipoic acid: energy production, antioxidant activity and health effects: CRC Press.

Percy, M. E. (1984). Catalase: an old enzyme with a new role? Canadian journal of biochemistry and cell biology, 62(10), 1006-1014.

Petersen Shay, K., Moreau, R. F., Smith, E. J., & Hagen, T. M. (2008). Is alpha-lipoic acid a scavenger of reactive oxygen species in vivo? Evidence for its initiation of stress signaling pathways that promote endogenous antioxidant capacity. IUBMB Life, 60(6), 362-367. doi:10.1002/iub.40

Pocock, G., & Richards, C. D. (2009). The human body: an introduction for the biomedical and health sciences: Oxford University Press.

Ponsoda, X., Bort, R., Jover, R., Gomez-Lechon, M., & Castell, J. (1995). Molecular mechanism of diclofenac hepatotoxicity: association of cell injury with oxidative metabolism and decrease in ATP levels. Toxicology in Vitro, 9(4), 439-444.

Powis, G. (1987). Metabolism and reactions of quinoid anticancer agents. Pharmacology & therapeutics, 35(1-2), 57-162.

Roth, R. A., & Ganey, P. E. (2010). Intrinsic versus Idiosyncratic Drug-Induced Hepatotoxicity—Two Villains or One? The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 332(3), 692-697. doi:10.1124/jpet.109.162651

Russmann, S., Kullak-Ublick, G. A., & Grattagliano, I. (2009). Current concepts of mechanisms in drug-induced hepatotoxicity. Current medicinal chemistry, 16(23), 3041-3053.

Saad, E. I., El-Gowilly, S. M., Sherhaa, M. O., & Bistawroos, A. E. (2010). Role of oxidative stress and nitric oxide in the protective effects of α-lipoic acid and aminoguanidine against isoniazid–rifampicin-induced hepatotoxicity in rats. Food and Chemical Toxicology, 48(7)1869-1875. doi:http://doi.org/10.1016/j.fct.2010.04.026

Selhub, J. (1999). Homocysteine metabolism. Annu Rev Nutr, 19, 217-246. doi:10.1146/annurev.nutr.19.1.217

Shay, K. P., Moreau, R. F., Smith, E. J., Smith, A. R., & Hagen, T. M. (2009). Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: Molecular mechanisms and therapeutic potential. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects,1790(10),11491160.doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.07.026

Shila, S., Subathra, M., Devi, M. A., & Panneerselvam, C. (2005). Arsenic intoxication-induced reduction of glutathione level and of the activity of related enzymes in rat brain regions: reversal by dl-α-lipoic acid. Archives of toxicology, 79(3), 140-146.

Sorg, O. (2004). Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? Comptes Rendus Biologies, 327(7), 649-662. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.crvi.2004.05.007

Stabler, S. P., Sekhar, J., Allen, R. H., O'neill, H. C., & White, C. W. (2009). α-Lipoic acid induces elevated S-adenosylhomocysteine and depletes S-adenosylmethionine. Free Radical Biology and Medicine, 47(8), 1147-1153.

Tang, W., Stearns, R. A., Bandiera, S. M., Zhang, Y., Raab, C., Braun, M. P., Baillie, T. A. (1999). Studies on Cytochrome P-450-Mediated Bioactivation of

Diclofenac in Rats and in Human Hepatocytes: Identification of Glutathione Conjugated Metabolites. Drug Metabolism and Disposition, 27(3), 365-372.

Teichert, J., Hermann, R., Ruus, P., & Preiss, R. (2003). Plasma kinetics, metabolism, and urinary excretion of alpha-lipoic acid following oral administration in healthy volunteers. J Clin Pharmacol, 43(11), 1257-1267. doi:10.1177/0091270003258654

Tolman, K., & Rej, R. (2005). *Tietz fundamentals of clinical chemistry and molecular diagnostics* (C. A. Burtis & E. Ashwood Eds.) (s.747-755): Elsevier Health Sciences.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 39(1), 44-84. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001

Vertuani, S., Angusti, A., & Manfredini, S. (2004). The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. Curr Pharm Des, 10(14), 1677-1694.

Vishal Tandon MD, Gupta BM, Tandon R.(2005). Free radicals/reactive oxygen species. Jk - Practitioner, 12(3), 143-148.

Vitvitsky, V., Mosharov, E., Tritt, M., Ataullakhanov, F., & Banerjee, R. (2003). Redox regulation of homocysteine-dependent glutathione synthesis. Redox report, 8(1), 57-63.

Wardman, P., & von Sonntag, C. (1995). Kinetic factors that control the fate of thiyl radicals in cells. Methods Enzymol, 251, 31-45.

Widmaier, E. P., Raff, H., & Strang, K. T. (2006). Vander's human physiology: McGraw Hill Boston, Mass, USA.

Willis, J., Kendall, M., Flinn, R., Thornhill, D., & Welling, P. (1979). The pharmacokinetics of diclofenac sodium following intravenous and oral administration. European journal of clinical pharmacology, 16(6), 405-410.

Wu, G., Fang, Y. Z., Yang, S., Lupton, J. R., & Turner, N. D. (2004). Glutathione metabolism and its implications for health. J Nutr, 134(3), 489-492.

Özgeçmiş

Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : Tuğba ERKMEN
Doğum tarihi ve yeri :12.12.1990, Manisa
Uyruğu :T.C
Medeni durumu :Bekar
İletişim adresleri : Odunpazarı, Eskişehir

Eğitim Durumu

•Marmara Ünivversitesi Eczacılık Fakültesi –Lisans (2009-2015)

Mezuniyet Tarihi: 6 Şubat 2015

Diploma notu: 81,4

•İstanbul Beşiktaş Atatürk Anadolu Lisesi / Denizli Anadolu Lisesi (2005-2009) Diploma notu: 4,96/5

•İstanbul Şair Behçet Kemal Çağlar İ.Ö.O (2002-2005)

YABANCI DİL ve DÜZEYİ

•İngilizce - Upper-intermediate

•İspanyolca – A2

Mesleki Deneyim :

Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar: TBD (Türkiye Biyokimya Derneği)

Yayınlar: *Erkmen, T., Şahin, C., & Arıcıoğlu, F. (2015). Şizofreni'de inflamatuvar mekanizmaların yeri. Clinical and Experimental Health Sciences, 5(2), 134-139.*
(Makale, Sözlü Bildiri, Poster Bildiri, Kitap, Kitap Bölümü vd.)

Bilimsel Etkinlikler

Projeler :

Uluslararası Stress Projesi (proje no: 699381 Human Performance Neurometrics)

Kurslar ve Eğitim Programları :

- Moleküler Biyoloji Ve Genetik İstanbul Üniversitesi - 03.2014
- Kök Hücre Sempozyumu Marmara Üniversitesi - 02.2014
- Türk biyokimya kongresi 3-6 Kasım 2015
- İügen Kış Okulu İstanbul Üniversitesi - 4-6 mart 2016
- Alzheimer Hastalığının Moleküler Temeli Ve Yeni Tedavi Stratejileri Sempozyumu 17 - 18 Mayıs 2016
- XXII. Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Kursu Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre Ve Gen Tedavileri Araştırma Ve Uygulama Merkezi 4-7 Temmuz 2017