

## 1. GİRİŞ

Ülkemizde ve dünyada alkol kullanımı ve alkole bağlı ölüm oranları gün geçtikçe artmakta ve buna bağlı olarak ülke sağlık giderlerinde gün geçtikçe artış gözlenmektedir. Alkolik karaciğer hastalığı kronik alkol tüketimi nedeniyle ortaya çıkan primer sağlık sorunudur. Alkolün karaciğerde oluşturduğu hasarın moleküler mekanizmasının açıklığa kavuşması için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır.

Alkol metabolizmasında karaciğer primer rol oynamaktadır (1). Kronik alkol kullanımında Mikrozomal Etanol Okside edici Sistem (MEOS) ve Alkol Dehidrogenaz (ADH) yollarında  $\alpha$ -hidroksietil [ $\text{CH}_3\text{C}(\cdot)\text{HOH}$ ], hidroksil ( $\cdot\text{OH}$ ) ve süperoksit ( $\text{O}_2^-$ ) anyon radikallerinin üretimi artmakta ve bu durum da redükte glutatyon (GSH),  $\alpha$ -tokoferol,  $\beta$ -karoten tüketimi, lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve hepatotoksinler ile karsinogenlerin aktivasyonuna neden olmaktadır (1-12).

Aktive olmuş T-hücreleri ve makrofajlar etanolün aracılık ettiği karaciğer hasarının sürdürülmesinde katkıda bulunan tümör nekroz faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ) ve interferon-gama (IFN- $\gamma$ )'yı da içeren sitokinleri salgırlar. TNF- $\alpha$  fibroblast proliferasyonunu uyarır, sitotoksik lenfosit aktivitesini hızlandırır, kollajenaz aktivitesini ve hepatosit nekrozunu artırır (8-9, 13-16). IFN- $\gamma$ , indüklenebilir nitrikoksit sentaz (iNOS) aktivitesini indükleyerek nitrik oksit (NO) üretimini arttırmaktadır. IFN- $\gamma$  ve NO sitokrom P450 2E1 (CYP450 2E1) aktivitesini inhibe etmektedir. Bununla beraber IFN- $\gamma$  ile NO, TNF- $\alpha$  ve peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) üretimini arttırmaktadır (17-20).

Flavonoidler, bitkisel gıdalarda özellikle çay, kırmızı şarap, elma, soğan ve baklagillerde bol miktarda bulunan bileşiklerdir. Bitkilerin ikincil metabolitlerdendir. Fotosentezle oluşan ve yaşamsal gereksinimleri için kullandıkları karbohidratlar, aminoasitler gibi birincil metabolitlerden türeler. İnsan diyetiyle günlük ortalama tüketimi 1 g olduğu sanılmaktadır (21-28).

Quercetin (3,5,7,3',4'-pentahidroksiflavon) eksojen kaynaklı antioksidan bir flavonoid olup çeşitli mekanizmalarla oksidatif hasarı ve hücre ölümünü engeller. Oksijen radikallerini temizler, lipid peroksidasyonuna karşı koruma sağlar. Antioksidan, antiinflamatuvar, antitümöral, antibakteriyal ve antiviral gibi klinik özellikleri vardır (21-29).

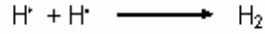
Bu çalışmanın amacı, kronik alkol alımının inflamasyon ve oksidatif stres yoluyla neden olduğu karaciğer hasarı üzerinde quercetin'in koruyucu etkisini incelemektir. Bu amaçla karaciğer dokusunda lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak doku thio barbitürik asit reaktif ürünleri (TBARS), protein oksidasyonunun göstergesi olarak protein karbonil düzeyi ve antioksidan kapasitenin bir göstergesi olarak da GSH ile protein süfhidril (SH) gruplarının düzeyleri ve enzimatik antioksidan kapasiteyi gösterme açısından süperoksit dismutaz (SOD) ile katalaz (CAT) enzimlerinin aktiviteleri ölçüldü. İnflamasyonun göstergesi olarak da proinflamatuvar sitokinlerden TNF- $\alpha$  ve IFN- $\gamma$ 'nın karaciğer düzeyleri belirlendi.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. SERBEST RADİKALLER

Serbest radikaller, son yörüngelerinde bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron ( $e^-$ ) içeren atom veya moleküllerdir. Oldukça reaktif olup kısa ömürlüdürler. Elektriksel olarak pozitif yüklü, negatif yüklü veya nötral olabilir (30-31).

Serbest radikaller kovalent bağlı bir molekülün, her atomunda ortak  $e^-$ 'lerden birinin kalarak, kovalent bağın homolitik bölünmesiyle ya da radikal olmayan bir moleküle tek bir  $e^-$ 'un eklenmesiyle oluşurlar. Bu nedenle serbest radikallerde yarım bağ olduğu düşünülebilir. Bu tür maddeler ortaklanmamış  $e^-$ 'larından dolayı oldukça reaktiftirler (32-33). İki radikal karşılaştığı zaman çift olmayan  $e^-$ 'lerini birleştirirler ve bir kovalent bağ teşkil ederler. Hidrojen atomu eşleşmemiş  $e^-$ 'uyla bir radikaldir ve iki hidrojen atomu diatomik bir hidrojen molekülü oluşturmak üzere kolayca birleşebilirler (34-35).

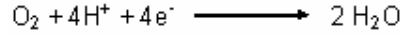


$Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  ve  $Mo^{5+}$  gibi geçiş metallerinin de ortaklanmamış  $e^-$ 'ları olduğu halde serbest radikal olarak kabul edilmezler. Fakat reaksiyonları kataliz ettiklerinden dolayı serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar (32,36-37).

Radikaller nonradikallerle bir kaç yoldan reaksiyona girerler. Bir radikal ortaklanmamış  $e^-$ 'unu bir nonradikale verebilir (redükte edici radikal) veya bir çift oluşturmak için diğer bir molekülden bir  $e^-$  alabilir (okside edici radikal) ya da bir nonradikale birleşebilir. Bu üç reaksiyon tipinden hangisi ile olursa olsun nonradikal ürün sonunda bir radikale dönüşür (36).

Biyolojik sistemler için serbest radikallerin başlıca kaynağı moleküler oksijendir ( $O_2$ ). 1924'te  $O_2$ 'in eşleşmemiş  $e^-$ 'lar içerdiği saptanmıştır.  $\cdot\ddot{O}\cdot$

olarak gösterilmesi uygun olan  $O_2$ 'nin dört  $e^-$ 'u basamaklar halinde redükte olarak su şekline dönüşür (36).



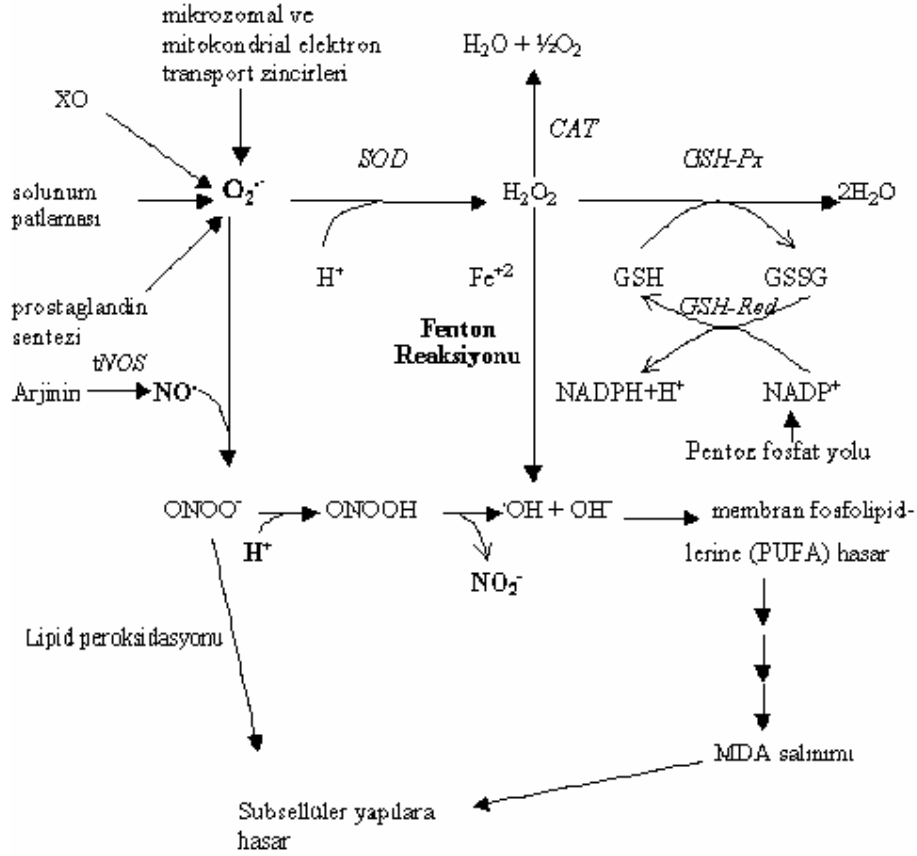
$O_2$ 'nin redüksiyonu esnasında oluşan protonlaşmış ve protonlaşmamış ara ürünleri gösterilmektedir.  $O_2$  bir  $e^-$  alınca  $O_2^{\cdot-}$  oluşur. Eğer iki  $e^-$  transfer edilirse oluşan ürün hidrojen peroksittir ( $H_2O_2$ ).  $H_2O_2$  bir radikal değildir, fakat kuvvetli oksidan bir maddedir. İki'den fazla  $e^-$  alabilir ve oldukça sitotoksik olan ürünlere dönüşür. Ferro demir ( $Fe^{+2}$ )  $H_2O_2$ 'e üçüncü  $e^-$ 'unu transfer ederse O–O bağı kırılır, su ve  $\cdot OH$  oluşur (34,36).

Bu reaktif ara ürünlerinin hepsi radikal olmadığı için sıklıkla hatalı olarak kullanılan “serbest oksijen radikalleri” yerine “reaktif oksijen ürünleri (ROS)” terimini kullanmak yerinde olur (34). ROS tanımı içine bazen singlet oksijen ( $^1O_2$ ) ve nötrofil myeloperoksidazı tarafından  $H_2O_2$ 'ten üretilen hypoklorik asid (HOCl) de dahil edilebilir.

## 2.2. BİYOLOJİK SİSTEMLERDE OLUŞAN REAKTİF OKSİJEN ÜRÜNLERİ (ROS)

Biyolojik sistemlerin en önemli serbest radikalleri oksijen kaynaklı olanlarıdır. Daha az olarak karbon ve kükürt merkezli olanlar da vardır. ROS canlılığın devamı için belli oranlarda gereklidir.

Mikrozomal ve mitokondriyal  $e^-$  transport zincirinden  $e^-$ 'ların diffüze olması esnasında, nükleotid metabolizmasında hipoksantin ve ksantin basamaklarında, fagositik hücrelerde solunum patlaması esnasında, araşidonik asid metabolizması esnasında ve argininden nitrik oksitin (NO) sentezi esnasında ROS üretilmektedir (Şekil 2.2.1).

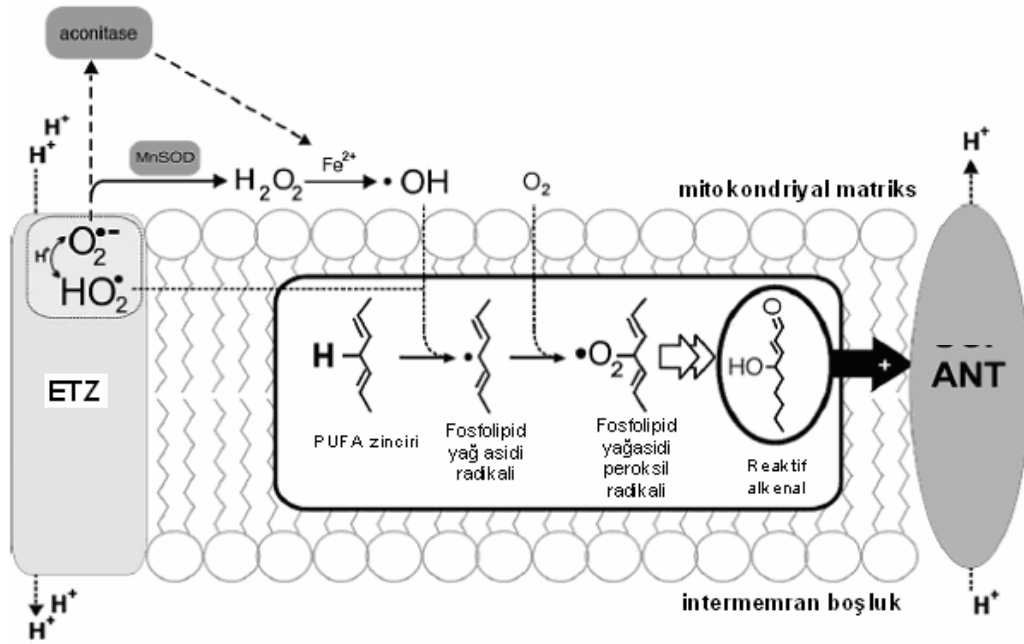


Şekil 2.2.1. Reaktif oksijen ürünlerinin kaynakları ve meydana gelen reaksiyonlar

### 2.2.1. Süperoksit Radikali ( $O_2^{\cdot-}$ )

$O_2$ 'in tek e $^-$ la indirgenmesiyle oluşan  $O_2^{\cdot-}$  bütün aerobik hücrelerde bulunur. Hem oksidan hem de redüktan özelliğe sahiptir. En çok mitokondri, endoplazmik retikulum ve kloroplast gibi sellüler e $^-$  transport zincirinin çeşitli komponentlerinde  $O_2$ 'e e $^-$  sızmasıyla oluşur. Aşırı solunumla  $O_2$  konsantrasyonunun artması sonucu sızma miktarı ve buna bağlı olarak  $O_2^{\cdot-}$  üretim hızı artar (Şekil 2.2.2.1.1) (32,37).

Mitokondriyal e $^-$  transport zincirinden e $^-$  iki yerden sızar. Birincisi, NADH-Dehidrojenaz basamağı, ikincisi ise koenzim Q ya da ubikinon basamağıdır. e $^-$ ların  $O_2$ 'e taşınmasından sorumlu olan sitokrom oksidaz enzimi  $O_2$ 'nin % 98'ini harcayarak suya indirger.  $O_2$ 'nin % 2'si ise transport zincirinden sızan e $^-$ larla  $O_2^{\cdot-}$  oluşturur (36).



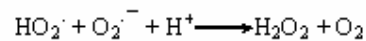
Şekil 2.2.1.1. Mitokondriyal kaynaklı reaktif oksijen ürünlerinin oluşumu ve lipid peroksidasyonu. ETZ; Elektron transport zinciri, ANT; Adenin nükleotid translokaz.

$O_2^{\cdot-}$ , bir serbest radikal olmakla birlikte direkt olarak fazla zarar vermez. Asıl önemi,  $H_2O_2$  kaynağı olması ve geçiş metallere indirgeyicisi olmasıdır.  $O_2^{\cdot-}$ , pH 7,2 de yaklaşık  $3.8 \times 10^5$  mol/s sabitesinde daha stabil bir metabolit olan  $H_2O_2$ 'e dönüşür (38).



Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda membrana bağlı sitokromların oksidasyonu da serbest radikaller üretilmektedir (32,37,39).

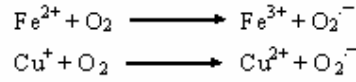
$O_2^{\cdot-}$ , düşük pH değerinde daha reaktif olup oksidan perhidroksil radikali ( $HO_2^{\cdot}$ ) oluşturmak üzere protonlanır. Fizyolojik pH'daki protonlanmış formu % 1'den azdır.  $O_2^{\cdot-}$  ile  $HO_2^{\cdot}$  reaksiyona girince biri okside olurken diğeri indirgenir. Bu reaksiyon sonucunda  $O_2$  ve  $H_2O_2$  meydana gelir (şekil 2.2.1.1) (32).



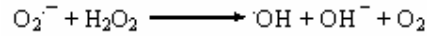
$O_2^{\cdot-}$ 'in, fizyolojik bir serbest radikal olan NO ile birleşmesi sonucu reaktif bir oksijen türevi olan  $ONOO^-$  meydana gelir.  $ONOO^-$ 'lerin doğrudan proteinlere zararlı etkileri vardır (32).



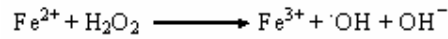
Geçiş metallerinin otooksidasyonunu da  $O_2^{\cdot-}$  meydana getirebilir. Bu reaksiyonlar geri dönüşümlü olduklarından geçiş metalleri iyonlarının  $O_2$  ile reaksiyonları geri dönüşümlü redoks reaksiyonları olarak düşünülebilir (32).



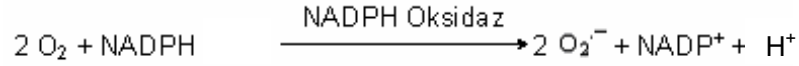
$O_2^{\cdot-}$   $Cu^{2+}$  gibi geçiş metalleri ve radikal türleri ile kolayca reaksiyona girer ve  $H_2O_2$  ile "Haber-Weis reaksiyonu" vererek oldukça toksik  $\cdot OH$ 'ni oluşturur (35,40).



$Fe^{2+}$  iyonları katalizörlüğünde "Fenton reaksiyonu" gerçekleşir ve reaksiyon ortalama 4000 kat hızlanır (35).

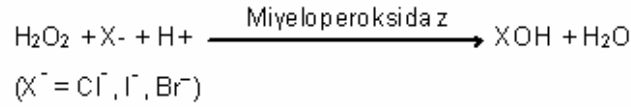


Fagositik lökositler (nötrofiller, monositler, makrofajlar ve eozinofiller) çeşitli biyolojik hedeflerin parçalanmasına sebep olan ve enfeksiyona karşı hücrel cevabı başlatan hücrelerdir. Solunum patlaması esnasında fagositik hücrelerde diğer ROS ile beraber  $O_2^{\cdot-}$  de oluşmaktadır. Nötrofillerde  $O_2^{\cdot-}$  üretimi plazma membranının dış yüzeyine yerleşmiş bulunan NADPH oksidaz aracılığıyla oluşur. Uygun bir stimulus ile fagositik hücre uyarıldıktan sonra NADPH oksidaz aktive olur. NADPH'tan iki  $e^-$  alınarak iki molekül  $O_2$ 'e aktarılır. Böylece iki molekül  $O_2^{\cdot-}$  oluşur.

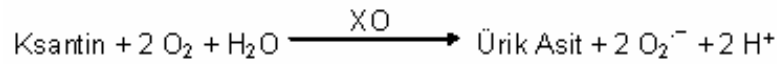


Respiratuvar patlama esnasında tüketilen  $\text{O}_2$ 'nin çoğu  $\text{O}_2^{\cdot -}$  ara ürünü üzerinden  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'e dönüştürülür. Kronik granülamatoz hastalık olarak bilinen konjenital bozuklukta NADPH oksidaz eksikliğine bağlı olarak  $\text{O}_2^{\cdot -}$  ve diğer ROS üretilemez ve böylece öldürülemeyen pek çok bakteri türü serbest kalır. Örneğin; fagosite edilemeyen stafilokok aereus gibi bakterilerle hastalar ciddi, kalıcı ve tekrarlayan enfeksiyonlara maruz kalırlar (32,35-36).

Nötrofillerin kullandığı diğer bir bakteri öldürme mekanizması da bir hem enzimi olan myeloperoksidazın (MPO) kataliziyle florür dışındaki halojenleri ve  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'i kullanarak HOX'in oluşturulmasıdır. Bu asitler oksidan özelliklerinden dolayı güçlü antibakteriyel ajanlardır (32).

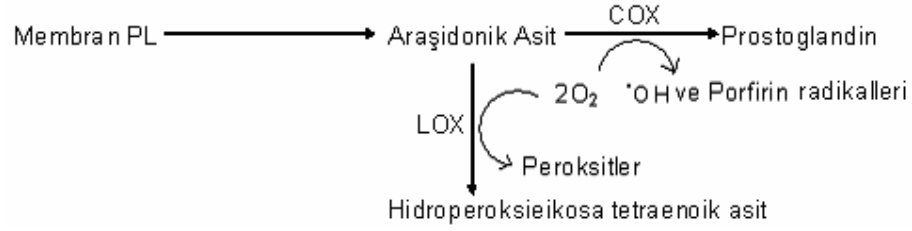


Hücrelerde  $\text{O}_2^{\cdot -}$  oluşumuna neden olan diğer bir enzim XO'dur. Sağlam dokularda % 90'ı ksantin dehidrogenaz (XD) formunda bulunan XO enzimi düşük oksijen basıncında inaktifken yüksek oksijen basıncında aktif hale gelir. XO enzimi ksantinün ürik aside dönüşümü sırasında  $\text{O}_2^{\cdot -}$  oluşumuna neden olur (32).



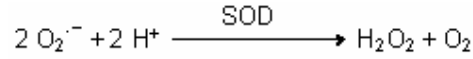
Araşidonik asit metabolizması esnasında siklooksijenaz (COX) ve lipoksijenaz (LOX) yoluyla  $\text{O}_2^{\cdot -}$  üretilir. Fagositik hücrelerin uyarılması fosfolipaz ve protein kinaz aktivasyonuna, sonuçta plazmaya araşidonik asidin salınımına neden olur (32).





Normal metabolizma yanı sıra hiperoksi, inflamasyon ve radyasyon gibi çevresel ajanlar oksijen metabolizmasını artırarak ROS oluşumunu artırır. Ayrıca neoplastik ilaçlar, bazı anestezipler, bazı çözücüler, sigara dumanı, hava kirliliği, aromatik hidrokarbonlar gibi çeşitli çevresel ajanlar da ROS'nin ortaya çıkmasına yol açarlar.

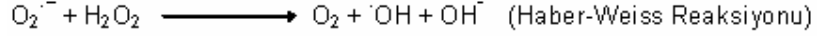
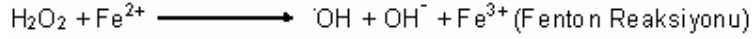
Oluşan O<sub>2</sub><sup>-</sup> ya spontan olarak ya da SOD enziminin katalizlediği reaksiyonla H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'e dönüşür. Spontan dismutasyon en hızlı pH 4.8 gerçekleşir.



### 2.2.2. Hidroksil Radikali (·OH)

·OH H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in geçiş metalleri varlığında indirgenmesi (Fenton reaksiyonu) ile oluşan son derece reaktif bir radikaldir. Ayrıca H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in O<sub>2</sub><sup>-</sup> ile reaksiyonu sonucunda da (Haber-Weis reaksiyonu) meydana gelir. Haber-Weis reaksiyonu katalizörsüz çok yavaş olduğu halde Fe<sup>+2</sup> katalizörlüğünde çok hızlı oluşur (32,35,40).

·OH'nin yarılanma ömrü çok kısadır. Suyun iyonize edici radyasyona maruz kalmasıyla da oluşur. Çok reaktif olduğu için hemen yakın çevredeki moleküllerle birleşir. Nonradikal biyolojik moleküllerle zincir reaksiyonları başlatır. ·OH DNA'nın pürin ve pirimidin bazları ile reaksiyona girerek, DNA baz modifikasyonlarına yol açabilir.



$\cdot OH$  tiyoller ve yağ asitleri gibi daha bir çok molekülden hidrojen atomları kopararak yeni radikallerin oluşumuna neden olur (32,35,37).

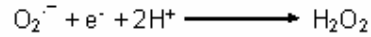
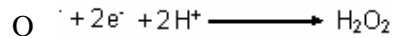


### 2.2.3. Singlet Oksijen ( $^1O_2$ )

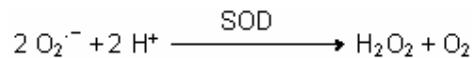
$O_2$ 'in eşleşmemiş  $e^-$ 'lerden birinin verilen enerji sonucu bulunduğu orbitalden başka bir orbitale kendi spininin ters yönünde yer değiştirmesiyle oluşur.  $^1O_2$  in ortaklaşmamış elektronu olmadığı için nonradikal ROS'dür. Serbest radikal reaksiyonları sonucu oluştuğu gibi serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da sebep olur. Delta ve sigma olmak üzere iki şekli vardır. Porfiria gibi doğuştan metabolizma bozukluklarında singlet oksijen oluşumu artabilir (32,37).

### 2.2.4. Hidrojen Peroksit ( $H_2O_2$ )

Moleküler oksijenin 2  $e^-$  alması veya süperoksidin bir  $e^-$  alması sonucu peroksit oluşur. Oluşan peroksit molekülü 2 hidrojen atomu ile birleşerek  $H_2O_2$  meydana gelir.



Ancak biyolojik sistemlerde  $H_2O_2$  esas olarak süperoksidin dismutasyonu ile oluşur. Dismutasyon ya spontan olarak ya da süper oksid dismutaz (SOD) katalizi ile olarak gerçekleşir.



$H_2O_2$ 'in eşleşmemiş elektronları olmadığından dolayı radikal değildir. Bu nedenle reaktivitesi sınırlıdır. Ancak diğer ROS geçebilecekleri bir anyon kanalı olmadıkça membranlardan çok yavaş geçebildiği halde  $H_2O_2$  çok kolay geçebilir. Eritrositler ve vasküler endotelial hücrelerin membranı böyle bir kanala sahiptir (32,37).

### 2.2.5. Nitrik Oksit (NO)

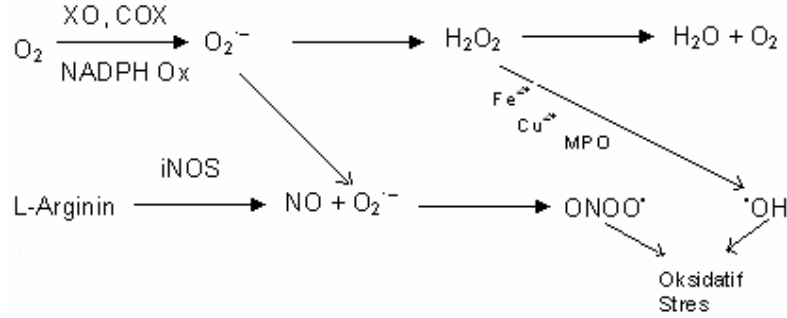
NO yarı ömrü kısa olan (3-5 s) fakat çok fazla biyolojik fonksiyonları bulunan bir moleküldür. Hücre membranlarından kolayca diffüze olabilen ve hedef hücreleri aktive edebilen yeni bir sinyal ileti molekülü olarak kabul edilmektedir. Ayrıca, oldukça reaktif bir serbest radikaldir (41).

NO, nötrofiller, makrofajlar, endotel hücreleri, plateletler ve nöronlar tarafından üretilmektedir. NO sentezi, nöronlarda, endotel hücrelerinde ve plateletlerde reseptör-aracılı ya da iyon kanalı-bağımlı  $Ca^{+2}$  influksının sonucunda Ca-kalmoduline bağımlı NOS enzimi tarafından olmaktadır. Endotel hücrelerinde ise; aktif bazı biyolojik moleküllerin spesifik hücre reseptörlerine bağlanması sonucu olmaktadır. İmmün sistem hücrelerinde ise NO sentezi kalsiyumdan bağımsız gerçekleşmektedir. Lipopolisakaritler (LPS), TNF, interlökin-1 (IL-1) ve IFN- $\gamma$  gibi sitokinler NO sentezini indükleyebilmektedirler (42).

NO, biyolojik etkilerini hedef hücredeki guanilat siklaz enzimini aktive ederek ve intrasellüler cGMP artışına neden olarak göstermektedir (14). cGMP ise protein kinaz G'yi aktive ederek fosforilasyonu uyarmaktadır. Ayrıca NO, reaktif bir serbest radikal olup  $O_2^{\cdot-}$  ile birleşerek sitotoksik bir radikal olan ONOO $\cdot$  ve  $\cdot$ OH radikalini oluşturmaktadır. Bu da NO'nun sitotoksik ve dejeneratif etkilerine neden olmaktadır (Şekil 2.2.5.1) (43).

NO, L-arginin'in oksidasyonu sonucu oluşmaktadır. Bu reaksiyondan sorumlu olan enzim NOS (E.C. 1.14.13.39), protoporfirin IX-hem içeren bir

enzim olup molekül ağırlığı 130-160 kDa'dur. Homodimer olarak bulunur ve FAD, FMN, BH<sub>4</sub> ve kalmodulin kofaktörlerini gereksinmektedir (44).



Şekil 2.2.5.1. Reaktif nitrojen türleri ve reaktif oksijen ürünlerinin kaynakları, etki mekanizmaları ve birbirleriyle olan ilişkileri

Üç ayrı NOS izoformunun varlığı, farklı doku kaynaklarından elde edilen, enzimi kodlayan genin izolasyonu ve sekans analizi yapılarak gösterilmiştir. iNOS, endotelial NOS (eNOS) ve nöronal NOS (nNOS). iNOS ekspresyonu, LPS ve sitokinlere bağımlı olup, kalsiyumdan bağımsızdır. eNOS ve nNOS ekspresyonu ise kalsiyuma bağımlıdır. iNOS nötrofillerde, kanser hücrelerinde, hepatositlerde ve endotel hücrelerinde sitokin ve LPS indüksiyonu sonrasında artmaktadır. eNOS, büyük damarların endotel tabakasında lokalizedir. Ancak plateletlerde bulunan NOS aktivitesinin de eNOS olduğu söylenmektedir. nNOS'un ise esas yerleşim yeri serebellumdur (45). NOS izoformları arasındaki aminoasit sekansı benzerliği insanda %51-57 arasında değişmektedir (46).

### 2.2.6. Peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>)

ONOO<sup>-</sup>, NO ve süperoksitten oluşmaktadır. Reaksiyon çok hızlı olup hız sabiti  $k = 6,7 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$ 'dir. ONOO<sup>-</sup> sadece XO veya aktive nötrofillerin hızlı süperoksit oluşturması ve NOS aktivasyonu sonucu oluşmaktadır. ONOO<sup>-</sup>'in şok, inflamasyon ve iskemi-reperfüzyondaki rolü gösterilmiştir. ONOO<sup>-</sup> oldukça hasar verici bir oksijen radikaldir (32,43)



Tablo 2.2.6.1. Reaktif oksijen ürünlerinin tahmini yarı ömürleri.

Reaktif Oksijen Ürünleri		Yarı Omru (saniye)
$O_2^{\cdot-}$	Süperoksit anyon radikali	Enzimatik
$H_2O_2$	Hidrojen peroksit	Enzimatik
$^{\cdot}OH$	Hidroksil radikali	$10^{-9}$
$^1O_2$	Singlet oksijen	$10^{-6}$
$RO^{\cdot}$	Alkoksil radikali	$10^{-6}$
$ROO^{\cdot}$	Peroksil radikali	7
$Q^{\cdot}$	Semikinon radikali	Günler
$NO^{\cdot}$	Nitrik oksit radikali	3-5
$ONOO^{\cdot}$	Peroksinitrit radikali	0,05-1

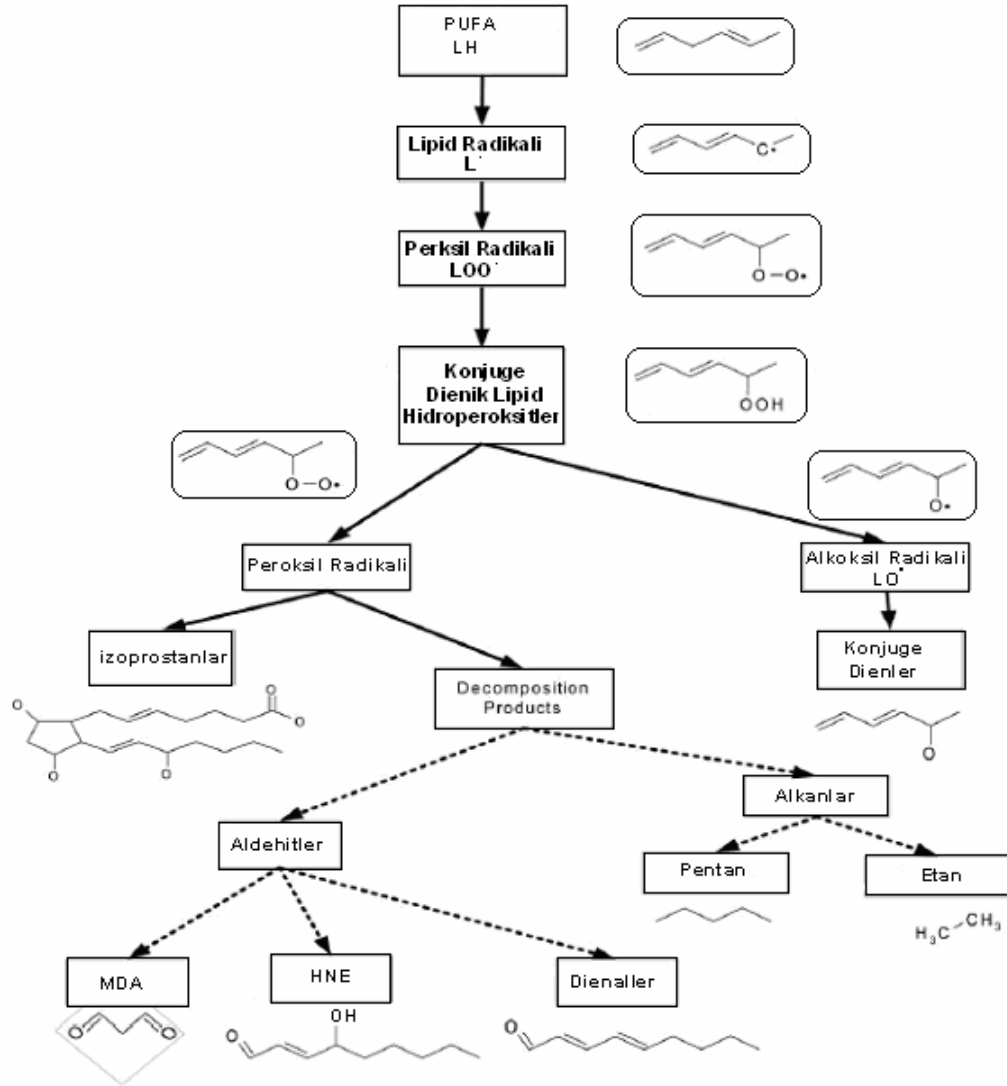
### 2.3. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller, hücrelerin lipit, protein, karbonhidrat , DNA ve enzim gibi bütün önemli bileşenlerine etki ederler. Bu etkiler aşağıda başlıklar halinde açıklanabilir.

#### 2.3.1. Membran Lipitleri Üzerine Olan Etkileri

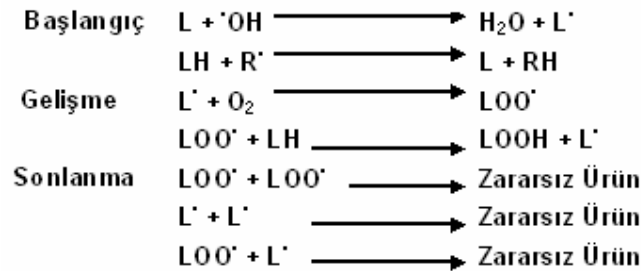
Serbest radikaller, hücrelerin antioksidant savunma kapasitelerini aşan oranlarda oluştuklarında organizmada çeşitli bozukluklara yol açarlar. Hücrelerin reaktif oksijen ürünlerine karşı en hassas komponentleri lipitlerdir. Membran lipitlerindeki doymamış yağ asitlerinin reaktif oksijen ürünleri tarafından oksidasyonu lipit peroksidasyonu olarak bilinir (35). Şekil 2.3.1.1'de Poliansatüre yağ asitlerinin (PUFA) ROS tarafından otooksidasyonunu görülmektedir.

Kronik alkol kullanımında ferröz iyonları ile lipid peroksidasyonu yoğun bir şekilde görülmektedir. Demir iyonlarının kendileri serbest radikal olup ferröz iyonlar, moleküler oksijen ile elektron transfer reaksiyonuna girerler. Herhangi bir kaynaktan süperoksit oluşumu, demir iyonları varlığında fenton reaksiyonu ile  $OH^{\cdot}$  radikali oluşumuna neden olur (47).

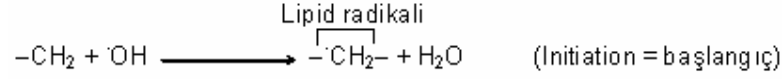


Şekil 2.3.1.1. Lipid peroksidasyonun da meydana gelen reaksiyonlar ve ürünler. L: Lipid, PUFA: Çoklu doymamış yağ asidi, MDA: Malondialdehit, HNE: 4-hidroksinonenal (20).

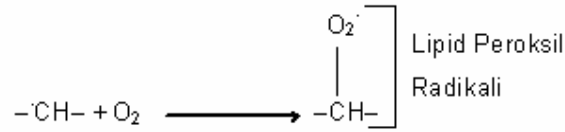
Lipid peroksidasyonu, diğer zincir reaksiyonları gibi üç aşamadan oluşur; Başlama, ilerleme ve sonlanma.



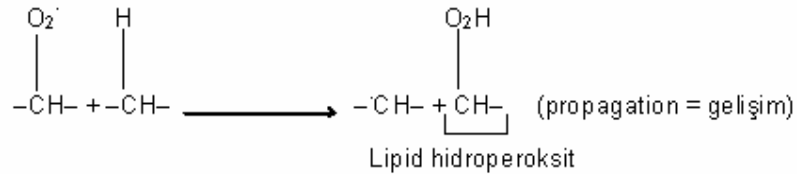
Reaktif oksijen ürünleri membranlara yakın bölgelerde ortaya çıktığında membran fosfolipitlerinin yağ asidi yan zincirlerine saldırmasıyla lipid peroksidasyonu başlar.  $\cdot\text{OH}$  radikali çok doymamış yağ asidi zincirindeki  $\alpha$ -metilen gruplarından bir H uzaklaştırır.



Reaksiyon  $\cdot\text{OH}$  radikalini ortadan kaldırır, fakat membranda C merkezli ( $-\dot{\text{C}}\text{H}-$ ) lipid radikali oluşur. Oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Molekül içi çift bağların pozisyonlarının değişmesiyle konjuge dien yapıları ve daha sonra lipid radikallerinin moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipid peroksit radikali meydana gelir.



Lipid peroksil radikalleri, membran yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitleriyle reaksiyona girerek yeni karbon merkezli radikaller oluştururken, kendileri de açığa çıkan H atomuyla birleşerek lipid hidroperoksitlerine dönüşürler. Böylece olay kendi kendine katalizlenerek devam eder.



Araşidonik asit metabolizması sonucu oluşan serbest radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonuna “enzimatik lipid peroksidasyonu”, diğer radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonuna ise “non enzimatik lipid peroksidasyonu” denir (35).

Lipid peroksidasyonu sonucunda; konjuge dienler, MDA, 4-HNE, akrolein, izoprostanlar ile etan ve pentan gibi alkanlar meydana gelir. Lipid peroksidasyonunun değerlendirilebilmesi için oksidasyon ürünlerinin kantitatif ölçümleri gerekmektedir (48).

*Lipid hidroperoksitler (LOOH);* Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ve iyodometrik testler ile ölçülmektedir (48).

*Konjuge dienler;* iki karbon-karbon çift bağı (C = C) içeren alkenlere “dienler” denir. Konjuge dienler ise çift bağların birer tek bağ (C-C) ile ayrılmış olduğu dienlerdir. Spektrofotometrik olarak 234 nm'deki ölçülürler (48).

.....- C = C - .....C = C - ..... Dien

.....- C = C - C = C - ..... Konjuge Dien

*İzoprostanlar;* Araşidonik asit metabolizması sonucunda COX yoluyla oluşmaktadır. F<sub>2</sub> α-izoprostan (F<sub>2</sub> α-IP)'ların bazı immümmünolojik testler ile ve gaz kromatografisi/kütle spetrometresi (GC/MS) ile ölçülmesi sonucunda tayin edilmektedirler (48).

*MDA Konsantrasyonu;* TBARS testi, GC/MS veya HPLC ile ölçülmektedir (48).

*4-HNE;* HPLC ile ölçülmektedir (48).

*Alkanlar (Pentan ve etan);* GC/MS ile ölçülmektedir (48).

MDA, Protein ve asetaldehite bağlanarak yeni epitoplara oluşumunu sağlamaktadır. Antijen gibi rol oynayan MDA-Protein ve MDA-Asetaldehit (MAA) otoimmün bir komplikasyonun oluşumuna neden olmaktadır. Ayrıca MDA'ya karşı da anti-MDA antikoru oluşmakta ve bu da immün cevabın hızlanmasına neden olur. MAA, proinflatuar mediyatörlerin ve adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu stimüle etmektedir (49).

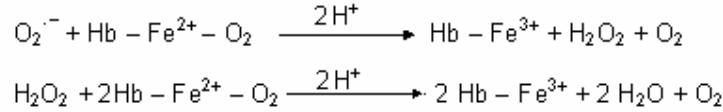


Lipit peroksidleri geçiş metalleri katalizi ile yıkıldığında çoğu zararlı olan aldehitler oluşur. Oluşan aldehitler içinde en çok dikkati MDA ekmiştir. MDA ölçümü ile lipit peroksidasyonun değerlendirilmesi yapılabilmektedir. Bu bileşikler ya hücrel olarak metabolize olurlar ya da başlangıçta etkili oldukları bölgeden diffüze olup hasarı hücrenin diğer bölümlerine yayarlar. L' nin hidrofobik yapıda olması dolayısıyla reaksiyonların çoğu membrana bağlı moleküllerde meydana gelir. LOO• ve aldehitler, membran komponentlerinin çapraz bağlama ve polimerizasyonuna neden olur. Böylece membranlarda, reseptörleri ve membrana bağlı enzimleri inaktive etmek suretiyle membran proteinlerinde de ciddi hasarlar meydana getirebilirler. İyon trasportunu etkileyebilirler. Plazma lipoproteinleri ve özellikle düşük dansiteli lipoproteinlerde oksidasyona uğrayabilirler. Okside lipoproteinler hücre fonksiyonlarının bozulmasına aracılık edebilirler (35).

### **2.3.2. Proteinler Üzerine Olan Etkileri**

Proteinler serbest radikallere karşı lipidlerden daha az hassastır. Etkilenme dereceleri içerdikleri aminoasit kompozisyonuna bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür içeren aminoasitlerden meydana gelmiş proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenir. Karbon merkezli radikaller ve sülfür radikalleri meydana gelir. Proteinlerin lizin, arjinin, prolin ve threonin rezidülerinin yan zincirlerinin metal katalizli oksidasyonu protein karbonil türevlerinin oluşumuna yol açar. Protein karbonil türevleri aynı zamanda  $\alpha$ -amidasyon ve glutamil oksidasyon yolları ile polipeptid zincirlerinin uyarılmasıyla da oluşurlar. Protein karbonilleri sadece proteinlerin direkt oksidasyonu ile değil, aynı zamanda indirgeyici şekerler veya PUFA'nın oksidasyon ürünleri ile proteinlerin fonksiyonel gruplarının etkileşimi ile de oluşabilirler. Böylece protein-protein çapraz bağları da oluşur. Bu reaksiyonlar sonucunda albümin ve immünoglobülin G gibi çok sayıda disülfid bağları içeren proteinlerin tersiyer yapıları bozulur. Yapıları bozulan proteinler normal fonksiyonlarını meydana getiremezler. Enzimler protein yapısında olduklarından enzim aktivitelerinde değişiklikler meydana gelir (50-51).

Heme proteinleri de serbest radikallerden önemli derecede zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin  $O_2^{\cdot-}$  radikali ve  $H_2O_2$  ile reaksiyonu methemoglobin oluşumuna neden olur (32).



### 2.3.3. Karbohidratlar Üzerine Olan Etkileri

Monosakkaridlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, diğer peroksitler ve okzoaldehidler meydana gelir. Okzoaldehitler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. PUFA ve karbohidrat oksidasyonunun bir ürünü olan glyoxal'in hücre bölünmesini inhibe ettiği kaydedilmiştir. Böylece kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar. İnflamatuvar eklem hastalığında bir mukopolisakkarid olan hiyalürinik asidin sinoviyal sıvıda artmış olan  $H_2O_2$  ve  $O_2^{\cdot-}$  ile parçalandığı gösterilmiştir (32).

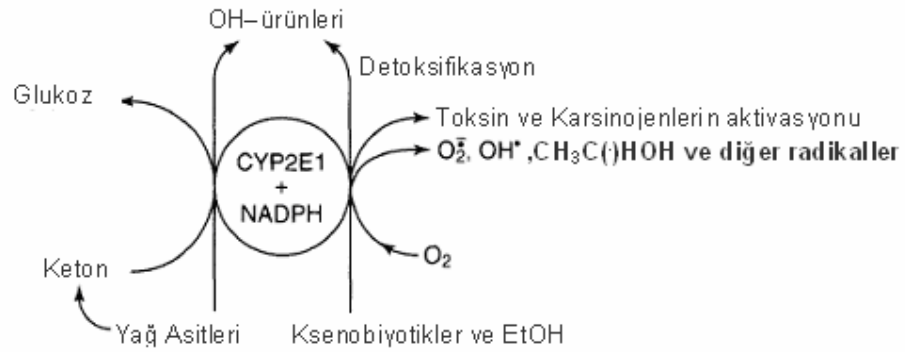
### 2.3.4. Nükleik Asitler Üzerine Olan Etkileri

Reaktif oksijen ürünleri DNA üzerinde de sitotoksik etkiye sahiptir. Serbest radikaller, siklobutan pirimidin dimerleri, dipirimidinler, tek zincir kırılmaları, DNA-protein çapraz bağları oluştururlar. DNA polimerazı inhibe ederler. Hücrede mutasyon ve ölüme yol açarlar (38). Alkolün indüklediği oksidatif stres esnasında makrofajlar tarafından fazla miktarda imal edilerek salgılanan  $NO^{\cdot}$  ve onun oksidasyon ürünleri DNA hasarına bağlı hücre ölümüne yol açar.  $^{\cdot}OH$ , deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere neden olur. Nötrofillerden salınan  $H_2O_2$  membranlardan kolayca diffüze olarak hücre çekirdeğine ulaşıp DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve sonuçta hücre ölümüne yol açabilir (32).  $O_2^{\cdot-}$  'e maruz kalan DNA molekülleri hayvanlara enjekte edildiklerinde daha fazla antijenik yapı gösterdikleri ve sirkülasyonda anti-DNA antikörleri bulunduğu gösterilmiştir (32).

## 2.4. KRONİK ALKOL TÜKETİMİ VE OKSİDATİF STRES

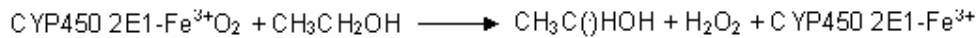
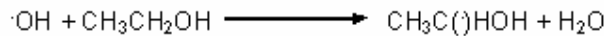
Alkolün neden olduğu karaciğer hasarında serbest oksijen radikallerinin rolü olduğu bilinmektedir. Karaciğerde alkol 3 ayrı enzim sistemi ile okside edilir, bunlar ADH, MEOS ve CAT'dır (1-3, 52-57).

MEOS, CYP450 2E1 komponentine sahip olup endoplazmik retikulumda bol bulunur. CYP450 2E1 indüksiyonunda hidroksietil radikalleri, süperoksit ve hidroksil radikalleri üretilmektedir ve bunlar GSH tüketimi, lipid peroksidasyonu ve hepatotoksinler ile karsinojenlerin aktivasyonuna neden olmaktadır (Şekil 1.2.a) (1-3,52-58).



Şekil 2.4.1. CYP450 2E1'in fizyolojik ve toksik rolü (24).

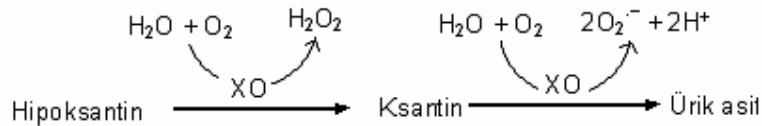
MEOS yolunda üretilen, CH<sub>3</sub>C(•)HOH radikali etanol metabolizması esnasında CYP450 2E1 bağımlı mikrozomal monooksijenaz sistem aracılığıyla üretilir. CH<sub>3</sub>C(•)HOH, etanolün •OH ile etkileşimiyle non-enzimatik olarak üretilirler. CH<sub>3</sub>C(•)HOH, aynı zamanda ferrik CYP450 2E1-O<sub>2</sub> kompleksi (CYP450 2E1-Fe<sup>3+</sup>O<sub>2</sub>) etanolün oksidasyonu ile oluşmaktadır (59).



ADH NADH üretimini arttırma yoluyla intrasellüler redoks statüyü değiştirir ve bu durum mitokondrilerdeki solunum zincirini aktive eder ve böylece mitokondriyal kaynaklı reaktif oksijen ürünlerinin ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $HO_2^{\cdot}$ ,  $CH_3C(\cdot)HOH$ ,  $H_2O_2$  ve  $\cdot OH$ ) jenerasyonunu arttırır (35). Yüksek NADH/NAD<sup>+</sup> oranı ferritinden demirin mobilize olmasına neden olur, açığa çıkan demir  $O_2$  ve  $H_2O_2$  ile etkileşerek  $O_2^{\cdot-}$  ve  $\cdot OH$  radikallerinin oluşumuna neden olur (fenton reaksiyonu). Artmış olan  $\cdot OH$  radikalleri lipid peroksidasyonunu başlatır (55-57, 61-64).

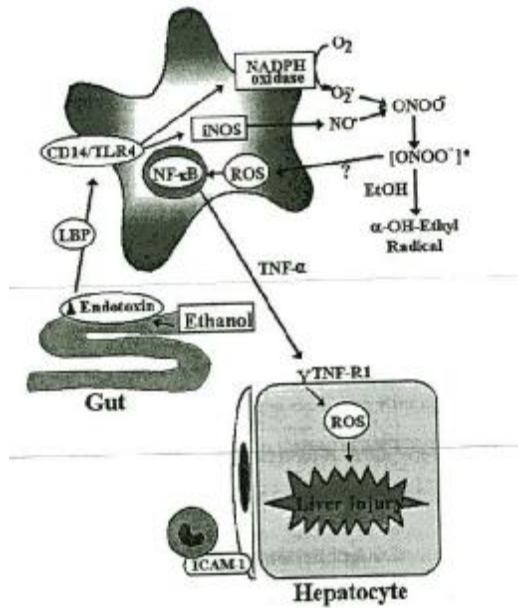
CAT alkol eliminasyonunda en az kullanılan metabolik yol olup sonuçta  $CH_3CHO$  ve  $H_2O$  oluşurken  $H_2O_2$  ise elemine edilir. Literatürlerde geçen hakim kanaat kronik alkol kullanımında katalaz aktivitesinin azaldığı yönündedir, böylelikle sitozolik antioksidan kapasitede bir düşüş görülür (1, 54).

Alkol metabolizmasında sekonder ürün olan asetaldehit proteinlerin tersiyer ve quaternal yapılarını bozmak suretiyle yeni epitoplarn oluşumuna aracılık etmektedir. Lokal inflamasyonla birlikte hücre membranının yapısı bozulmakta ve intrasellüler  $Ca^{++}$  konsantrasyonu artarak aktive olan spesifik proteazlar XD'ı, bir süperoksit üreticisi olan XO'a dönüştürür. Böylelikle serbest oksijen radikallerinin üretimine katkıda bulunurlar (60,65-66).



Asetaldehitin oksidasyonu sonucunda son ürün olarak oksijen radikalleri ortaya çıkar. Kronik alkol alımı sırasında aktive olan nötrofiller ve kupffer hücrelerinin de ROS için ek bir kaynak oldukları bilinmektedir. Asetaldehit oluşması sonrasında lipid peroxidasyonu artmakta ve serbest radikal hasarı kalıcı hale gelmektedir. GSH'a bağlanan asetaldehit,  $H_2O_2$  ile hasar oluşturulmasına karşı GSH'ın koruyucu etkisini azaltmakta ve  $\cdot OH$  oluşumunu arttırmaktadır (5-8, 67).

Alkolik karaciğer hastalığında nötrofil infiltrasyonundan da kaynaklanan NADPH ox enzim aktivitesinin artışı görülmektedir. Bu da  $O_2^{\cdot-}$  üretimini artırır. NOS enzim aktivitesinde görülen artış  $NO^{\cdot}$  ve  $ONOO^{\cdot-}$  artışına neden olmaktadır.  $ONOO^{\cdot-}$ , doğrudan lipid peroksidasyonuna neden olabilir ve DNA hasarına neden olarak hücre ölümüne yol açar. Ortamda artan ROS NF- $\kappa$ B aracılığıyla TNF- $\alpha$  üretimini arttırmaktadır (şekil 2.4.1). TNF- $\alpha$ 'da hepatositlerde inflamasyona neden olarak ROS'ni artırır ve hücreyi apoptoz veya nekroza doğru götürür (9,13,67).



Şekil 2.4.1. Reaktif oksijen ürünlerinin ve TNF- $\alpha$  arasındaki etkileşim (67).

MDA ve 4-HNE asetaldehit ile kompleks oluşturarak, CYP450 2E1'e bağlanıp antijenik yapı oluşturur ve bu antijenik kompleks hücre yüzeyinde eksprese olarak immünolojik yanıt ve sonuçta hepatosit hasarına yol açmaktadır (48,59).

Kronik alkol tüketimi karaciğer  $\alpha$ -tokoferol,  $\beta$ -karoten ve GSH rezervlerinin azalmasına yol açarak, SOD ve CAT gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerini düşürerek, MPO, NADPH ox, COX, XO gibi prooksidan enzim aktivitelerini arttırarak karaciğerin koruyucu antioksidan defans mekanizması üzerinde negatif etki yapar ve alkolün neden olduğu hepatik hasara katkıda bulunur (5-8, 67-68).

## 2.5. ANTiOKSiDAN SAVUNMA

Oksijenli solunum yapan canlılarda aerobik metabolizma sırasında yan ürün olarak oluşan ROS'nin zararlı etkilerini ortadan kaldırmak için organizma güçlü bir savunma sistemine sahiptir. Bu sistem “*antioksidan savunma sistemi*” olarak adlandırılmaktadır. Antioksidanlar lipidlerin yanı sıra proteinler, karbohidratlar ve nükleik asitler gibi makromoleküller üzerinde koruyucu etkiye sahiptirler. Organizmanın yaşamını sağlıklı bir şekilde sürdürebilmesi için oksidanlar ve antioksidanlar arasında bir denge bulunmalıdır. ROS'nin artması veya antioksidan sistem yetersizliği gibi nedenlerle bu dengenin bozulması halinde, serbest radikaller oksidatif stres sürecini başlatmakta ve çeşitli patolojiler gelişmektedir. Gıda gibi organik moleküller içeren ürünlerde ise bozulmaya neden olmaktadır.

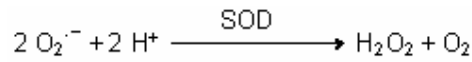
Antioksidanlar etkilerini, ROS'nin oluşumunu önleyerek ve onları temizleyerek gösterirler. Örneğin quercetin hem LOX'ı ve COX'ı inhibe edip ROS'nin oluşumunu engelleyerek hem de oluşan  $\cdot\text{OH}$  ve  $\text{O}_2^{\cdot-}$  gibi radikalleri temizleyerek etkisini gösterir (69-70). Antioksidanları enzimatik ve nonenzimatik ya da endojen ve eksojen kaynaklı antioksidanlar diye sınıflandırabiliriz (Tablo 2.5.1).

Tablo 2.5.1. Biyolojik sistemlerdeki antioksidanlar

Enzimatik	Nonenzimatik	
Süperoksit dismutaz (SOD)	Glutasyon (GSH)	Albümin
Katalaz (CAT)	$\alpha$ -tokoferol (vit E)	Serüloplazmin
Glutasyon peroksidaz (GPer)	Askorbat (vit C)	Transferin
Fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidaz (PLGPer)	$\beta$ -karoten	Ferritin
	Flavonoidler	Laktoferrin
Glutasyon-S-transferaz (GST)	Ürat	Melatonin
Glutasyon redüktaz (GSSGR)	Bilirubin	Sistein

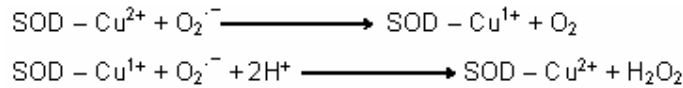
### 2.5.1. Süperoksit Dismutaz (SOD, E.C.1.15.1.1)

Antioksidan savunmanın ilk basamağını  $\text{O}_2^{\cdot-}$ 'in  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'e dismutasyonunu katalizleyen SOD enzimi oluşturur.



Süperoksit dismutaz enzimi, ilk kez 1960 yılında McCord ve Fridovich tarafından memeli dokularında gösterilmiştir (32,71). Memeli hücrelerinde SOD'ın üç tipi bulunmaktadır. Bunlardan ilki sitozolde ve mitokondrial membranın iç bölümünde bulunan dimerik yapıdaki sitozolik Cu-Zn SOD enzimidir. Moleküler ağırlığı 33.000 Da olup 2 bakır ve 2 çinko atomuna sahiptir. İkinci izomer ise mitokondrial matrikste ve kısmen stoplazmada fonksiyon gösteren mitokondrial Mn-SOD'dur. Memeli Mn-SOD'ı 80.000 Da moleküler ağırlığa sahip olup tetramerik yapıdadır. 2 veya 4 Mn atomu içerir. Sitozolik Cu-Zn SOD siyanidle inhibe edilirken, mitokondrial Mn-SOD inhibe olmaz. Her iki SOD'ın katalizlediği reaksiyon da aynıdır. Süperoksitin enzimatik dismutasyonu spontan olanından yaklaşık 4.000 kat daha hızlıdır. Ayrıca 1982 yılında glikoprotein yapısında olan ekstraselluler SOD (EC-SOD) tanımlanmıştır. Moleküler ağırlığı 135.000 Da'dır. Dört eşit subüniti vardır. 4 Cu ve muhtemelen 4 Zn atomu taşır. EC-SOD ve Cu-Zn SOD'ın prostetik metalleri benzemesine rağmen amino asit dizilişi, antijenik özellikleri ve kromozomal yerleşimleri farklıdır (32,39).

$O_2^{\cdot-}$  SOD'ın  $Cu^{2+}$  ve arginin rezidüsünün guadino grubuna bağlanır. Bu bağlanma sonucunda  $O_2^{\cdot-}$ 'ten bir elektron  $Cu^{2+}$  'ye transfer olurken  $Cu^{1+}$  ve  $O_2$  meydana gelir. İkinci bir  $O_2^{\cdot-}$ ,  $Cu^{1+}$  'den bir elektron, bağlanma ortamında ise iki proton alarak  $H_2O_2$  oluşturur. Sonuçta enzim tekrar reaksiyonun başındaki formuna ( $Cu^{2+}$  formu) dönmüş olur.



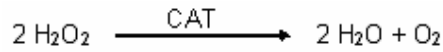
Hem spontan olarak hem de dismutasyonla oluşan  $H_2O_2$ , CAT ve glutatyon peroksidaz (GPer) enzimleri tarafından suya dönüştürülerek detoksifiye edilir.

SOD fagosite edilmiş bakterilerin intrasellüler olarak öldürülmesinde de önemli rol oynar. Bu nedenle SOD granülosit fonksiyonunda çok

önemlidir. Lenfositlerde granülositlerden fazla SOD bulunmamaktadır (32, 36-37).

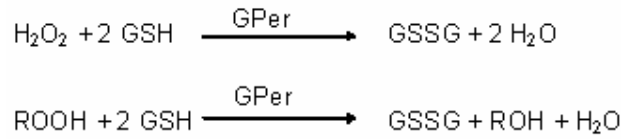
### 2.5.2. Katalaz (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Oksidoredüktaz, E.C.1.11.1.6)

Katalaz yapısında dört tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Sitozolde ve daha çok peroksisomlarda lokalizedir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin O<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O dönüşümünü katalizler. Etkisi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve metil, etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşı gösterir. Büyük molekülü lipid hidroperoksitlerine ise etki etmez (32).



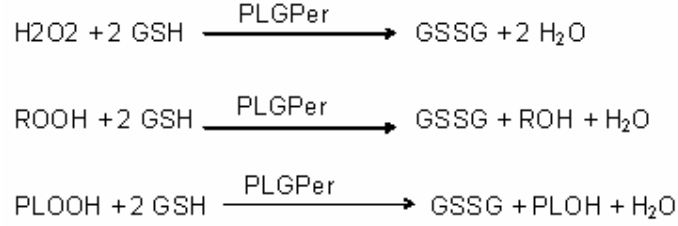
### 2.5.3. Glutasyon Peroksidaz (GPer) (Glutasyon: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Oksidoredüktaz, E.C.1.11.1.9)

Hücrelerde oluşan hidroperoksitlerin detoksifikasyonundan sorumlu bir diğer enzim de GPer'dir. Molekül ağırlığı 85.000 Da'dur. Tetramerik yapıda olup 4 selenyum atomu içerir. Sitozolik bir enzim olan GPer aşağıdaki reaksiyonları katalizler.



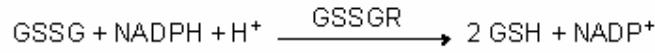
Membran fosfolipid hidroperoksitlerini alkole indirgeyen fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidaz (PLGPer) da selenyum atomu içerir ve monomerik yapıdadır. Sitozolik bir enzimdir. Membrana bağlı antioksidan olan vitamin E'nin yetersiz olduğu durumlarda PLGPer membran peroksidasyona karşı korumasını sağlar. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin yüksek konsantrasyonunda CAT, düşük konsantrasyonunda ise GPer etkin rol oynar (32,35-36).



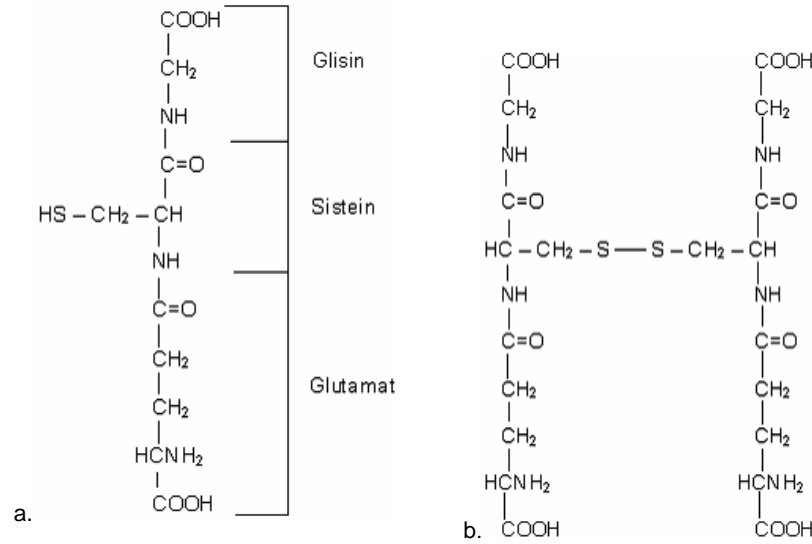


#### 2.5.4. Glutasyon Redüktaz (GSSGR) (NAD:Okside Glutasyon Oksidoredüktaz, E.C.1.6.4.2)

Hidroperoksitlerin redükte olması esnasında meydana gelen okside glutasyon (GSSG), glutasyon redüktazın (GSSGR) katalizlediği reaksiyonla tekrar redükte hale (GSH) dönüşür. Reaksiyonun gerçekleşmesi için NADPH'ya ihtiyaç vardır (37,72).



#### 2.5.5. Redükte Glutasyon (GSH)

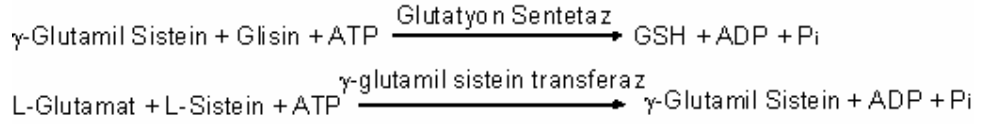


Şekil 2.5.5.1.a. Redükte glutasyonun (GSH) yapısı ve b. Okside glutasyonun (GSSG) yapısı

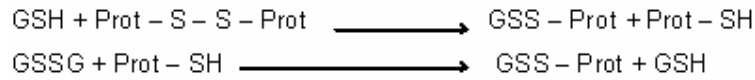
Redükte glutasyon, yapısında glutamik asit, sistein ve glisin bulunduran bir tripeptit olup aktif bir (-SH) grubuna sahiptir (Şekil 2.2.5.a). Vücuttaki GSH'nın büyük bölümü karaciğerde iki aşamada sentezlenir.

GSH; L-glutamat, L-sistein ve L-glisin aminoasitlerinden 2 mol ATP kullanılarak iki basamaklı bir reaksiyonla  $\gamma$ -glutamil sentetaz ve glutatyon sentetaz enzimlerinin katalizi ile sentezlenir ve periferde kullanılmak üzere karaciğerden kana salınır (73).

Vücutta enzimatik olmayan en önemli antioksidandır. Reaktif oksijen ürünleri ile reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Ayrıca, proteinlerdeki -SH gruplarını redükte halde tutarak bu grupları oksidasyona karşı muhahaza eder. Böylece, proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonuna engel olur. Ksenobiotiklerin detoksifikasyonuna ve amino asitlerin membranlardan geçişini sağlar (32, 73,74).

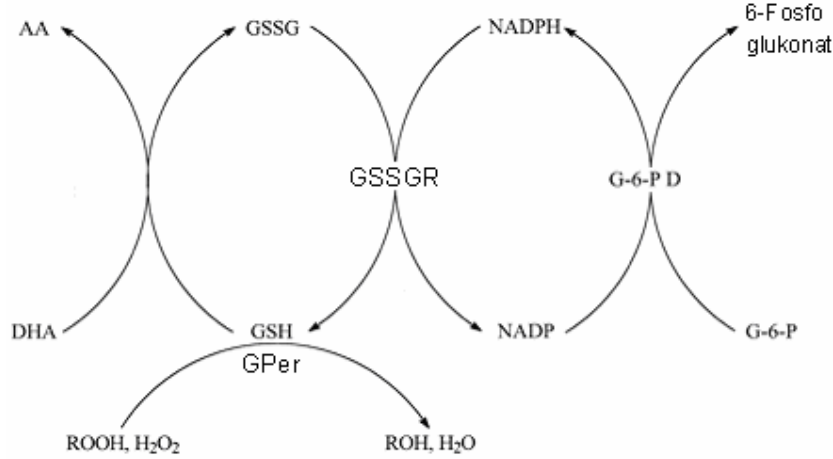


Redükte ve okside glutatyon proteinlerin sülfidril grupları (prot-SH) veya disülfidlerle (prot-S-S-prot) değiş tokuş reaksiyonuna girebilirler ve sonuçta karışık disülfidler oluşur.



GSH hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşmesini önler (72,75). Eritrosit zarını  $\text{H}_2\text{O}_2$  'den, lökositleri fagositozda kullanılan oksidan maddelerden ve lens proteinlerini oksidatif hasarlardan korur (32).

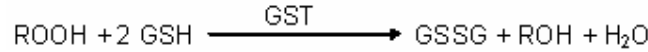
GSH'ın oksidasyonu sonucu oluşan GSSG, NADPH kullanılarak GSSGR enziminin katalizi ile tekrar redükte hale dönüşür (Şekil 1.3.5.c).



Şekil 2.5.5.2. Glutasyon redoks döngüsü. DHA; Dehidroaskorbat, AA; Askorbik asit, GSH; Redükte glutasyon, GSSG; Okside glutasyon, GSSGR; Glutasyon redüktaz, ROOH; Organik peroksitler, ROH; organik alkoller, G-6-P; Glukoz-6-Fosfat, G-6-PD; Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz.

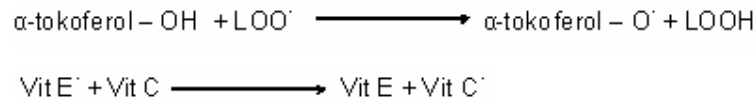
### 2.5.6. Glutasyon -S transferaz (GST)

GST ksenobiyotiklerin biotransformasyonunda önemli rol oynayan dimerik bir enzimdir. İlk defa 1961 yılında tanımlanmış olup bu güne kadar bir çok izoenzimi bulundurmuştur. GST, çok doymamış yağ asidi (örn: araşidonik asit ve linoleik asit) hidroperoksitlerine karşı selenyum bağımsız GPer aktivitesi göstererek bir defans mekanizması oluşturur (32,76).



### 2.5.7. Vitamin E

Antioksidan savunmanın diğer önemli kısmını lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını kıran antioksidanlar oluşturur. Vitamin E bunların en önemlilerinden biridir. Yağda eriyen vitaminlerdendir. Tokoferol yapısında olup doğal olarak alfa, beta, gama, delta, eta ve zeta gibi şekillerde bulunur. Antioksidan aktivitesi en yüksek olan tokoferol  $\alpha$ -tokoferoldür. Hücre membranları ve plazma lipoproteinleri, lipidde eriyebilen bir molekül olan alfa tokoferole sahiptir (32,34,77-78).



Vitamin E konsantrasyonları mitokondri ve mikrozomlar gibi membrandan zengin hücre fraksiyonlarında bulunur (32,34).

### 2.5.8. Vitamin C (Askorbik Asit)

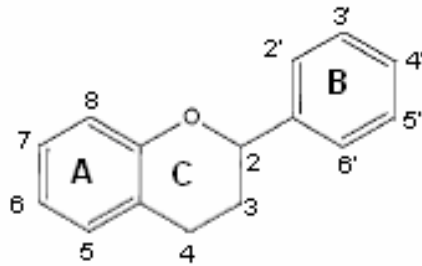
Suda eriyebilen vitaminlerden olan vitamin C, özellikle taze sebze ve meyvelerde bol bulunur. Isıya dayanıksız, dondurulmağa ise dayanıklıdır. Plazma konsantrasyonu 0.5-1.5 mg/dl kadardır (32,78).

Organizmada birçok hidroksilasyon reaksiyonda indirgeyici ajan olarak rol oynar. Güçlü indirgeyici aktivitesinden dolayı güçlü bir antioksidandır.  $O_2^-$  ve  $\cdot OH$  radikallerini temizler. C vitamini antioksidan özelliğinin yanında oksidan özelliğine de sahiptir.  $Fe^{3+}$  'ü  $Fe^{2+}$  'ye indirger (32,34).

### 2.5.9. Flavonoidler

#### 2.5.9.1. Yapı ve oluşumları

Sarı renkli olmaları nedeniyle latince sarı anlamına gelen "flavus" sözcüğünden türetilerek flavonoid adını alan bu bileşikler 15 C atomlu 2-fenil benzopiron (difenil propan) yapısı gösterirler ( $C_6- C_3- C_6-$ ) (Şekil II.3.9.1.a). Bu yapıları nedeniyle polifenolik bileşikler olarak kabul edilirler (45), iskelet yapılarına göre kalgon, flavonol, flavon, flavanol gibi çeşitli türleri vardır. P vitamini olarak kabul edilirler (21-22,28,79-80).

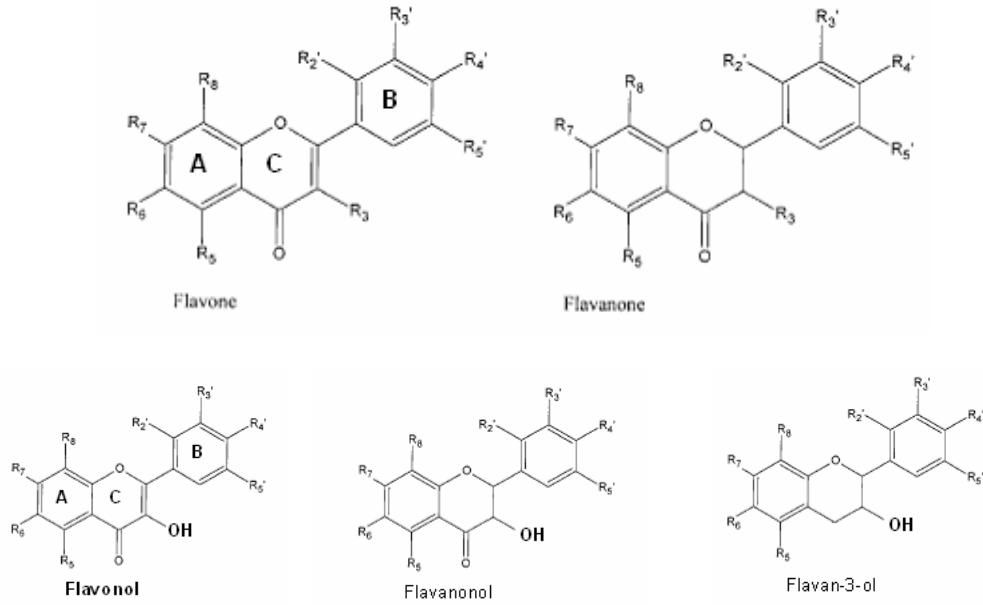


Temel Yapı

Şekil 2.5.9.1.1. Flavonoidlerin temel yapısı (28'den modifiye edilerek).

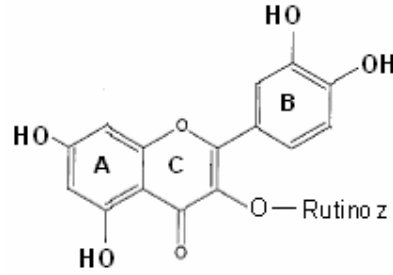
Flavonoidler, bitkisel gıdalarda bol ve yaygın olarak bulunan bileşiklerdir. Bitkilerin ikincil metabolitlerdendir. Fotosentezle oluşan ve

yaşamsal gereksinimleri için kullandıkları karbohidratlar, aminoasitler gibi birincil metabolitlerden türerler. Flavonoidler A, B, ve C halkalarından meydana gelmiştir (Şekil 2.5.9.1.1). A halkası glukoz metabolizmasından meydana gelen asetil koenzim-A üzerinden sinamik asit gibi fenil propanid bileşiklerinden oluşmuştur (21-22). Karbon isketinde numaralarla gösterilen yerlere –OH veya H'in bağlanmasına göre çeşitli flavonoidler meydana gelmiştir (Şekil 2.5.9.1.2).



Şekil 2.5.9.1.2. Çeşitli Flavonoidler (28)

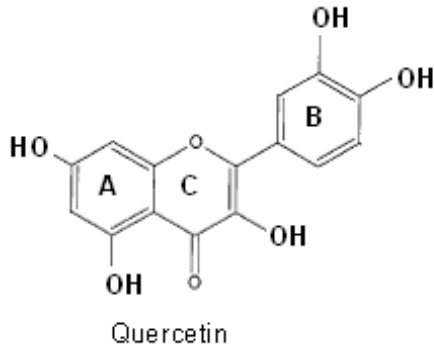
Sayılarının yaklaşık 4000'in üzerinde olduğu tahmin edilen flavonoidler çay, kırmızı şarap, elma, soğan ve baklagillerde bol miktarda bulunmaktadır. İnsan diyetiyle günlük ortalama tüketiminin 1 g olduğu sanılmaktadır. Karbon iskeletine bağlı –OH gruplarına şeker, metil, sülfat vb. grupların konjügasyonu ile farklı türleri meydana gelmektedir. Örneğin bir flavonol olan quercetine rutinozun bağlanmasıyla rutin oluşur (şekil 2.5.9.1.3) (21,23-27).



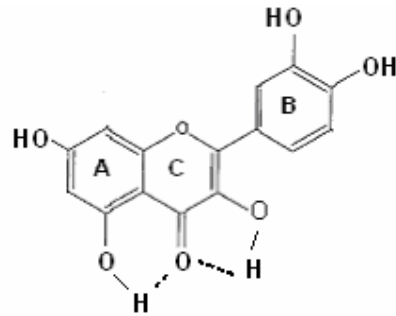
Şekil 2.5.9.1.3. Rutinin yapısı

### 2.5.9.2. Quercetin:

Flavanol iskeletinde 3,5,7,3',4' C atomlarına –OH gruplarının substutisyonu ile oluşur (Şekil 2.5.9.2.1.a ve b). İnsanların diyetle aldıkları günlük quercetin miktarının ortalama 50-500 mg olduğu sanılmaktadır (23). İntravenöz olarak verilen quercetin için yarı ömrü  $\alpha$  fazı için  $8.8 \pm 1.2$  dk,  $\beta$  fazı için  $2.4 \pm 0.2$  saat (üstün yarı ömrü)'tir. % 98 oranında proteinlere bağlı olarak taşınır. Plazma seviyesi 20-40 dakikada çok azalır, 54 dakikada ise tespit edilemeyecek seviyeye düşer (82). Flavonoidler ve quercetin gıdalarda genellikle glikozid şeklinde bulunan büyük molekülü yapılarıdır. Bu özelliklerinden dolayı bağırsaklardan emilimi zordur. Yaklaşık % 1'i bozulmadan, büyük kısmı ise metabolize edilerek 3,4,dihidroksifenilasetik asit ve m-hidroksifenilasetik asit olarak idrarla atılır (23, 82).



Şekil 2.5.9.2.1.a. Quercetin yapısı



b. Quercetin'in serbest radikal yakalama bölgeleri

### 2.5.9.3. Flavonoidler ve Quercetin'in Canlılar Üzerindeki Etkileri

Flavonoidler ve flavonoidlerin bir üyesi olan quercetin'in canlılar üzerindeki klinik etkilerini şu şekilde özetleyebiliriz;

- a. Antitümöral etki (23,28,30,34,90-91),
- b. Antiviral etki (23,28,30-34),
- c. Antibakteriyal etki (28),
- d. Antiinflamatuvar etki (28,83-85),
- e. Antitrombotik etki (28,91),
- f. Vazodilatasyon etki (28,34),
- g. Antiallerjik etki (28,30,34),
- h. Hücresel immünitinin stimülasyonu etki (28,34),
- i. Antiiskemik etki (28),
- j. Antiaterosklerotik etki (21,28,88,92-99),
- k. Antihistaminik etki (28,100),
- l. Antidiyabetik etki (insulin salımının stimülasyonu).
- m. Antioksidan etki (serbest radikalleri tutma ve zincir kırıcı etkisi)
- n. Antiosteoporotik etki (28,101).

Flavonoidler antioksidan özelliklerini gösterebilmek için serbest radikallerle reaksiyona girerek onları etkisiz hale getirmektedir. Quercetin'in serbest radikallerle ilgili etki mekanizmalarını şu şekilde açıklayabiliriz;

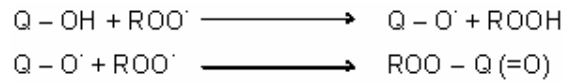
- a. Süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ) (21,102), singlet oksijen ( $^1O_2$ ) ve hidroksil ( $\cdot OH$ ) radikallerini temizler (24,26,102-106).
- b. Peroksil ( $ROO\cdot$ ) radikalini ve alkoksil ( $RO\cdot$ ) radikalini yakalar ve lipid peroksil ( $LOO\cdot$ ) zincirini kırar (25-26,69,93,96,106,108-109).
- c. Ksantin oksidazı inhibe eder (28,34,104).
- d. Siklooksigenazı ve lipoksigenaz enzim aktivitelerini inhibe eder (26,112).
- e. Demir ve bakır gibi geçiş metallerini şelatlar (21,105).
- f. Enzim fonksiyonlarına bağımlı kalsiyum modülasyonu ile hücresel regülasyonda önemli bir rol oynayan küçük bir asidik protein olan kalmodülini inhibe eder (21,23).
- g. Protein kinaz enzimini inhibe eder (23).
- h. Laktat transportunu engeller (23).
- i. Vit.C absorpsiyonunu artırır (104).

j. Dehidroaskorbatın askorbata redüksiyonunu sağlar (104).

Flavonoidlerin serbest radikal yakalama ve antioksidan özellikleri yapılarında bulunan 3 gruptan ileri gelmektedir. Bu yapısal gruplar şunlardır:

- B halkasındaki o-dihidroksi (kateşol) grubu (radikal hedef yeri).
- C halkasındaki 4-okzo grubu ile 2-3 çift bağı (elektron delokalizasyonu için gerekli)
- 3 ve 5 hidroksil grupları (maksimal radikal yakalama ve metal şelatlama için gerekli).

Bu üç yapısal özellik serbest radikal yakalama ve antioksidan güç için çok önemlidir. Bu gruplar Şekil 3.9.d'de quercetin üzerinde koyu olarak görülmektedir. Quercetin lipit peroksil radikali ile reaksiyonunu şu şekilde gösterebiliriz.



Quercetin (Q-OH) lipit peroksil radikali (ROO) ile reaksiyona girerek onu indirgerken kendisi radikal yapı (Q-O) oluşturmaktadır. Quercetin radikali daha kararlı bir radikal olup ikinci bir lipid radikali ile reaksiyona girerek radikal olmayan bir bileşik meydana getirmektedir (93,104,106,109).

#### 2.5.9.4. Quercetin Lipofilik ve Hidrofilik Antioksidanlarla İlişkiler

Quercetin lipofilik bir antioksidandır, fakat  $\alpha$ -tokoferolden daha hidrofiliktir.  $\alpha$ -tokoferolün kroman halkası membran fosfolipidlerinin ester karbonil gruplarıyla hidrojen bağı yaparak stabilize olup membran içine lokalize olurken daha hidrofilik olan quercetin muhtemelen membranın polar yüzüne yakın şekilde lokalize olmaktadır. Quercetin orada sulu peroksil radikallerini kolayca yakalamakta ve böylece lipit peroksil radikallerine  $\alpha$ -tokoferolden daha hızlı şekilde etki etmektedir. Bu şekilde quercetin  $\alpha$ -tokoferol tüketimini önlemektedir. Quercetinden daha lipofilik bir antioksidan olan askorbik asit de



quercetin gibi membranın polar yüzünde lokalize olmuştur. Askorbik asitin sulu oksijen radikallerini temizleyerek lipid peroksidasyonunu önlediği bildirilmektedir (113). Özetle quercetin ve askorbik asit membranın yüzeyindeki serbest radikalleri temizlerken,  $\alpha$ -tokoferol membranın içindeki serbest radikalleri temizlemektedir. Bu üç antioksidanın serbest radikaller üzerine etkilerinin sinerjik olduğu görülmüştür. Quercetin ve askorbik asit  $\alpha$ -tokoferol radikalini rejenere etmektedir. Askorbik asit quercetin radikalini de rejenere etmektedir. Oluşan askorbil radikalide GSH tarafından askorbata dönüştürülür. Quercetin radikali GSH tarafından redükte edilmektedir. Quercetin askorbik asit ve  $\alpha$ -tokoferolden daha güçlü bir antioksidan olduğu ileri sürülmektedir (81).

## 2.6. SİTOKİNLER

### 2.6.1. Sitokinlerin Tanımı

Bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde, yangısal ve immünolojik olayların seyri esnasında makrofaj ve lenfositlerden hormon benzeri, birbirleri üzerinde çeşitli etkileri olan birçok mediatör salınır ki bunlara “sitokin” denir. Hücre kaynaklı ve çözünebilir moleküller oldukları için “sitokin” olarak adlandırılmaktadırlar. T ve B lenfositler tarafından üretilen sitokinlere “lenfokinler” denir. Monositler veya makrofajlar tarafından üretilen ve immün sistem hücreleri arasında iletişimi ve aktivasyonu sağlayan mediatörlere ise “monokinler” denir. Bu mediatörlerin görevi yangısal reaksiyonlarda, hücreler arası sinyaller ile tepkinin düzenlenmesidir. Sitokinler, yangıyı ve bağışıklığı, lökositlerin gelişmelerini, hareketlerini ve farklılaşmalarını sağlayarak düzenlerler. Lökositler arasında etkileşim yapan sitokinler “İnterlökin” adı altında toplanmışlardır (9,13,114-116).

### 2.6.2. Genel Özellikleri

Polipeptid veya glikoprotein yapıda olan sitokinlerin molekül ağırlıkları 8-110 kDa arasındadır. Sadece mast hücreleri ve trombositlerdeki transforming

growt faktör-beta (TGF- $\beta$ ) depolanabilmektedir. Sitokinlerin etki alanları çoğunlukla sınırlıdır (otokrin, parakrin veya jukstakrin).

Sitokinler etkileşimlerini kompleks bir etkileşim ağı şeklinde düzenlemektedirler. Sitokin etkileşim ağı çeşitli yollarla kontrol edilmektedir. Sinerjistik veya antagonist etki gösteren ve çok sıkı kontrol edilen sitokinlerin üretimi sürekli olmamaktadır. Diğer sitokinlerin üretimini uyaran veya engelleyen sitokinler kendilerinin veya diğer sitokin reseptörlerinin ekspresyonunu düzenlemektedirler. Spesifik bir reseptöre bağlanabilen reseptör antagonistleri, ileti gönderememektedir. Sitokin bağlayıcı reseptörleri eksprese eden bazı hücreler, ligand bağlayabilmekte fakat ileti oluşturamamaktadırlar. Sitokin reseptörlerinin ayrılan ekstraselüler bölgeleri çözülmüş sitokin molekülünü bağlayabilmektedir. Çözülmüş reseptörler serum ve idrarda saptanabilmektedir. Sitokin etkileşim ağının çoklu fizyolojik rolü bulunmaktadır. Organlar arasındaki iletişimde çoğunlukla sitokinler aracılık etmektedir. Doğrudan etkilere ek olarak immün sistem, sinir sistemi ve endokrin sistemlerin entegrasyonunda işlev görmektedirler. Etkileri çoğunlukla bölgesel olan sitokinler, kan dolaşımına salınarak sistemik etki de gösterebilmektedirler. IL-1, TNF- $\alpha$  ve IL-6 gibi sitokinler hipotalamus ve hipofize doğrudan etkilidirler (9,13-14,114-118).

Sitokinlerin ortak özelliklerini aşağıdaki gibi sıralayabiliriz;

- a. Sitokinler, doğal ve spesifik bağışıklık olayları sırasında üretilirler, bağışık ve yangısal cevapların sağlanmasında ve regülasyonunda etkilidirler.
- b. Genellikle bir reaksiyon sırasında salgılanan ve depolanamayan mediatör maddelerdir.
- c. Bir çok farklı hücreden sentezlenen ve çoğu birbirinden değişik maddelerdir.
- d. Sitokinler aynı anda birden fazla hücre üzerinde etkilidirler. Bu özellikleri, *pleiotropism* olarak isimlendirilmektedir.

- e. Sitokin fonksiyonları genellikle birbirini andırmakla birlikte çok fazladır.
- f. Sitokinler genellikle immün sistemin regülasyonunda etkili olan bir diğer mediatör maddenin (sitokinin) sentezini veya inhibisyonunu sağlayarak birbirleri üzerinde de etkiye sahiptirler.
- g. Sitokinler, polipeptid hormonlar gibi hedef hücreler yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanmayı sağlayarak diğerlerinin fonksiyonlarını başlatırlar.
- h. Sitokin reseptörlerinin çoğu, spesifik sinyallerle düzenlenir. Bu etkilerini, diğer sitokinleri bu reseptörlere bağlayarak pozitif veya negatif uyarım yaparak gösterirler.
- i. Sitokinlerin çoğu hedef hücreler için büyütme ve/veya bölünme regülatörleri olarak etkirler.

### 2.6.3. Yapıları

Yapılarında karbohidrat ve disülfid köprülerinin bulunması sitokinlere çözünebilme ve parçalanmaya dirençli olma özelliği kazandırmaktadır. Monomer, dimer ve trimer yapıda olabilirler. Sitokinler  $10^{-10}$  ve  $10^{-15}$  M konsantrasyonlarda biyolojik olarak aktiftirler ve genellikle sekrete edildikleri bölgede etkili olurlar. Bazıları uzak mesafelerde de etkili olabilirler. Kan dolaşımı ile hedef hücrelere taşınan sitokinlerin endokrin, parakrin, otokrin ve jukstakrin etkileri bulunmaktadır (14,114-115,117-118).

### 2.6.4. Sentez ve Salınmaları

Sitokinlerin çoğu propeptid olarak kodlanmaktadır. Sentezlenen sitokin amino ucu ile golgi sistemine yönelmekte ve glikoprotein yapıda olanlar glikozillenmektedir. Sinyal peptidin kopması ile olgunlaşmış protein olarak salgılanmaktadır.

Her sitokini bir mRNA kodlamaktadır. Sitokin üretimi ve yanıtın büyüklük derecesi genetik düzeyde kontrol edilmektedir. Sitokin üretimini uyarıcı etkenler arasında bakteri ve ürünlerinin yüzeylere tutunması,

kompleman bileşenleri, konak hücre stres proteinleri, değişikliğe uğramış hücre yüzey adhezinleri bulunmaktadır. Bunların dışında, ROS ve lipid peroksit ürünleri de sitokin üretimini uyarmaktadır.

Sitokinler, immün sistem ve immün sistem dışı hücrelerden salgılanmaktadır. Sentezlandıkları immün sistem hücreleri arasında monosit/makrofaj, T lenfositler, B hücreleri ve doğal öldürücü hücreler (NK) bulunmaktadır. İmmün sistem dışındaki hücreler arasında böbrek peritübüler hücreler, kuppfer hücreleri, hepatositler, fibroblastlar, endotel hücreleri, kemik iliği stroma hücreleri, sertoli hücreleri, tipik epitel hücreler, mast hücreleri, nöronal hücreler, artrositler, hipofiz hücreleri, kas hücreleri, keratinositler kondrositler, osteoblastlar ve osteoklastlar yer almaktadır (14,114-118).

### 2.6.5. Sınıflandırılmaları

Sitokinler, genel özellikleri, işlevleri, aile grupları ve primer fonksiyonları gibi özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır (Tablo 2.4.5). Etkilerindeki çeşitlilik nedeniyle bir sitokin birkaç grubun üyesi olabilmektedir.

**Tablo 2.6.5.1.** Sitokinlerin sınıflandırılması (115)

<b>Elgert'in Aile Gruplarına Göre Sitokinler</b>	
İnterlökinler	IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-14, IL-15
Kemokinler	IL-18, MCP-1
İnterferonlar	INF- $\alpha$ , INF- $\beta$ , INF- $\gamma$
Sitotoksik/İmmüno düzenleyici/Büyüme faktörleri	TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , TGF- $\beta$
Koloni Uyarıcı Faktörler	G-CSF, GM-CSF, M-CSF, IL-3, IL-7
<b>Genel Özelliklerine Göre Sitokinler</b>	
Doğal İmmüniteye Aracılık Edenler	Tip 1 İnterferonlar, TNF, IL-1, IL-6, Kemokinler
Lenfosit Aktivasyonu, Büyüme ve Farklılaşmasını Düzenleyenler	IL-2, IL-4, TGF- $\beta$
İnflamatuvar Yanıtı Düzenleyenler	INF- $\gamma$ , Lenfotoksin, IL-5, IL-10, IL-12, Göçü Önleyici Faktör (MIF)
<b>Lökosit Hareketini Düzenleyenler</b>	
Kemokinler	IL-8, Eotaksin, Makrofaj İnflamatuvar Protein-1 $\alpha$
Hematopoezi uyarıcılar	C-kit Ligand, IL-3, IL-7, G-CSF, GM-CSF, M-CSF
<b>Primer İşlevlerine Göre Sitokinler</b>	
Proinflamatuvar Sitokinler	TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8 ve diğer Kemokinler, IL-12, IL-15, IL-18
Antiinflamatuvar Sitokinler	TGF- $\beta$ , IL-10
İmmüno stimülatuvar Sitokinler	
Hücre sel yanıt larda	IL-2, INF- $\gamma$
Allerjik ve humoral yanıt larda	IL-4, IL-13, TGF- $\beta$

### 2.6.6. Etkileri ve Etki Mekanizmaları

Sitokinler büyüme faktörlerinin izledikleri hücrel yollarda etki gösterebilmektedir. Sitokine özgün reseptör aileleri bulunmakta ve büyüme faktörleri reseptörlerinden farklı olarak intraselüler bölgelerinin katalitik aktiviteleri bulunmamaktadır. Sitokin-Reseptör kompleksleri, stoplazmada bulunan reseptöre kovalent olmayan bağlarla bağlı protein tirozin kinaz (PTK)'ları aktive etmektedirler. Aktive olan bu tirozin kinazlar (Janus kinazlar, JAK; Src protein) reseptörün hücre içi bölgesini fosforillemektedir. Hücrel SH2 bölgesi içeren sinyal iletici moleküllerin (STAT) fosforillenmiş reseptöre bağlanarak aktiflenmeleri ile hücrel ileti yolu başlamaktadır (14,114-120).

Sitokinlerin birbiri ile ilişkili olarak gösterdikleri başlıca etkileri;

- a. Lenfoid hücrelerin ve diğer bazı hücrelerin çoğalma ve farklılaşmasını sağlamak;
- b. İmmün cevabı şiddetlendirmek veya baskılamak yoluyla regüle etmek;
- c. İnflamasyon olaylarına katılan hücreleri aktive etmek, reaksiyon yerine toplayarak orada tutmak, çeşitli biyolojik etkinlik göstermek;
- d. Kemik iliğine etki ile hematopoetik regülasyona katılmak;
- e. Bazı hipofiz hormonlarının ve diğer biyolojik maddelerin sentez ve salınmalarına neden olmak;
- f. Ateş ve akut faz cevabını oluşturmak;
- g. Antiviral etkinlik (bazı sitokinler için)

### 2.6.7. Proinflamatuvar Sitokinlerin Sistemik Etkileri (14,17,114,116-117)

- a. Hücre aktivasyonu ve çoğalması
- b. Nötrofili
- c. Sitokin havuzunun giderek büyümesi
- d. Nöropeptid salınımı ve hipotalamik-adrenal eksenin aktivasyonu
- e. Ateş
- f. Adhezyon moleküllerinin sentezlenmesi

- g. Kapiller geçirgenliğin artması
- h. Kemotaksis
- i. Kompleman aktivasyonu
- j. Araşidonik asit turevlerinin sentezlenmesi
- k. Endotelde prokoagulan aktivasyonun indüksiyonu
- l. Hipotansiyon ve şok

### 2.6.8. Tümör Nekrozis Faktör (TNF)

TNF, sistemik inflamatuvar aktivitelerinin yanısıra lokal yangı oluşturmada etkili, lenfoid ve lenfoid olmayan organlar üzerinde çok çeşitli etkileri olan, moleküler yapıları birbirinden ayrı özellikte, farklı iki peptidten ibaret olup 20-50 kDa'luk homotrimer yapıdadırlar. Bunlar; TNF- $\alpha$  (cachectin, 17400 ma) ve TNF- $\beta$  (lympotoxin, 20000 ma) olarak bilinir. İkiisi de birbirleriyle yakından ilişkili proteinlerdir. Her iki TNF, hücelere aynı reseptöre bağlanır ve birçok ortak biyolojik aktiviteye sahiptirler.

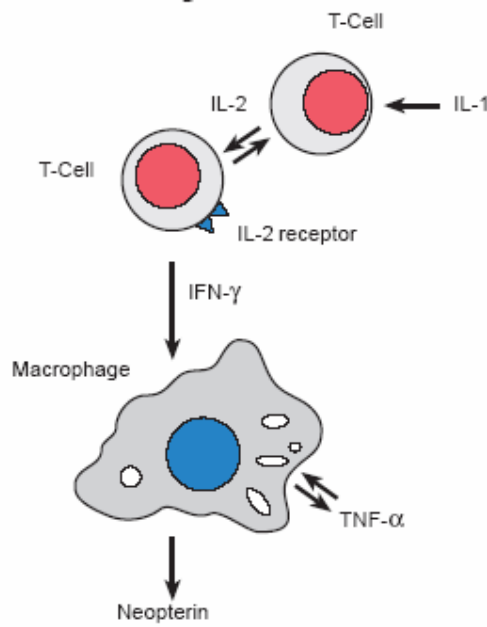
TNF- $\alpha$ , Tip-II membran proteini olarak da bilinir ve 157 aminoasitlik tek polipeptid zincirinden oluşmuştur. İnsanlarda TNF- $\alpha$  geni 6. kromozomda lokalizedir (6p21.3) ve 4 ekson, 3 intron içermektedir. Aktif makrofajlar ve T lenfositleri tarafından sentezlenir (114). Bazı kaynaklarda, B hüceleri, makrofajlar, NK hüceleri, keratinositler, astrositler, kuppfer hüceleri, fibroblastlar, nötrofiller, mast hüceleri, eozinofiller ve epitelyal hücelerden de sentezlendiği belirtilmektedir.

TNF- $\beta$ , T lenfositlerinden sentezlenir ve lenfotoksin olarak isimlendirilir. Hedef hücelere üzerinde sitotoksik etki gösterirler. Langerhans hüceleri tarafından da sentezlenmektedir.

TNF'nin, Tip-I ve Tip-II olmak üzere iki reseptörü vardır. Tip-I sitotoksik aktiviteyi ve fibroblast proliferasyonunu, Tip-II ise T hücre proliferasyonunu hızlandırır. Tip-II çok daha yüksek afiniteye sahiptir (14,17-18,114-117).

Fitohemaglutinin, LPS, ROS, mikoplazmalar ve bazı virüsler makrofajları uyararak TNF- $\alpha$  sentezletirler. Monositler IL-1 ile uyarıldıktan 4 saat sonra TNF- $\alpha$  üretirler. TNF- $\alpha$  salınımı INF- $\gamma$  tarafından da artırılır (Şekil 2.6.8.1) (17-18,114).

En önemli etkileri; inflamatuvar, immün cevabı güçlendirme ve tümör nekrozudur. IL-1 ile birlikte inflamasyonun temel mediatörüdür (14,17-18).



Şekil 2.6.8.1. Makrofajlardan TNF- $\alpha$ 'nın salınması

TNF'nin fonksiyonlarını maddeler halinde sıralayacak olursak (14,17, 114-120);

- a. Ateş yapıcı etkinlik
- b. Hepatosit aktivasyonu (akut faz proteinlerinin sentezi)
- c. Endotel hücresi ve makrofaj aktivasyonu
- d. Osteoklast aktivasyonu
- e. kaşeksi; Lipoprotein lipazın inhibisyonu ile eksojen trigliseridlerin akümülyasyonunu önleyerek
- f. IL-1, IL-6 ve IL-8 ile birlikte araşidonik asit türevlerinin sentezinin indüksiyonu
- g. Nötrofil adhezyonunun artması

- h. Anjiyogenez
- i. MHC klas-I antijen ekspresyonunun indüksiyonu
- j. Fibroblast ve mezenşimal hücre proliferasyonu
- k. Hipotalamik aktivasyon (glukokortikoid salınımı)
- l. Sinovyal hücre aktivasyonu (kollajenaz sentezi)
- m. Trombodülin ekspresyonunun inhibisyonu (Trombinin aktivatör Protein C'ye dönüşümünün inhibisyonu)
- n. Nöronların çoğalması ve fonksiyonlarının regülasyonu
- o. T hücre aktivasyonu ve B hücre proliferasyonunun indüksiyonu (Ig yapımı)
- p. Apoptozun indüksiyonu
- q. Adhezyon moleküllerinin [ICAM-1 (intraselüler adhezyon molekül-1), VCAM-1 (vasküler adhezyon molekül-1) ve ELAM-1 (Endotelyal adhezyon molekül-1)] ekspresyonunda artış
- r. TNF- $\alpha$  düzeyinin ölçümü, transplant çalışmalarında da kullanılmaktadır. Böbrek ve kemik iliği naklinin reddedilmesi durumunda TNF- $\alpha$  düzeyi artar.
- s. TNF- $\alpha$  düzeyinin hastalarda artması *septicemia* ve *meningococcal* hastalıklarda ölümlle sonuçlanır. Belirtileri, hipotansiyon, nötropeni ve kapiller geçirgenliğin artmasıdır.

### 2.6.9. İnterferonlar (IFN)

IFN, virüsler, hücre içi paraziti olan diğer mikroorganizmalar, bakteri endotoksinleri, mitojenler gibi çeşitli etkenlerin uyarısıyla sentezlenen protein ve glikoprotein yapısında maddelerdir. IFN'lar sadece virüslere karşı sentezlenen bir madde değil, aynı zamanda diğer birçok antijene karşı da sentezlenen bir mediatördür (14,114-116).

Bugün bilinen üç tipi vardır (Tablo 2.6.9.1). Bunlar  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$  interferonlardır. Ayrıca her grupta alt tipleri bildirmiştir. Bunlardan INF- $\gamma$ 'lar immün interferonlar olarak bilinir. IFN- $\alpha$  ve IFN- $\beta$ 'nın moleküler ağırlığı 18-20 kDa olup bu IFN'lara Tip-1 IFN'lar denir. IFN- $\gamma$  ise moleküler ağırlığı 20-25



kDa olup buna da Tip-2 IFN'lar denir. IFN- $\alpha$  ve IFN- $\beta$  aynı reseptöre, IFN- $\gamma$  ise farklı reseptöre bağlanır. IFN- $\gamma$  reseptörünün genetik defekti, makrofajlarda fonksiyonel yetersizliğe neden olur (14,114,116-117).

Virüslerle enfekte hücreler, IFN sentezleyerek hücre dışına salgırlar. Bunlar daha çok IFN- $\alpha$  ve IFN- $\beta$  gruplarıdır. Hücre dışındaki bu IFN'lar sağlıklı hücrelerin IFN reseptörlerine bağlanarak hücreyi uyarırlar ve anti-viral protein sentezini sağlarlar. Bu şekilde enfekte hücrelerden çıkan virüslerin bu hücrelere girmelerini engellerler. IFN'un uyarısıyla sentezlenen antiviral protein, konakçının ribozomlarına bağlanarak mRNA'nın translasyonunu engeller ve böylece virüsün hücreye sentezlettirmek istediği viral nükleik asitler ve proteinlerin yapımı engellenmiş ve virüs çoğalması durmuş olur.

Hücrelerin IFN sentezi, uyarıcı etkenin özelliğine (örneğin, hızlı üreyen ve güçlü sitopatik etki yapan virüsler, yavaş üreyen virüslere göre daha az IFN sentezlenmesine sebep olurlar) ve konakçının yaşına (yeni doğanlarla gençler, erişkinlere göre daha fazla IFN sentezleyebilirler) bağlı olarak değişebilmektedir.

İmmün IFN olarak bilinen IFN- $\gamma$ , 143 aminoasit rezidüsüne sahiptir. IFN- $\gamma$  geni 12. kromozomda lokalizedir (12q24.1) ve 4 ekson, 3 intron içerir. bağışıklık sistemi üzerinde düzenleyici (immünomodülatör) etki gösterir. IFN'ların, NK hücreleri üzerinde de etki yaptıkları, bu hücrelerin mikrobiyal etkenlere ve tümör hücrelerine karşı aktivitelerini güçlendirdiğinden IFN'lardan kanser tedavisinde ve viral enfeksiyonların tedavisinde çok şeyler beklenmektedir (14,18-20,114,116).

**Tablo 2.6.9.1.** İnterferonlar ve sınıflandırılmaları (114).

Grup	Üreten Hücre	Uyarıcı Etkenler
IFN- $\alpha$	Lökositler	Virüsler, Bakteriyel ürünler, Tümörler, Polinükleotidler
IFN- $\beta$	Fibroblast ve Epitel hücreleri	Virüsler, Bakteriyel ürünler ve Polinükleotidler
IFN- $\gamma$	T lenfositleri	Antijen + Antikor kompleksleri, Mitojenler vs.

IFN'ların bazı etkilerini maddeler halinde sıralayabiliriz (14,18-20,114, 116,121);

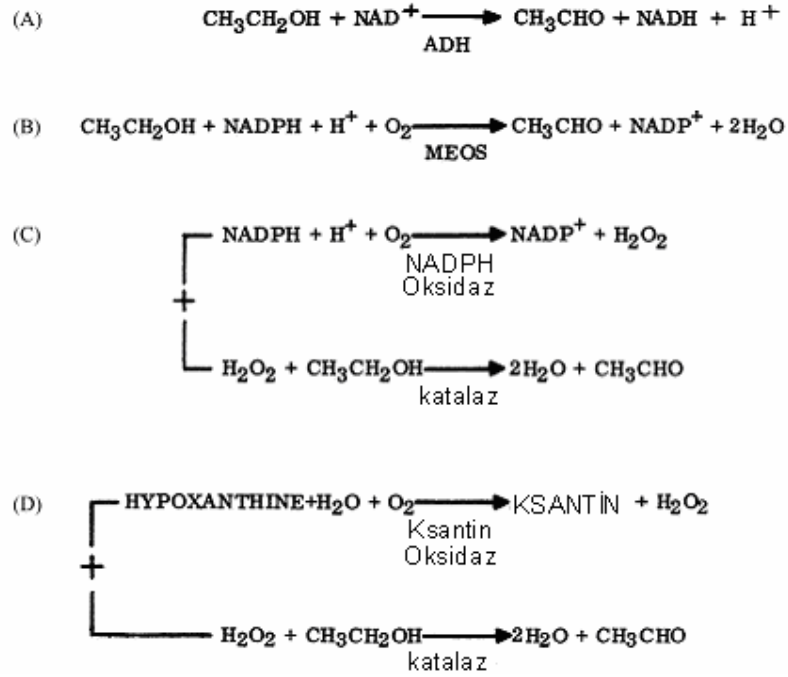
- a. CD4+ T hücrelerinin Th1 fenotipine dönüşümü
- b. Th1 ve NK hücre aktivitesinin şiddetlenmesi (immün supressiflere dirençli LAK hücrelerinin oluşması)
- c. Th2 hücrelerinin inhibisyonu
- d. Makrofaj ve endotel hücrelerinin aktivasyonu (MAF etkinliği)
- e. CD8 T efektörlerin oluşması
- f. B hücre proliferasyonu ve farklılaşması
- g. Yüzey reseptörlerin ekspresyonunda artış
- h. Diğer sitokin etkinliklerinin şiddetlendirilmesi veya zayıflatılması
- i. NADPH oksidaz ve NOS sentezinin artması
- j. IP10 ve MCP-1 indüksiyonu (lenfosit ve monosit kemotaksisi)
- k. Kaşeksi (Lipoprotein lipaz ve Gliserol fosfat dehidrogenaz inhibisyonu ve lipid akümüülasyonunu önleyerek)
- l. Antiviral etkinlik
- m. Antiproliferatif etkinlik (hücrebölünmesinin ve onkogen ekspresyonunun inhibisyonu)
- n. Ateş yapıcı etkinlik
- o. INF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  yapan CD4+ T hücre proliferasyonunu in vitro olarak indükler
- p. IFN- $\gamma$ , birçok hücrenin intraselüler patojenleri öldürme yeteneklerini arttırır

## 2.7. ALKOL METABOLİZMASI

Alkol tüketiminin neden olduğu karaciğer hastalıkları, gün geçtikçe büyük önem kazanmaktadır. Erkeklerde günlük 40 g ve üzeri, kadınlarda ise 20 g alkol tüketimi risk olarak tanımlanmaktadır. Yaklaşık 8 yıl süre ile günde 160 g alkol tüketen kişilerde siroz geliştiği gözlenmiştir. Henüz spesifik bir genetik faktör tespit edilememekle beraber ailesinde alkole bağımlı siroz olan kişilerde alkol tüketimi sonucu siroz gelişim riskinin yüksek olduğu gösterilmiştir. Sağlıklı erişkin erkekler günde yaklaşık 160 g kadar alkolü metabolize edebilme kapasitesine sahiptir. İnsanların pek çoğu saatte 10 gr alkolü metabolize edebilmekte (10 g/saat) ve kan alkol düzeyi her saat yaklaşık 0,15 g azalmaktadır (0,15 g/saat) (4,15-16,57,121-123).

Karaciğer, alkol metabolizmasındaki primer organdır. Alkol, karaciğerde ADH, endoplazmik retikulumlardaki MEOS ve CAT ile metabolize edilir. CAT bu üç sistem içinde en az kullanılanı olup peroksizomlarda ve mitokondrilerde bulunur (Şekil 2.7.1). Alkol emilim olduktan sonra, sitozolik ADH tarafından elde edilen asetaldehit (AA), mitokondriyal ve sitozolik *asetaldehit dehidrogenaz (ALDH)* ile asetata oksitlenmektedir. Büyük bir kısmı karaciğerden kana diffüze olan asetat TCA döngüsünde oksitlenmek üzere diğer dokular (özellikle kaslar) tarafından alınmaktadır (1-3,52-54,56-57,63).

NADH oksidatif fosforilasyon ile, ATP üretiminde kullanılmaktadır. Asetaldehitin bir kısmı kana geçerek diğer dokulara geçmektedir. Bir kısmı TCA döngüsünde oksitlenen asetatın önemli bir kısmı kas dokuları tarafından alınarak Ac-CoA oluşturulmaktadır. Çok yüksek etanol düzeyleri dışında etanolün kalori içeriği ATP'ye çevrilmektedir (60,122).



Şekil 2.7.1. Etanolün oksidasyonu. (A) Alkol dehidrogenaz (ADH) ile NADH açığa çıkar, (B) Hepatic microsomal ethanol oxidizing system (MEOS) ile NADPH harcanır, (C) Katalazın NADPH oksidaz ile (D) Ksantin oksidaz ile alkolü okside etmeleri, bu arada hidrojen peroksit elemine edilir (24).

Alkol eliminasyonundaki farklılık, ADH ve MEOS genetik polimorfizmi sonucu ortaya çıkmaktadır. ADH'lar stoplazmik enzimler olup karaciğerde birçok izoformları vardır. ADH izoformları arasındaki farklılıklar etnik gruplar arasındaki alkol eliminasyon hızındaki belirgin farklılıkların nedenidir. Örneğin Asya'lılar b2 ADH alt ünitesine sahiptirler ve b1 alt ünitesine sahip olan kuzey Avrupa'lılara göre alkolü %20 daha hızlı metabolize ederler (56-58,124-125).

Yapılan araştırmalar ADH enzim sistemi karaciğer dışında mide ve barsakta da bulunduğunu göstermiştir. Alınan alkolün önemli bir kısmı mide ADH'ı tarafından metabolize edilmekte ve bu, alkolün ilk geçiş eliminasyonu olarak bilinmektedir. Bu eliminasyon, alkolün yol açtığı hepatotoksisite göz önüne alındığında büyük öneme sahip olmaktadır (54-58). Midede alkolün metabolize edilmesi portal sisteme geçen alkol miktarının azalmasına ve karaciğerde daha az hasara yol açmasına neden olmaktadır. Gastrik mukozada ADH aktivitesi kadınlarda daha düşük olduğundan aynı miktarda alkol alan kadınlarda erkeklere göre kan alkol seviyesi daha yüksek

olmaktadır. Bu durum da kadınların Alkolik karaciğer hastalığı (AKH)'na daha yatkın olmalarına yol açmaktadır (15-16,123,126-127). AKH ancak bazı eşik değerler aşıldığında ortaya çıkmaktadır. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar sonucunda bir erkeğin AKH'nı geliştirebilmesi için 20 yıl boyunca günde en az 40 gr alkol tüketmesi gerekmektedir. Kadınlar için eşik değer 20 g/gün'dür (16,55). Bu miktarlarda alkol tüketen hemen her insanda karaciğer hastalığını düşündürülen biyokimyasal ve histolojik anormallikler ortaya çıkar. Fazla miktardaki alkol tüketimi karaciğerde yağlanma, hepatik fibrozis ve siroza neden olmaktadır (4,55-57,61-64,125).

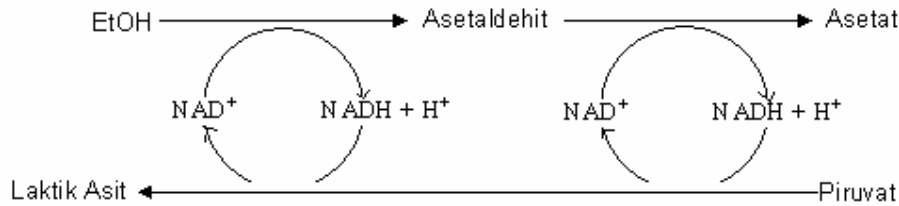
ADH'nin EtOH için  $K_m$  değeri 1mM (46mg/L) olduğu için enzim, bir veya iki kadeh alkolden sonra zorunlu olarak doymuş hale gelmekte ve alkol metabolizması sıfırıncı (0.) dereceden kinetik göstermektedir. Doku alkol düzeyi 50 mg/dl'nin üzerine çıktığında MEOS devreye girer, bu tepkimede NADPH yapısındaki indirgenme yükseltgenme potansiyeli şeklindeki enerji kullanılmaktadır (124,128). MEOS için önemli nokta CYP450 2E1 komponentine sahip oluşudur. Bu enzim sadece alkolün oksidasyonu değil birçok ilacın metabolize edilmesinde de görevlidir. Kronik alkol tüketimi CYP450 2E1 enzim aktivitesinin 5-10 kat artmasına sebep olur. Bu aktivite artışı kronik alkol kullanımı olan kişilerde alkolün hızlı elimine edilmesinin nedenidir. Uzun yıllar alkol kullanan bir kişinin MEOS sistemi çok aktif çalışmakta ve bu kişilerin karaciğer ve kan dolaşımında bulunan asetaldehit dokularında hasar oluşturmaktadır. Akut EtOH kullanımı MEOS üzerinde inhibisyon (akut kullanımda EtOH ADH'ı tercih ettiği ve MEOS sistemi çalışmadığı için inhibisyon görülmektedir), kronik kullanım ise indüksiyon etkisi göstermektedir. CYP450 sistemini uyaran EtOH, kendi metabolizmasının yanı sıra barbitüratların ve bazı ilaçların da metabolizmalarını arttırmaktadır. İlaçların atılımında kullanılan diğer enzim sistemlerindeki artış MEOS indüksiyonu ile birlikte olduğundan alkol ile birlikte sedatif barbitüratlar alındığında enzime bağlanmak için birbirleri ile yarışmaktadırlar. Kompetitif enzim inhibisyonu ilaç klirensinin azalmasına ve çok yüksek kan barbitürat düzeylerinin görülmesine neden olmaktadır. İlaç

daha uzun süre kanda kaldığından dolayı ölüme neden olabilmektedir (2-3, 54-58,60-63,122,124,128-129).

Kronik EtOH tüketiminde EtOH'ün kalori içeriği etkin olarak ATP üretiminde kullanılmamaktadır. Bu etkinliğin azalmasına katkıda bulunan birkaç faktör vardır. Yüksek miktarda EtOH alındığında EtOH'ün %10-30 kadarı AA'e oksitlenmektedir. Bu sistem NADPH şeklindeki indirgen eşdeğerleri tüketmektedir. Asetatın oksidasyonu ile yine ATP üretilebilmektedir. Diyet açısından herhangi bir değerinin olmadığına inanılan EtOH'ün vücutta CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O'ya oksitlenmesi ile karbohidratlardan (4 kcal/mol) elde edilen enerjiden daha fazla, yağlardan ise daha az (7,1 kcal/mol) enerji sağlanmaktadır. Günde 100-120 g alkol tüketen bir kişi bazal metabolik enerjisinin yaklaşık yarısını sadece bu kaynaktan elde edebilmektedir. Kalori dışında bir yararı olmadığı için alkoliklerde vitamin ve mineral eksikliği görülmektedir. Kronik alkoliklerin, dokularından elde edilen mitokondrilerde, normal ATP sentezi için gerekli olan transmembran proton gradiyentinin korunamadığı gözlenmiştir. Bu nedenle EtOH enerjisinin büyük bir kısmı ısıya dönüşmektedir. EtOH oksidasyonu, yağ asidi ve glukoz oksidasyonunun normal metabolik yolları ile girişim yapmaktadır. Oksidatif süreci tamamlamak için ara ürünlerin bu metabolik yollar arasındaki döngüsü EtOH varlığında glukoz ve yağ asitlerinin oksidasyonunu daha az etkili hale getirmektedir (52,54-57,63,68).

Karaciğer metabolizması, alkolden çok ciddi boyutlarda etkilenmektedir. Karaciğerde alkol metabolizmasının negatif kontrol mekanizması bulunmadığı için alkolün oksidasyonu, diğer besinlerin oksidasyonundan önce tercih edilmektedir. Feed-back inhibisyonun olmaması, alkol metabolizması tepkimelerinin enerji üreten yol olmaktan çok detoksifikasyon sistemi olarak geliştiğini düşündürmektedir. Alınan EtOH'den Ac-CoA, NADH ve ATP üredildiği için glukoz ve yağ asitleri normal yollarında okside olamamaktadır. Ortamda alkolden sağlanan fazla miktarda NADH, bulunduğu metabolizma yeni NADH oluşumuna yol açacak oksidasyon

yolları yerine NADH tüketecek yolları tercih etmektedir. Bu nedenle çeşitli yollarda kontrol gerçekleşmektedir. Ac-CoA, NADH ve ATP; glukoz metabolizmasını fosfofruktokinaz (PFK) ve piruvat dehidrogenaz aşamalarında inhibe etmektedir. NAD<sup>+</sup> azalması ve Malonil-CoA düzeyinin artması yağ asidi oksidasyonunu azaltmaktadır. Yüksek NADH ve ATP düzeyleri ile NAD<sup>+</sup> azalması TCA siklüsünü inhibe etmektedir. Etanolün asetik asite oksidasyonu ile oluşan 2 NADH solunum zincirinde okside edilerek hücrenin enerji gereksinimi fazlasıyla karşılandığı için alkoliklerin karaciğerde TCA döngüsü yavaşlamıştır. Yağ asidi oksidasyonunun azalması ve artmış yağ asitlerinin esterleşmesi sonucu trigliserit (TG) sentezi, çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) salgılanması ve plazma TG düzeyi artmaktadır. Özellikle, yüksek İnsülin/Glukagon oranı Ac-CoA karboksilaz aktivitesini uyardığında yağ asidi sentezi de hızlanmaktadır. Yüksek ATP ve NADH düzeylerine rağmen alkol, pirüvat ve oksaloasetatın glukoneogenezde kullanılmasını inhibe etmektedir. Tersinir laktat dehidrogenaz (LDH) ve malat dehidrogenaz tepkimeleri ile laktat/pirüvat ve malat/oksalasetat oranlarını yüksek NADH/NAD<sup>+</sup> oranı artmakta ve kan laktat düzeyi artarken pirüvat ve oksaloasetat tüketilmektedir (Şekil 2.7.2). Ağır fiziksel aktivite sonrası veya aç karnına alkol alan kişide karaciğer glikojen depoları tükendiğinden beklenenden daha önce hipoglisemi gelişmektedir (15-16,55-57,64,125,130-135).

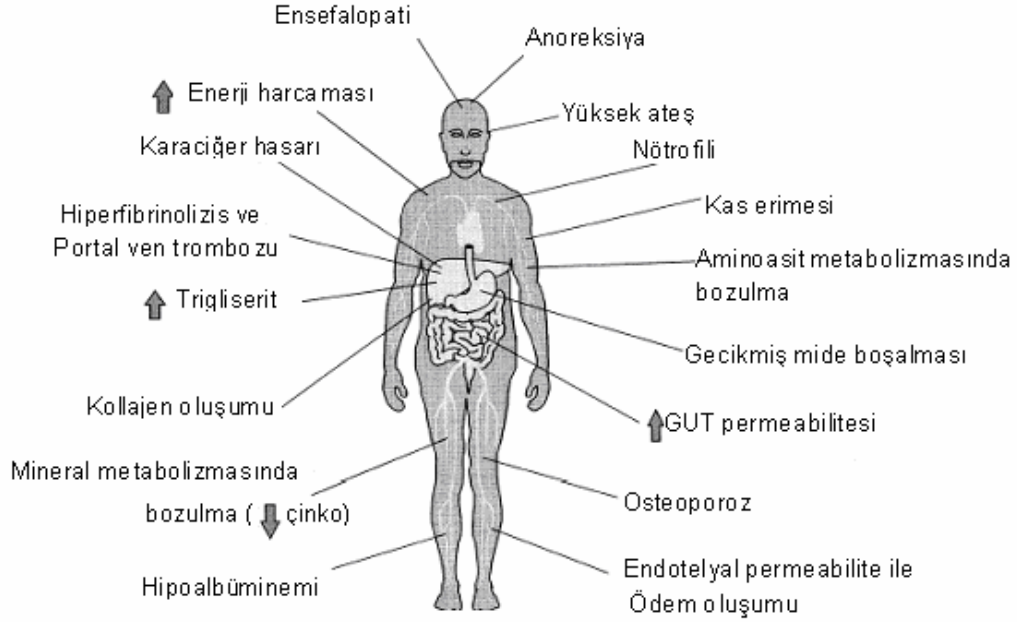


Şekil 2.7.2. EtOH metabolizması sonucu laktik asit düzeyinin artışı.

### 2.7.1. Alkolik Karaciğer Hastalığının Patofizyolojisi

Kronik alkol tüketiminde karaciğer, mide, kalp, beyin gibi birçok organ etkilenir ve bu organlarda ağır karaciğer hasarı, yağlı karaciğer, karaciğerde

fibröz ve kollajen doku gelişimi, ensefalopati, anoreksiya, nötrofili, yüksek ateş, GUT, osteoporoz, Kas erimesi, gecikmiş mide boşalması, aminoasit ve mineral metabolizmalarında bozulmalar gibi çeşitli patolojiler baş göstermektedir (şekil 2.7.1.1) (9,13).



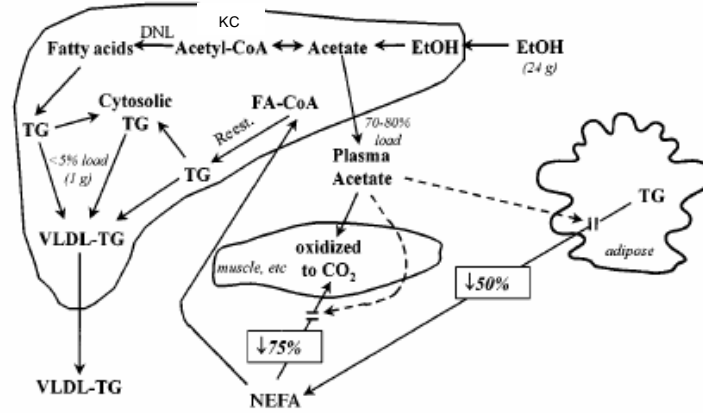
Şekil 2.7.1.1. Kronik alkol tüketiminin çeşitli organ ve dokular üzerindeki etkisi (48).

### 2.7.1.1. Yağlı karaciğer

Alkol oksidasyonu sonucunda  $NAD^+$ 'nin indirgenmesi ile ortaya çıkan fazla miktarda NADH, karaciğerde  $NAD^+$  bağlı birçok prosesin etkilenmesine yol açar. TG sentezi artarken yağ asitlerinin beta oksidasyonu inhibe olur ve yağ asitleri esterifiye olarak TG depolanır. Son nokta ise hepatik steatozdur.

Etanolün asetik asite oksidasyonu ile oluşan 2 NADH solunum zincirinde okside edilerek hücrenin enerji gereksinimi fazlasıyla karşılandığı için alkoliklerin karaciğerde TCA döngüsü yavaşlamıştır. Yağ asidi oksidasyonunun azalması ve artmış yağ asitlerinin esterleşmesi sonucu TG sentezi, VLDL salgılanması ve plazma TG düzeyi artmaktadır (şekil 2.7.1.1.1) (54-58,63-64,125).





Şekil 2.7.1.1.1. Kronik etanol tüketiminde lipid metabolizması ve VLDL-TG sentezi. EtOH; etanol, DNL; Denovo lipogenez, TG; Trigliserit, FA-CoA; Fatti asil CoA sentaz, NEFA; Non esterifiye yağ asitleri

### 2.7.1.2. Karbohidrat Metabolizması Değişiklikleri

Yüksek NADH/NAD<sup>+</sup> oranı glukoneogenezde de bazı düzensizliklere yol açar. Glukoz üretimindeki bazı anahtar enzimlerin aktivitelerinin inhibisyonu aşikar hipoglisemi ile sonuçlanır. Bu durum özellikle karbohidrat malnütrisyonu yüksek olan hastalarda yüksektir (52,55-57).

### 2.7.1.3. Oksidatif Hasar

Alkolün CYP450 2E1 ile metabolize edilmesi sonucu O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, hidroksietil ve <sup>•</sup>OH gibi ROS oluşmaktadır. ROS bir seri peroksidasyon reaksiyonu başlatır ve hücre zedelenmesi ile sonunda hücrenin ölümüne neden olur. Hidroksietil radikali makromoleküllere kovalent olarak bağlanıp yapı ve fonksiyonlarını etkilediği gibi GSH ve diğer hücrel tiyollerle de etkileşebilir. Bu şekilde GSH havuzunun tüketimi ve hücrel redoks eşitliğinin bozulmasına yol açarak ROS oluşumuna katkı sağlar (1-12).

ADH sisteminin rol oynadığı alkol metabolizması da farklı bir yöntemle serbest radikal oluşumuna yol açar. Yüksek NADH/NAD<sup>+</sup> oranı ferritinden demirin mobilize olmasına neden olur. Bu da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile etkileşerek O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ve <sup>•</sup>OH radikallerinin oluşumuna neden olur. Etanolün ADH yolunda metabolize edilmesi ile NADH üretimi artmakta ve bu durum intrasellüler redoks statüyü değiştirerek mitokondrilerdeki solunum zincirini aktive eder, böylelikle

mitokondriyal  $O_2^-$  üretimi artar (55-57,60-64). Yüksek NADH/NAD<sup>+</sup> oranı kronik alkolizmde laktik asidoz, ketoasidoz ve hipoglisemiye yol açmaktadır. Laktat ve keton cisimleri böbrekler tarafından ürik asit atılımını etkilediği için hiperürisemi de görülmektedir.

Alkol metabolizmasında sekonder ürün olarak oluşan AA lokal inflamasyona neden olmaktadır. Böylelikle hücre membranının bozulmasıyla intraselüler  $Ca^{++}$  konsantrasyonu artar, spesifik proteazlar aktive olur ve XD'ı, bir  $O_2^-$  üreticisi olan XO'a dönüştürür. Böylelikle serbest oksijen radikallerinin üretimine katkıda bulunurlar (60,65-66). Ayrıca AA oksidasyonu sonucunda son ürün olarak oksijen radikalleri ortaya çıkar. Kronik alkol alımı sırasında aktive olan nötrofiller ve kupffer hücrelerinin de ROS için ek bir kaynak oldukları bilinmektedir (15-16,132-134,136).

Kronik alkol tüketimi karaciğer vitamin A, E ve GSH rezervlerinin azalmasına yol açarak karaciğerin koruyucu antioksidan defans mekanizması üzerinde negatif etki yapar ve alkolün yaptığı hepatik hasara katkıda bulunur (5-8,67-68,137).

#### **2.7.1.4. Asetaldehit Etkisi**

AA, karaciğerde doğrudan hepatoselüler hasar ve nekroza yol açabilecek yüksek reaktiviteye sahiptir. AA hücrel proteinlerin lizin rezidülerine bağlanarak AA-protein yapılarını oluşturur. Ayrıca tubüline bağlanan AA hücrenin protein trafiğini etkileyerek hücrelerde şişmeye (balonlaşma) yol açar (1,48,54,58,60-62,124).

Kronik alkolizmde oluşan doku hasarının çoğu, yüksek dozlarda alkol alındıktan sonra karaciğerde biriken ve kana salınan AA'ten kaynaklanmaktadır. Oldukça reaktif olan asetaldehit, amino gruplarına, fosfolipidlere ve nükleotidlere kovalent olarak bağlanmaktadır. Etkilenen proteinler arasında hemoglobin, kalmodülin, ribonükleaz ve tubulin

bulunmaktadır. Kalp ve diğer dokulardaki proteinler de karaciğerdeki proteinler kadar etkilenmektedir (4,48,59,62,122,138).

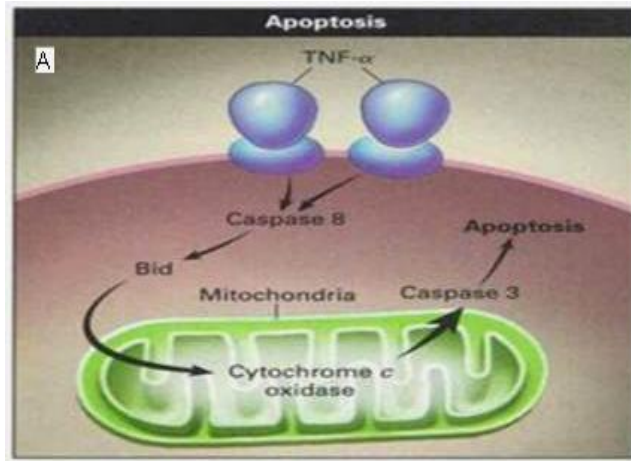
Asetaldehit; hepatik lipoprotein partiküllerinin oluşması için gerekli olan protein sentezinin ve proteinlerin tubuline–bağımlı salgılanmasının azalmasına yol açmaktadır. Salgı mekanizmasının bozulması sonucu, karaciğerde TG'ler ve proteinler birikmektedir. Yağ asidi oksidasyonunun inhibisyonu sonucu yüksek miktarda oluşan VLDL kanda artmasına rağmen belirgin miktarda protein ve TG'in karaciğerde biriktiği görülmektedir. Proteinlerin birikimi ile hepatositlere giren su, karaciğerin şişmesine ve hepatik yapı parçalanmasına yol açmakta ve hipertansiyon gelişmektedir (63, 139-140).

AA'in oluşması sonrasında lipid peroxidasyonu artmakta ve ROS hasarı kalıcı hale gelmektedir. GSH'a bağlanan asetaldehit, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile hasar oluşturulmasına karşı GSH'ın koruyucu etkisini azaltmakta ve ·OH radikali oluşumunu arttırmaktadır (4,59,141). Protein ve lipid hasarı mitokondrinin NADH ve AA oksitleme kapasitesini azalttığı için AA, oluşan hasarın devam etmesine yol açmakta ve AA birikimine neden olmaktadır.

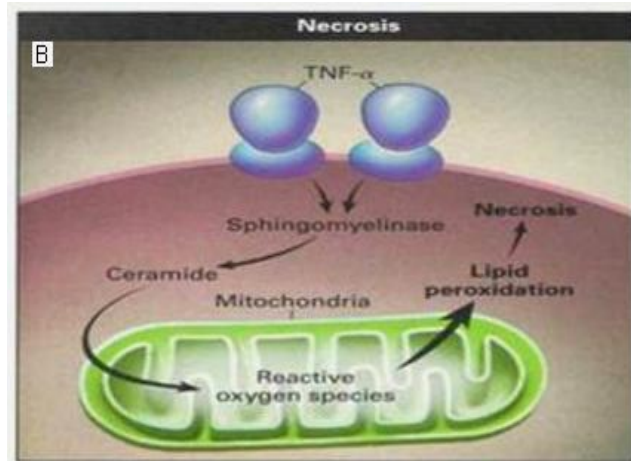
#### **2.7.1.5. Sitokin Üretimi ve İnflamasyon**

Sitokinler düşük moleküler ağırlıklı (genelde <30 kD) sellüler mediyatörlerdir. Monosit ve makrofajlarda üretilip salgılanırlar. Karaciğer hasarına özgü olarak kupffer hücrelerinden de salgılanırlar (9,13,137,142). IL-1 ve TNF- $\alpha$  gibi proinflamatuvar, IL-10 gibi antiinflamatuvar, IL-6 gibi akut faz sitokinleri ve IL-8 gibi kemokinler AKH'nda kaçınılmaz metabolik komplikasyonları modüle ederler ve AKH'nda önemli rol oynarlar (9,13,143-145). LPS ve ROS AKH'nda sitokin üretimini indüklemektedir. Bunların ikisi de inflamatuvar cevapta kromatin oluşumuna ve proinflamatuvar mediyatörlerin gen ekspresyonuna neden olarak önemli rol oynayan NF- $\kappa$ B ve aktivatör protein-1 (AP-1) gibi transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu stimüle eder. Bu transkripsiyon faktörleri inhibitör- $\kappa$ B (I- $\kappa$ B) kinaz aktivasyonunun aracılığıyla;

mitojen aktive protein (MAP) kinaz metabolik yolunu ve fosfoinozid 3-kinaz (PI-3-Kinase; PI-3K) metabolik yolunu regüle eder. Ayrıca proinflamatuvar mediyatörlerin ekspresyonunu sağlar (9,13,16,142,145-146). MAA yapılarının TNF- $\alpha$ , monosit kemoatraktant Protein-1 (MCP-1) ve Makrofaj Inflamatuvar Protein-2 (MIP-2) dahil çeşitli sitokin ve kemokinlerin sekresyonunu stimüle eder. Ayrıca MAA, Intraselüler Adhezyon Molekül-1 (ICAM-1), L-Selektin ve P-Selektin gibi adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu upregüle eder (49). TNF- $\alpha$ , hücre ölümünü nekroz veya apoptozdan uygun olanı ile indükler (Şekil 2.7.1.5.A ve B) (9,13,137,145,147-148).



Şekil 1.5.1.5.a. TNF- $\alpha$ 'nın hücre ölümünü apoptozis ile indüklemesi (139)



Şekil 1.5.1.5.b. TNF- $\alpha$ 'nın hücre ölümünü Nekrozis ile indüklemesi (139).

Alkolik hepatit olgularının %75'inden fazlasında plazma IL-1, IL-6, IL-8 ve TNF- $\alpha$  seviyeleri artmıştır. Bu sitokinler geniş metabolik etkilere sahiptirler ve hepatitin ateş, bozulmuş besin metabolizması ve asit gibi klinik bulgularının oluşumunu tetikler. IL-6 ve TNF- $\alpha$  düzeyleri hepatik inflamasyon düzeyi ile doğru orantılı olarak yüksektirler. Bu üç sitokin hepatitin klinik semptomlarında önemli rol oynamalarına rağmen karaciğere hasar veren asıl mediatör TNF- $\alpha$ 'dır. Kesintisiz makrofaj aktivasyonu TNF- $\alpha$  üretimini arttırarak patolojik etkilerinin açığa çıkarmasına neden olmaktadır (143-145). TNF- $\alpha$ , fibroblast proliferasyonunu uyarır, sitotoksik lenfosit aktivitesini hızlandırır, kollajenaz aktivitesini ve hepatosit nekrozunu arttırır (14,116-117,144). Kronik alkol verilen deney hayvanlarında hepatoselüler nekroz ve inflamasyon oluşumundan önce TNF- $\alpha$  mRNA ekspresyonu uyarıldığı görülmüştür. Alkoliklerde de dolaşımda bulunan TNF- $\alpha$  düzeyleri hepatik inflamasyon periyodunda giderek artar ve kötü prognoz gösterir. TNF- $\alpha$  lökosit aktivasyonunu arttırarak da hepatoselüler hasara yol açmaktadır. Bu veriler ışığında TNF- $\alpha$ 'nın hepatositler üzerinde sitotoksik etkisi olduğu söylenmektedir. Alkolik karaciğer hasarını da içeren toksin indükleyici model çeşitlerinde hücre hasarını ve ölümünü modüle etmede anti-sitokin terapi son derece başarılı olmuştur (9,13,16,134,144,150-153). İnsanlarda Crohn's hastalığı ve Romatoid artrit gibi hastalık süreçlerinde antisitokin terapi başarı ile uygulanmıştır. Sitokinlerin yararlı etkilerini devam ettirmek ve olası toksik ajanların zararlı etkilerinin inhibisyonu amacıyla alkolik karaciğer hastalarında anti-sitokin tedavi uygulanmasının yararlı olacağı düşünülmektedir (9,13,149,151).

AKH'nda rolü olduğu düşünülen diğer sitokin ise IL-8'dir. Bu sitokinin hepatositler üzerine doğrudan sitotoksik etkisi yoktur. Ancak kemoatraktan rolü nedeni ile IL-8 karaciğerde nötrofil infiltrasyonuna yol açar. Nötrofillerden salınan proteolitik enzimler ve serbest oksijen radikalleri aracılığıyla hepatoselüler zedelenme meydana gelir. Alkolik hepatiti, diğer karaciğer hastalıklarından ayıran en önemli özellik nötrofil infiltrasyonudur. IL-8 kronik alkol tüketimi esnasında hepatosit ve kupffer hücreleri tarafından üretilir

(Alkolün IL-8 üretimini nasıl tetiklediği henüz bilinmemektedir). Ayrıca, TNF- $\alpha$  ve oksidan maddeler de IL-8 üretimini uyarmaktadır (14,127,131,142,146).

#### **2.7.1.6. İmmün Cevap**

Kronik alkol tüketiminin, karaciğerde belirli proteinlere karşı hücrel ve humoral immün cevabı tetikleyerek hasara yol açtığı düşünülmektedir. AA-Protein yapıları ve Mallory cisimciklerine karşı intrasellüler otoantikolar olduğu saptanmıştır. Fakat otoimmün cevabın alkolik karaciğer hasarındaki rolü halen açıklık kazanmamıştır. MDA ve 4-HNE, AA ile kompleks oluşturup, CYP450 2E1'e bağlanarak antijenik kompleks teşkil eder ve bu antijenik kompleks hücre yüzeyinde eksprese olarak immünolojik yanıt ve sonuçta hepatosit hasarına yol açmaktadır (49,59).

AA ve proteinlere bağlanan MDA (MAA ve MDA-Protein) immün sistem için yeni epitop oluşumunu sağlamaktadır. Karaciğerde MAA yapısı en erken 2 ve en geç 6 haftalık etanol tüketiminden sonra tespit edilir. Alkolik karaciğer hasarında, neoantijen gibi davranan MAA ve MDA-Protein yapılarına karşı antikorların oluşumu yoluyla immünotoksik reaksiyonlar gelişmektedir (49).

#### **2.7.1.7. Fibrozis Oluşumu**

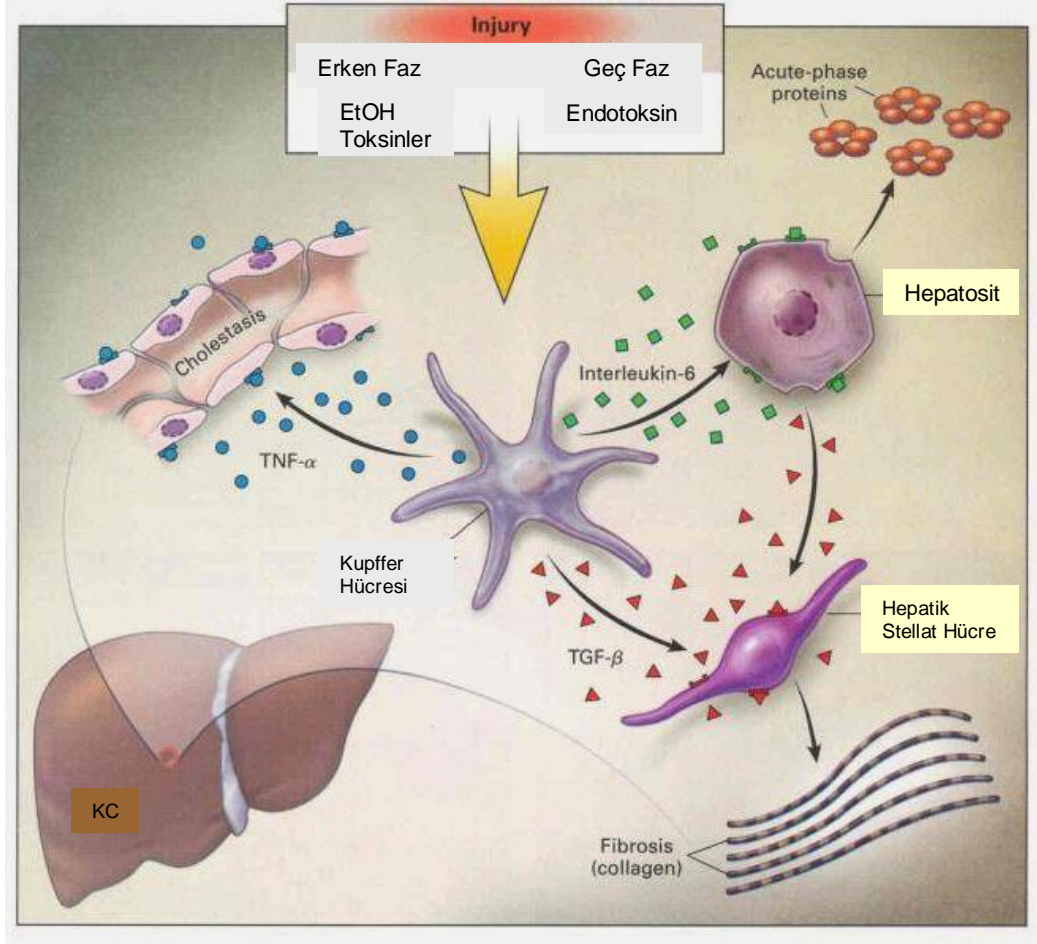
Karaciğer fibrozu kronik alkol kullanımının ciddi ve geri dönüşümsüz bir sonucudur. Fibrozis alkoliklerin %10-15'inde görülmesine karşın karaciğer hastalığı bulguları olan alkoliklerde %50 oranında karşılaşılan bir durumdur. Alkolik karaciğer fibrozu fizyopatolojisinde perisinüzoidal hücreler (ito hücreleri) rol oynamaktadır. Perisinüzoidal hücreler disse aralığında vitamin-A depolanmasında rol oynayan hücrelerdir. Perisinüzoidal hücreler toksik infeksiyöz ya da alkolik karaciğer zedelenmesi ile miyofibroblast benzeri hücrelere farklılaşır. Farklılaşan bu hücreler karaciğerde kollajen ve fibronektin üretimini uyararak AKH'na özgü perisinüzoidal fibrozis gelişimine neden olurlar (15-16,65,130-135,152, 154-155). Fibrozis oluşumuna aynı zamanda ROS hasarı da katkıda bulunmaktadır. Hepatik fibrozis geliştikten

sonra, karaciğer fonksiyonları bozulmaktadır. Üre sentezinin etkilenmesi sonucu kan  $\text{NH}_4^+$  düzeyleri artarak hepatik ensefalopatiye yol açmaktadır (15-16,57,64,125,132-133,157).

Perisinüzoidal hücrelerin farklılaşmasına yola açan uyarılar tam olarak bilinmese de AA ve AA-Protein artışı TGF- $\beta$  artışına neden olarak perisinüzoidal hücrelerin miyofibroblast benzeri hücrelere farklılaşmasına yol açtıkları bilinmektedir. Alkol ile beslenen ratlarda kupffer hücrelerinin IL-6 ve TNF- $\alpha$  ürettikleri bu sitokinlerin de fibrozisi tetiklediği görülmüştür. Ayrıca farklılaşan perisinüzoidal hücreler TGF- $\beta$  üreterek kendi kendilerini uyardığı da gösterilmiştir (Şekil 2.5.1.7.a) (9,13-14,20).

AA ALDH tarafından Ac-CoA'ya çevirilir. Ac-CoA bir yandan yağ asitlerinin sentezinde kullanılırken öte yandan da tamamen yakılarak enerji olarak kullanılır. Alkole bağlı karaciğer yağlanması'nın esas sebebi. Ac-CoA'nın yağ asitlerine dönüşmesiyle beraber, AA'in toksik etki göstermesidir. Sonuçta kallojen sentezi artarak fibrozis meydana gelir (5-6,10,60,67,156).





Şekil 2.7.1.7. Kollajen doku sentezi ve firozis mekanizması (139).

## 2.7.2. Alkolik Karaciğer Hastalığında Etkili Faktörler

AKH patogeneğinde etkili birçok faktör olduğu belirtilmiştir.

### 2.7.2.1. Hereditör Faktörler

ADH, CYP450 2E1, ALDH enzimlerindeki polimorfizm AKH'nda risk faktörü olarak incelenmektedir. Yapılan çalışmalar ADH fenotip değişiklikleri kişiler arasında alkol eliminasyon hızında 3-10 kat arası değişikliklere yol açabilmektedir. Alkolü daha hızlı elimine edenlerde karaciğer hastalığı görülme riski daha yüksektir. Bunun tam aksi durum ALDH enzimi polimorfizminde görülmektedir. AA'i daha yavaş elimine edenlerde karaciğer hastalığı açısından daha fazla risk altındadırlar. ALDH2\*2 alleli AA eliminasyonunda tamamen inaktif bir alleldir. Çin'li ve Japonların %50'si bu



allel bakımından homozigotturlar ve alkol aldıklarında ciddi reaksiyon verirler. Bu allele heterozigot olanlarda ciltte kızarma reaksiyonu vermezler. Ancak normalde ALDH alleleline sahip olanlara göre daha fazla AKH riski altındadırlar ve daha fazla alkolik karaciğer hasarına maruz kalırlar (61-62,124-125,128, 157).

### **2.7.2.2. Cinsiyet**

Kadınlar AKH'na erkeklere göre daha yatkındırlar. Yapılan çalışmalarda 40 g alkol tüketen kadınların 10 yılda AKH'nin belirtilerini göstermeye başladıkları görülmüştür. Bazı yazarlar bu yatkınlığı kadınlardaki yavaş gastrik alkol metabolizmasına bağlamaktadır. Ancak daha fazla alkolün portal sisteme ulaşması, kadınlardaki AKH'nı tam olarak açıklayamamaktadır. Hızlanmış karaciğer zedelenmesinin bir başka açıklaması ise cinsiyete özgü yağ asidi metabolizması değişiklikleridir. Kadınlarda yağ asidi  $\beta$ -oksidasyonunda yağ asitleri TG olarak depolanamamakta ve alternatif yol olan CYP450 enzim sistemi aracılığıyla metabolize olmaktadır. Erkeklerdeki bu alternatif yol kadınlarda yeterince etkin olmayıp yağ asitlerinin karaciğerde hasara yol açmasına sebebiyet vermektedir (15,49,55,126-127,132,134,141,158). Alkol kullanan kadınlarda erkeklere göre plazma endotoksin, ICAM-1, ROS yapıları, nötrofil infiltrasyonu ve NF- $\kappa$ B düzeyleri artmaktadır. NF- $\kappa$ B sentezi kadınlarda erkeklere göre 7-8 kat armaktadır (49).

### **2.7.2.3. Beslenme**

AKH nutrisyonel durum ile güçlü negatif bir ilişki içindedir (26, 30-32). Diyet faktörlerinin doğrudan alkolik hasarın sebebi olmamalarına karşın AKH gelişimini ve progresyonunu geliştirdiği bilinmektedir. Malnütrisyon, AKH'na birkaç farklı yolla katkıda bulunur. Vitamin A ve vitamin E gibi antioksidan maddelerin kronik alkol kullanımı sonucunda azalmaları nedeni ile alkolün karaciğerde yol açtığı oksidatif stresin karaciğere verdiği hasar artmaktadır. Kronik alkol tüketimine bağlı olarak demirin barsaktan emilimi artar ve karaciğer demir depolarında artış olur. Demirin de oksidatif stres yoluyla karaciğere zarar verdiği bilinmektedir (1,52,57-58,64,68,124-125,130).

#### **2.7.2.4. Karaciğer Doku Demiri**

AKH'nda artmış Fe emilimi ve karaciğerde Fe depolanması sonucu serum demir satürasyonunun artmış olduğu, karaciğer biyopsisinde de kantitatif demir düzeyinin 500 mg/g kuru ağırlığına kadar yükseldiği görülmektedir (54, 61,68,160-162).

#### **2.7.3. Klinikte Alkol Kullanımını Gösteren Biyokimyasal Belirteçler**

Aşırı alkol kullanımını gösteren “biyokimyasal belirteçler” alkol bağımlılığının yaygınlığının taranması, tedavisi, önlenmesi ve alkol kullanımına bağlı diğer medikal hastalıkların saptanmasında önemli bir yere sahiptirler. Bu belirleyiciler, halk sağlığı alanında da bir ilerleme sağlayabilirler. Bazı ülkelerde bu belirleyiciler, iş alanlarında ağır içicilerin saptanmasında kullanılmaktadırlar.

##### **2.7.3.1. Karbohidrat Yetersiz Transferrin (KYT)**

Transferrin karaciğerde sentezlenen ve salgılanan demir taşıyan bir glikoproteindir. Yoğun alkol kullanımı dönemlerinde transferrin içindeki karbohidrat içeriği (sialik asit, galaktoz, N-asetil glukozamin) düşmektedir. Bu durum KYT olarak adlandırılmıştır. Alkol bağımlılarında günlük 50-80 g bir haftalık alkol kullanımının KYT serum düzeylerini anlamlı olarak artırdığı bulunmuştur. KYT'in yarılanma ömrü 15 gün kadardır. KYT artışının sosyal içicilere göre alkol bağımlılarında daha fazla olduğu saptanmıştır. Rutinde yalancı pozitif sonuçların oluştuğu nadir durumlar vardır. Son yıllarda, KYT alkol kullanımını gösteren önemli bir test olmuştur (163).

##### **2.7.3.2. Gama Glutamil Transferaz (GGT)**

Alkol kullanımını saptamada en sık kullanılan testtir. Kronik alkol kullanımı sırasında serum GGT düzeyleri artar. Günde 40-60 g alkol kullananlarda GGT düzeyleri artmaktadır. Yarı ömrü 14-26 gündür (164).

GGT birçok durumda yalancı pozitif olarak artabilir. Ağır içicilik olmadan GGT'nin arttığı durumlar; safra kesesi hastalıkları, bazı kalp ve böbrek hastalıkları, şiddetli travma, hipertiroidizm, şişmanlık, barbitürat, antikoagulan ve antikonvülzan kullanımınıdır (165).

Tüm biyokimyasal belirleyiciler hem iyileşme sürecindeki alkol bağımlılarında nüksü saptamada hem de tanı koyarken ağır içicileri belirlemede bazı kısıtlılıklara sahiptirler. Bu kısıtlılıkları ortadan kaldırmak için KYT ile GGT birlikte kullanılmaktadır. Birlikte kullanımın duyarlılığı artırdığı ileri sürülmüştür. GGT ve KYT'nin birlikte ölçüldüğü çalışmalarda KYT'nin özgüllüğünün daha yüksek olduğu saptanmıştır. Ancak aynı zamanda GGT'nin duyarlılığı KYT'ye göre hafifçe yüksek bulunmuştur. Karaciğer hastalığı olan alkol bağımlılarında karaciğer hastalığı olmayan alkol bağımlılarına göre GGT'nin alkol kullanımına daha duyarlı olduğu bulunmuştur. Nüks belirleyicisi olarak GGT KYT'ye göre daha az duyarlıdır. Bu nedenle testlerin tek tek kullanımlarından çok birlikte kullanılmalarının daha uygun olduğu kabul edilmektedir (166-167).

### **2.7.3.3. Transaminazlar**

AST ve ALT karaciğer hasarını saptamada rutinde sık kullanılan testlerdir. Alkol, transaminazların sentezinde prekürsör olan B6'ya bağlı pridoksal 5-fosfatın azalmasına neden olduğundan serum ALT düzeyi 300U/L'yi nadiren geçer. Diğer karaciğer hastalıklarında ALT düzeyi AST 'nin üzerine çıkarken alkole bağlı karaciğer hasarında AST/ALT oranı genellikle 1,5'in üzerindedir. Bu da mitokondrial AST (mAST) artışına bağlı olup tüm AST'nin %20'sini geçmez (157). Diğer karaciğer hastalıklarını AKH'ndan ayırmak için mAST ve mAST/AST oranının da kullanılabileceği gösterilmiştir. Yüksek AST düzeyleri kalp, kas, beyin, pankreas, böbrek, akciğer, eritrosit ve lökositlerde de bulunmaktadır. Bu durum karışıklıklara yol açabilir. Buna karşılık ALT yoğun olarak karaciğerde bulunur. İçmenin bırakılmasından birkaç hafta sonra değerler normal sınırlarına döner (168).

#### **2.7.3.4. Ortalama Eritrosit Hacmi (Mean Corpuscular Volume-MCV)**

Devamlı alkol kullanımı eritrosit hacmin artırabilir. Alkol kullanımına bağlı MCV artışının mekanizması bilinmemektedir. Yapılan çalışmalarda bu artışın nedenleri olarak; alkolün eritrositler üzerinde doğrudan etkisi, folik asit eksikliği ve ilerlemiş karaciğer hastalığı gösterilmiştir. Alkole bağlı olmayan karaciğer hastalıkları, folik asit eksikliği, Vitamin B<sub>12</sub> eksikliği, hipotiroidizm, retikulositoz, antikonvülzanlar ve yaşlılıkta da MCV artmaktadır. MCV alkol bırakıldıktan sonra birkaç ay içinde normal sınırları içine döndüğü için yalnızca tarama testlerinde kullanılabilir (165,168).

#### **2.7.3.5. 5-Hidroksitriptofol / 5-hidroksiindol-3-asetik asit**

Alkol kullanımını saptamak için son zamanlarda kullanılan testlerden birisi de idrardaki 5-hidroksitriptofol (5-HTOL)/5-hidroksiindol-3-asetik asit (5-HIAA) oranıdır. Her iki bileşik de serotonin metabolizmasının ürünüdür. Alkol kullanımı 5-HTOL miktarını artırır, 5-HIAA miktarını azaltır. 5-HTOL alkol alımından 14-22 saat sonra normal seviyelerine döner (165).

#### **2.7.3.6. Beta-Hekzoaminidaz ( $\beta$ -Hex)**

Lizozomal bir glikozidazdır. Bu enzimin aktivitesi aşırı alkol alımı sırasında artmaktadır. Birçok dokuda bulunan bu enzimin A, B, I, P izoformları vardır (59). Bazı çalışmalarda  $\beta$ -Hex'in alkol bağımlılarını ayırmada GGT, KYT, AST veya ALT'den daha duyarlı olduğu ileri sürülmüştür. Özellikle  $\beta$  izoformu kullanılmaktadır. Yarı ömrü kısa olduğu için (2-4 gün) tarama testlerinde kullanılamayacağı ancak nükslerde faydalı bir yöntem olabileceği ileri sürülmüştür. Alkole bağlı olmayan karaciğer hastalıkları, böbrek hastalıkları, diabetes mellitus, miyokard infaktüsü, tirotoksikoz, gebelik, nefrotoksik ilaçlar yalancı pozitiflik oluşturabilir.  $\beta$ -Hex'in KYT ve GGT ile birlikte kullanımının yararlı olduğu ileri sürülmüştür (169).

#### **2.7.3.7. Asetaldehit Bileşimleri**

Asetaldehit, alkol metabolizması sırasında oluşan reaktif bir ara üründür. Asetaldehit proteinlerle "kararlı ve kararsız" bileşimler oluşturur. Kararlı

protein-asetaldehit bileşimleri alkol kullanımını ayırmak için kullanılmıştır. Son zamanlarda hemoglobinle ilişkili asetaldehitinin alkol kullanımında etkili bir test olabileceğine ait çok sayıda çalışma yapılmıştır (165).

#### **2.7.3.8. Diğer Laboratuvar Testleri**

Son yirmi yıl içinde aşırı alkol kullanımını belirlemek için bir çok test kullanılmıştır. Bu testler birçok kısıtlılıklara sahiptir. Bunlar; HDL (High density lipoprotein), kolesterol, apo A-I ve A-II,  $\alpha$ -amino-N-butirik-asit/lösin oranı, kan asetat, kan metanol, idrar dolikol, 2,3-butanediol ve salsolinol miktarı olarak özetlenebilir. Hem idrarda hem de kanda bakılan belirleyicilerden birisi de etil-glukuronittir. Etil-glukuronid etil alkolün doğrudan bir metabolitidir. Özellikle nökslerde orta süreli bir belirleyici olarak faydalı olabileceği ileri sürülmüştür. Bir diğer test yağ asitleri etil esterleridir (165).

Son zamanlarda yeni birkaç test daha gelişme sürecindedir. Bunlar; Alkol Kullanımını Erken Saptama Testi, Hemoglobin-İlişkili Asetaldehit, yağ asitleri etil esterleri ve cilt yüzeyi alkol buharı ölçümleridir (157,165).

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Hayvanlar

Bu çalışmada 38 adet, 3-3,5 aylık 280-320 g ağırlığında Sprague-Dawley erkek rat kullanıldı. Ancak infüzyon sırasında ve çalışma boyunca ölen hayvanlar çalışma dışı tutuldu ve 25 rat ile çalışma tamamlandı. Ratlar standart bir diyetle beslendiler ve içebildikleri kadar su içmelerine izin verildi. Tüm deney gruplarında çevresel şartlar kontrol altında tutuldu (12 saat/12 saat ışık / karanlık siklüsü, 25-28 °C ortam ısısı).

Ratlar aşağıdaki gibi 4 gruba ayrıldı;

1. Kontrol grubu (K) (n=6): Bu gruba 30 gün süre ile intra gastrik (i.g.) yolla 2 ml/gün serum fizyolojik (SF) verildi. Yiyebildikleri kadar yem ve içebildikleri kadar su içmelerine izin verildi.

2. Alkol Grubu (EtOH) (n=7): 30 gün süre ile i.g. olarak, 12 saat açlıktan sonra etanol (EtOH) verildi. Distile su ile hazırlanan %80 EtOH (v/v) 1 ml/gün ve SF 1 ml/gün olarak verildi. EtOH verildikten bir saat sonra ise yem ve su verildi.

3. Quercetin Grubu (Q) (n=7): 30 gün süre ile 3 günde 1 kez 100 mg/kg quercetin ve 1 ml SF verildi. Quercetin, % 3 g olarak SF ile süspanse edilerek hazırlandı. Quercetin verildikten bir saat sonra yiyebildikleri kadar yem ve içebildikleri kadar su içmelerine izin verildi.

4. Quercetin + EtOH Grubu (Q+EtOH) (n=5): 30 gün boyunca i. g. olarak 3 günde 1 kez 100 mg/kg quercetin verildikten 2 saat sonra % 80 (v/v) EtOH'den 1 ml/gün verildi. EtOH verildikten bir saat sonra yem ve su verildi.

K grubu, EtOH grubu, Q grubu ve Q+EtOH grubu ratlar son yüklemmeden 24 saat sonra Alfamin ile intraperitoneal olarak anesteziden sonra dekapite edildi. Operasyon öncesi ratlar yaklaşık 12 saat aç bırakıldılar. Anestezi edilen ratlar sırtüstü yatırılarak, operasyon masasına dört ekstremitelerinden tespit edildiler. Ratlar dekapite edildikten sonra kanları alınıp ALT analizleri yapıldı. Daha sonra karaciğerleri alınıp buz soğukluğundaki SF ile yıkandı ve analiz saatine kadar -20 °C'de saklandı.

Rat karaciğerleri uygun tamponlar kullanılarak Ultra Turrax homojenizatör (IKA T18 Basic, Wilmington, NC) ile homojenize edildi ve UP 50 H ultraschallprozessor (TUV) (Berlin) model sonikatör kullanılarak sonike edildi. Homojenatlar 4000 rpm (+4 °C)'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernantlar numune olarak kabul edildi.

Protein tayinleri Fluka (Protein quantification kit-Rapid, Buchs/Schweiz) kitiyle çalışıldı. standart olarak Bovine serum albümin (BSA) kullanıldı. Ölçümler Trinity (Biotech Captia Reader) model ELISA cihazında yapıldı.

Alanin transaminaz (ALT) ölçümü HITACHI-917 oto analizörü ile özgün ticari kitler kullanılarak yapıldı. Karaciğer sitokin düzeyleri (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) Trinity (Biotech Captia Reader) model ELISA cihazında Biosource'den alınan kitlerle antijen-antikör birleşmesine dayalı yöntemle ölçüldü.

Tüm spektrofotometrik ölçümlerde, Shimadzu UV-1601 spektrofotometresi kullanıldı.

1,1,3,3-tetraetoksipropan, 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoikasit (DTNB), GSH, Quercetin dihidrat, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Riboflavin, Nitro Blue Tetrazolium klorid (NBT) SIGMA chemical Co. (St. Louis, USA)'dan temin edildi. Diğer kimyasallar da MERCK (E.Merck, Daimstadt Germany)'ten sağlandı ve bütün kimyasallar analitik saflıkta idi.

## 3.2. Biyokimyasal Analiz

### 3.2.1. Karaciğer TBARS Düzeylerinin Ölçümü

Karaciğer TBARS düzeyleri Ohkawa ve ark. yöntemine göre ölçüldü (169).

#### Prensip:

MDA'nın asidik ortamda thio barbitürik asitle oluşturduğu rengin 532 nm dalga boyunda absorbansının ölçülmesi prensibine dayanarak yapıldı.

#### Reaktifler:

- Potasyum fosfat tamponu                      0,1 M    pH 7,4
- Sodyum dodesil sülfat                         % 8,1
- Asetik asit                                         % 20,    pH 3,5
- Tiyobarbitürik asit (TBA)                     % 0,8
- Bütanol/Piridin                                 15:1

#### Prosedür:

Karaciğer TBARS düzeyinin ölçümü için; dokular fosfat tamponunda homojenize edildi (1 g doku + 9 ml tampon). 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant 0,5'er ml (500 µl) alınarak herbirinin üzerine 0,2 ml %8,1 Sodyum dodesil sülfat, 5 ml %20 asetik asit (pH: 3,5) ve 1,5 ml %0,8 TBA solüsyonu eklenerek 95 °C'de 60 dakika kaynatıldı. Soğutulduktan sonra 5 ml Bütanol:Piridin (15:1) eklendi ve karıştırılıp 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst tabakadaki rengin absorbansı reaktif körüne karşı 532 nm dalga boyunda okundu.

Standart olarak 1,1,3,3-tetraetoksipropan'ın 4,173 µmol/L'lik çözeltisi kullanıldı. TBARS düzeyleri plazmada nmol/mg protein olarak ifade edildi. ve aşağıdaki formüle göre hesaplandı;

$$C_N = (A_N/A_S) \times C_S$$



$C_N$ : Numunenin Konsantrasyonu  
 $C_S$ : Standardın Konsantrasyonu  
 $A_N$ : Numunenin Absorbansı  
 $A_S$ : Standardın Absorbansı

### 3.2.2. Karaciğer Protein Karbonil Grupları Tayini

Karaciğer protein karbonil grupları Levine ve ark. modifiye spektrofotometrik metoduna göre çalışıldı (170).

#### Prensip:

2,4-dinitrofenilhidrazin (DNP) karbonil grupları ile birleştiğinde renkli bir hidrazon oluşmakta ve oluşan bu hidrazonun absorbansı 360 nm dalga boyunda okunmaktadır.



#### Reaktifler:

- DNP (2,4- dinitrofenilhidrazin) 10 mM
- HCl 2 N
- TCA (Trikloroasetikasit) %10, %20
- NaOH 1M
- Sodyum fosfat tamponu 1/15 M pH:7,8

#### Prosedür:

Karaciğer dokuları fosfat tamponunda homojenize edildi (1 g doku + 9 ml tampon). 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatanttan 500 µl alınarak üzerine 500 µl %20 TCA eklenip vortekslenmek suretiyle karıştırıldı. 4000 rpm'de 15 sn santrifüj edildikten sonra süpernatant döküldü. Pelet 500 µl DNP (2N HCl içinde 50 °C'de çözülecek) ile karıştırıldıktan sonra

karanlıkta oda ısısında bir saat bekletildi. Her 10 dakikada bir vortekslenerek pelletin DNP ile muamelesi sağlandı. Daha sonra 500 µl TCA eklenip 2-3 dakika oda ısısında dinlendirildi. 4000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant döküldü ve aynı işlem %10 TCA ile üç kez tekrarlandı. presipitat 2 ml 1 M NaOH içinde 37 °C'de 30 dk. bekletilerek çözüldü. Numunenin absorbansı NaOH körüne karşı 360 nm dalga boyunda Shimadzu UV-1601 spektrofotometresinde okundu.

$\epsilon_{\max} = 22000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  kullanılarak sonuçlar µmol/mg protein olarak verildi.

### 3.2.3. Karaciğer -SH Grupları Tayini

Karaciğer -SH grupları Koster ve ark. spektrofotometrik metoduna göre belirlendi (171).

#### Prensip:

Protein SH grupları, DTNB tarafından indirgenir ve disülfid bağı oluşturarak bir kromofor (5-merkaptto-2-nitrobenzoik asit) açığa çıkarırlar. Oluşan kromoforun absorbansı 412 nm dalga boyunda okunmaktadır.

#### Reaktifler:

- DTNB (5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoik asit)) 2 mM
- Potasyum fosfat tamponu 0,1 M pH 7,4
- Sodyum Sitrat %1

#### Prosedür:

100 µl numune üzerine 1500 µl (1,5 ml) fosfat tamponu eklendi. 400 µl DTNB (%1 sodyum sitrat içinde) ilave edildikten sonra 5 dakika 37 °C'de bekletildi. Numunelerin absorbansı 412 nm dalga boyunda reaktif körüne karşı Shimadzu UV-1601 spektrofotometresinde okundu.

Sonuçlar  $\epsilon_{\max}=13600 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  kullanılarak nmol/mg protein olarak verildi.

### 3.2.4. Karaciğer GSH Düzeylerinin Ölçümü

Karaciğer GSH düzeyleri spektrofotometrik olarak Beutler yöntemi ile belirlendi (172).

#### Prensip:

Dokudaki GSH'ın SH grupları bir disülfid kromojeni olan 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB)'i indirgemesi ile sarı renkli bir bileşik oluşur. Bu bileşiğin 412 nm dalga boyunda ölçülen absorbansı GSH konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

#### Reaktifler:

- Potasyum fosfat tamponu 0,1 M pH 7,4
- Çöktürücü solüsyon (Proteinsizleştirme çözeltisi)
  - Metafosforik asit 1,67 g/dl,
  - EDTA 0,2 g/dl
  - NaCl 30 g/dl
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  çözeltisi 0,3 M
- DTNB 2 mM
- Sodyum sitrat %1

#### Prosedür:

Karaciğer dokuları fosfat tamponunda homojenize edildi (1 g doku + 9 ml tampon). 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatanttan 0,5 ml alınıp üzerine 1,5 ml fosfat tamponu eklendi. Hazırlanan süpernatant numuneleri üzerine 3 ml çöktürücü solüsyondan eklenerek karıştırıldı. 5 dakika oda ısısında bekledikten ve renk kıvamına geldikten sonra süzgeç kağıdından süzülerek filtrat elde edildi. 0,4 ml filtrat üzerine 2 ml 0,3 M

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> çözeltisi ve 0,5 ml 40 mg/dl DTNB (%1'lik sitrat içerisinde çözölen) ile muamele edilerek oluşun rengin absorbansı Shimadzu UV-1601 spektrofotometresinde 412 nm dalga boyunda reaktif körüne karşı okundu. GSH standartı (50 µmol/L) hazırlandı. Numunelere uygulanan işlem, GSH standardına da uygulandı. GSH düzeyleri, standart ve numune absorbansları kullanılarak aşağıdaki formüle göre hesaplandı ve nmol/mg protein olarak ifade edildi.

$$C_N = (A_N/A_S) \times C_S$$

C<sub>N</sub>: Numunenin Konsantrasyonu

C<sub>S</sub>: Standardın Konsantrasyonu

A<sub>N</sub>: Numunenin Absorbansı

A<sub>S</sub>: Standardın Absorbansı

### 3.2.5. Karaciğer CAT Aktivitelerinin Ölçümü

Karaciğer CAT aktiviteleri Beutler'in spektrofotometrik metoduna göre çalışıldı (173).

#### Prensip:

CAT aktivitesi, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin H<sub>2</sub>O'ya dönüşmesi esnasındaki absorbans değişimi reaktif körüne (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hariç diğer bütün reaktifleri içeren kör) karşı 230 nm dalga boyunda absorbans farkları alınarak hesaplandı.

#### Reaktifler:

- Sodyum Fosfat tamponu                      1/15 M    pH:7,8
- Tris-HCl-EDTA                                pH: 8,0
- Tris-HCl                                        1 mM
- EDTA                                         5 mM
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>    10 mM

**Prosedür:**

Karaciğer dokuları fosfat tamponunda homojenize edildi (1 g doku + 9 ml tampon) ve 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatanttan 1/2000'lik dilüsyon hazırlandı.

100 µl Tris-HCl-EDTA (pH:8,0) üzerine 1800 µl 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve 60 µl distile su eklenip 10 dakika 37 °C'de inkübe edildi. Enzimatik reaksiyon, dilüe homojenat (1/2000)'tan 40 µl eklenmesi ile başlatıldı. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin H<sub>2</sub>O'ya dönüşümünü, 4 dakika boyunca reaktif körüne karşı (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hariç diğer bütün reaktifleri içeren kör) absorbans değişimi izlenip kaydedildi (5 ölçüm yapıldı). Bir dakikada oluşan ABS değişimi (ΔABS) bulundu.

Enzim ünitesi, absorbans değişimi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye ait ekstinksiyon katsayısına bölünerek aşağıdaki formüle göre hesaplandı. CAT aktiviteleri U/mg protein olarak ifade edildi.

$$A=(\Delta\text{ABS}/(E \times N \times \text{VH})) \times \text{TH}$$

E: Milimolar ekstinksiyon katsayısı (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> için 0,71)

N: İndikatörün molekül sayısı (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> için 2)

VH: Homojenatın volümü

ΔABS: Dakikada değişen absorbans

TH: Total hacim (3 ml)

### 3.2.6. Karaciğer SOD Aktivitelerinin Ölçümü

Karaciğer SOD aktiviteleri Winterbourn ve ark. spektrofotometrik metoduna göre çalışıldı (174).

#### Prensip:

Yöntemin esasını oksijen ve fotoredüksiyonla indirgenen riboflavinin reaksiyonu sonucu oluşan  $O_2^{\cdot -}$  ile NBT'un redüksiyonunu enzimin inhibe etme yeteneği oluşturur.

#### Reaktifler:

- EDTA+NaCN 0,1 M  
(0,1 M 100 ml EDTA içine 1,5 g NaCN eklenir)
- Nitro Blue Tetrazoliumchloride (NBT) 1,5 mM
- Sodyum fosfat tamponu 1/15 M pH 7,8
- Riboflavin 0,12 mM

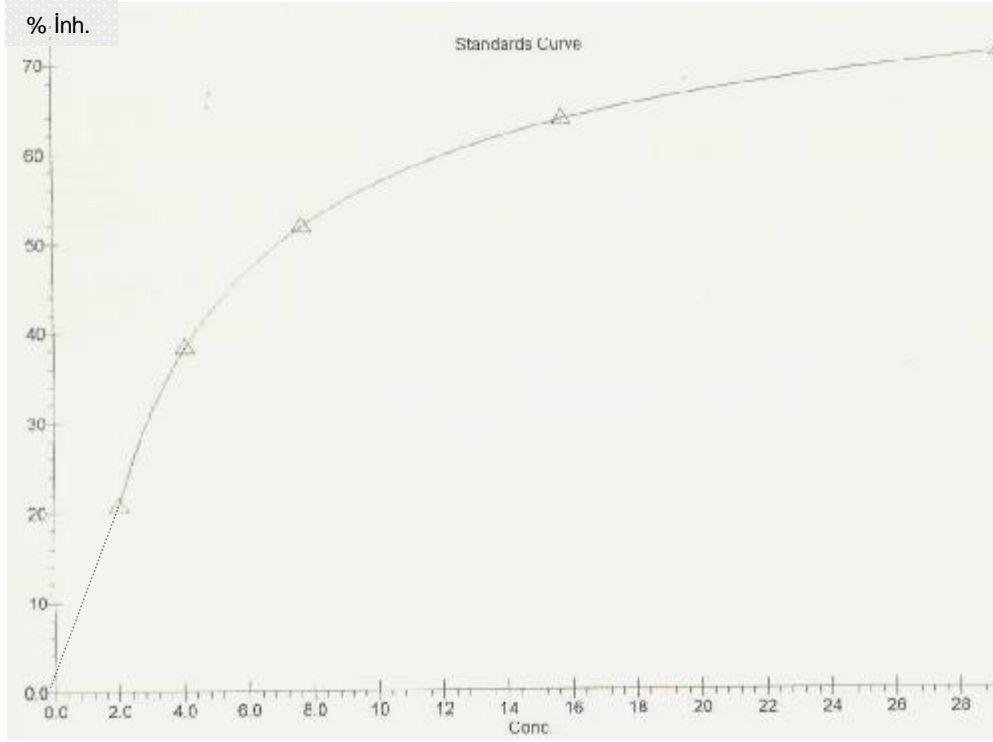
#### Prosedür:

Karaciğer dokuları fosfat tamponunda homojenize edildi (1 g doku + 9 ml tampon). 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatanttan 50 µl alınıp üzerine 200 µl EDTA+NaCN eklendi. Ardından 100 µl NBT, 2,6 ml fosfat tamponu ve 50 µl riboflavin eklendikten sonra 15 dakika kutu içinde florasan ışığına maruz bırakıldı. Oluşan rengin absorbansı Shimadzu UV-1601 spektrofotometresinde 560 nm dalga boyunda hava körüne karşı okundu. % inhibisyon aşağıdaki formüle göre hesaplandı. Aynı işlem SOD standartları ile tekrarlandı. Sonuçlar aşağıdaki grafiğe göre hesaplandı ve U/mg protein olarak verildi.

$$\% \text{ İnhibisyon} = 100 \times (A_K - A_N) / A_K$$

$A_K$ : Kör absorbansı

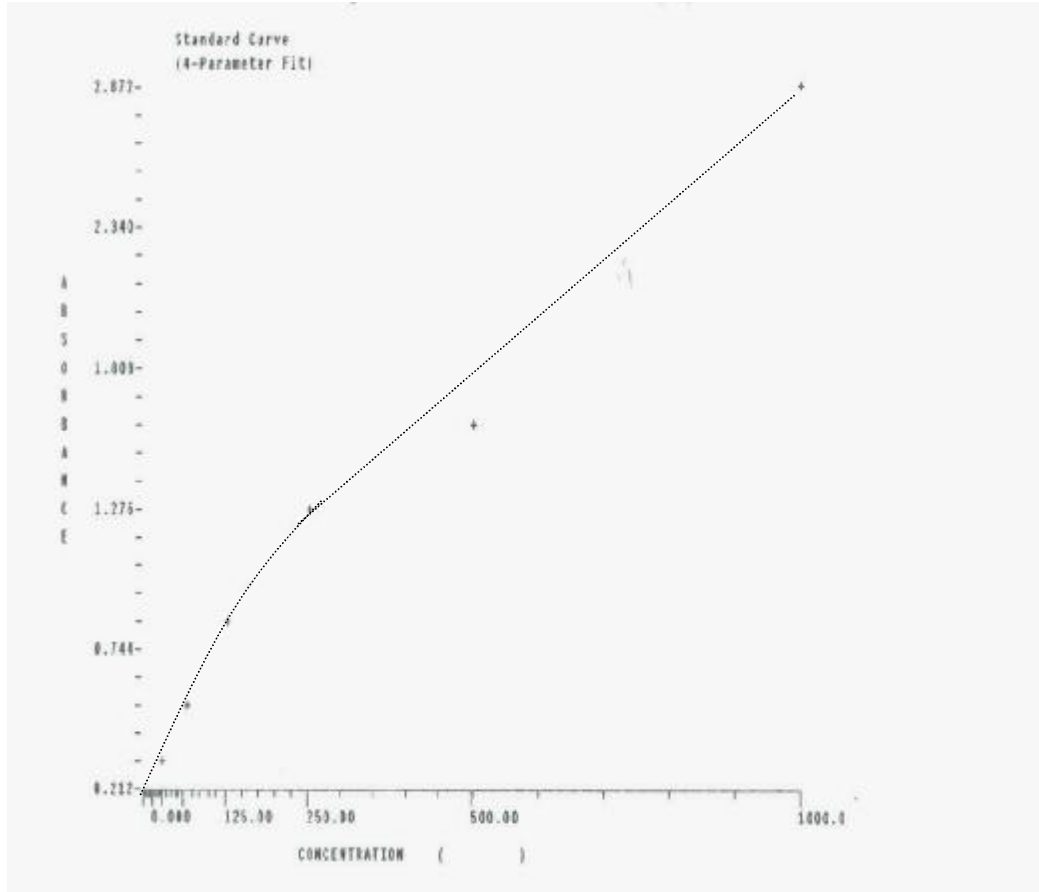
$A_N$ : Numune absorbansı



Şekil 3.2.6.1. SOD standart grafiği

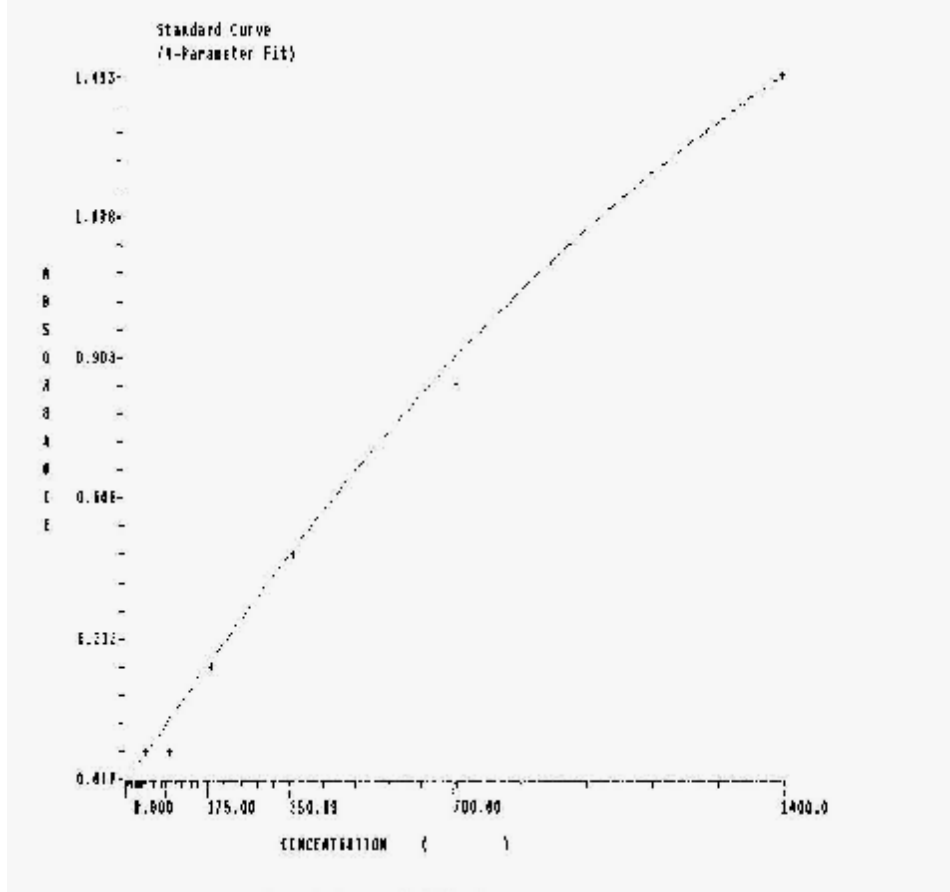
### 3.2.7. Karaciğer Sitokin Düzeylerinin Ölçümü

Karaciğer TNF- $\alpha$  ve IFN- $\gamma$  sitokin düzeyleri Trinity (Biotech Captia Reader) model ELISA cihazında Biosource (BioSource Europe S.A. Rue de l'Industrie, 8 B-1400 Nivelles, Belgium)'den alınan kitlelerle antijen-antikor birleşmesine dayalı yöntemle ölçüldü.



Şekil 3.2.7.1. TNF- $\alpha$  Standart grafiği.





Şekil 3.2.7.2. IFN- $\gamma$  Standart grafiği.

### 3.3. İstatiksel Analiz

Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata (SEM) olarak verildi. İstatistiksel analiz SPSS 10.0 versiyonu (Chicago, IL, USA) kullanılarak Mann-Whitney U testi ile yapıldı. İstatistiksel anlamlılık seviyesi olarak  $p < 0,05$  seviyesi kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Karaciğer TBARS Düzeyleri

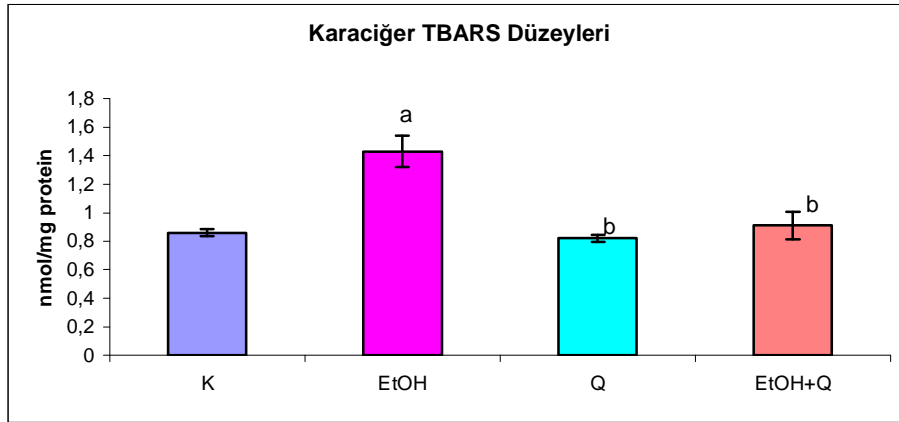
Karaciğer TBARS düzeyleri Tablo 4.1.1 ve Şekil 4.1.1'de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre karaciğer TBARS düzeyleri EtOH grubunda kontrol grubuna göre, anlamlı olarak yüksek ( $p<0.05$ ), Q ve EtOH+Q gruplarında ise EtOH grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ( $p<0.05$ ).

**Tablo 4.1.1.** Karaciğer TBARS düzeyleri

Gruplar	nmol/mg Protein
Kontrol	0,86 ± 0,024
EtOH	1,43 ± 0,11 <sup>a</sup>
Quercetin	0,82 ± 0,026 <sup>b</sup>
EtOH	0,91 ± 0,098 <sup>b</sup>

(a) K grubu ile karşılaştırıldığında  $p<0,05$

(b) EtOH grubu ile karşılaştırıldığında  $p<0,05$



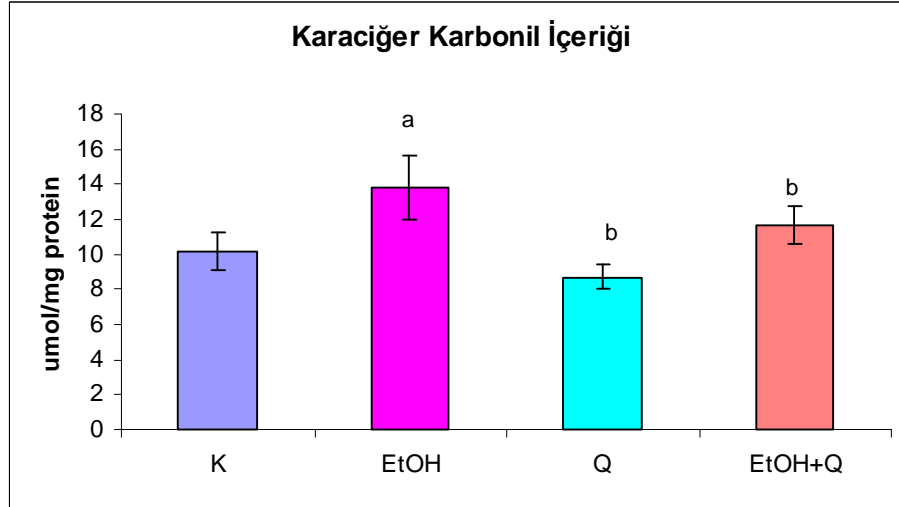
**Şekil 4.1.1.** Karaciğer TBARS düzeyleri

### 4.2. Karaciğer Protein Karbonil Grupları

Karaciğer protein karbonil içerikleri Tablo 4.2.1 ve Şekil 4.2.1'de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre protein karbonil düzeyleri EtOH grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek ( $p<0.05$ ), Q ve EtOH+Q gruplarında ise EtOH grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ( $p<0.05$ ).

**Tablo 4.2.1.** Karaciğer protein karbonil grupları içeriği

Gruplar	$\mu\text{mol/mg protein}$
Kontrol	$10,16 \pm 1,09$
EtOH	$13,77 \pm 1,82^a$
Quercetin	$8,72 \pm 0,69^b$
EtOH+Q	$11,67 \pm 1,06^b$

(a) K grubu ile karşılaştırıldığında  $p < 0,05$ (b) EtOH grubu ile karşılaştırıldığında  $p < 0,05$ 

Şekil 4.2.1. Doku protein karbonil grupları düzeyi

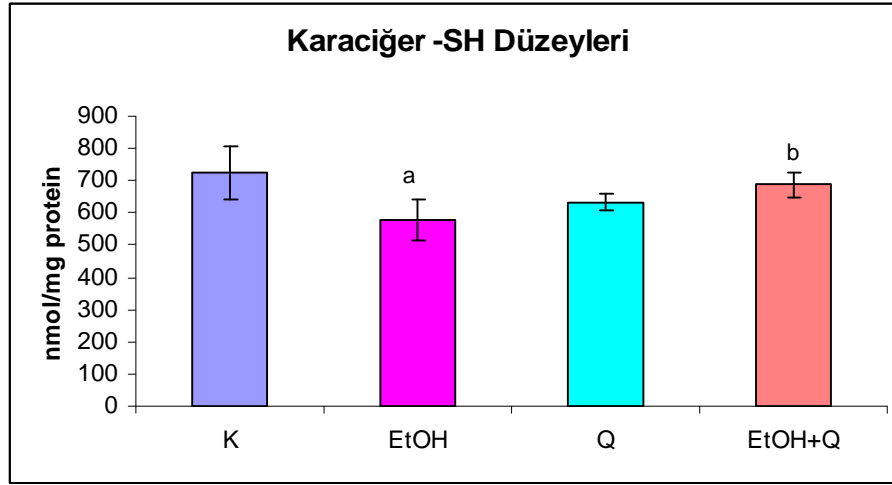
### 4.3. Karaciğer Sülfhidril (-SH) Grupları

Karaciğer -SH düzeyleri Tablo 4.3.1. ve Şekil 4.3.1'de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre karaciğer SH düzeyleri EtOH grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük ( $p < 0,05$ ), EtOH+Q grubunda ise EtOH grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ( $p < 0,05$ ).

**Tablo 4.3.1.** Karaciğer -SH grupları düzeyi

Gruplar	$\text{nmol/mg protein}$
K	$724 \pm 80,83$
EtOH	$577 \pm 65,38^a$
Q	$632 \pm 25,79$
EtOH+Q	$687 \pm 38,2^b$

(a) K grubu ile karşılaştırıldığında  $p < 0,05$ ,(b) EtOH grubu ile karşılaştırıldığında  $p < 0,05$



Şekil 4.3.1. Karaciğer -SH düzeyleri

#### 4.4. Karaciğer GSH Düzeyleri

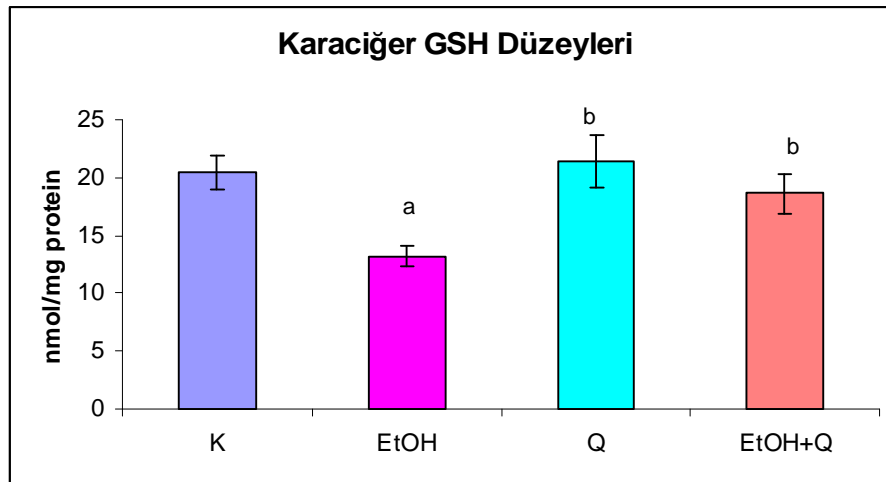
Karaciğer GSH düzeyleri Tablo 4.4.1 ve Şekil 4.4.1'de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre karaciğer GSH düzeyleri EtOH grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük ( $p < 0.05$ ), Q ve EtOH+Q grubunda ise EtOH grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ( $p < 0.05$ ).

Tablo 4.4.1. Karaciğer GSH düzeyleri

Gruplar	nmol/mg protein
K	20,46 ± 1,469
EtOH	13,23 ± 0,95 <sup>a</sup>
Q	21,43 ± 2,3 <sup>b</sup>
EtOH+Q	18,61 ± 1,69 <sup>b</sup>

(a) K grubu ile karşılaştırıldığında  $p < 0,05$ ,

(b) EtOH grubu ile karşılaştırıldığında  $p < 0,05$



Şekil 4.4.1. Doku redükte glutatyon (GSH) düzeyleri

#### 4.5. Karaciğer CAT Aktiviteleri

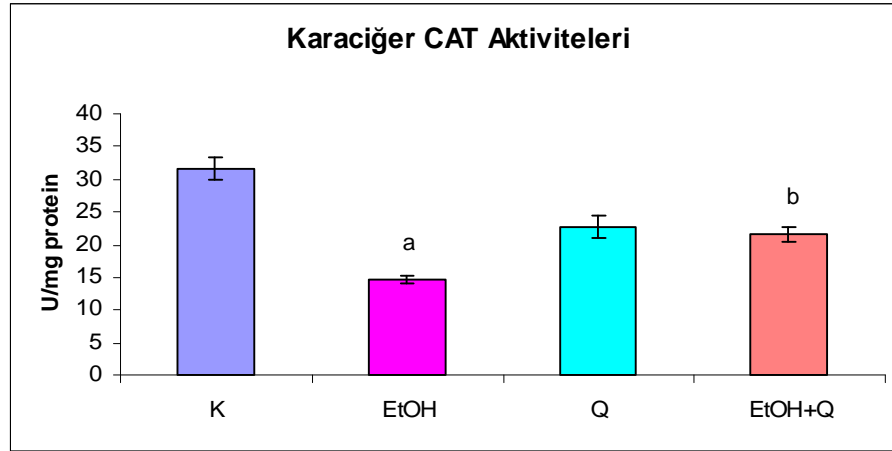
Karaciğer CAT aktiviteleri Tablo 4.5.1 ve Şekil 4.5.1'de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre doku katalaz aktiviteleri EtOH grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük ( $p<0.05$ ), EtOH+Q grubunda ise EtOH grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ( $p<0,05$ ).

**Tablo 4.5.1.** Karaciğer Katalaz aktiviteleri

Gruplar	U/mg protein
K	31,68 ± 1,67
EtOH	14,71 ± 0,67 <sup>a</sup>
Q	22,7 ± 1,69
EtOH+Q	21,55 ± 1,11 <sup>b</sup>

(a) K grubu ile karşılaştırıldığında  $p<0,05$ ,

(b) EtOH grubu ile karşılaştırıldığında  $p<0,05$



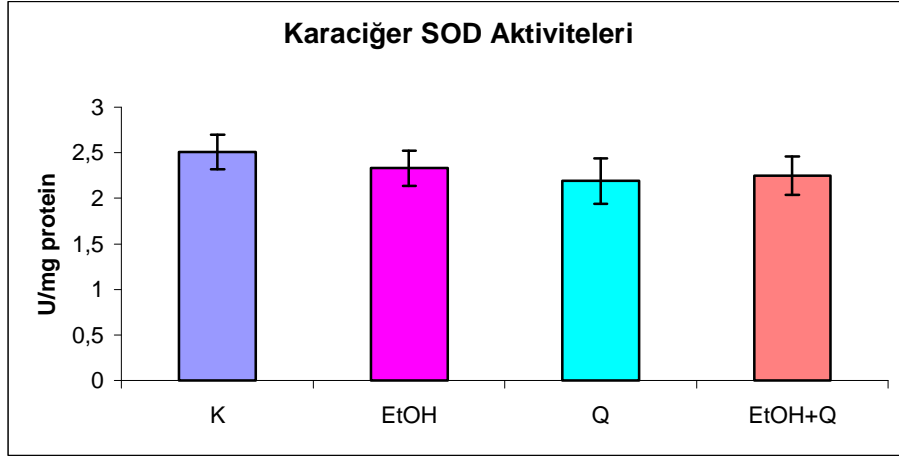
Şekil 4.5.1. Karaciğer Katalaz aktiviteleri

#### 4.6. Karaciğer Süperoksit dismutaz (SOD) Aktiviteleri

Karaciğer SOD aktiviteleri Tablo 4.6.1 ve Şekil 4.6.1'de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre SOD aktiviteleri bakımından anlamlı fark bulunamadı.

**Tablo 4.6.1.** Karaciğer SOD aktiviteleri

Gruplar	U/mg protein
Kontrol	2,51 ± 0,19
EtOH	2,33 ± 0,19
Quercetin	2,19 ± 0,25
Q + EtOH	2,25 ± 0,21



Şekil 4.6.1. Karaciğer SOD aktiviteleri

#### 4.7. Karaciğer Sitokin Düzeyleri

##### 4.7.1. TNF- $\alpha$ Düzeyleri:

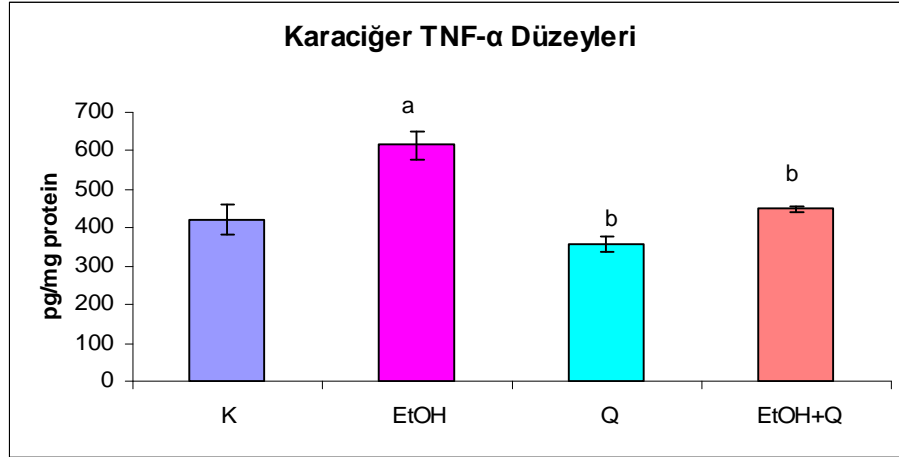
Karaciğer TNF- $\alpha$  düzeyleri Tablo 4.7.1.1 ve Şekil 4.7.1.1'de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre karaciğer TNF- $\alpha$  düzeyleri EtOH grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek ( $p < 0.05$ ), Q ve EtOH+Q gruplarında ise EtOH grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ( $p < 0.05$ ).

**Tablo 4.7.1.1.** Karaciğer TNF- $\alpha$  düzeyleri

Gruplar	pg/mg protein
K	421,877 $\pm$ 39,212
EtOH	614,366 $\pm$ 37,8 <sup>a</sup>
Q	357,739 $\pm$ 17,77 <sup>b</sup>
Q + EtOH	449,187 $\pm$ 7,36 <sup>b</sup>

(a) K grubu ile karşılaştırıldığında  $p < 0,05$ ,

(b) EtOH grubu ile karşılaştırıldığında  $p < 0,05$

Şekil 3.7.1.1. Karaciğer TNF- $\alpha$  düzeyleri

#### 4.7.2. IFN- $\gamma$ Düzeyleri

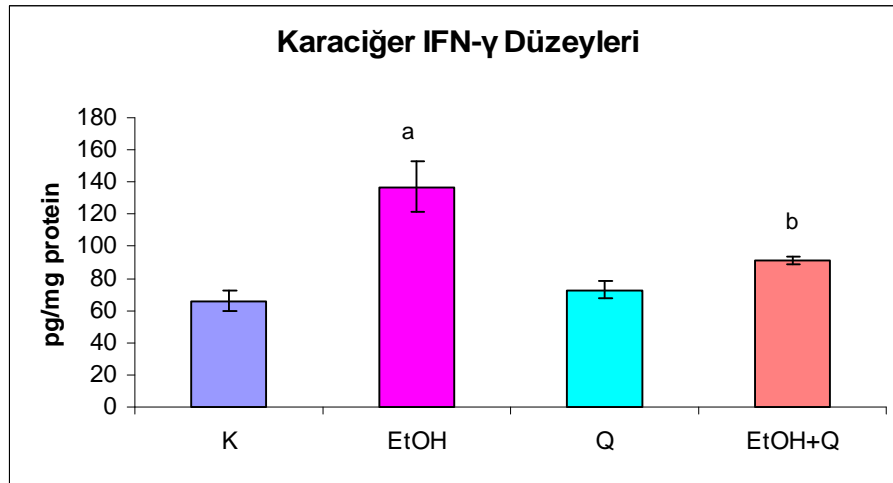
Karaciğer IFN- $\gamma$  düzeyleri Tablo 4.7.2.1 ve Şekil 4.7.2.1'de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre karaciğer IFN- $\gamma$  düzeyleri EtOH grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek ( $p < 0.05$ ), EtOH+Q grubunda ise EtOH grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ( $p < 0.05$ ).

Tablo 4.7.2.1. Karaciğer IFN- $\gamma$  düzeyleri

Gruplar	pg/mg protein
Kontrol	66 $\pm$ 6,94
EtOH	137 $\pm$ 15,9 <sup>(a)</sup>
Quercetin	73 $\pm$ 5,06
Q + EtOH	91 $\pm$ 2,72 <sup>(b)</sup>

(a) K grubu ile karşılaştırıldığında  $p < 0,05$ ,

(b) EtOH grubu ile karşılaştırıldığında  $p < 0,05$

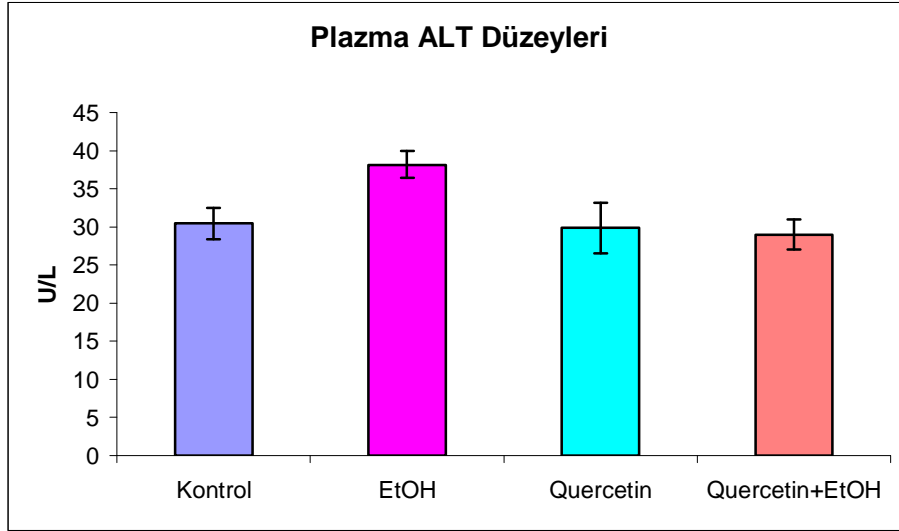
Şekil 4.7.2.1. Karaciğer IFN- $\gamma$  düzeyleri

#### 4.8. Plazma ALT Düzeyleri

Plazma ALT düzeyleri Tablo 3.8.1 ve Şekil 3.8.1'de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı. Ancak kontrol grubuna göre EtOH grubunda göreceli bir artış, Q ve EtOH+Q gruplarında ise EtOH grubuna göre göreceli bir düşüklük görüldü.

**Tablo 4.8.1.** Plazma ALT Düzeyleri

Gruplar	U/L
Kontrol	30,43 ± 2,09
EtOH	38,17 ± 1,77
Quercetin	29,86 ± 3,33
Q + EtOH	29,00 ± 1,98



**Şekil 4.8.1.** Plazma ALT Düzeyleri



## 5. TARTIŞMA

Kronik alkol alımı ROS'nin oluşumunu indükleyen faktörlerden biridir. Kronik alkol alımı sırasında CYP450 2E1 komponentine sahip olan MEOS devreye girer. CYP450 2E1 indüksiyonunda ROS jenerasyonu artarken, ADH sisteminde ise NADH üretimi yoluyla intrasellüler redoks statü değişir ve bu durum mitokondriyal ROS üretimini tetikler. Ayrıca sekonder ürün olan asetaldehit, proteinlerin tersiyer yapılarını bozmak suretiyle ROS'nin üretimine katkıda bulunur (55-57,60-63). ROS protein, karbohidrat ve lipid moleküllerinde oksidatif hasara neden olmaktadır (5,10-12,67). Kronik etanol tüketiminde meydana gelen ROS, lipidler, proteinler, nükleik asitler ve karbohidratlar üzerine etkilidirler. Etanol metabolizması esnasında ve etanolla indüklenen oksidatif strese kaynaklanan lipid peroksidleri ve reaktif aldehytlar (MDA, 4-HNE ve akrolein gibi) alkolik karaciğer hasarının patogenezinde tetikleyici rol oynadıkları kanıtlanmıştır. ROS etkisiyle oluşan lipid peroksidasyon ve karbohidrat oksidasyon ürünleri de proteinlerin amino asit içeriğinde modifikasyonlar oluşturmakta ve plazma protein karbonil içeriğinde artışa neden olmaktadır (2-3,48,55-57,59-60).

Oral etanol alımından sonra, direkt etanole maruz kalarak hasara uğramış mukoza hücreleri yüzeyinden salınan spesifik proteazlarca ksantin dehidrogenaz ksantin oksidaza dönüştürülmektedir. Etanol oksidasyon prosesinde üretilen AA, XO için substrat gibi davranır. XO sisteminde üretilen  $O_2^{\cdot-}$  Fenton reaksiyonu yoluyla  $\cdot OH$  radikallerine dönüştürülür.  $\cdot OH$  radikalleri lipid peroksidasyonunu başlatır. Rat karaciğer mikrozomlarında  $Fe^{2+}$  iyonlarının perferil iyonları vasıtasıyla lipid peroksidasyonunu indükleyebileceği rapor edilmiştir. Lipid peroksidasyonu ve protein karbonil bileşikler, oral etanol alınmasıyla oluşan gastrik hasar ile ilgili ROS üretiminin bir sonucudur (66). Quercetin ksantin/XO sistemi, COX ve LOX gibi serbest radikal üretimine katkıda bulunan enzimleri inhibe ederek oksidatif hasarı önlemektedir. Quercetin aynı zamanda antiinflamatuvar etki göstermekte

olup MPO aktivitesini düşürerek mide mukoza hücrelerini aktive olmuş nötrofil infiltrasyonunun zararlı etkilerinden korumaktadır. Quercetin  $Ca^{+2}$  influksu ve protein kinaz aktivitesini supresse etmek suretiyle gastrik dokuda mast hücrelerinden histamin salınımını inhibe ettiği bilinmektedir (100).

Alkol metabolizmasında karaciğer primer rol oynamaktadır. Gastro-intestinal yoldan hızla emilen etanolün % 90'ı karaciğer hücrelerinde metabolize olmaktadır. Etanolün neden olduğu oksidatif stresin insanlarda yağlı karaciğer, siroz, fibrozis gibi karaciğer hastalıklarına neden olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte canlının bir organında meydana gelen olaylardan, kan yolu ile diğer organların da etkilenmesi beklenir. Bu nedenle biz alkolün etkisini, kronik alkol tüketiminden en fazla etkilenen organ olan karaciğerde inceledik.

İlk kez 1963 yılında, Di Luzio kronik alkol tüketimiyle karakterize lipid peroksidasyonunu tespit etmiştir (175). Bu lipid peroksidasyonu artmış serbest radikal reaksiyonlarının bir indikatörüdür. MDA ise lipid peroksidasyon ürünlerinden biridir. MDA membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna neden olur. Bu da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirebilir. Bu etkiler MDA'nın niçin mutajenik, genotoksik ve karsinojenik olduğunu açıklar. Ayrıca MDA, MDA-Asetaldehid ve MDA-Protein yapılarına karşı oluşan antikolar otoimmün bir hasara neden olabilirler (49).

Bizim çalışmamızda kronik etanol verilen ratlarda (EtOH grubu) karaciğer TBARS düzeyleri K, Q ve EtOH+Q grubuna göre anlamlı olarak yüksek, EtOH+Q grubunda ise EtOH grubuna göre anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. EtOH+Q grubunda düşük TBARS düzeyleri, quercetinin oksidatif strese karşı koruyucu etkisine bağlanabilir.

Cardin ve ark. (141) kronik alkolik karaciğer hastalığı olanlarda serum TBARS düzeylerinin arttığını ve steatoz skorunun da kontrol grubuna göre yüksek olduğunu göstermişlerdir. Fiorelli ve ark. (176) alkolik sirozlu hastalarda TBARS, 4-HNE ve diğer lipid peroksitlerinin, nonalkolik sirozlu hastalarda kontrol grubundan daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Molina ve ark. (29), yaptıkları çalışmada kronik etanol verilen ratlarda TBARS düzeyleri, kontrol grubuna göre anlamlı bir artış göstermekte iken hem quercetin ve hem de etanol verilen ratlarda ise TBARS düzeylerinde bizim sonuçlara benzer şekilde bir düşme tespit etmişler.

Flavonoidlerin TBARS üzerindeki etkileri birçok araştırmacı tarafından çalışılmış ve TBARS düzeylerini anlamlı olarak düşürdüğü görülmüştür (28, 93,97-98). Flavonoidlerin TBARS'ı düşürme etkisi genellikle lipid peroksidasyonunu başlatıcı olarak görülen  $\cdot\text{OH}$  radikali ve onun prokürsörü olan  $\text{O}_2^{\cdot-}$  radikalini temizleme etkisine ve zincir kırıcı etkilerine dayandırılmaktadır. Flavonoidler aynı zamanda reaktif oksijen ürünlerinin kaynağı olan ksantin oksidaz, siklooksijenaz, lipoksijenaz, NADPH oksidaz, fosfolipaz A<sub>2</sub>, fosfolipaz C, miyeloperoksidaz, CYP 450 2E1 bağımlı oksidazların metabolik yollarını inhibe ederek serbest radikal oluşumunu engellemektedirler (28,83-85,103-104,109).

Membran fosfolipidlerinin fosfolipaz A<sub>2</sub> tarafından parçalanması ile oluşan araşidonik asitin lipoksijenazlar tarafından oksidasyonu ile endoperoksitler oluşmaktadır (32). Takahama ve ark. (27) göre linoleik asidin lipoksijenaz tarafından peroksidasyonu quercetinin lipoksijenazı inhibe etmesi ile engellenmektedir. Moroney ve ark. (69) peritoneal lökositlerle yaptıkları çalışmada quercetinin lipoksijenazı inhibe ederek TBARS seviyelerini düşürdüğünü göstermişlerdir. Terao ve ark. (113) da quercetinin fosfolipid çift tabakalarında lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etkisini göstermişlerdir.

Quercetin'in ayrıca Fe ve Cu gibi geçiş metallerini elatlayarak bu iyonların Fenton reaksiyonu ve Haber-Weis reaksiyonları ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den  $\cdot$ OH radikali oluşumunu engelleyerek lipid peroksidasyonunu önlemektedirler (21-22,28,85,103).

Serbest radikallerin reaktif etkilerinden dolayı oksidasyona uğrayan diğer bir makromolekül, proteinlerdir. Proteinlerin bazı aminoasit rezidüleri, ROS tarafından karbonil türevlerine dönüşürler. Serbest radikaller, katyon bağlanma bölgesindeki ve yakınındaki aminoasit rezidülerini oksitler. Bu reaksiyon genelde proteinleri, esansiyel katyon bağlanma bölgelerini hasara uğratarak inaktive eder.

Esterbauer ve ark. (177) poliansatüre yağ asitlerinin radikal bağımlı oksidasyonu sonucu  $\alpha,\beta$ -doymamış aldehitlerinin, özellikle 4-HNE'nin oluştuğunu ve bu moleküllerin proteinlerin sülfidril grupları ile "Michael addition tip" mekanizması ile reaksiyona girerek, karbonil fonksiyonunu içeren daha stabil tiyoeter türevlerini oluşturduklarını göstermişlerdir. Ayrıca bu  $\alpha,\beta$ -doymamış aldehitleri histidin ve lizin rezidüleri ile reaksiyona girerek, karbonil içeren molekülleri oluşturmaktadırlar.

Yaptığımız çalışmada kronik etanol verilen ratlarda karaciğer dokusu protein karbonil içeriği düzeyleri EtOH grubunda K, Q ve EtOH+Q gruplarına göre anlamlı yüksek olup EtOH+Q grubunda ise EtOH grubuna göre düşük protein karbonil düzeyleri tespit edilmiştir. Bu durum, quercetin'in kronik etanol tüketiminde meydana gelen serbest radikalleri temizleme özelliğinden ve oksidatif strese karşı koruyucu etkisinden kaynaklanabilir.

Molina ve ark. (29), yaptıkları çalışmada kronik etanol verilen ratlarda protein karbonil düzeyleri, kontrol grubuna göre anlamlı bir artış göstermekte iken hem quercetin ve hem de etanol verilen ratlarda ise protein karbonil düzeylerinde bizim sonuçlara benzer şekilde düştüğünü göstermişler.

İntragastrik yolla alkol alımında en fazla etkilenen organ midedir. Kahraman ve ark. (100) intragastrik yolla %80 EtOH (v/v) verdikleri ratlarda, gastrik doku TBARS düzeyleri ile protein karbonil içeriklerinde yükselme tespit etmişlerdir. Quercetin'in ise bu parametreleri anlamlı şekilde düşürdüğünü görmüşlerdir.

GSH hücrelerde bulunan en önemli nonenzimatik antioksidan moleküldür. GSH serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Bunun dışında proteinlerin –SH gruplarını redükte halde tutarak bu grupların oksidasyonuna engel olur. Böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu önler. Eritrosit membranını ROS ve lipid hidroperoksitlerinin oksidasyonuna karşı korur. Biyolojik sistemlerde tiyol ve disülfid redoksu önemlidir. Proteinlerin –SH grupları ve özellikle GSH vitamin E ile vitamin C'yi redükte formda tutmaktadır. Böylelikle membran antioksidan defans sistemi korunmuş olur. GSH eksikliğinde okside olan bu vitaminlerin redüksiyonu azalacak ve membran yapısında bozulmalar görülecektir (4-8). Vücuttaki GSH'nın major kaynağı karaciğerdir. GSH, L-glutamat, L-sistein ve L-glisin aminoasitlerinden 2 mol ATP kullanılarak iki basamaklı bir reaksiyonla  $\gamma$ -glutamil sentetaz ve glutatyon sentetaz enzimlerinin katalizi ile sentezlenir ve periferde kullanılmak üzere karaciğerden kana salınır.

Etanol metabolizmasında sekonder ürün olarak oluşan asetaldehit,  $\alpha$ -hidroksietil radikalleri, lipid hidroperoksitleri ve aldehitik lipid peroksit ürünleri GSH ve diğer tiyollere bağlanırlar. Böylelikle GSH havuzunun tüketimi ve hücrel redoks eşitliğinin bozulmasına neden olarak ROS'nin jenerasyonuna katkı sağlar (4,59).

Alkolik insanlarda ve EtOH ile beslenmiş eksperimental hayvan modellerinde GSH düzeylerinin düştüğü rapor edilmiştir (4-8). Ancak bazı araştırmacılar GSH düzeyleri ile GSH/GSSG oranının yükseldiğini bildirmişlerdir. Bu durumu GST, GSSGR ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz

(G6PD) enzim aktivitelerinin artmasına, GPer enzim aktivitesinin düşüklüğüne ve böylelikle GSH sentezinin artmasına atfetmişler (10,178).

Çalışmamızda kronik alkol kullanımından sonra karaciğer GSH ve -SH düzeyleri, EtOH grubunda K grubuna göre düşüklük gösterirken EtOH+Q grubunda ise EtOH grubuna göre anlamlı bir yükselme görülmüştür.

Molina ve ark. (29), yaptıkları çalışmada kronik etanol verilen ratlarda GSH düzeyleri, kontrol grubuna göre anlamlı düşüklük göstermekte iken hem quercetin ve hem de etanol verilen ratlarda ise GSH düzeylerinde bizim sonuçlara benzer biçimde yükseldiğini göstermişler.

SOD enzimi intraselüler enzimatik bir antioksidan olup  $O_2^{\cdot-}$  radikalının,  $H_2O_2$ 'ye dismutasyonunu sağlamaktadır. Böylece antioksidan savunmanın ilk basamağını oluşturur. Hem spontan ve hem de enzimatik dimutasyonla oluşan  $H_2O_2$ , GPer ve CAT tarafından suya dönüştürülerek detoksifiye edilir. Kronik etanol tüketiminde görülen düşük SOD enzim aktivitesi antioksidan kapasitede azalmaya neden olup oksidatif hasarda bir artış görülmektedir. Bunun nedeninin ortamda artmış olan süperoksit anyon radikallerinin etkisi olduğu düşünülmüştür (6-7,67).

Kessova ve ark. (179), SOD geni knockout edilmiş farelerde kronik etanol tüketiminin karaciğer üzerinde etkisini göstermek için yaptıkları çalışmada hepatik ATP içerikleri, mitokondriyal GSH düzeyleri ve Mn-SOD aktiviteleri anlamlı olarak düşük; peroksinitrit, protein karbonil ile lipid peroksidasyon ürünleri gibi oksidatif stres markırları ile serum ALT düzeylerini ise yüksek bulmuşlardır.

Çalışmamızda, karaciğer dokusu SOD aktiviteleri bakımından gruplar arasında anlamlı fark bulunamadı.

Molina ve ark. (29) yaptıkları çalışmada kronik etanol verilen ratlarda SOD enzim aktivitesi, kontrol gruplarına göre anlamlı düşüklük göstermekte iken hem quercetin ve hemde etanol verilen ratlarda ise SOD enzim aktivitesinin yükseldiğini göstermişler.

Katalaz, intraselüler antioksidan bir enzim olup sitozolde ve peroksizomlarda lokalizedir.  $H_2O_2$ 'in moleküler oksijen ve suya dönüşümünü katalizler. Büyük molekülü lipid hidroperoksitlerine etki etmeyip,  $H_2O_2$  ve metil, etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşı gösterir. Kronik etanol tüketiminde diğer antioksidan enzimler gibi katalazın da enzim aktivitesinde önemli derecede bir düşüklük görülmektedir. Bu da antioksidatif defansın zayıflamasına neden olmakta ve hücreler  $H_2O_2$ 'in reaktif etkileri maruz kalmaktadır. Bu da alkolik karaciğer hastalığında oksidatif hasarın önemli derecede artmasına neden olur (1,52-58).

Bizim çalışmamızda, kronik etanol verilen ratlarda karaciğer CAT enzim aktivitesinde kontrol gruplarına göre anlamlı bir düşüş görülmüş, etanolden 2 saat önce quercetin verilen EtOH + Q grubunda ise EtOH grubuna göre karaciğer katalaz enzim aktivitesinde anlamlı bir artış tespit edilmiştir.

Molina ve ark. (29) yaptıkları çalışmada kronik etanol ile beslenmiş ratlarda K grubuna kıyasla katalaz enzim aktivitesinde anlamlı bir düşüklük görülmekte iken kronik etanolün yanında quercetinde verilmiş olan rat grubunda ise EtOH grubuna göre katalaz enzim aktivitesinde anlamlı bir artış olduğunu göstermişlerdir.

Jurczuk ve ark. (180) EtOH verilen ratlarda antioksidan enzim aktivitelerinde SOD'da % 38, CAT'da ise % 6 'lık bir azalma tespit etmişler. Buna mukabil TBARS düzeylerinde ise artış görülmüştür. Serum demir konsantrasyonunda % 6, karaciğer demir konsantrasyonunda ise % 53 artış tespit etmişler.

Alkolik karaciğer hastalığında sitokinlerin rolü konusunda birçok çalışma yapılmıştır. Kronik etanol tüketiminden sonra meydana gelen ROS ve endotoksinler NF- $\kappa$ B aracılığıyla TNF- $\alpha$  gibi proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu stimüle etmektedir. Alkolik hepatitte aktive olan T-hücreleri ve makrofajlar etanolün aracılık ettiği karaciğer hasarının sürdürülmesinde önemli bir role sahip olan TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 ve IFN- $\gamma$ 'yı içeren sitokinleri salgırlar. TNF- $\alpha$  fibroblast proliferasyonunu uyarmakta olup sitotoksik lenfosit aktivitesi ile kollejenaz aktivitesini artırır. Sitotoksik sitokinler hücre ölümünü apoptoz ve nekroz yolu ile gerçekleştirmektedirler (9,13,15-16).

Kan endotoksin düzeyleri etanol alımından en geç bir saat sonra yükselmektedir (16). Endotoksinlerin artışı alkolik karaciğer hastalığı hayvan modellerinde ve alkolik insanların kanlarında tespit edilmiştir. Endotoksin lipopolisakkaritler gut bakterial florası gram-negatif bakterilerin hücre materyallerinden kaynaklanmaktadır. LPS'ler karaciğere LPS-Bağlayıcı protein (LBP) aracılığıyla taşınmaktadırlar ve genelde kupffer hücrelerinde temizlenirler. Endotoksinler kupffer hücrelerine CD14 spesifik reseptörlerine bağlanmak suretiyle hücre içi sinyal zincirini başlatarak kupffer hücrelerinin aktivasyonunu sağlar. Bunun sonucunda sitokinler ve diğer maddelerin sekresyonu sağlanır. Başlıcaları TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  gibi proinflamatuvar sitokinler ile PGE<sub>2</sub> ve PGD gibi prostoglandinlerdir. Gadolinium klorid (GdCl<sub>3</sub>) ile bu hücrelerin yıkımı veya antibiyotiklerle gut florasının sterilizasyonu yoluyla endotoksinlerin azaltılması, erken inflamatuvar cevabı bloklamakta ve etanol yoluyla oluşan hepatik nekrozu azaltmaktadır. Benzer sonuçlar anti-TNF $\alpha$  antikolarıyla da elde edilmektedir. GdCl<sub>3</sub>, kupffer hücrelerini inaktive eder, karaciğer patolojisinde yağlı karaciğer azaltma yoluyla bir düzelme meydana getirir. Ancak inflamasyonu düzeltemez. Bununla beraber GdCl<sub>3</sub> tedavisiyle, etanol tüketimi yoluyla aktive olan karaciğer CYP450 2E1 indüksiyonu anlamlı olarak azalır. Azalmış hepatik steatozis CYP450 2E1 ekspresyonunun azalması ile paralel bir ilişki göstermektedir (16).



TNF- $\alpha$  üretimi alkolik karaciğer hasarının patogenezinde kritik bir faktördür (9,13,180). Alkolün indüklediği TNF- $\alpha$  üretimi prosesinde hem oksidatif stres ve hem de endotoksinler rol oynamaktadır. Bununla beraber bu faktörler arasındaki sebep-sonuç ilişkisi henüz tam olarak anlaşılammıştır. Bazı araştırmacılar akut alkol tüketimini takiben plazma endotoksin yükselmesi, hepatik oksidatif stres ve TNF- $\alpha$  üretimi arasındaki ilişkiyi göstermek amacıyla, alkol hepatotoksitesi oluşturdukları fareleri kullanarak yaptıkları çalışmalarda hepatik TNF- $\alpha$  üretiminin plazma endotoksin ve hepatik lipid proksidasyonu ile ilişki içinde olduğunu tespit etmişlerdir (180). Ayrıca bu faktörlerin birbirleri üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir. ROS ve endotoksinler TNF- $\alpha$  üretimini artırırken, TNF- $\alpha$  üretiminin de lipid peroksidasyonunu indüklediği ve böylelikle ROS üretimini artırdığı rapor edilmiştir (9,13,67, 181).

Yaptığımız çalışmada, intragastrik yolla kronik etanolün etkilerine maruz bıraktığımız EtOH grubunda, plazma ve hepatosit doku homojenatında ölçülen TNF- $\alpha$  ve IFN- $\gamma$  düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı yüksek, EtOH + Q grubunda ise EtOH grubuna göre anlamlı düşük bulundu. Bu sonuç quercetin'in antiinflammatuvar etkilerine atfedilebilir.

Daha önce yapılan birçok çalışmada kronik alkol tüketiminde yüksek sitokin düzeyleri tespit edilmiştir. Monden ve ark. (182) TNF- $\alpha$ , IL-1 ve süperoksit anyon radikalinin, rat hepatosit kültüründe protein sentezini inhibe ettiğini rapor ettiler.

Zhou ve ark. (181) gavaj yoluyla alkol verdikleri farelerde, alkol intoksikasyonunun neden olduğu karaciğer hasarını TNF- $\alpha$  üretimi ve hepatik lipid peroksidasyonu ile ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir. Kupffer hücrelerindeki hepatik TNF- $\alpha$  üretimini immünohistokimyasal lokalizasyon ve mRNA ekspresyonunun ölçümü ile ispatlamışlar.

Daniluk ve ark. (143) Kompanse ve dekompanse alkolik sirozlu hastalarda yaptıkları çalışmada, serum IL-6 düzeylerini hem kompanse hem de dekompanse sirozlularda kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek buldular. TNF- $\alpha$  ve IL-8 düzeyleri ise sadece dekompanse sirozlularda istatistiksel olarak anlamlı yükselmiş olup kompanse sirozlularda ise TNF- $\alpha$  ve IL-8 düzeyleri rölatif yükselme göstermiştir. Proinflamatuvar mediyatör olan bu sitokinler ağır karaciğer hasarının bir göstergesi olarak da kullanılabilir.

Rodriguez ve ark. (69) ağır alkol içicisi olan 43 hastada kontrollere göre yüksek TNF- $\alpha$  ve IFN- $\gamma$  düzeyleri tesbit etmişler. Enfekte olan hastalarda olmayanlara göre IFN- $\gamma$  düzeyleri bakımından anlamlı yüksek bulunurken TNF- $\alpha$  düzeylerinde anlamlı fark görülmemiştir. Tüm hastalarda ödem, jinekomasti ve ensefolapati görülmekteydi.

Ağır içicilerde ve hayvan modellerinde artmış karaciğer doku hasarını sadece TNF- $\alpha$  ve diğer proinflamatuvar sitokinlerin artışıyla açıklamak uygun değildir. Karaciğer parankimal hücreleri TNF- $\alpha$ 'ya cevabı değiştirmektedir. TNF- $\alpha$ , normalde karaciğer hücreleri için sitotoksik değildir, bilakis antiapoptotik özellikleri de mevcuttur. TNF- $\alpha$ , intraselüler bir dizi metabolik yolu başlatarak apoptoz veya nekroz ile hücre ölümüne öncülük eder. TNF- $\alpha$  karaciğer hücreleri üzerinde iki tip plazma membran reseptörüne bağlanır; p55 [tip I TNF reseptör (TNFR1)] ve p75 [tip II TNF reseptör (TNFR2)]. Karaciğer hücrelerinde TNF reseptörleri knockout edilmiş farelerde TNFR1'in etanolün indüklediği karaciğer hasarı için spesifik olduğu rapor edilmiştir (145).

Kronik alkol tüketiminde cinsiyet farklılığı da karaciğer hasarı için önemli bir faktördür. Erkeklerle göre kadınlarda daha düşük miktardaki etanol tüketimi ile karaciğer hasarının gelişmesinin sebebi, kadınlarda gastrik ADH enziminin erkeklerle göre daha İnaktif olmasından kaynaklanmaktadır. Böylelikle kan etanol ve endotoksin düzeyleri erkeklerle nazaran daha yüksek

görülür. NF- $\kappa$ B gibi transkripsiyon faktörleri erkeklere göre yaklaşık 7-8 kat fazla sentezlenir (16).

Colantoni ve ark. (123) 8 hafta boyunca %36 etanol içeren sıvı diyetle besledikleri ratlarda TNF- $\alpha$  düzeyleri kontrollere göre anlamlı yükseklikler bulmuşlardır.

Kronik EtOH tüketiminden sonra kanda artan endotoksin ve ROS, diğer proinflamatuvar sitokinler gibi IFN- $\gamma$  ekspresyonunu arttırmaktadır. IFN- $\gamma$ , iNOS enzim aktivitesini indüklemek suretiyle NO salınımını arttırmaktadır. Ortamda artmış olan NO, CYP450 2E1 üzerinde inhibe edici etkisi bulunmaktadır. Aynı zamanda eksperimental çalışmalarda IFN- $\gamma$ 'nın da CYP450 2E1 indüksiyonunu inhibe ettiği, bu şekilde ROS oluşumunu engellediği ve böylelikle koruyucu rol alabileceği bildirilmiştir. Bununla birlikte, NO ve ONOO<sup>-</sup> türevleri membran makromoleküllerinde oksidasyona neden olarak hücre hasarına da neden olabilirler. Ayrıca NO ve ONOO<sup>-</sup> TNF- $\alpha$  ekspresyonunu da arttırmaktadır (13-20).

Yaptığımız çalışmada, karaciğer IFN- $\gamma$  düzeylerini EtOH grubunda kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulduk. Bununla beraber, EtOH+Q grubunda ise EtOH grubuna göre anlamlı bir düşüş tespit edilmiştir. Bunun sebebi quercetin'in IFN- $\gamma$  stimulosyonunu uyaran ROS ve endotoksinin kan düzeylerini düşürmesinden kaynaklanabilir. Bu da quercetin'in antiinflamatuvar ve antioksidan özelliklerinden ileri gelebilir.

Alkolik karaciğer hastalığı olan hastalarda ve eksperimental hayvan modelleriyle yapılan önceki çalışmalarda, alkol tüketen gruplarda kontrol gruplarına göre IFN- $\gamma$ 'nın yükseldiği rapor edilmiştir (9,13,15-16,142). Bazı araştırmacılar insanlarda, alkolün akut döneminde IFN- $\gamma$  düzeylerinin arttığını belirtmişlerdir (69,143).

## 6. SONUÇ

Etanolün, lipid peroksidasyonunda, protein oksidasyonunda, TNF- $\alpha$  ve IFN- $\gamma$  düzeylerinde artışa yol açması, karaciğer dokusunda oluşturduğu hasarda ROS'nin ve inflamasyonun rolü olduğunu göstermiştir.

Quercetin, karaciğer TBARS ve protein karbonil içeriklerini düşürerek GSH, SH ve CAT düzeylerini yükselterek etanolün yol açtığı oksidatif hasarı önlediği görülmüştür.

### **Muhtemel mekanizmalar:**

1. Quercetin, serbest radikalleri temizleme ve metal iyonlarını şelatlama gibi özellikleri nedeni ile lipid peroksidasyonunu ve protein oksidasyonunu azaltması, lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunu kırarak hasarın ilerlemesini önlemesi.

2. Quercetin, XO, NADPH Oksidaz, MPO, COX ve LOX gibi prooksidan enzimlerin aktivitelerini inhibe etmesi,

3. GSH'nin redükte formda kalmasını sağlayarak antioksidan aktivitede artışa yol açması ve böylelikle proteinlerin SH rezidülerinin oksidasyonunu engellemesi,

4. Karaciğer ROS seviyelerini düşürerek proinflamatuvar sitokinler TNF- $\alpha$  ve IFN- $\gamma$  stimülasyonunu sağlayan faktörlerin azaltılması olarak sıralanabilir.

Sonuç olarak, bu çalışma gösteriyor ki etanol, metabolize edildiği organ olan karaciğerde oksidatif ve antioksidatif parametrelerle yansıtılan oksidatif hasara neden olmaktadır. Ayrıca güçlü bir antioksidan olan quercetin, ise etanolün zararlı etkilerinden karaciğer hücrelerini korumada yararlı olabileceğine veya en azından kısmen hücrelerdeki bu oksidatif hasarı azaltabileceğine inanmaktayız.

## REFERANSLAR

1. Lieber C.S. (1995) Medical disorders of alcoholism. *The New England Journal of Medicine* **333**, 1058-106.
2. Lieber C.S. (1999) Microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS): the first 30 years (1968-1998)-a review. *Alcohol Clin Exp Res* **23**, 991-1007;.
3. Lieber C.S. (1997) Cytochrome P-450 2E1: its physiological and pathological role. *Physiological Review* **77**, 517-544.
4. Dupond I., Bodenez P., Berthou F., Simon B., Bardou L.G., Lucas D. (2000) Cytochrome P-450 2E1 activity and oxidative stress in alcoholic patients. *Alcohol Alcohol* **35**, 98-103;.
5. Koch O.R., Pani G., Barrello S., et al. (2004) Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol induced cell injury. *Molecular Aspects of Medicine* **25**, 191-198.
6. Reinke L.A. (2002) Spin trapping evidence for alcohol-associated oxidative stress. *Free Radical and Biology & Medicine* **32**, 953-957.
7. Nordmann R. (1994) Alcohol and antioxidant system. *Alcohol Alcohol* **29**, 513-522.
8. McDonough K.H. (2003) Antioxidant nutrients and alcohol. *Toxicology* **189**, 89-97.
9. McClain C.J., Shedlofsky S., Barve S., Hill D.B. (1997) Cytokines and alcoholic liver disease. *Alcohol Research and Health* **21**, 317-320.
10. Porta E.A. (1997) Dietary Modulation of oxidative stress in alcoholic liver disease in rats. *J Nutr* **127**, 912S-915S.
11. Abraham P, Wilfred G and Ramakrishna B. Oxidative damage to the hepatocellular proteins after chronic ethanol intake in the rat. *Clinica Chimica Acta* **325**, 117-125.
12. Videla L.A. Valenzuela A. (1982) Alcohol ingestion, liver glutathione and lipoperoxidation: metabolic interrelations and pathological implications. *Life Sciences* **31**, 2395-2407.
13. McClain C.J., Barve S., Deaciuc I., Kugelmas M., Hill D. (1999) Cytokines in alcoholic liver disease. *Seminars in Liver Disease* **19**, 205-219.

14. Andus T., Bauer J., Gerok W. (1991) Effect of cytokines on the liver. *Hepatology* **13**, 364-375.
15. Nanji A.A. (2002) Role of Kupffer cells in alcoholic hepatitis. *Alcohol* **27**, 13-15.
16. Thurman R.G. (1998) Mechanism of hepatic toxicity II. Alcoholic liver injury involves activation of Kupffer cell by endotoxin. *Am J Physiol* **275 (Gastrointest Liver Physiol. 38)**, G605-G611.
17. Dinarello C.A. (1997) Role of pro- and anti-inflammatory cytokines during inflammation: experimental and clinical findings. *J Biol Regul Homeost Agents* **11**, 91-103.
18. Lin H.Z., Yang S.Q., Zeldin G., Diehl A.M. (1998) Chronic ethanol consumption induces the production of tumor necrosis factor- $\alpha$  and related cytokines in liver and adipose tissue. *Alcohol Clin Exp Res* **22**, 231S-237S.
19. Laso F.J., Iglesias M.C., Lopez A., Ciudad J., San Miguel J.F., Orfao A. (1998) Increased interleukin-12 serum levels in chronic alcoholism. *J Hepatol* **28**, 771-777.
20. Laso F.J., Lapena P., Madruga J.I., et al. (1997) Alterations in tumor necrosis factor- $\alpha$ , interferon- $\gamma$ , and interleukin-6 production by natural killer cell-enriched peripheral blood mononuclear cells in chronic alcoholism: relationship with liver disease and ethanol intake. *Alcohol Clin Exp Res* **21**, 1226-1231.
21. Formica J.V., Regelson V. (1995) Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Fd Chem Toxic* **33**, 1061-1080.
22. Heller W., Forkmann G. (1988) Flavonoids: Advanced in research (J.B. Harborne ed.). Chapman & Hall, London.
23. Booth A.N., Murray C.W., Cones F.T., Dees F. (1956) The metabolic fate of rutin and quercetin in the animal body. *Federation Proc* **18**, 251-257.
24. Bors W., Heller W., Michel C., Saran M. (1990) Flavonoid as antioxidant: determination of radical scavenging efficiencies. *Method in Enzymology* **186**, 343-355.
25. Elengovan V., Sekar N., Govindasamy S. (1994) Chemopreventive potential of dietary bioflavonoids against 20-methylcholanthrene-induced tumorigenesis. *Cancer Lett* **87**, 107-113.

26. Morel I., Lescoat G., Cogrel P., et al. (1993) Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin, and diosmetin on iron-loaded rat hepatocytes cultures. *Biochem Pharmacol* **45**, 13-19.
27. Takahama U. (1985) Induced of lipoxygenase-dependent lipid peroxidation by quercetin: mechanism of antioxidative function. *Phytochem* **24**, 1443-1446.
28. Nijveldt R.J., Van Nood E., Van Hoorn D.E.C., Boelens PG, Van Norren K., Van Leeuwen P.A.M. (2001) Flavonoids: a review of probable mechanism of action and potential application. *Am J Clin Nutr* **74**, 418-425.
29. Molina M.F., Reus I.S., Iglesias I., Benedi J. (2003) Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevent and protect against ethanol-induced oxidative stress in Mouse liver. *Biol Pharm Bull* **26**, 1398-1402.
30. Floyd R.A. (1993) Basic Free Radical Chemistry, Free Radical In Aging. Edited By B.P.Yu Boca Raton, F.L:Crc P. 39-55.
31. Fridovich I. (1978) The Biology of Oxygen Radicals. *Science wash* **201**, 875-880.
32. Akkuş İ. (1995) Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza yayınları. Konya
33. Weisiger R.A. (1986) Oxygen radicals and ischemic tissue injury. *Gastroenterology* **90**, 494-496.
34. Koch O.R., Pani G., Borrello S., Colavitti R., Cravero A., Fare S., Galeotti T. (2004) Oxidative stress and antioksidant defenses in ethanol-induced cell injury. *Mol Asp Med* **25**, 191-198.
35. Halliwell B. (1991) Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med* **91**, 11-12.
36. McCord J.M. (1992) Human disease, free radicals and oxidant balance. *Clin Biochem* **26**, 351-357.
37. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1990) Role of free radical and catalytic metal ion in human disease: an overview. *Methods in Enzymology*. **186**, 1-85.
38. Aalt B., Haenen R.M., Doelman J.A. (1991) Oxidant and antioxidant: State of The Art. *Am J Med* **91**, 3-13.

39. Marklund S.L. (1984) Properties of extracellular superoxide dismutase from human lung. *Biochem J* **220**, 269-272.
40. Haber F., Weiss J.J. (1984) The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc R Soc Lond Ser* **147**, 332-351
41. Bradt D.S., Snyder S.H., (1990) Isolation of Nitric Oxide Synthase, a Calmodulin Requiring Enzyme. *Proc Natl Acad Sci* **87**, 682-685.
42. Dawson W.I., Dawson T.M., London E.D., Bradt D.S., Snyder S.H. (1991) Nitric Oxide Mediates Glutamate Neurotoxicity in Primary Cortical Cultures. *Proc Natl Acad Sci* **88**, 6868-6871.
43. Beckman J.S., Beckman T.W., Chen J., Marshall P.A., Freeman B.A. (1990) Apparent Hydroxyl Production By Peroxynitrite: Implication for Endothelial Injury From Nitric Oxide and Super Oxide. *Proc Natl Acad Sci* **87**, 1620-1624.
44. Ogden J.E., Moore P.K. (1995) Inhibition of Nitric Oxide Synthase-a Potential For a Novel Class Of Therapeutic Agent? *TIBTECH* **13**, 70-78.
45. Knowles R.G. (1996) Nitric Oxide Synthases, Keeping The Cell Reduced: Enzymes Influencing Redox Reactions. *Biochemical Society Transactions* **24**, 875-878.
46. Crane B.R., Arvai A.S., Gachui R., Wu C., Ghosh D.K. (1997) The Structure Of Nitric Oxide Synthase Oxygenase Domain and Inhibitor Complexes. *Science* **278**, 425-431
47. Gutteridge J.M.C. (1982) The Role of Superoxide and Hydroxyl Radicals in Phospholipid Peroxidation Catalysed By Iron Salts. *FEBS Lett* **150**, 454-458.
48. Dotan Y., Lichtenberg D., Pinchuk I. (2004) Lipid Peroxidation Cannot Be Used As a Universal Criterion Of Oxidative Stress. *Progress in Lipid Research* **43**, 200-227.
49. Tuma D.J. (2002) Role of Malondialdehyde-Acetaldehyde adducts in liver injury. *Free Radical Biology & Medicine* **32**, 303-308.
50. Stadtman E.R. (1993) Oxidation Of Free Aminoacids and Aminoacids Residues In Protein By Radiolysis and Metal Catalyzed Reactions. *Annu Rev Biochem* **62**, 797-821.
51. Stadtman E.R. (1992) Protein Oxidation and Aging. *Science* **257**, 1220-1224.



52. Lieber C.S. (2000) Alcohol: its metabolism and interaction with nutrients. *Annu Rev Nutr* **20**, 395-430.
53. Lieber C.S. (2002) S-Adenosil-L-Methionin and alcoholic liver disease in animal models: implication for early intervention in human beings. *Alcohol* **27**, 173-177.
54. Lieber C.S. (1994) Mechanism of ethanol-drug-nutrition interaction. *Clin Toxicol* **30**, 631-681.
55. Lieber C.S. (2000) Alcohol and liver: metabolism of alcohol alcohol and its role in hepatic and extrahepatic disease. *Journal of Medicine* **67**, 84-94.
56. Lieber C.S. (1994) Alcohol and the liver: 1994 update. *Gastroenterology* **106**, 1085-1105.
57. Lieber C.S. (2000) Alcoholic liver disease: new insight in pathogenesis lead to new treatments. *Journal of Hepatology* **32**, 113-128.
58. Lieber C.S. (1991) Perspectives: do alcohol calories count? *Am J Clin Nutr* **54**, 976-982.
59. Albano E., French S.W., (1999) Sundberg M.I. Hydroxiethyl Radicals in Ethanol Hepatotoxicity. *Front Biosci* **15**, D533-D540.
60. Celec P., Jani P., Smrekova L., et al. (2003) Effects of anabolic steroids and antioxidant vitamins on ethanol induced tissue injury. *Life Sciences* **74**, 419-434.
61. Cederbaum A.I. (2003) Iron and CYP2E1-dependent oxidative stress and toxicity. *Alcohol* **30**, 115-120.
62. Cederbaum A.I., Wu D., Mari M., Bai J. (2001) CYP2E1-dependent toxicity and oxidative stress in HEPG2 cells. *Free Radical Biology & Medicine* **31**, 1539-1543.
63. Lieber C.S. (2004) CYP2E1: From ASH to NASH. *Hepatol Res* **28**, 1-11.
64. Maher J.J. (1997) Explorin alcohol's effects on liver function. *Alcohol Research and Health* **21**, 5-12.
65. Poli G. (2000) Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Molecular Aspects of Medicine* **21**, 49-98.

66. Mizui T., Sato H., Hirose F., Doteuchi M. (1987) Effect of Antiperoxidatif Drugs on damage induced By Ethanol in Rats. *Life Sci* **41**, 755-763.
67. Arteel G.E. (2003) Oxidant and antioxidant in alcohol-induced liver disease. *Gastroenterology* **124**, 778-790.
68. Lieber C.S. (2003) Relationship Between Nutrition, Alcohol use and Liver Disease. *Alcohol Res Health* **27**, 220-231.
69. Moroney M.A., Alcaraz M.J., Forder R.A., Carey F., Hoult J.R.S. (1988) Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclooxygenase, inhibition by antiinflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids. *J Pharm Pharmacol* **40**, 787-792.
70. Robac J., Duniec Z., Zdrowska H.B., Stenpien W.O., Cisowski W. (1986) The effects of some flavonoids on non-enzymatic lipid peroxidation and enzymatic oxidation of arachidonic acid. *Pol J Pharmacol* **38**, 483-491.
71. Fridovich I. (1975) Superoxide dismutase. *Annu Rev Biochem* **44**, 147-159.
72. İnal E.M., Bor M.N. (1979) Redükte glutatyon ve glutatyon redüktazın klinik önemi. *Doğa Tr J Med Sci* **4**, 24-32.
73. Kaplowitz N., Okhetens M., (1985) The regulation of hepatic glutathione. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* **25**, 715-744.
74. Emri T., Posci I., Szentirmai A. (1997) Glutathione metabolism and protection against oxidative stress caused by peroxides in penicillium chrysogenum. *Free Rad Biol Med* **23**, 809-814.
75. İnal E.M, Bor N.M. (1984) Changes of reduced glutathione, glutathione reductase and glutathione peroxidase after radiation in Guinea pigs. *Biochem Med* **31**, 217-227.
76. Zhang K., Das N.P. (1994) Inhibitor effects of plant polyphenols on rat liver glutathione-S-transferases. *Biochemical Pharmacol* **47**, 2063-2068.
77. Siess H. (1991) Oxidative stres: From basic researchto clinical application. *Am J Med* **91**, 31-38.
78. Schwedhelm E., Maas R., Troost R., Böger R.H. (2003) Clinical Pharmacokinetics Of Antioxidants and Their Impact On Systemic Oxidative Stress. *Clin Pharmacokinet* **42**, 437-459

79. Cholbi M.R., Paya M., (1991) Alcaraz M.J. Inhibitory of phenolic compound on CCl<sub>4</sub>-induced microzomal lipid peroxidation. *Experientia* **47**, 195-199.
80. Pavanato A., Tunuon M.J., Campos S.S., (2003) Effects of quercetin on liver damage in rat with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Dig Dis Sci* **48**, 824-829.
81. Descner E.E., Ruperto J., Wong G., Newmark H.L. (1991) Quercetin and rutin as inhibitor of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis* **12**, 1193-1193.
82. Gugler R., Leschik M., Dengler H.J. (1975) Disposition of Quercetin in man after single oral and intravenous doses. *Eur J Clin Pharmacol* **9**, 229-234.
83. Middleton E. (1998) Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Flavonoids in Living System*. Edited by Manthey and Buslig Plenum pres, New York.
84. Ferrandiz M.L., Alcaraz M.J. (1991) Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents and Action* **32**, 283-288.
85. Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T.C. (2000) The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implication for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev* **52**, 673-751.
86. Cao G., Sofic E., Prior R.L. (1997) Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure activity relationships. *Free Rad Biol Med*; **22**, 749-760.
87. Griglewski R.J., Korbut R. Robak J., Swies J. (1987) On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. *Biochem Pharmacol* **36**, 317-322.
88. Hertog M.G.L., Feskens E.J.M., Hollman P.C.H, Kafan M.B, Kromhout D. (1993) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet* **342**, 1007-1011.
89. Hertog M.G.L, Hollman P.C.H, Putte B. (1993) Content of potentially anti cancerogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruit juices. *J Agric Food Chemical* **41**, 1242-1246.
90. Florence T.M. (1990) Free radicals, antioxidants and cancer prevention. *Prot Nutr Soc Aust Annu Conf* **15**, 88-93.

91. Stavric B. (1994) Quercetin in our diet: from potent mutagen to probable anticarcinogen. *Clin Biochem* **27**, 245-248.
92. O'Reilly J.D., Mallet A.I., McAnlis G.T., et al. (2001) Consumption of flavonoids in onion and black tea: lack of effect on F<sub>2</sub>-isoprostanes and autoantibodies to oxidized LDL in healthy humans. *Am J Clin Nutr* **73**, 1040-1044.
93. Bok S.H., Park S.Y., Park Y.B., (2002) Quercetin dihydrate and gallate supplements lower plasma and hepatic lipids and change activities of hepatic antioxidant enzymes in high cholesterol-fed rats. *Int J Vitam Nutr Res* **72**, 161-169.
94. Fremont L., Gozzelino M.T., Franchi M.P., Linard A. (1998) Dietary flavonoids reduce lipid peroxidation in rats fed polyunsaturated or monounsaturated fat diets. *J Nutr* **128**, 1495-1502.
95. Aviram M., Fuhrman B. (2002) Wine flavonoids protect against LDL oxidation and atherosclerosis. *New York Academy Sciences* **957**, 146-161.
96. Kerry N.L., Abbey M. (1997) Red wine and fractioned phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation invitro. *Atherosclerosis* **135**, 93-102.
97. Frankel E.N., Kanner J., German J.B., Parks E., Kinsella J.E. (1993) Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* **341**, 354-357.
98. Paya M., Ferrandiz M.L., Sanz M.J., Alcaraz M.J. (1993) Effect of phenolic compounds on bromobenzene-mediated hepatotoxicity in mice. *Xenobiotica* **23**, 327-333.
99. Fuhrman B., Lavy A., Aviram M. (1995) Consumption of red wine in meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am J Clin Nutr* **61**, 649-654.
100. Kahraman A., Erkasap N., Köken T., Serteser M., Aktepe F., Erkasap S. (2003) The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions. *Toxicology* **183**, 133-142.
101. Hegarty V.M., May H.M., Khaw K.T. (2000) Tea drinking and Bone Mineral Density in older Women. *Am J Clin Nutr* **71**, 1003-1007.
102. Robak J., Griglewski R.J. (1988) Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharmacol* **37**, 837-841.

103. Husain S.R., Cillard J., (1987) Cillard P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochem* **26**, 2489-2491.
104. Kandaswami C., Middleton E. (1994) Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. Free Radical in Diagnostics Medicine. Edited by D.Armstrong, Plenum pres, New York.
105. Morand C., Crespy V., Manach C., Besson C., Demigne C., Remesy C. (1998) Plasma metabolites of quercetin and their antioxidant properties. *Am J Physiol* **275**, R212-R219.
106. Groot H., Rauen U. (1998) Tissue injury by reactive oxygen species and protective effects of flavonoids. *Fundam Clin Pharmacol* **12**, 249-255.
107. Graefe E.U., Derndorf H., Veit M. (1999) Pharmacokinetics and bioavailability of the flavonol quercetin in humans. *International Journal of Clinical and Therapeutics* **37**, 219-233.
108. Skaper S.D., Fabris M., Ferrari V., Carbonare M.D., Leon A. (1997) Quercetin protects cutaneous tissue-associated cell types including sensory neurons from oxidative stress induced by glutathione depletion: cooperative effects of ascorbic acid. *Free Rad Biol Med* **22**, 669-678.
109. Hollman P.C.H., Katan M.B. (1999) Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food and Chemical Toxicology* **37**, 937-942.
110. Nagao A., Seki M., Kobayashi H. (1999) Inhibition of xantine oxidase by flavonoids. *Biosci Biotechnol Biochem* **63**, 1787-1790.
111. Stavric B. (1994) Role of chemopreventers in human diet. *Clin Biochem* **27**, 319-332.
112. Middleton E., Kandaswami C. (1992) Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochemical Pharmacology* **43**, 1167-1179.
113. Terao J., Piskula M., Yao Q. (1994) Protective effects of epicatechin, epicatechin gallate and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers. *Arc Biochem Biophys* **308**, 278-284.
114. Arai K.I., Lee F., Miyjima A., Miyatake S., Arai N., Yokota T. (1990) Cytokines: Coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu Rev Biochem* **59**, 783-836.

115. Sözmen E.Y. (2002) Hücre büyümesi, farklılaşması ve kanser. In: Onat T., Emerk K., Sözmen E.Y. (eds) İnsan Biyokimyası. ISBN: 975-8624-20-2, Palme Yayıncılık, Sıhhiye-Ankara.
116. Burger D., Dayer J.M. (2002) Cytokines, acute-phase proteins and hormones: IL-1 and TNF- $\alpha$  production in contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes. *New York Academy of Sciences* **966**, 464-473.
117. Elenkov I.J., Chrousos G.P. (2002) Stres hormones, preinflammatory and antiinflammatory cytokines and autoimmunity. *New York Academy of Sciences* **966**, 290-303.
118. Liles W.C., Van Voorhis W.C. (1995) Review: nomenclature and biologic significance of cytokines involved in inflammation and the host immune response. *J Infect Dis* **172**, 1573-1580.
119. Aderem A.A. (1993) How Cytokines Signal Messages Within Cell. *J Infect Dis* **167**, 2-7.
120. Foxwell B.M., Barrett K., Feldmann M. (1992) Cytokine receptors: structure and signal transduction. *Clin Exp Immunol* **90**, 161-169
121. Goff W.L., O'Rourke K.I., Johnson W.C., Lacy P.A., Davis W.C., Wyatt C.R. (1998) The role of IL-10 in iNOS and cytokine mRNA expression during in vitro differentiation of bovine mononuclear phagocytes. *J Interferon Cytokine Res* **18**, 139-49.
122. Fataccioli V., Andraud E., Gentil M., French S.W., Rouach H. (1999) Effects of chronic ethanol administration on rat liver proteasome activities: relationship with oxidative stress. *Hepatology* **29**, 14-20.
123. Colantoni A., Idilman R., De Maria N., et al. (2003) Hepatic apoptosis and proliferation in male and female rats fed alcohol: Role of cytokines. *Alcohol Clin Exp Res* **27**, 1184-1189.
124. Çekin A.H., Boyacıoğlu A.S. (2002) Alkolik Karaciğer Hastalığı. In: Özden A., Şahin B., Yılmaz U., Soykan İ. (eds) Gastroenteroloji. Fersa Matbaacılık Ltd Şti.
125. Ishak K.G., Zimmerman H.J., Ray M.B. (1991) Alcoholic liver disease: pathologic, pathogenetic and clinical aspects. *Alcohol Clin Exp Res* **15**, 45-66.
126. Kovach E.J., Messingham K.A.N. (2002) Influence of alcohol and gender on immune response. *Alcohol Research and Health* **26**, 257-263.

127. Nanji A.A., Jokelainen K., Fotouhinia M., et al. (2002) Increased of alcoholic liver injury in female rats: role of oxidative stress, entoxine and chemokines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **281**, G1348-1356G.
128. Oktay G. (2002) Karbohidratlar. In: Onat T., Emerk K., Sözmen E.Y. (eds) İnsan Biyokimyası. ISBN: 975-8624-20-2, Palme Yayıncılık, Sıhhiye-Ankara.
129. Lieber G.S. (2004) Milestones in Liver Disease; The Unexpected Outcomes Of Medical Research: Serendifity and The Microsomal Ethanol Oxidizing System. *J Hepatol* **40**, 198-202.
130. Ponnappa B.C., Rubin E. (2000) Modeling of Alcohol's effect on organ in animal models. *Alcohol Research and Health* **22**, 93-104.
131. Molina P.E., McClain C., Valla D., et al. (2002) Molecular pathology and clinical aspects of alcohol-induced tissue injury. *Alcohol Clin Exp Res* **26**, 120-128.
132. Enomoto N., Ikejima K., Bradford B., et al. (1998) Alcohol causes both tolerance and sensitization of rat kupffer cell via mechanisms dependent on endotoxin. *Gastroenterology* **115**, 443-451.
133. Spitzer J.J., Bautista A.P. (1998) Tolerance of sensitivity: Ethanol and kupffer cells. *Gastroenterology* **115**, 494-496.
134. Adachi Y., Bradford B.U., Gao W., Bojes H.K., Thurman R.G. (1994) Inactivation of kupffer cells prevents early alcohol-induced liver injury. *Hepatology* **20**, 453-460.
135. Casini A. (2000) Alcohol-induced fatty liver and inflammation: where do kupffer cells act? *Journal of Hepatology* **32**, 1026-1030.
136. Giavarotti L., D'almeida V., Giavarotti K.A.S., et al. (2002) Liver necrosis induced by acute intraperitoneal ethanol administraiton in aged rats. *Free Radical Research* **36**, 269-275.
137. McClain C.J., Hill D.B., Song Z., et al. (2002) S-Adenosylmethionine, cytokines and alcoholic liver disease. *Alcohol* **27**, 185-192.
138. Kaplowitz N. (2000) Mechanism of liver cell injury. *J Hepatol* **32**, 39-47.
139. Tilg H., Diehl A.M. (2000) Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *The New England Journal of Medicine* **343**, 1467-1476.



140. Lieber C.S. (2004) Alcoholic Fatty Liver: Its Patogenesis and Mechanism Of Progression to Inflammation and Fibrosis. *Alcohol* **34**, 9-19.
141. Cardin R., D'errico A., Fiorentino M., Cechetto A., Naccarato R., Farinati F. (2002) Hepatocyte proliferation and apoptosis in relation to oxidative damage in alcohol-related liver disease. *Alcohol Alcohol* **37**, 43-48.
142. McClain C.J., Hill D.B., Song Z., Deaciuc I., Barve S. (2002) Monocyte activation in alcoholic liver disease. *Alcohol* **27**, 53-61.
143. Daniluk J., Ciesielska A.S., Drabko J., Szerszen M.K. (2001) Serum cytokine levels in alcohol-related liver cirrhosis. *Alcohol* **23**, 29-34.
144. Rodriguez E.R., Reimers E.G., Fernandez F.S., et al. (1995) Cytokine levels in acute alcoholic hepatitis: a sequential study. *Drug and Alcohol Dependence* **39**, 23-27.
145. Hoek J.B., Pastorino J.G. (2002) Ethanol, oxidative stress and cytokine-induced liver cell injury. *Alcohol* **27**, 63-68.
146. Rahman I., Marwick J., Kirkman P. (2004) Redox Modulation and Chromatin Remodeling: Impact On Histone Acetylation and Deacetylation, NF- $\kappa$ B and Proinflammatory Gene Expression. *Biochem Pharmacol* **68**, 1255-1267.
147. Diehl A.M. (2000) Cytokine regulation of liver injury and repair. *Immunological Reviews* **174**, 160-171.
148. Yin M., Wheeler M.D., Kono H., et al. (1999) Essential role of tumor necrosis factor  $\alpha$  in alcohol-induced liver injury in mice. *Gastroenterology* **117**, 942-952.
149. Dinarello C.A. (2003) Anti-Cytokine Therapeutics and Infection. *Vaccine* **21**, 24-34.
150. Papadakis K.A., Targan S.R. (2000) Tumor necrosis factor: biology and therapeutic inhibitors. *Gastroenterology* **119**, 1148-1157.
151. Luster M.I., Simeonova P.P., Gallucci R., Matheson J. (1999) Tumor necrosis factor  $\alpha$  and toxicology. *Critical Reviews in Toxicology* **29**, 491-511.
152. Kono H., Arteel G.E., Rusyn I., Sies H., Thurman R.G. (2001) Ebselen prevents early alcohol-induced liver injury in rats. *Free radical Biology & Medicine* **30**, 403-411.



153. Dinarello C.A. (1992) Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor: Effector Cytokines in Autoimmune Diseases. *Semin Immunol* **4**, 133-145.
154. Purohit V., Ruuso D. (2002) Role of S-adenosyl-L-methionin in the treatment of alcoholic liver disease: introduction and summary of the symposium. *Alcohol* **27**, 151-154.
155. Bode C., Bode J.C. (2003) Effect of alcohol consumption on the gut. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* **17**, 575-592.
156. Checa J.C.F., Kaplowitz N., Colell A., Garcia C.R. (1997) Oxidative stress and alcoholic liver disease. *Alcohol Research and Health* **21**, 321-324.
157. Köken T., Serteser M., Kahraman A. (2003) Biyokimya. In: Dilek O.N. (ed) Karaciğer. ISBN: 975-7150-72-X. Afyon Kocatepe Üniversitesi Klinik Tıp Kitapları Serisi, Yayın No: 58, Uyum Ajans, Ankara.
158. Ma X. Baraona E., Goozner B.G., Lieber C.S. (1999) Gender Differences in Medium-Chain Dicarboxylic Aciduria in Alcoholic Men and Women. *Am J Med* **106**, 70-75.
159. Pietrangelo A. (2003) Iron-induced oxidant stress in alcoholic liver fibrosis. *Alcohol* **30**, 121-129.
160. Purohit V., Russo D., Salin M. (2003) Role of iron in alcoholic liver disease: introduction and summary of the symposium. *Alcohol* **30**, 93-97.
161. Fletcher L.M., Powell L.W. (2003) Hemochromatosis and alcoholic liver disease. *Alcohol* **30**, 131-136.
162. Fletcher L.M., Bridle K.R., Crawford D.H.G. (2003) Effects of alcohol on iron storage disease of the liver. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* **17**, 663-677.
163. Lesch O.M., Walter H., Antal J. (1996) Carbohydrate deficient transferrin as a Marker of Alcohol Intake: a Study With Healthy Subjects. *Alcohol* **31**, 265-271.
164. Gjerde H., Amundsen A., Skog O.J. (1987) Serum Gamma-Glutamyltransferase: an Epidemiological Indicator Of Alcohol Consumption? *Br J Addict* **82**, 1027-1031.

165. Mirsal H., Kalyoncu A., Pektaş Ö. (2002) Alkol Kullanımının Biyokimyasal Belirleyicileri ve Klinik Kullanımları. *Bağımlılık Dergisi* **3**, 165-172.
166. Litten R.Z., Allen J.P., Fertig J.B. (1995) G-glutamyltrans-peptidase and Carbohydrate-Deficient Transferin: Alternative Measures Of Excessive Alcohol Consumption. *Clin Exp Res* **19**, 1541-1546.
167. Sillanaukee P., Olsson U. (2001) Improved Diagnostic Classification Of Alcohol Abusers By Combining Carbohydrate-Deficient Transferin and Gamma-Glutamyl Transfrase. *Clin Chem* **47**, 681-685.
168. Romsan A.S., Lieber C.S. (1990) Biochemical Markers Of Alcohol Consumption. *Alcohol Health Res World* **14**, 208-218.
169. Okhawa H, Ohishi N, Yagi K. (1979) Assay for Lipid Peroxidase in Animal Tissues By Thiobarbituric Acid Reaction. *Anal Biochem* **95**, 351-358.
170. Levine R.L., Garland D., Oliver C.N., (1990) Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins. *Method Enzymol* **186**, 464-478.
171. Koster J.F., Biemond P., Swaak J.G. (1986) Intracellular and Extracellular Sulphydryl Levels in Romatoid Arthritis. *Annals of The Rheumatic Disease* **45**, 44-46.
172. Beutler E., Robson M.J., Buttenvieser E. (1957) The Glutathione Instability of Drug Sensivity Red Cells. *J Lab Med* **49**, 84.
173. Beutler E. (1973) Red Cell Metabolism, A Manuel Of Biochemical Methods. Grune & Stratton, Inc., New York.
174. Wintenbourn C.C., Hawkin R.E., Brian M., Corell R.W. (1975) The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med* **85**, 337-341.
175. Di Luzio N.R. (1963) Prevention for the acute ethanol-induced fatty liver by antioxidants. *Physiologist* **6**, 619-673.
176. Fiorelli G., De Feo T.M., Tavazzi D., Nova I., Fargion S. (2002) Red Blood Cell Antioxidant and Iron Status in Alcoholic and Nonalcoholic Cirrhosis. *Eyr J Clin Invest* **32**, 21-27.
177. Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H., (1991) Chemistry and bio chemistry of 4-hydroxynonenal, malondealdehyde and aldehydes. *Free Radic Biol Med* **11**, 81-128.

178. Oh S.I., Kim C., Chun H.J., Park S.C. (1998) Chronic ethanol consumption affects glutathione status in rat liver. *J Nutr* **128**, 758-763.
179. Kessova I.G., Ho Y.S., Thung S., Cederbaum A.I. (2003) Alcohol-Induced Liver Injury in Mice Lacking Cu, Zn-Superoxide Dismutase. *Hepatology* **38**, 1136-1145.
180. Jurczuk M., Brzoska M.M., Moniuszko-Jakoniuk J., Galazyn-Sidorczuk M., Kulikowska-Karpinska E. (2004) Antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to cadmium and ethanol. *Food and Chemical Toxicology* **42**, 429-438.
181. Zhou Z., Wang L., Song Z., Lambert J.C., McClain C.J., Kang Y.J. (2003) A critical involvement of oxidative stress in acute alcohol-induced hepatic TNF-alpha production. *Am J Pathol* **163**, 1137-1146.
182. Monden K., Arai S., Itai S., (1991) Enhancement and Hepatocyte Modulating effect of Chemical Mediators and Monokines Produced By Hepatic Macrophages in Rats With Induced Sepsis. *Res Exp Med* **191**, 177-187.