

T.C.  
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ETANOLÜN İNDÜKLEDİĞİ KARACİĞER HASARINDA  
MATRİKS METALLOPROTEİNAZLARIN ROLÜ VE  
ANTİOKSİDANLARIN ETKİSİ**

**Bio. Fatih GÜRSOY**

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Doç.Dr. Tülay KÖKEN**

**Bu Tez Afyon Kocatepe Üniversitesi Araştırma Fonu Tarafından 031.TIP.05  
Proje Numarası İle Desteklenmiştir**

**Tez No:2005-018**


**2005 - AFYONKARAHİSAR**

**KABUL VE ONAY**

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Biyokimya Anabilim Dalı  
Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından  
**Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.


Tez Savunma Tarihi: 24 / 06 / 2005

  
Prof. Dr. Ömer ÇOLAK  
ÜYE

  
Doç. Dr. Tülay KÖKEN  
ÜYE

  
Doç. Dr. Mustafa SERTESER  
ÜYE

Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Fatih GÜRSOY'un "Etanolün İndüklediği Karaciğer Hasarında Matriks Metalloproteinazların Rolü ve Antioksidanların Etkisi" başlıklı tezi 25/ 06 / 2005 günü saat 13<sup>00</sup>'da lisansüstü eğitim ve öğretim sınav yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

  
Doç. Dr. Yüksel ARIKAN  
Enstitü Müdürü

**ÖNSÖZ**

Tez konusunun belirlenmesi, çalışmaların planlanması ve yürütülmesi esnasında değerli destek ve yardımlarını gördüğüm kıymetli tez hocam Biyokimya Anabilimdalı Başkanı sayın Doç.Dr. Tülay KÖKEN'e, eğitimin süresince değerli katkılarını, yardım ve desteklerini esirgemeyen kıymetli hocalarım Doç.Dr. Mustafa SERTESER ve sayın Yrd.Doç.Dr. Ahmet KAHRAMAN'a teşekkürler ederim.

Eğitimim süresince maddi ve manevi yardım ve desteklerin esirgemeyen çok değerli aileme minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim ve çalışmalarım sırasında her türlü yardım ve çabalarını benden esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Bio. Ayhan VURMAZ ile Bio. Hamdullah ÇAKAR'a, sevgili kardeşim Ferhat GÜRSOY'a, bize rahat bir çalışma ortamı sağlayan Afyon Kocatepe Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi Başkanı sayın Doç.Dr. Zehra AKINCI'ya, Araş.Gör. Özlem GÜCÜYENER'e ve Rektörlük ANS Uygulama ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Lab. çalışanlarına teşekkür ederim.

Bu Tez, Afyon Kocatepe Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 031.TIP.05 proje numarası ile desteklenmiştir.

**İÇİNDEKİLER**

Kabul ve Onay	II
Önsöz	III
İçindekiler	IV
Simgeler ve Kısaltmalar	VIII
Şekiller Dizini	XI
Tablolar Dizini	XII
ÖZET	1
SUMMARY	3
1. GİRİŞ	5
1.1. Serbest Radikaller	7
1.1.1. Serbest Oksijen Radikalleri ve Reaktif Oksijen Türleri	8
1.1.1.1. Süperoksid Radikali	8
1.1.1.2. Hidrojen Peroksid	9
1.1.1.3. Hidroksil Radikali	11
1.1.1.4. Singlet Oksijen	11
1.1.2. Serbest Radikallerin Kaynakları	12
1.1.2.1. Biyolojik Kaynakları	12
1.1.2.2. İntraselüler Kaynakları	12
1.1.2.3. Geçiş Metalleri ve Serbest Radikal Oluşumu	15
1.1.2.4. Fagositoz ve Respiratory Burst	16
1.1.3. Serbest Radikallerin Etkileri	18
1.1.3.1. Membran Lipidlerine Etkileri	18
1.1.3.2. Proteinlere Etkileri	20
1.1.3.3. Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri	20
1.1.3.4. Karbonhidratlara Etkileri	21
1.2. Antioksidan Savunma Sistemleri	21
1.2.1. Doğal (Endojen) Antioksidanlar	22

1.2.1.1. Enzimler	22
1.2.1.2. Enzim Olmayanlar	22
1.2.2. Eksojen Antioksidanlar (İlaçlar)	23
1.2.3. Antioksidan Etki Tipleri	24
1.2.4. Enzimatik Antioksidanlar	24
1.2.4.1. Süperoksid Dismutaz (SOD)	24
1.2.4.2. Glutasyon Peroksidaz	25
1.2.4.3. Glutasyon-S-Transferazlar (GST)	26
1.2.4.4. Mitokondrial Sitokrom Oksidaz	26
1.2.5. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	27
1.2.5.1. Vitaminler	27
1.2.5.1.1. C Vitamini	27
1.2.5.1.2. E Vitamini	28
1.2.5.1.3. Karatenoidler	31
1.2.5.2. Enzimatik Olmayan Diğer Antioksidanlar	31
1.3. Alkol Metabolizması	33
1.3.1. Alkol Metabolizması Reaksiyonları	39
1.3.2. Alkolün Karaciğer Hasar Mekanizmaları	42
1.3.2.1. Doğrudan Toksik Etkileri	42
1.3.2.1.1. Lipid ve Karbonhidrat Metabolizması Değişiklikleri	42
1.3.2.1.2. Oksidatif Stres	43
1.3.2.1.3. Asetaldehit Etkisi	43
1.3.2.1.4. Fibroz Oluşum Mekanizmaları	44
1.3.2.2. Alkolik Karaciğer Hastalığının Oluşumunda Etkili Ko-Faktörler	44
1.3.2.2.1. Herediter Faktörler	44
1.3.2.2.2. Cinsiyet	45
1.3.2.2.3. Beslenme	45
1.3.2.2.4. Viral Hepatit	45
1.3.2.2.5. Karaciğer Doku Demiri	46
1.3.2.2.6. Sigara ve Kahve İçimi	46

1.4. Ekstraselüler Matriks ( ECM )	46
1.4.1. Hepatik Ekstraselüler Matriksi	47
1.4.2. Ekstraselüler Matriks Komponentleri	48
1.4.2.1. Kollojen	49
1.4.2.1.1. Kollojen Tipleri	49
1.4.2.1.2. Kollojen Yıkılımı	50
1.4.2.2. Elastin	50
1.4.2.3. Fibronektin	52
1.4.2.4. Proteoglikanlar	52
1.5. Matriks Metalloproteinazlar ( MMPs)	52
1.5.1. Metalloproteinazların Yapısı	53
1.5.2. Metalloproteinazlar Ailesinin Üyeleri	54
1.5.2.1. Kollojenazlar	55
1.5.2.2. Jelatinazlar	55
1.5.2.3. Stromelizinler	55
1.5.2.4. Matrilizin	57
1.5.2.5. Membran Tip Metalloproteinazlar ( MT-MMPs)	57
1.5.2.6. Diğer Metalloproteinazlar	58
1.5.3. ProMMP Aktivasyonu	58
1.5.4. İntraselüler Aktivasyon	58
1.5.5. Endojen Matriks Metalloproteinaz İnhibitörleri	59
1.5.5.1. Doku İnhibitör Matriks Metalloproteinazların (TIMPs) Biyolojik Fonksiyonları	60
1.5.6. Matriks Metalloproteinaz-9 (MMP-9)	60
2. MATERYAL ve METOD	62
2.1. Denekler	62
2.2. Biyokimyasal analiz	63
2.2.1. Karaciğer MDA Düzeylerinin Ölçümü	63
2.2.2. Karaciğer Protein Karbonil Grupları Tayini	64
2.2.3. Karaciğer Sülfhidril (-SH) Grupları Tayini	65
2.2.4. Karaciğer GSH Düzeylerinin Ölçümü	66
2.2.5. Karaciğer SOD Aktivitelerinin Ölçümü	67

2.2.6. Doku proMMP-9 Konsantrasyonlarının Ölçülmesi	68
2.3. İstatistiksel Analiz	70
3. BULGULAR	71
3.1. Karaciğer MDA Düzeyleri	71
3.2. Karaciğer GSH Düzeyleri	72
3.3. Karaciğer SOD Aktiviteleri	73
3.4. Karaciğer Protein Karbonil Düzeyleri	74
3.5. Karaciğer SH Düzeyleri	75
3.6. Karaciğer proMMP-9 Düzeyleri	76
4. TARTIŞMA	77
5. SONUÇ	83
REFERANSLAR	84

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

AA	:Asetaldehit
ADH	:Alkol dehidrogenazlar
Ala	:Alanin
ALDH	:Aldehit dehidrogenaz
CAT	:Katalaz
CO <sub>2</sub>	:Karbon dioksit
Cu <sup>+2</sup>	:Bakır
DMN	:Dimetilnitrazamin
DNA	:Deoksiribonükleik asit
DNP	:2,4-Dinitrofenilhidrazin
DTNB	:5,5,-dithibios(2-nitrobenzoik asit)
ECM	:Ekstraselüler matriks
EDTA	:Etilen diamin tetraasetik asit
ELISA	:Enzyme linked immunoabsorbant assay
EtOH	:Etanol
Fe <sup>+2</sup>	:Ferro demir
Fe <sup>+3</sup>	:Ferri demir
GPI	:Glikozilfosfatidilinozitol
GSH	:Redükte glutatyon
GSH-Px	:Glutatyon peroksidaz
GSSG	:İndirgenmiş glutatyon
GST	:Glutatyon-S-transferaz
HO•	:Hidroksil radikali
HO <sub>2</sub> •	:Perhidroksil radikali
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	:Hidrojen peroksit
HSCs	:Hepatik stellate hücreleri
I.g	:İntra gastrik
I.p	:İntra peritonal



LOO <sup>·</sup>	:Peroksil radikali
MDA	:Malondialdehid
MEOS	:Mikrozomal okside edici sistem
MFs	:Miyofibroblastlar
mg	:Miligram
MMPs	:Matriks metalloproteinazlar
NaCl	:Sodyum klorür
NAD <sup>+</sup>	: Nikotinamid adenin dinükleotid (yükseltgenmiş)
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotid ( indirgenmiş)
NADP <sup>+</sup>	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (yükseltgenmiş)
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (indirgenmiş)
NaOH	:Sodyum hidroksit
nmol	:Nanomol
NO	:Nitrik oksit
NO <sub>2</sub> <sup>·</sup>	:Azot dioksit
NO <sub>2</sub> <sup>+</sup>	:Nitronyum iyonu
O <sub>2</sub> <sup>-·</sup>	:Süperoksid radikal anyonu
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	:Singlet oksijen
O <sub>2</sub>	:Süperoksit
OH <sup>-</sup>	:Hidroksil
PUFA	:Poliansatüre yağ asitleri
R <sup>·</sup>	:Karbon merkezli radikaller
RNA	:Ribonükleik asit
RO <sup>·</sup>	:Alkoksil radikalleri
ROO <sup>·</sup>	:Peroksil radikalleri
ROOH	:Peroksitler
ROS	:Reaktif oksijen türleri
RS <sup>·</sup>	:Thiyl radikalleri
RSO <sup>·</sup>	:Sülfenil radikali
RSO <sub>2</sub> <sup>·</sup>	:Peroksil radikali
SDS	:Sodyumdodesil sülfat
SH	:Sülfhidril

SOD	:Süperoksit dismutaz
TCA	:Trikarboksilik asid
TBARS	:Thio barbitürik asit reaktif ürünleri
TNF- $\alpha$	:Tumor necrosis factor alfa
TGF- $\beta$	:Transforming growth factor beta
Zn	:Çinko

**ŞEKİLLER DİZİNİ**

<b>Şekil.1.2.5.1.2.a.</b> Vitamin E'nin formları	28
<b>Şekil 1.2.5.1.2.b.</b> Vitamin E'nin rejenerasyonu	30
<b>Şekil.1.3.1.</b> Alkolün metabolizması	35
<b>Şekil.1.1.4.1.</b> Karaciğer ECM molekülleri	48
<b>Şekil.1.5.1.1.</b> MMP'lerin yapısı	54
<b>Şekil.1.5.5.1.</b> MMP'lerin aktivasyonu ve inhibisyonu	60
<b>Şekil 3.2.6.1.</b> SOD standart grafiği	68
<b>Şekil 2.2.5.1.</b> ProMMP-9 standart grafiği	70
<b>Şekil 3.1.1.</b> Karaciğer MDA düzeylerinin karşılaştırılması	71
<b>Şekil 3.2.1.</b> Karaciğer GSH düzeylerinin karşılaştırılması	72
<b>Şekil 3.3.1.</b> Karaciğer SOD aktivitelerinin karşılaştırılması	73
<b>Şekil 3.4.2.</b> Karaciğer Karbonil düzeylerinin karşılaştırılması	74
<b>Şekil 3.5.1.</b> Karaciğer SH düzeylerinin karşılaştırılması	75
<b>Şekil 3.6.1.</b> Karaciğer proMMP-9 düzeylerinin karşılaştırılması	76

**TABLULAR DİZİNİ**

<b>Tablo.1.4.2.1.</b> Genetik olarak tanımlanmış kollojen tipleri	51
<b>Tablo.1.5.2.a.</b> MMP ailesinin üyeleri	56
<b>Tablo 3.1.1.</b> Karaciğer MDA düzeyleri	71
<b>Tablo.3.2.1.</b> Karaciğer GSH düzeyleri	72
<b>Tablo 3.3.1.</b> Karaciğer SOD aktiviteleri	73
<b>Tablo 3.4.1.</b> Karaciğer Karbonil düzeyleri	74
<b>Tablo 3.5.1.</b> Karaciğer SH düzeyleri	75
<b>Tablo 3.6.1.</b> Karaciğer proMMP-9 düzeyleri	76

## ÖZET

Alkol alışkanlığı bir çok ülkede karaciğer hastalıklarının önde gelen nedenleri arasındadır. Aşırı alkol tüketimi veya alkol alışkanlığı sonucunda meydana gelen karaciğer patolojileri arasında hepatik steatozis, alkolik hepatit, hepatik fibrozis ve siroz yer almaktadır. Son yıllarda alkolün yol açtığı patolojik değişikliklerin ve bu hastalıkların oluşum sürecinde oksidan stresin etkisi üzerinde durulmaktadır. Alkol metabolizmasının çeşitli basamaklarında serbest radikal üretimine bağlı olarak etanol ile indüklenen pro-oksidan stres meydana gelmektedir. Reaktif oksijen türleri (ROS) lipid peroksidasyonu ve membran hasarının gelişmesine yol açar. Vücudumuzda ROS'un zararlı etkilerine karşı antioksidan savunma mekanizması vardır. Antioksidan savunmanın önemli kısmını lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını kıran antioksidanlar oluşturur. Vitamin E bu antioksidanların en önemlilerinden biridir.

Matriks metalloproteinazlar, ekstraselüler matriks yıkılımında önemli bir yere sahip enzim grubudur. Matriksinler olarak da adlandırılırlar. Ekstraselüler matriksin bozulmasında fonksiyonu olan  $Zn^{+2}$  ve  $Ca^{+2}$  bağımlı endopeptidazlardır. Bu çalışmada etanolün indüklediği karaciğer hasarında oksidatif stresi ve proMMP-9'un karaciğer hasarında rolünün olup olmadığını görmeyi ve bir antioksidan olan vitamin E'nin, oksidatif hasar ile proMMP-9 üzerindeki etkisini görmeyi amaçladık.

Bu çalışmada, 25 adet Sprague-Dawley erkek ratlar dört gruba ayrıldı: 1) Kontrol grubu: 30 gün boyunca (2 ml/gün) serum fizyolojik I.g olarak verildi. 2) Etanol (EtOH) grubu: 30 gün boyunca etanol (1 ml/gün %80 v/v) I.g olarak verildi. 3) Vitamin E (VitE) grubu: (100 mg/kg/gün) vitamin E verildi. Vitamin E, serum fizyolojik ile birlikte total 1 ml. olarak verildi. . 4) Vitamin E + Etanol grubu: 30 gün boyunca I.g yöntemle (100 mg/kg/gün) vitamin E verildikten 2 saat sonra etanol (1 ml %80 v/v) verildi.

Karaciğer dokusunda, oksidatif stresin göstergesi olan malondialdehit (MDA), karbonil ve antioksidan kapasitenin göstergesi olarak glutatyon (GSH), sülfhidril (SH) ve süperoksid dismutaz (SOD) aktiviteleri ile promatriks metalloproteinaz-9 (proMMP-9) düzeyleri ölçüldü.

Yapılan çalışmalar sonucunda EtOH grubunda kontrol grubuna göre artmış karaciğer MDA, karbonil, proMMP-9 düzeyleri, azalmış GSH, SH düzeyleri ve azalmış SOD aktivitesi gözlemlendi. Etanol grubu ile karşılaştırıldığında VitE+EtOH grubunda azalmış MDA, karbonil düzeyleri ve artmış GSH, SH düzeyleri, artmış SOD aktivitesi ve azalmış proMMP-9 düzeyleri gözlemledik.

Bu sonuçlara göre, alkolün karaciğerin oksidan ve antioksidan dengesini etkilediği, lipid peroksidasyonunun artışına yol açtığını gördük. Alkolün indüklediği oksidatif streste proMMP-9 düzeylerinin anlamlı olarak arttığını, vitamin E'nin oksidan stresi azalttığını ve buna bağlı olarak proMMP-9 düzeylerinin azaldığını düşünmekteyiz.

**Anahtar Kelimeler:** Oksidatif stres, Etanol, proMMP-9, Vitamin E

## SUMMARY

Alcohol addiction is one of the leading reasons of liver diseases in many countries. Hepatic steatosis, alcoholic hepatitis, hepatic fibrosis and cirrhosis can be mentioned among the diseases resulting due to alcohol addiction. In recent years, studies have been focused on effect of oxidant stress, in the process of pathological changes and mentioned diseases caused by alcohol. In many steps of alcohol metabolism dependent of production of reactive oxygen species (ROS) that is occurred alcohol induced pro-oxidant stress. Lipid peroxidation and membran damage is developed by ROS. In our body, against the harmful effects of ROS there is an antioxidant mechanism. Antioxidants which are break the lipid peroxidation chains reactions constitute an important part of the antioxidant defense. Vitamine E is one of the important antioxidant. Matrix metalloproteinases (MMPs) are an enzyme group of that degrade extracellular matrixes (ECM). MMPs also called matrixins. MMPs are  $Zn^{+2}$  and  $Ca^{+2}$  dependent endopeptidases that breakdown the ECM. The aim of present study, we evaluate whether the vitamine E treatment could have a protective effect against oxidative stress and pro-MMP-9 and the oxidative stress and role of pro-MMP-9 in alcohol induced liver injury in rats or not.

In this study, twenty five male Sprague-Dawley rats were divided four groups: 1) Control group: received saline, intragastrically (2 ml/day) throughout thirty days. 2) Ethanol (EtOH) group: received EtOH (1 ml/day, 80% v/v), intragastrically and saline throughout thirty days. 3) Vitamine E (VitE) group: received VitE (100 mg/kg/day) with saline that total volume is 1 ml throughout thirty days. 4) VitE+EtOH: VitE was introduced 2 h before EtOH administration (1 ml 80% v/v) throughout thirty days.

Malondialdehyde (MDA) levels as an indicator of lipid peroxidation, content of protein carbonyl as an indicator of protein oxidation, the levels of glutathione (GSH) and protein sulphhydryl groups (SH) and superoxide dismutase (SOD) activities as indicators of antioxidant capacity and proMMP-9 levels have been estimated in liver tissue.

As a result of these measurement, it has been shown that increased tissue MDA, protein carbonyl groups, proMMP-9 and decreased GSH, SH levels and decreased SOD activities in EtOH group were found when compared to control group. Decreased tissue GSH, SH levels and increased SOD activities in EtOH+VitE group were also found when compared to EtOH group. The SOD activities were not significantly different from other groups.

In conclusion, alcohol effect between oksidant and antioksidant balance in liver and it is increased lipid peroxidation. Alcohol induced oxidative stress increased significantly proMMP-9 levels of liver tissue and VitE decreased oxidative stress and we think that decreased proMMP-9 levels are dependent decreasing of oxidative stress.

**Key Words:** Oxidative stress, Ethanol, proMMP-9, Vitamine E



## 1.GİRİŞ

Alkol alımı, gün geçtikçe karaciğer hastalıklarına yol açan sebeplerin başında gelmeye başlamıştır. Günlük 80 gr ve üzeri alkol tüketimi risk olarak tanımlanmaktadır. Alkol, sitozolik alkol dehidrogenaz (ADH) ve mikrozomal etanol okside edici sistem (MEOS) ile asetaldehite dönüştürülerek metabolize olur. Sağlıklı erişkin erkekler günde yaklaşık 160 gr kadar alkolü metabolize edebilme kapasitesine sahiptir. Asetaldehit, asetaldehit dehidrogenaz (AADH) tarafından asetil-KoA'ya çevirir. Asetil-KoA bir yandan sitrik asit siklusuna girerek yağ asidine dönüşürken bir yandan da önce asetata daha sonra da karbondioksit ve suya dönüşür. Alkole bağlı karaciğer yağlanması majör sebebi asetil-KoA'nın yağ asidine dönüşmesi olmakla beraber, asetaldehid de toksik etki göstermektedir. Tüm bu etkenler kollojen sentezini fibrozise doğru indükleyerek sonuçta siroz oluşumuna yol açar. Alkolün sitokrom P450-2E1 indüksiyonu ile oluşan reaktif oksijen ürünlerinin oluşturduğu oksidatif strese hücre harabiyetine yol açmaktadır (1).

Serbest radikaller dış orbitallerinde tek sayıda ortaklanmamış elektron taşıyan elektrik yüklü veya yüksüz olabilen atom veya moleküllerdir. Bu bileşikler organizmada normal metabolik yolların işleyişi sırasında oluştuğu gibi, çeşitli dış etkenlerin etkisiyle de oluşmaktadır. Aerobik metabolizması olan memelilerde serbest radikaller başlıca oksijenden türemektedir (2).

Serbest radikallerin yol açtığı hücre hasarı sonucunda lipid peroksidasyonu oluşmaktadır. Zar yapısındaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu ile oluşan peroksidasyon olayı, serbest radikaller tarafından başlatılır ve lipid hidro peroksitlerinin aldehit (MDA) ve diğer karbonil bileşiklere dönüşmesiyle sonuçlanır. Membranlarda meydana gelen lipid peroksidasyonu membran organizasyonunu bozarak hücrenin yapısı bozulur (2).

Oksidatif stresin meydana getirdiği zararlı etkileri ortadan kaldırmak için vücudumuzda antioksidan savunma gelişmiştir. Bu antioksidan savunmanın üyelerinden birisi E vitamini'dir. E vitamini, tokoferoller ve tokotrienoller için genel bir deyimdir, biyolojik olarak en aktif ve doğal formu  $\alpha$ -tokoferoldür. E

vitamininin en önemli özelliği doğal bir antioksidan olması peroksitleri ve serbest oksijen radikallerini nötralize edebilmesidir (3,4).

Matriks metalloproteinazlar (MMP), ekstraselüler matriks yıkılımda önemli bir yere sahip enzim grubudur (5). Matriksinler olarak da adlandırılırlar. Ekstraselüler matriksin bozulmasında fonksiyonu olan  $Zn^{+2}$  ve  $Ca^{+2}$  bağımlı endopeptidazlardır. Bu grupta yer alan enzimler, katalitik olarak aktif bölgelerinde çinko ( $Zn^{+2}$ ) iyonu içerirler. İnaktif zimojenler olarak salınırlar. Metalloproteinazların aktiviteleri ise; gen transkripsiyonu, proenzim aktivasyonu spesifik doku inhibitörleri ile inhibisyonu olmak üzere üç düzeyde kontrol edilmektedir (6). Matriks metalloproteinazlar, embriyonik gelişim, morfogenez, fibrozis, reproduksiyon ve doku remodellingi gibi bazı normal fizyolojik olaylarda da önemli rol oynarlar (7). Aynı zamanda artrit, kanser, kardio vasküler rahatsızlıklar gibi bazı patolojik olaylara da katılırlar.

Bu enzim ailesinin bir üyesi olan MMP-9 (EC 3.4.24.35); jelatiniz B, 92 KDV tip IV kollojenaz olarak da adlandırılır. Latent zimojenler olarak salınırlar. Aktivasyonunun genel kontrol mekanizması pro-domain'in, enzimin konformasyonel değişikliğine neden olan proteolitik parçalanmasıdır (8).

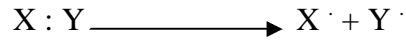
Bu çalışmada etanolün indüklediği karaciğer hasarında oksidatif stresi ve proMMP-9'un karaciğer hasarında rolünün olup olmadığını ve bir antioksidan olan vitamin E'nin, oksidatif hasar ile proMMP-9'un üzerindeki etkisini görmeyi amaçladık.

### 1.1. Serbest Radikaller

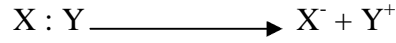
Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron ihtiva eden atom veya moleküllerdir. Bu tip maddeler, ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktiftirler. Ortaklanmamış elektron, genel olarak üst kısma yazılan bir nokta ile gösterilir (4).

Serbest radikaller 3 yolla meydana gelirler:

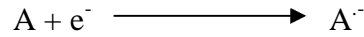
1. Kovalent bağlı normal bir molekülün, her bir parçasında ortak elektronlardan birisinin kalarak homolitik bölünmesi.



2. Normal molekülden tek bir elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi. Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron atomların birinde kalırlar. Böylece serbest radikaller değil, iyonlar meydana gelirler.



3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi.



Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu meydana gelirler. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötral olabilirler. Organik veya inorganik moleküller şeklinde olabilirler.  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Mn^{2+}$  ve  $Mo^{5+}$  gibi geçiş metallerinin de ortaklanmamış elektronları olduğu halde serbest radikal olarak kabul edilmezler. Fakat, bu iyonlar reaksiyonları katalize ettiklerinden dolayı serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar.

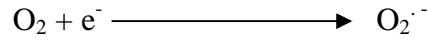
### 1.1.1. Serbest Oksijen Radikalleri ve Reaktif Oksijen Türleri

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Serbest oksijen radikali biyokimyasında anahtar rolü oynayan maddeler oksijenin kendisi, süperoksid, hidrojen peroksit, geçiş metallerinin iyonları ve hidroksil radikalidir. Bunlardan ilk dördünün çeşitli reaksiyonları ile sonucusu meydana gelir.

Oksijenin elektronları o şekilde dağılmışlardır ki bu elektronların iki tanesi eşleşmemiştir. Bu yüzden oksijen bazen bir “diradikal” olarak da değerlendirilir. Oksijenin bu özelliği onun diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girmesini sağlar. Radikal olmayan maddeler ile daha yavaş reaksiyona girer. Oksijen en son suya indirgenir. Bu arada, kısmi redüksiyonla çok sayıda yüksek derecede reaktif ürünler de oluşabilirler (4).

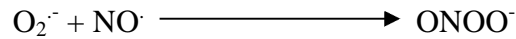
#### 1.1.1.1. Süperoksid Radikali

Hemen hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu, serbest süperoksid radikal anyonu ( $O_2^{\cdot-}$ ) meydana gelir.



Süperoksid, bir serbest radikal olmakla birlikte kendisi direkt olarak fazla zarar vermez. Asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır.

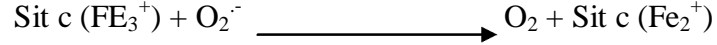
Süperoksidin, fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit ile birleşmesi sonucu reaktif bir oksijen türevi olan peroksinitrit meydana gelir.



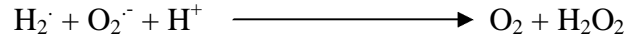
Böylece  $NO$ 'ın normal etkisi inhibe edilir. Ayrıca, peroksinitritlerin doğrudan proteinlere zararlı etkileri vardır ve azot dioksit ( $NO_2^{\cdot}$ ), hidroksil radikali ( $\cdot OH$ ) ve nitronyum iyonu ( $NO_2^+$ ) gibi daha başka toksik ürünlere dönüşürler.

Süperoksid, düşük pH değerlerinde daha reaktif olup perhidroksil radikali ( $HO_2^{\cdot}$ ) oluşturmak üzere protonlanır. Fizyolojik pH'daki protonlanmış formu % 1'den azdır.

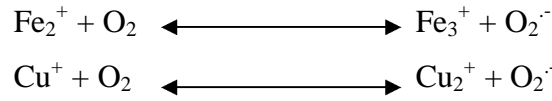
Süperoksit anyonu, hem oksitleyici hem de redükleyici özelliğe sahiptir. Redükta olarak görev yaptığında, örneğin, ferrisitokrom c'nin ya da nitroblue tetrazolium'un redüksiyonunda bir elektron kaybeder ve oksijene okside olur. Sitokrom c'yi indirgemesi Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ve fagositler tarafından üretilen  $O_2^-$  tayini yapılır.



Oksidan olarak görev yaptığında, örneğin epinefrinin oksidasyonunda bir elektron alır ve hidrojen peroksit indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonunda oksijen ve hidrojen peroksit meydana gelirler.



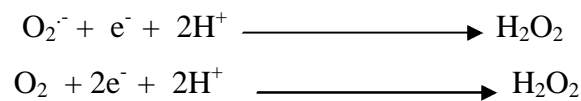
İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu da süperoksit meydana getirebilir.



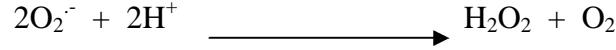
Bu reaksiyonlar geri dönüşümlüdürler. Bu yüzden, geçiş metalleri iyonlarının oksijenle reaksiyonları geri dönüşümlü redoks reaksiyonları olarak düşünülebilir.

#### 1.1.1.2. Hidrojen Peroksit

Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden 2 elektron alması veya süperoksitin bir elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü 2 hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksidi ( $H_2O_2$ ) meydana getirir.  $H_2O_2$  membranlardan kolayca geçebilen, uzun ömürlü bir oksidandır (4).



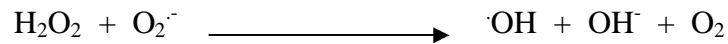
Ancak, biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin asıl üretimi süperoksidin dismutasyonu ile olur. İki süperoksid molekülü iki proton alarak hidrojen peroksid ve moleküler oksijeni oluştururlar. Reaksiyon sonucu radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden bu bir dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir.



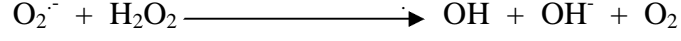
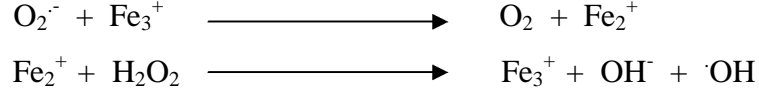
Bu dismutasyon ya spontandır ya da SOD enzimi tarafından katalizlenir. Spontan dismutasyon pH 4.8'de en hızlıdır. Bu pH'da protonlanmış ve protonlanmamış radikal konsantrasyonları eşittir. Fakat, hem protonlanmış radikalın arttığı daha asid pH'da hem de süperoksid iyonunun fazla olduğu alkali pH'da bu hız belirgin şekilde düşüktür. Süperoksidin SOD tarafından dismutasyonu ise daha geniş bir pH aralığında katalizlenir. Özellikle spontan dismutasyonun nispeten yavaş olduğu nötral ya da alkali pH'da enzimatik dismutasyon daha belirgindir.

Hidrojen peroksid, açığa süperoksid çıkmadan oksijenin direkt divalen reaksiyonu ile de oluşabilir.

Hidrojen peroksid bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü süperoksid ile reaksiyona girerek, en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir.



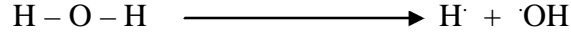
Bu reaksiyona Haber-Weiss reaksiyonu adı verilir. Haber-Weiss reaksiyonu ya katalizör varlığında ya da katalizörsüz cereyan edebilir. Fakat, katalizörsüz reaksiyon oldukça yavaş ilerler. Demirle katalizlenen ikinci şekli ise çok hızlıdır. Bu reaksiyonda feri demir ( $\text{Fe}_3^+$ ) süperoksid tarafından ferro demire ( $\text{Fe}_2^+$ ) indirgenir. Sonra bu ferro demir kullanılarak "Fenton reaksiyonu" ile hidrojen peroksidden  $\cdot\text{OH}$  ve  $\text{OH}^-$  üretilir. Reaksiyon mekanizması aşağıdaki şekildedir:



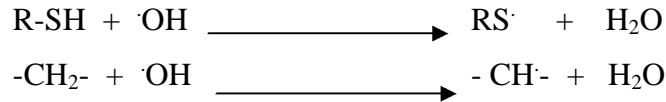
Görüldüğü gibi süperoksit, hem hidrojen peroksit kaynağı hem de geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisidir. İndirgenmiş geçiş metalleri ( demir ve bakır gibi) okside şekillerine göre hidrojen peroksitle daha reaktiftirler.

### 1.1.1.3.Hidroksil Radikali

Hidroksil radikali ( $\cdot\text{OH}$ ), hidrojen peroksitin geçiş metallere varlığında indirgenmesiyle ( Fenton reaksiyonu ile) meydana gelir. Suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda da hidroksil radikali oluşur (4).



Son derece reaktif bir oksidan radikalidir. Yarılanma ömrü çok kısadır. Oluştugu yerde büyük hasara sebep olur. Aşağıda gösterildiği gibi tioller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak yeni radikallerin oluşmasını sebep olur.



### 1.1.1.4. Singlet Oksijen

Singlet oksijen ( $^1\text{O}_2$ ), ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da sebep olur. Oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle oluşur. Delta ve sigma olmak üzere 2 şekli vardır. Singlet oksijen, uyarılmış elektronların daha düşük enerji seviyelerine inmesiyle ışık yayar.

Singlet oksijenin kimyasal bir bileşikle etkileşimi sonucu kemiluminesans meydana gelmesi ve bunun ölçülmesiyle reaktif oksijen türlerinin direk tayini yapılabilmektedir (4).

Serbest oksijen radikallerinin etkisi sonucu karbon merkezli radikaller ( $R\cdot$ ), peroksil (peroksi) radikalleri ( $ROO\cdot$ ), alkoksil (alkoksi) radikalleri ( $RO\cdot$ ), thiyl radikalleri ( $RS\cdot$ ) gibi önemli serbest radikaller de meydana gelirler. Bunlardan özellikle poliansatüre yağ asitlerinden meydana gelen peroksil radikali yarı ömrü uzun olan bir radikaldir.

Thiyl radikalleri ise oksijenle tekrar reaksiyona girip sülfenil ( $RSO\cdot$ ) veya peroksil ( $RSO_2\cdot$ ) gibi radikalleri meydana getirirler.

### **1.1.2. Serbest Radikallerin Kaynakları**

#### **1.1.2.1. Biyolojik Kaynakları**

-Aktive olmuş fagositler (Respiratory Burust)

-Antineoplastik ajanlar : Nitrofurantoin, bleomisin, doxorubicine ve adriamicine.

-Radyasyon

-Alışkanlık yapan maddeler: Alkol ve uyuşturucular

-Çevresel ajanlar (hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler; hiperoksi, pestisidler, sigara dumanı, solventler, anestezipler, aromatik hidrokarbonlar)

-Stres: Streste katekolamin düzeyi artar. Katekolaminlerin oksidasyonu ise serbest radikal kaynağıdır. Bu olay stresin hastalıkların patogenezindeki rolünün serbest radikal üretimiyle ilgili olabileceğini göstermesi bakımından önemlidir.

#### **1.1.2.2. İntraselüler Kaynakları**

-Küçük moleküllerin oksidasyonu: Tioller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler, tetrahidropterinler, antibiyotikler.

-Enzimler ve proteinler: Ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, hemoglobin

-Mitokondrial elektron transportu

-Endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemleri (sitokrom P-450, sitokrom  $b_5$ )



-Peroksizomlar: oksidazlar, flavoproteinler

-Plazma membranı: Lipooksijenaz, prostaglandin sentetaz, fagositlerde NADPH oksidaz, lipid peroksidasyonu.

Oksidatif stres yapıcı durumlar: İskemi, travma, intoksikasyon.

İyonizan radyasyonun etkisi gibi nadir durumlar dışında, serbest radikaller genellikle hücrelerde elektron transfer reaksiyonlarıyla meydana gelirler. Bu reaksiyonlar, ya enzimlerin etkisiyle ya da nonenzimatik geçiş metalleri iyonlarının redoks kimyası aracılığı ile cereyan ederler.

Normalde hücrelerde en büyük serbest radikal kaynağı, elektron transport zincirinden elektron sızıntısıdır. Mitokondri iç zarında yerleşmiş oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri büyük oranda indirgendiği zaman mitokondrial süperoksid radikal üretimi artar. Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda ise serbest radikal üretimi membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklanır.

Birçok enzimin katalitik siklusları sırasında da serbest radikaller açığa çıkarlar. Bu enzimlerden biri ksantin oksidaz olup normalde NAD-bağımlı dehidrogenaz olarak etki eder ve herhangi bir serbest radikal üretimine sebep olmaz. Fakat, in vivo olarak oluşturulan iskemi, enzimin dehidrogenaz formundan oksidaz formuna dönüşmesine ve süperoksid radikalının üretimine sebep olur.

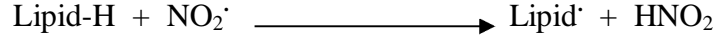
Aldehid oksidaz yapı itibarı ile ksantin oksidaza benzer ve substratlarının çoğu aynı olup, süperoksid radikali üretir. Benzer şekilde dihidroorotat dehidrogenaz, flavoprotein dehidrogenaz, amino asit oksidaz ve triptofan dioksijenaz gibi enzimler de radikal oluşmasına sebep olurlar.

Peroksizomlar çok önemli hücre içi  $H_2O_2$  kaynağıdır. Bu organeldeki D-amino asit oksidaz, urat oksidaz, L-hidroksil asit oksidaz ve yağ asidi açıl-CoA oksidaz gibi oksidazlar süperoksid üretmeden, bol miktarda  $H_2O_2$  üretimine sebep olurlar. Ancak, peroksizomlarda katalaz aktivitesi de çok yüksek olduğu için bu organelden sitozole ne kadar  $H_2O_2$  geçtiği bilinmemektedir.

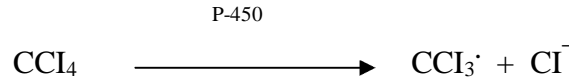
Hayvan hücrelerinde süperoksidin bir başka kaynağı da, askorbik asit, tioller (glutatyon, sistein gibi), adrenalin ve flavin koenzimleri gibi bazı bileşiklerin otooksidasyonudur.

Hücrelerde serbest radikal üretimi, bazı yabancı toksik maddeler tarafından da büyük oranda arttırılabilir. Bu maddeler ya doğrudan serbest radikal üretirler veya antioksidan aktiviteyi düşürürler. Bu tip maddeler dört grupta toplanabilirler.

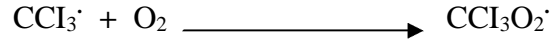
1- Toksinin kendisi bir serbest radikaldir. Kirli havanın koyu rengini veren azot dioksit ( $\text{NO}_2$ ) gazı böyle bir maddedir. Bu radikal iyi bir lipid peroksidasyonu başlatıcısıdır.



2- Toksin, bir serbest radikale metabolize olur. Mesela, toksik bir madde olan karbontetraklorür ( $\text{CCl}_4$ ) karaciğerde sitokrom P-450 tarafından triklorometil serbest radikale dönüştürülür.



Bu radikalın oksijenle reaksiyonu sonucu meydana gelen peroksil radikali de kuvvetli bir lipid peroksidasyonu başlatıcısıdır.



Böylece, reaktif serbest radikal üretimi, karaciğerde antioksidan savunmaları aşar. Bu da selüler membranların oksidatif yıkımı ve ciddi doku hasarı ile sonuçlanır.

3- Toksinin metabolizması esnasında serbest oksijen radikali meydana gelir. Bunun tipik bir örneği paraquartdır. Özellikle karaciğerde biriken paraquart, bir serbest radikale indirgendikten sonra tekrar yükseltgenerek rejenere edilirken beraberinde oksijen indirgenir. Böylece bol miktarda süperoksid üretilmiş olur.

4- Toksin, antioksidan aktiviteyi düşürür. Mesela, parasetamolün karaciğerde sitokrom P-450 tarafından metabolizması glutatyonla reaksiyona giren ve miktarını azaltan bir ürün meydana getirir.

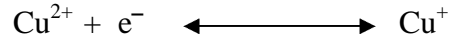
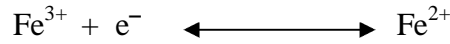
Bir hem proteini olan sitokrom P-450, birçok endojen bileşiğin ve ksenobiyotiğin (xenobiotic) hidroksilasyonunu katalize eder. Bu reaksiyonlarda

oksijen kaynağı olarak moleküler oksijeni kullandığı gibi peroksitleri (ROOH) de kullanabilir. Böylece bir peroksidaz gibi etki eder. Ancak, alkol ve asetonla indüksiyonunda olduğu gibi bazı hallerde, sitokrom P-450 aşırı miktarda süperoksit üreten bir izoenzime dönüşür.

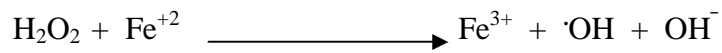
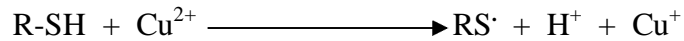
Araşidonik asid metabolizması da reaktif oksijen metabolitlerinin önemli bir kaynağıdır. Fagositik hücrelerin uyarılması fosfolipaz ve protein kinazın aktivasyonuna ve plazma membranından arşidonik asidin salınımına yol açar.

### 1.1.2.3. Geçiş Metalleri ve Serbest Radikal Oluşumu

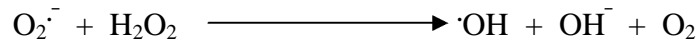
Geçiş metalleri, özellikle demir ve bakır, fizyolojik şartlarda çeşitli oksidasyon basamakları arasındaki elektron alışverişi yükseltgenme indirgenme reaksiyonları ile olur.



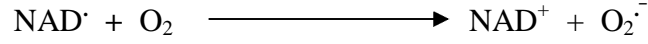
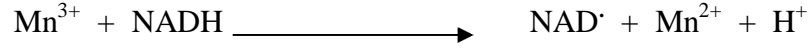
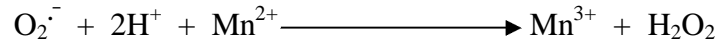
Geçiş metalleri bu özelliklerinden dolayı serbest radikal reaksiyonlarını hızlandırır ve katalizör vazifesi görürler. Bu tip maddelere “oksidan stressor” adı verilir. Tiyollerden thiyl, Haber-Weis ve Fenton reaksiyonları ile  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ’den  $\cdot\text{OH}$  sentezini katalizlerler.



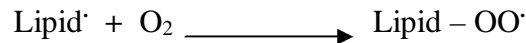
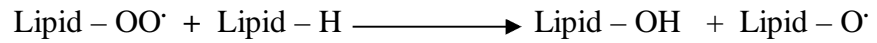
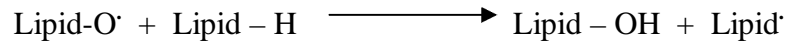
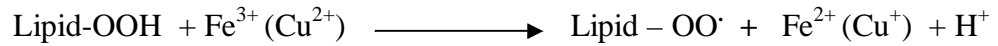
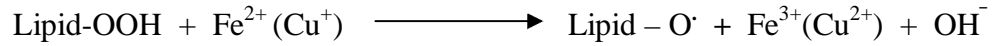
Fe, Cu



$\text{Mn}^{2+}$  ‘nın  $\text{O}_2^{\cdot-}$  tarafından oksidasyonu  $\text{Mn}^{3+}$  veya Mn-oksijen komplekslerinin oluşumunu sağlar. Bu kompleksler  $\text{O}_2^{\cdot-}$  ‘den çok daha oksitleyicidirler. Mesela,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , NADH ile çok yavaş reaksiyona girdiği halde ortama  $\text{Mn}^{2+}$  ilavesi reaksiyonu oldukça hızlandırır. Reaksiyon mekanizması aşağıdaki şekildedir.



Metal iyonlarının serbest radikal reaksiyonlarındaki asıl önemleri ise lipid peroksidasyonundaki etkileridir. Aşağıda gösterildiği gibi, geçiş metalleri lipid peroksidasyonunu başlatmaktan ziyade sentezlenmiş olan lipid hidroperoksitlerinin parçalanmalarını ve lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonlarını katalize ederler. Böylece daha az zararlı olan radikalleri daha zararlı hale getirirler.



#### 1.1.2.4. Fagositoz ve Respiratory Burst (Solunumsal Patlama)

Fagositik lökositler çeşitli biyolojik hedeflerin parçalanmasına ve hasarına sebep olabilen, enfeksiyona karşı vücudun hücre sel cevabını başlatan hücrelerdir.

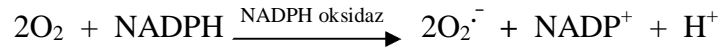
Oksijenin redüksiyon (süperoksid anyonu, hidrojen peroksid, hidroksil radikalleri) ve eksitasyon (singlet oksijen) ürünleri, fagositlerin (nötrofiller, eosinofiller, mononükleer fagositler) toksik özelliklerinden sorumludurlar. Bu toksik maddeler, fagositoz esnasında mikroorganizmaların ve diğer yabancı hücrelerin yıkımında kullanılırlar. Ancak, bunlar hücrelerin antioksidan savunma güçlerini

aştıklarında normal konak hücrelerine zarar verirler ve çeşitli hastalıkların patogeneğinde rol oynarlar (4).

Fagositik lökositler çözünebilir ya da partiküler bir stimulusla (opsonize mikroorganizmalar, kompleman fragmanı C5a, lökotrien B4, bakteriel orijinli N-formylated oligopeptidler gibi) uyarıldıktan sonra lizozomal komponentleri dışarı vermeye başlarlar ve reaktif oksijen metabolitleri oluşumuyla birlikte, mitokondri dışındaki oksijen tüketiminde bir patlama (respiratory burst) gösterirler. Fagosite edilmiş bakteri, respiratory burst ürünlerinin toksik etkisiyle öldürülür. Bu oksidan ürünler süperoksid anyonu, hidrojen peroksid, hidroksil radikali ve halid oksidasyon ürünleridirler.

Respiratory burst'den sorumlu olan enzim NADPH oksidazdır. Bu bir ektoenzim olup, plazma membranının dış yüzeyinde bulunur. Fagositik vakuol oluşturmak için plazma membranı invagine olduğunda, enzim iç tarafta kalır ve vakuoler boşluktaki oksijene etki eder.

Uygun bir stimulusla fagosit uyarıldıktan sonra NADPH oksidaz aktive edilir ve indirgenmiş piridin nükleotidlerinden (NADPH) iki elektron alınarak iki molekül oksijene transfer edilir. Böylece, iki molekül süperoksid oluşturulur.

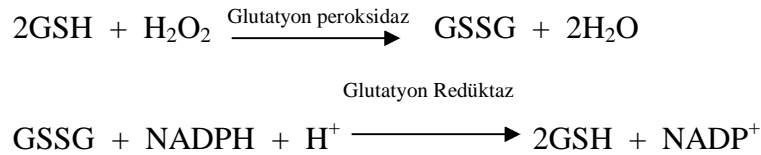


Respiratory burst sırasında tüketilen oksijenin çoğu süperoksid ara ürünü üzerinden fagositler tarafından bakterisidal bir ajan olarak kullanılan hidrojen peroksida dönüştürülür.



Süperoksidin sınırlı reaktivitesine rağmen, geçiş metalleri iyon komplekslerini indirgeyebilmesi ya da okside edebilmesi, metallerle ligandlar oluşturabilmesi, organik substratları okside edebilmesi, perhidroksil radikaline protonlanabilmesi bu radikalın fagosit aracılığı ile olan sitotoksitede önemli bir rol oynamasına sebep olur.

Fagositlerin stimülasyonu, heksos monofosfat şantı yoluyla glukoz oksidasyonunda artışa yol açar. Hekzosmonofosfat şantı, glukozun karbondioksit ve beş karbonlu bir şekere okside olduğu, elektron alıcısı olarak NADP<sup>+</sup>'nin görev yaptığı bir metabolik yoldur. Nötrofilde bu yolla glukoz oksidasyonu, NADPH'in oksidasyonu sonucu NADP<sup>+</sup> oluşum oranı ile sınırlıdır. Bu yüzden şant aktivasyonu, respiratory burst sırasında NADPH'in NADP'ye oksidasyonunun arttığını gösterir. Respiratory burst sırasında elektron vericisi olarak NADPH kullanılarak oksijenin süperokside indirgenmesi sonucu NADP<sup>+</sup> üretimi artar, heksos monofosfat yolu aktive olur. NADP<sup>+</sup>'nin diğer kaynağı, hidrojen peroksidin detoksifikasyonundan sorumlu olan glutatyon peroksidaz-glutatyon redüktaz sistemidir.



### 1.1.3. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller, hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler. Mitokondrideki aerobik solunumu ve kapiller permeabiliteyi bozar, hücrenin potasyum kaybını ve trombosit agregasyonunu artırır.

Proteaz, fosfolipaz, elastaz, siklooksijenaz, ksantin oksidaz, lipooksijenaz, triptofan dioksijenaz ve galaktoz oksidaz gibi litik enzimleri aktifleştirirken alfa-1-antitripsin gibi bazı savunma sistemlerini inaktive ederler. Serbest radikallerin bu etkileri aşağıdaki başlıklar halinde incelenebilir.

#### 1.1.3.1. Membran Lipidlerine Etkileri (Lipid Peroksidasyonu)

Serbest radikaller, savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak oranlarda oluştuğu zaman organizmalarda çeşitli bozukluklara yol açarlar. Biyomoleküllerin tüm büyük sınıfları serbest radikaller tarafından etkilenirler, fakat lipidler en hassas olanlarıdır. Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar.

Poliansatüre yağ asidleri (Poly unsaturated fatty acid-PUFA)'nın oksidatif yıkımı, lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü, kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Lipid peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür (4).

Lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan bir serbest radikal etkisi sonucu membran yapısında bulunan PUFA zincirinden bir hidrojen atomu uzaklaştırılması ile başlar. Bunun sonucu yağ asidi zinciri bir lipid radikali niteliği kazanır. Oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Molekül içi çift bağların pozisyonlarının değişmesiyle dien konjugatları ve daha sonra lipid radikalinin moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipidperoksil radikali meydana gelir. Lipid peroksil radikalleri, membran yapısındaki diğer PUFA'yı etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak hidroperoksidlerine dönüşürler. Böylece olay kendi kendine katalizlenerek devam eder.

Lipid peroksidasyonu ya toplayıcı reaksiyonlarla sonlandırılır ya da otokatalitik yayılma reaksiyonlarıyla devam eder.

Plazma membranı ve organel lipid peroksidasyonu, daha önce bahsedilen serbest radikal kaynaklarının hepsiyle stimüle edilebilir ve metallerin varlığında artar. Bu metaller redoks katalisti olarak görev yaparlar ve süperoksid ve hidrojen peroksidin daha güçlü oksidanlara dönüşümünü katalizlerler.

Lipidlerden, araşidonik asid metabolizması sonucu serbest radikal üretimine "enzimatik lipid peroksidasyonu", diğer radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonuna ise "non-enzimatik lipid peroksidasyonu" adı verilir.

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid hidroperoksitlerinin yıkımı, geçiş metalleri iyon katalizini gerektirir. Lipid hidroperoksitleri yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehidler oluşurlar. Bu bileşikler, ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ ihtiva eden yağ asidlerinin peroksidasyonunda tiobarbütirik asidle ölçülebilen malondialdehid (MDA) meydana gelir. Bu metod lipid peroksit seviyelerinin ölçülmesinde sıklıkla kullanılır. MDA, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir fakat lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir.

Lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve indirekt olarak reaktif aldehydler üreterek diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece, birçok hastalığa ve doku hasarına sebep olur. Lipid radikallerinin hidrofobik yapıda olması yüzünden reaksiyonların çoğu membrana bağlı moleküllerle meydana gelir. Membran permeabilitesi ve mikroviskozitesi ciddi şekilde etkilenir. Peroksidasyonla oluşan malondialdehyd, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna sebep olur. Bu da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir. Bu etkiler, malondialdehydin neden mutajenik, genotoksik ve karsinojenik olduğunu açıklar.

### **1.1.3.2. Proteinlere Etkileri**

Proteinler serbest radikal etkisine karşı, PUFA'dan daha az hassastırlar ve başlayan zarar verici zincir reaksiyonlarının hızla ilerleme ihtimali daha azdır. Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme dereceleri amino asid kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür ihtiva eden moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metionin, sistein gibi amino asidlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikaller meydana gelirler. Bu reaksiyonlar sonucu immünglobülin G ve albümin gibi fazla sayıda disülfid bağı bulunduran proteinlerin üç boyutlu yapıları bozular. Böylece normal fonksiyonlarını yerine getiremezler (4).

Proteinler üzerine olan serbest radikal hasarı birikmişse ya da bazı proteinlerin spesifik bölgesi üzerinde yoğunlaşmışsa hücrenin canlılığı bakımından zararlı etki yapar.

Hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin  $O_2^-$  veya  $H_2O_2$  ile reaksiyonu methemoglobin oluşumuna sebep olur.

### **1.1.3.3. Nükleik Asidler ve DNA'ya Etkileri**

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Sitotoksisite, büyük oranda, nükleik asid baz



modifikasyonlarından doğan kromozom değişikliklerine veya DNA'daki diğer bozukluklara bağlıdır. Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksid membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. Bu yüzden DNA, serbest radikallerden kolayca zarar görebilen önemli bir hedeftir.

#### **1.1.3.4. Karbonhidratlara Etkileri**

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerine de önemli etkileri vardır. Monosakkaridlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksid, peroksidler ve okzoaldehitler meydana gelirler. Bunlar diyabet ve sigara içimi ile ilişkili kronik hastalıklar gibi patolojik proseslerde önemli rol oynarlar.

Okzoaldehidler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturabilme özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Böylece, kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar.

PUFA ve karbonhidrat oksidasyonunun bir ürünü olan glyoxal'in hücre bölünmesini inhibe ettiği kaydedilmiştir.

#### **1.2. Antioksidan Savunma Sistemleri**

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlar "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinirler. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek ve/veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler. Antioksidanlar, doğal (endojen kaynaklı) ve eksojen kaynaklı antioksidanlar olmak üzere başlıca iki ana gruba ayrılabilirdiği gibi serbest radikalın meydana gelişini önleyenler ve mevcut olanları etkisiz hale getirenler şeklinde de ikiye ayrılabilirler. Ayrıca enzim ve enzim olmayanlar şeklinde de sınıflandırılırlar. Hücrelerin hem sıvı hem de membran kısımlarında bulunabilirler (4).

### 1.2.1. Doğal (Endojen) Antioksidanlar

#### 1.2.1.1. Enzimler

- Mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi
- Süperoksid dismutaz
- Katalaz
- Glutatyon peroksidaz
- Glutatyon -S- transferaz
- Hidroperoksidaz

#### 1.2.1.2. Enzim Olmayanlar

##### a- Lipid fazda bulunanlar

$\alpha$ -tokoferol (E-vitamini)

$\beta$ -karoten

##### b- Sıvı fazda (hücre sitozolünde veya kan plazmasında bulunanlar)

askorbik asid

Melatonin

Ürat

Sistein

Seruloplazmin

Trasferrin

Laktoferrin

Miyoglobin

Hemoglobin

Ferritin

Metionin

Albümin

Bilirubin

Glutatyon

### 1.2.2. Eksojen Antioksidanlar (İlaçlar)

- Ksantin oksidaz inhibitörleri:
  - Tungsten
  - Allopürinol
  - Oksipürinol
  - Folik asit
  - Pterin aldehid
- NADPH oksidaz inhibitörleri:
  - Adenozin
  - Lokal anestezikler
  - Kalsiyum kanal blokerleri
  - Non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar
  - Diphenyline iodonium
- Rekombinant süperoksid dismutaz
- Trolox-C: E vitamini analogudur
- Endojen antioksidan aktiviteyi arttıran maddeler: Glutatyon peroksidaz aktivitesini arttırmaları
  - Ebselen
  - Asetilsistein
- Diğer nonenzimatik serbest radikal toplayıcıları:
  - Mannitol
  - Albümin
  - DMSO
- Demir redoks döngüsü inhibitörleri:
  - Desferroksamin
  - Seruloplazmin
- Nötrofil adezyon inhibitörleri
- Sitokinler: TNF ve İnterlökin-1
- Barbitüratlar
- Demir şelatörleri

### 1.2.3. Antioksidan Etki Tipleri

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler:

1. Toplayıcı etki (scavenging etki)
2. Bastırıcı etki (quencher etki)
3. Onarıcı etki (repair etki)
4. Zincir kırıcı etki (chain breaking etki)

Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirme işlemine toplayıcı etki denir.

Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan veya inaktif şekle dönüştüren olaya bastırıcı etki adı verilir. Vitaminler, flavonoidler, trimetazidin ve antisiyanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.

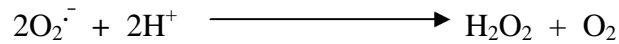
Serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkiye zincir kırıcı etki denir. Hemoglobin, seruloplazmin ve minareler zincir kırıcı etki gösterirler.

### 1.2.4. Enzimatik Antioksidanlar

Oksijenin hidrojen peroksida dismutasyonunu SOD, hidrojen peroksidin dismutasyonunu ise katalaz katalizlemektedir. Glutasyon peroksidaz ise hidrojen peroksid ve lipid peroksidlerini indirgemektedir. Yükseltgenmiş glutasyonun (GSSG), indirgenmiş glutatyona (GSH) dönüşümünü sağlayan glutasyon redüktaz, indirekt yolla antioksidan etki göstermektedir. Enzimatik savunma sistemleri arasında NADH peroksidaz ile sitokrom c oksidaz da yer almaktadır.

#### 1.2.4.1. Süperoksid Dismutaz (SOD)

İlk olarak 1968 yılında Mc Cord ve Fridovich tarafından tanımlanan süperoksid dismutaz (EC 1.15.1.1 , ECSOD) enzimi süperoksidin , hidrojen peroksid ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler. Hücresel bölmelerdeki süperoksid düzeylerini kontrol etmede önemli bir rol oynar (4).

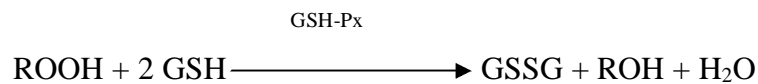
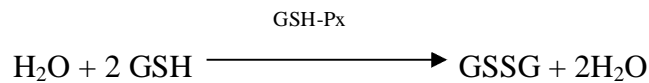


SOD'un katalize ettiği reaksiyonun hızı spontan reaksiyonun yaklaşık 4000 katıdır. İnsanda SOD'un iki tipi bulunmaktadır. Bunlar, sitozolde bulunan dimerik, Cu ve Zn ihtiva eden izomer (Cu-Zn SOD) ile mitokondride bulunan tetramerik Mn ihtiva eden izomerdirler (MnSOD). Genel olarak hücrede en bol bulunan izomer sitozolik Cu-Zn SOD'dir. Cu-Zn SOD 21 nolu kromozomda, Mn-SOD 6 nolu kromozomda lokalizedir. Sitozolik Cu-Zn SOD siyanidle inhibe edilirken, mitokondrial Mn SOD inhibe olmaz. Her iki SOD'un katalizlediği reaksiyon aynıdır. Enzimin fizyolojik fonksiyonu; oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Böylece lipid peroksidasyonunu inhibe eder. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan dokularda fazladır ve doku pO<sub>2</sub> artışı ile artar. Normal metabolizma sırasında hücreler tarafından yüksek oranda süperoksit üretimi olmasına rağmen bu enzim sayesinde intraselüler süperoksit düzeyleri düşük tutulur. SOD'un ekstraselüler aktivitesi çok düşüktür.

SOD fagosit edilmiş bakterilerin öldürülmesinde de rol oynar. Bu yüzden SOD, granülosit fonksiyonu için çok önemlidir.

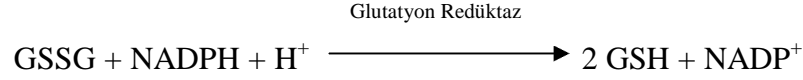
#### 1.2.4.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Glutasyon peroksidaz, hidroperoksidlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. GSH-Px ( glutasyon: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oksidoredüktaz, EC 1.11.1.9 )'in molekül ağırlığı yaklaşık olarak 85.000 D.'dur. Tetramerik, 4 selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir. GSH-Px aşağıdaki reaksiyonları katalizler (4).



Hücresinin yükseltgenme-indirgenme dengesini koruyan önemli bir indirgen ve antioksidan olan glutasyon, hücreleri endojen ve eksojen kaynaklı oksidanların zararlı etkilerinden korumaktadır. Proteinlerdeki -SH gruplarının korunması ve amino asitlerin hücre içine taşınmasında rol oynamaktadır. Glutasyon (GSH) selenyum içeren glutasyon peroksidaz ile yükseltgenmektedir (GSSG).

Hidroperoksidlerin redükte olması ile meydana gelen GSSG, glutatyon redüktazın katalizlediği reaksiyon ile tekrar GSH'a dönüşür.

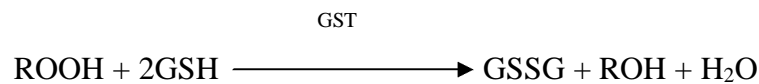


GSH-Px'in fagositik hücrelerde önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmelerini engeller. GSH-Px aktivitesi düşük olan makrofajlarda zimosanla başlatılan solunum patlamasını takiben, hidrojen peroksid salınımının arttığı gösterilmiştir. Eritrositlerde de GSH-Px oksidan strese karşı en etkili antioksidandır. GSH-Px aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksidin artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar.

#### 1.2.4.3. Glutatyon-S-Transferazlar (GST)

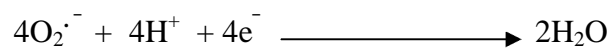
Glutatyon-S-transferazlar (GST)'lar E.C.2.5.1.18 kodlu her biri iki alt birimden oluşmuş (dimerik) bir enzim ailesi olup ilk defa 1961 yılında tanımlanmışlardır. Ksenobiotiklerin (yabancı maddeler) biotransformasyonunda önemli rol almalarından dolayı biyokimyacılara ilaveten genetikçiler, klinisyenler, farmakolojistler ve toksikolojistlerin ilgisini çeken bir enzimdir (4).

Başta araşidonik asid ve lineolat hidroperoksidleri olmak üzere lipid peroksidlerine karşı GST'lar Se-bağımsız GSH peroksidaz aktivitesi göstererek bir defans mekanizması oluştururlar.



#### 1.2.4.4. Mitokondrial Sitokrom Oksidaz

Solunum zincirinin son enzimi olan sitokrom oksidaz, aşağıdaki reaksiyonla süperoksidi detoksifiye eden enzimdir (4).



Bu reaksiyon, fizyolojik şartlarda sürekli cereyan eden normal bir reaksiyon olup bu yolla yakıt maddelerin oksidasyonu tamamlanır ve bol miktarda enerji üretimi sağlanır. Ancak, süperoksid üretimi çoğu zaman bu enzimin kapasitesini aşar. Bu durumda diğer antioksidan enzimler devreye girerek süperoksidin zararlı etkilerine engel olurlar.

## **1.2.5. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar**

### **1.2.5.1. Vitaminler**

#### **1.2.5.1.1. C Vitamini**

C Vitamini (askorbik asid), kapalı formülü  $C_6H_8O_6$  olan bir ketolaktondur. Suda eriyebilen vitaminlerden olan askorbik asid, özellikle yeşil renkli taze sebze, meyve ve turunçgillerde bol miktarda bulunur. İnce bağırsaklardan kolayca emilir. Isıtılmaya dayanıksız, dondurulmaya ise dayanıklıdır. Plazma konsantrasyonu 0.5-1.5 mg/dl kadardır.

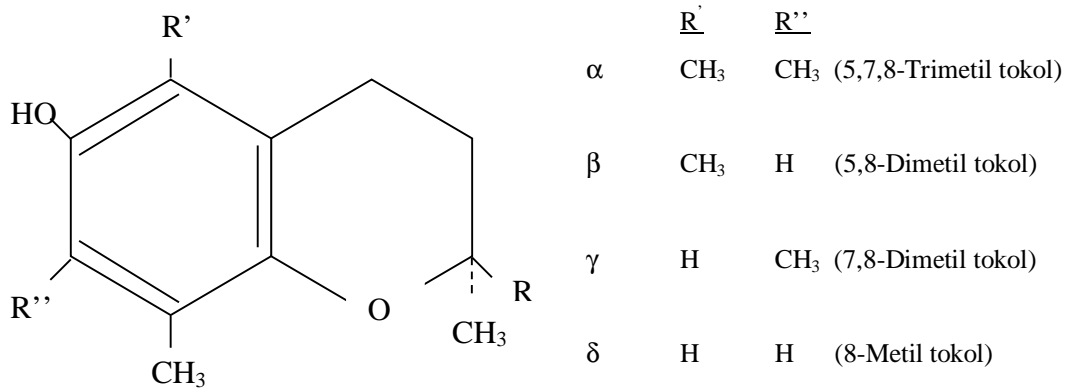
C Vitamini organizmada birçok hidroksilasyon reaksiyonlarında indirgeyici ajan olarak görev yapar. Güçlü indirgeyici aktivitesinden dolayı aynı zamanda güçlü bir antioksidandır. Süperoksid ve hidroksil radikali ile kolayca reaksiyona girerek onları temizler. C Vitamini ayrıca antiproteazların oksidan maddeler ile inaktive olmasını engeller ve tokoferoksil radikalinin,  $\alpha$ -tokoferole redüklenmesini sağlar.

C Vitaminin diğer bir özelliği, antioksidan etkisi yanında oksidan etkide göstermesidir. Çünkü C vitamini, ferri demiri ferro demire indirgeyen süperoksid radikali dışındaki tek selüler ajandır. Bu yolla askorbat, proteine bağlı ferri demiri uzaklaştırarak ya da doğrudan ferri demire indirgeyerek Fenton reaksiyonunda hidrojen peroksid ile etkileşmeye uygun olan ferro demire dönüştürür. Yani süperoksid üretimine katkıda bulunur. Bu özelliğinden dolayı C vitamini, serbest radikal reaksiyonlarının önemli bir katalisti veya bir pro-oksidan olarak değerlendirilir.

### 1.2.5.1.2. E Vitamini

E vitamini tokoferol yapısında olup ilk olarak Evans ve Sure tarafından tanımlanmış ve 1938 yılında izole edilmiştir. Doğal olarak alfa, beta, gama, delta, eta ve zeta gibi çeşitli tokoferoller bulunmaktadır (Şekil.1.2.5.1.2.a) (3,4). Bunların hepsi, izoprenoidlerin substitue edildiği 6-hidroksi kromanlar veya tokollerdir. D- $\alpha$ -tokoferol en geniş doğal dağılımı ve en büyük biyolojik aktiviteyi gösterir. Antioksidan aktivitesi en yüksek olan tokoferol de  $\alpha$ -tokoferoldür. Hücre membranları ve plazma lipoproteinleri, lipitte eriyebilen bir molekül olan alfa tokoferole sahiptir (9). Vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol) bütün dokularda antioksidan savunma için kritik bir komponenttir (2,11).

Alfa tokoferol molekülünün kimyasal olarak aktif kısmı, fenolik hidroksil grubuna sahip olan aromatik halkasıdır ve antioksidan özelliği bu gruptan kaynaklanır. Fenolik hidroksil grubunun hidrojen atomu kolaylıkla ayrılabilirdiği için peroksidasyon sonucu oluşan lipid peroksil radikalleri bir yağ asidi yan zinciri yerine bu antioksidanla reaksiyona girer (1, 11).



Şekil.1.2.5.1.2.a.Vitamin E'nin formları (3)

Bitkisel yağlar ve tohumlar, E vitamininden zengin kaynaklardır. Bitkisel yağların sabunlaşamayan kısımlarında ve en çok yer fıstığı, badem, pamuk yağı ve keten tohumunda bulunur. Zeytin yağında eser miktarda bulunur.



Diyette, yağda çözünmüş olarak alınır, yağ sindirimi sırasında açığa çıkar ve emilir. Emilebilmesi için yağ emiliminin ve safra asitlerinin normal olması gerekir. Herhangi bir taşıyıcı protein olmadan, pasif difüzyonla emilir. Önce şilomikron yapısına dahil olur. Şilomikronlar lipoprotein lipaz aracılığı ile hidroliz olurken E vitamininin bir bölümü dokulara taşınır. Kalan E vitamini ise şilomikron kalıntıları ile birlikte karaciğer tarafından alınıp, hepatik kökenli VLDL'ler aracılığı ile tekrar dolaşıma salınır veya HDL'ye transfer edilir. E vitamini en fazla LDL'de bulunur. Bir LDL partikülünde ortalama 6 tane  $\alpha$ - tokoferol molekülü vardır. LDL'nin dış tabakasında kromonal halkası sulu faza yönelmiş şekilde lokalizedir. E vitamininin en önemli depolama yeri yağ dokusudur. Plazma konsantrasyonu ise 0.5-1.8 mg/dl kadardır.

Çok güçlü bir antioksidan olan E vitamini, hücre membran fosfolipidlerinde bulunan poliansatüre yağ asitlerini serbest radikal etkisinden koruyan ilk savunma hattını oluşturur (10). Bir molekül  $\alpha$ - tokoferol 100 molekül PUFA'nın peroksidasyonunu engelleyebilir. E vitamini, süperoksid ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipid peroksi radikallerini ve diğer radikal örneklerini indirger.

Glutasyon peroksidaz ile E vitamini serbest radikallere karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler. Enzim, oluşan peroksidleri ortadan kaldırırken E vitamini peroksidlerin sentezini engeller.

E vitamini, selenyum metabolizmasında da önemli rol oynar. Selenyum, normal pankreas fonksiyonu ve E vitamini ile lipidlerin emilimi için gereklidir. Ayrıca, E vitamininin lipoproteinler içinde tutulmasına yardımcı olur. E vitamini ise selenyumun organizmadan kaybını önleyerek veya aktif şekilde tutarak selenyum ihtiyacını azaltır.

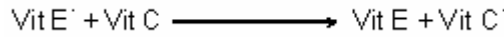
E vitamini, zincir kırıcı bir antioksidan olarak bilinir. Çünkü fonksiyonları, lipid peroksi radikallerini ( $LOO^{\cdot}$ ) parçalamak ve böylece lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını sonlandırmaktır.

Sonuçta oluşan tokoferoksil radikali nispeten stabildir ve lipid peroksidasyonunu kendi kendine başlatmak için yeterince reaktif değildir. Bu oksidasyon ürünü, glukoronik asit ile konjugasyona uğrayarak safra yolu ile atılır. Tokoferolün antioksidan etkisi, yüksek oksijen konsantrasyonlarında etkilidir. En

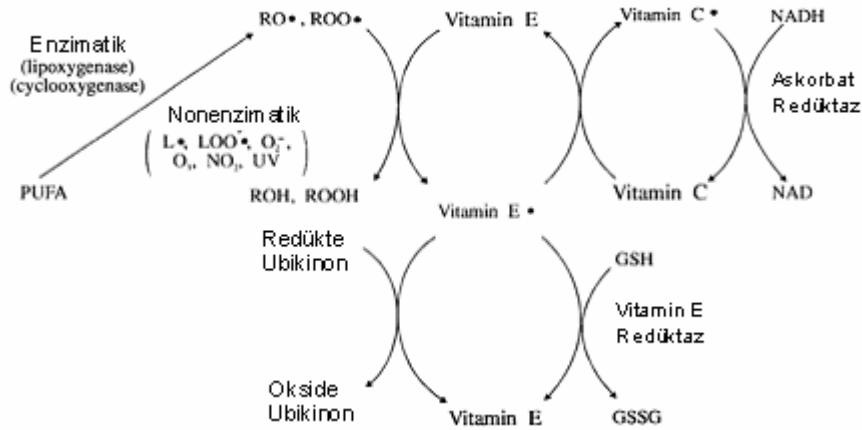
yüksek oksijen kısmi basıncına maruz kalan lipid yapılarında, örneğin eritrosit membranları ve solunum sistemi membranlarında yoğunlaşma eğilimindedir.

E vitamini, okside olduktan sonra ve parçalanmadan önce, askorbik asid ve glutatyon tarafından yeniden indirgenebilmektedir. Bu reaksiyon, bu maddelerin konsantrasyonlarına ve/veya indirgenmiş formlarını devam ettiren enzimlere bağlıdır. Bu yolla, tokoferol radikali, bir vitamin E radikal redüktaz aktivitesiyle E vitamininin doğal şekline dönüştürülebilir.

Oluşan  $\alpha$ -tokoferol-O radikali zayıf bir reaktiviteye sahiptir ve yağ asidi yan zinciri saldıramaz, sonuç olarak zincir reaksiyonu durdurulmuş olur. Oluşan vitamin E radikali vitamin C tarafından tekrar vitamin E'ye redükte edilir.



Oluşan vit.C radikali (semiaskorbat radikali) semiaskorbat redüktaz enzimi tarafından tekrar vit.C'ye indirgenir. Bazı tiyol bileşikleri (örn: GSH) de  $\alpha$ -tokoferölü rejenere edebilirler (Şekil 1.1.5.1.2.b.).



Şekil 1.2.5.1.2.b. Vitamin E'nin Rejenerasyonu.

Alfa-tokoferol dokularda değişik konsantrasyonlarda bulunur. En yüksek vit.E konsantrasyonları mitokondri ve mikrozomlar gibi membrandan zengin hücre fraksiyonlarında bulunur (4, 11).

Solunum havası ile dışarı atılan pentan miktarı, lipid peroksidasyonunun bir göstergesidir. Diyetle verilen E vitamininin, solunum havasındaki pentan miktarını azalttığı tespit edilmiştir. Bu da E vitamininin lipid peroksidasyonunu azalttığını göstermektedir. Nitekim, oral yolla verilen E vitamininin LDL'leri oksidasyona karşı koruduğu gösterilmiştir. Plazmada düşük E vitamini seviyesinin erken anjina pektoris için bir risk faktörü olduğunu ve E vitamini alımıyla koroner kalp hastalığı riskinin azaldığını gösteren deneysel ve epidemiolojik bulgular elde edilmiştir.

E ve C vitamini verilmesinin yaşlı kişilerde ortalama kan lipid peroksid konsantrasyonlarında bir azalmayla sonuçlandığı görülmüştür.

### 1.2.5.1.3. Karotenoidler

A vitamininin metabolik ön maddesi olan  $\beta$ -karoten, bitki pigmentlerinden olan karotenoid familyasının bir üyesidir.  $\beta$ -karotenin, singlet oksijeni bastırabildiği, süperoksid radikalini temizlediği ve peroksi radikalleri ile direkt olarak etkileşerek antioksidan vazife gördüğü tespit edilmiştir.

### 1.2.5.2. Enzimatik Olmayan Diğer Antioksidanlar

**Melatonin:** Melatonin en zararlı radikal olan  $\cdot$ OH radikalini ortadan kaldıran çok güçlü bir antioksidandır. Bu yüzden günümüze kadar bilinen antioksidanların en güçlüsü olarak kabul edilmektedir.

Melatoninin antioksidan olarak önemli bir özelliği de lipofilik olmasıdır. Dolayısı ile hücrenin bütün organellerine ve hücre çekirdeğine ulaşabildiği gibi kan-beyin bariyeri gibi bariyerleri de kolayca geçer. Böylece çok geniş bir dağılımda antioksidan aktivite gösterir.

**Glutasyon:** Karaciğerde genetik bilgiye ihtiyaç duymadan sentezlenebilen bir tripeptiddir. Glutamik asid, sistein ve glisin aminoasidlerinden meydana gelmiştir.

Çok önemli bir antioksidan olan glutasyon, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Bunun dışında, proteinlerdeki -SH gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı muhafaza eder. Böylece, fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. Yabancı bileşiklerin deoksifikasyonunu ve amino asidlerin membrandan

transportunu sağlar. Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşmesini önlemede rol alır.

Redükte glutatyon (GSH), reaksiyon sonucu oksitlenerek okside glutatyona (GSSG) dönüşür. Okside glutatyonun tekrar redükte hale gelmesi NADPH'ın kullanılması ile mümkündür.

Eritrosit zarını  $H_2O_2$ 'den, lökositleri fagositozda kullanılan oksidan maddelerden oksidatif hasardan korur.

**Ürat:** Normal plazma konsantrasyonunda hidroksil, süperoksid, peroksi radikallerini ve singlet oksijeni temizler. Fakat lipid radikalleri üzerine etkisi yoktur. Ayrıca C vitamininin oksidasyonunu engelleyici etkisi de bulunmaktadır.

**Sistein:** Süperoksid ve hidroksi radikali toplayıcısıdır.

**Albümin:** LOOH ve HOCl toplayıcısıdır.

**Bilirubin:** Süperoksid ve hidroksil radikali toplayıcısıdır.

**Seruloplazmin:** Muhtemelen SOD'a benzer mekanizma ile etki gösterir. Ferro demiri ( $Fe^{2+}$ ) ferri demire ( $Fe^{3+}$ ) yükseltgeyerek Fenton reaksiyonunu ve böylece serbest radikal oluşumunu inhibe eder.

**Transferin ve Laktoferrin:** Dolaşımdaki serbest demiri bağlarlar.

**Ferritin:** Dokudaki demiri bağlar.

**Ebselen:** Selenyumlu bir bileşik olup iyi bir antioksidandır. Glutatyon peroksidaz aktivitesini güçlendirir. Ayrıca lipoksijenaz yolunu inhibe eder.

**Sitokinler:** Başta katalaz olmak üzere antioksidan enzimleri aktive ederler.

**Demir şelatörleri:** Hidrojen peroksid, proteinlerin yapısındaki demiri serbestleştirerek Fenton reaksiyonunu hızlandırır. Böylece çok zararlı bir radikal olan  $\cdot OH$  üretimi artar. Demir şelatörleri ise hücre içine girerek serbest demiri bağlamak suretiyle onu etkisizleştirirler.

**Oksipürinol:** Allopürinolün metaboliti olup doğrudan  $\cdot OH$  ve HOCl radikallerini azaltıcı yönde etki eder.

**Mannitol:**  $\cdot OH$  radikalini toplayıcı etki (scavenger etki) gösterir.

**Probukol:** Kan kolesterolünü düşürmede kullanılan probukol, lipid peroksidasyonunun zincir kırıcı kuvvetli bir antioksidandır.

### 1.3. Alkol Metabolizması

Karaciğer alkolün metabolizmasındaki primer organdır. Karaciğer içinde alkol üç ayrı enzim sistemi ile oksidize edilir. Bunlar; alkol dehidrogenazlar (ADH), mikrozomal etanol okside edici sistem (MEOS) ve katalazdır. Katalaz peroksizomlarda ve mitokondrilerde bulunur ve bu üç sistem içinde en az kullanılanıdır (12).

ADH'lar sitoplazmik enzimlerdir ve karaciğer içinde birçok izoformları mevcuttur. ADH izoformları arasındaki farklılıklar etnik gruplar arasındaki alkol eliminasyon hızlarındaki belirgin farklılıkların nedenidir. ADH kan ve doku alkol konsantrasyonu düşük olduğu zaman alkol metabolizmasından sorumlu enzimdir. Doku alkol düzeyi 50 mg/dl üzerine çıktığı zaman MEOS devreye girer. MEOS için önemli nokta sitokrom P450 2E1 komponentine sahip oluşudur. Bu enzim sadece alkolün oksidasyonu değil birçok ilacın metabolize edilmesinde görevlidir. Kronik alkol tüketimi sitokrom P-450 2E1 enzim aktivitesinin 5-10 kat artmasına sebep olur. Bu aktivite artışı kronik alkol kullanımı olan kişilerde alkolün hızlı elimine edilmesinin nedenidir. MEOS, kronik alkol kullanan kişilerdeki alkol metabolizmasında, ara sıra alkol alan kişilere göre daha fazla rol üstlenmektedir.

Yapılan araştırmalar ADH enzim sisteminin karaciğer dışında mide ve bağırsakta da bulunduğunu göstermiştir. Alınan alkolün önemli bir miktarı mide ADH'sı tarafından metabolize edilmekte ve bu alkolün ilk geçiş eliminasyonu olarak bilinmektedir. Bu eliminasyon alkolün yol açtığı hepatotoksisite göz önüne alındığında büyük öneme sahip olmaktadır. Mide de alkolün metabolize edilmesi, portal sisteme geçen alkol miktarının azalmasına ve karaciğerde daha az hasara yol açmasına neden olur. Gastrik ADH aktivitesi kadınlarda daha düşük olduğu için aynı miktarda alkol alan kadınlarda erkeklere göre kan alkol seviyesi daha yüksek olmaktadır (12).

Diyet açısından herhangi bir kalori değerinin olmadığına inanılan alkolün (etanol,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ ) vücutta  $\text{CO}_2$  ve suya oksitlenmesi ile karbonhidratlardan elde edilen enerjiden daha fazla (4 kcal/g), yağlardan elde edilen enerjiden (9 kcal/g) daha az (7 kcal/g) enerji sağlanmaktadır. Günde 100-120 g alkol tüketen bir kişi bazal metabolik enerjisinin yaklaşık yarısını sadece bu kaynaktan elde edebilmektedir.

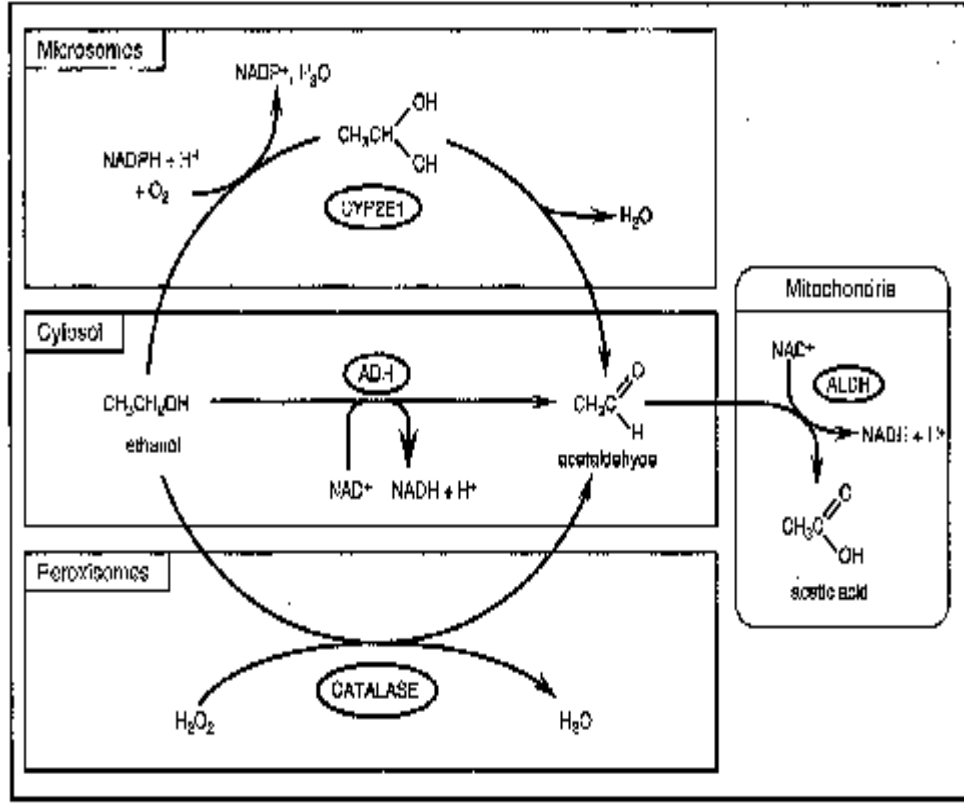
Kalori dışında bir yararı olmadığı için alkoliklerde vitamin ve mineral eksiklikleri görülmektedir.

Sitozolik alkol dehidrogenaz (ADH) tarafından alkolden elde edilen asetaldehit, mitokondrial ve sitozolik asetaldehit dehidrogenazlar tarafından asetata oksitlenmektedir. Alkol aynı zamanda karaciğer düz endoplazmik retikulumu içinde lokalize olan sitokrom P450 ailesinin bir üyesi olan mikrozomal etanol okside edici sistem (MEOS) tarafından da asetaldehide oksitlenmektedir (Şekil 1.3.1). Etanol için  $K_m$  değeri alkol dehidrogenazdan çok daha yüksek olduğu için ( $K_{m\text{ MEOS}} \gg K_{m\text{ ADH}}$ ) MEOS sentezi sitokrom P450 ailesinin diğer üyelerinin substratları ve etanol tarafından uyarılmaktadır. Bu nedenle MEOS, kronik olarak yüksek dozlarda alkol tüketen bireylerdeki etanol oksidasyonunun yaklaşık %30 kadarını karşılamaktadır. Büyük bir kısmı karaciğerden kana diffüze olan asetat, TCA döngüsünde oksitlenmek üzere kas ve diğer dokular tarafından alınmaktadır. Diyet kalorisinin %15 kadarından daha az kısmının tüketilen etanolden sağlanması halinde alınan etanol, ATP üretiminde etkin şekilde kullanılmaktadır. Oksidatif fosforilasyonda NADH, ATP üretiminde kullanılmaktadır. Asetaldehidin bir kısmı kana geçerek diğer dokulara taşınmaktadır. Bir kısmı TCA siklüsünde oksitlenen asetatın önemli bir kısmı kas dokuları tarafından alınarak asetil CoA oluşturulmaktadır. TCA döngüsünde asetil CoA oksitlenerek  $\text{CO}_2$  elde edilmektedir. Çok yüksek etanol düzeyleri dışında etanolün kalori içeriği, yüksek enerjili fosfat bağlarına (ATP) dönüştürülmektedir (14,15).

Çok yüksek dozlarda etanol alındığında etanolün bir kısmı endoplazmik retikulumdaki etanol okside edici sistem (MEOS) tarafından asetaldehide oksitlenmektedir. Yakıt ve NADPH elektronlarını alan  $\text{O}_2$ , suya indirgenmektedir. Bu tepkimede NADPH yapısındaki indirgenme potansiyeli şeklindeki enerji kullanılmaktadır. Uzun yıllar alkol kullanan kişilerin MEOS sistemi çok aktif şekilde çalışmakta ve bu kişilerin karaciğerinde ve kan dolaşımında bulunan asetaldehit, dokularda hasar oluşturmaktadır (4,14-21).

Alkol metabolizması, ADH aktivitesi ve  $\text{NAD}^+$  sağlanabilirliği ile sınırlandırılmaktadır. Alkol dehidrogenazın etanol için  $K_m$  değeri 1mM (46 mg/L) olduğu için enzim, bir veya iki kadeh alkolden sonra zorunlu olarak doygun hale gelmekte ve alkol metabolizması sıfırıncı dereceden kinetik göstermektedir.

İnsanların pek çoğu yaklaşık olarak saatte 10 g alkoli metabolize edebilmekte ve kan alkol düzeyi her saat yaklaşık 0,15 g azalmaktadır.



Şekil.1.3.1. Alkol metabolizması

Alkol metabolize eden enzimlerin genetik varyantlarının bulunması alkol toleransında bireysel farklılıkların görülmesine neden olmaktadır. Farklı optimum pH ve  $V_{\text{max}}$  değerlerine sahip üç ADH genetik varyantı tanımlanmıştır. En ilginç polimorfizmde asetaldehidi asetata oksitleyen mitokondrial aldehit dehidrogenaz enzimi etkilenmektedir. Normalde hız sınırlayıcı olamayan bu enzimin asetaldehit için  $K_m$  değeri düşük olduğundan ( $10\mu\text{M}$ ) ara ürün birikimi olmamaktadır. Atipik aldehit dehidrogenaz görülen pek çok Doğu Asyalıda polipeptidin 487. pozisyonunda glutamik asit yerine lizin bulunmaktadır. Negatif dominant bir mutasyon olan bu genetik varyantta mutant enzim, normal enzim ile inaktif oligomerler oluşturduğu için heterozigotlarda bile enzim aktivitesi sifıra yakındır. Bu bireylerde asetaldehit,

$K_m$  değeri 1 mM civarında olan sitozolik aldehit dehidrogenaz tarafından oksitlendiği için sadece bir-iki kadeh alkol alındığında toksik asetaldehit birikmektedir. Bunun sonucunda vazodilatasyon, yüz kızarıklığı ve taşikardinin görüldüğü doğuya özgü kızarıklık yanıtı görülmektedir. Bu enzimin eksik olduğu bireylerde alkolizm çok nadir ortaya çıkmaktadır. Mitokondrial aldehit dehidrogenazın farmakolojik olarak inhibe edilmesini sağlayan disulfiram (antabuse), alkoliklerin tedavisinde kullanılmaktadır. Alkollü içeceğe karışması halinde ölümcül olabileceği için bu bileşiğin kullanılması sıkı tıbbi kontrolü gerektirmektedir.

Kronik alkoliklerin dokularından elde edilen mitokondrilerde normal ATP sentezi için gerekli olan transmembran proton gradientinin korunamadığı görülmüştür. Bu nedenle etanolün enerjisinin büyük bir kısmı ısıya dönüşmektedir. Etanol oksidasyonu, yağ asidi ve glukoz oksidasyonunun normal metabolik yolları ile girişim yapmaktadır. Oksidatif süreci tamamlamak için ara ürünlerin bu metabolik yollar arasındaki döngüsü, etanol varlığında glukoz ve yağ asitlerinin oksidasyonunu daha az etkili hale getirmektedir (13-16).

Sitokrom P450 sistemini uyaran alkol, kendi metabolizmasının yanı sıra barbitüratların ve bazı ilaçların da metabolizmasını arttırmaktadır. Bu ilaçlara karşı iyi yanıt oluşturamadıkları için ölçülü içicilerde cerrahi işlemlerde anestezinin indüksiyonu ile problemler görülebilmektedir. Öte yandan alkollü bir kişide alkol metabolizması ilacın metabolizması ile yarışmaktadır. Akut etanol kullanımı MEOS üzerinde inhibisyon, kronik kullanım ise indüksiyon etkisi göstermektedir. Akut kullanımda etanol ADH yolunu tercih ettiği ve MEOS sistemi çalışmadığı için inhibisyon görülmektedir. İlaçların atılımında kullanılan diğer enzim sistemlerindeki artış MEOS indüksiyonu ile birlikte olduğu için alkol ile birlikte sedatif ve barbitüratlar alındığında enzime bağlanmak için birbirleri ile yarışmaktadırlar. Kompatitif enzim inhibisyonu ilaç klirensinin azalmasına ve çok yüksek kan barbitürat düzeylerinin görülmesine yol açmaktadır. İlaç daha uzun süre kanda kaldığı için ölüme neden olabilmektedir (14).

Karaciğer metabolizması alkolden çok ciddi boyutlarda etkilenmektedir. Karbonhidrat ve yağ asidi oksidasyonundan farklı olarak karaciğerde, alkol metabolizmasının negatif kontrol mekanizması bulunmadığı için alkolün



oksidasyonu, diğer besinlerin oksidasyonundan önce tercih edilmektedir. Geriye doğru beslenme ile inhibisyonun olmaması, alkol metabolizması tepkimelerinin enerji üreten yol olmaktan çok detoksifikasyon sistemi olarak geliştiğini düşündürmektedir. Normal olarak kolonda bakteriyel fermantasyon ile az miktarda alkol oluşmaktadır.

Alınan etanolden asetil CoA, NADH ve ATP üretildiği için glukoz ve yağ asitleri normal yollarında okside olamamaktadır. Ortamda alkolden sağlanan fazla miktarda NADH bulunduğunda metabolizma, yeni NADH oluşumuna yol açacak oksidasyon yolları yerine NADH tüketebileceği yolları tercih etmektedir. Bu nedenle çeşitli noktalarda kontrol gerçekleştirilmektedir (14).

Alkol alındığında üretilen asetil CoA, NADH ve ATP glukoz metabolizmasını, fosfofruktokinaz ve pirüvat dehidrogenaz aşamalarında inhibe etmektedirler.  $\text{NAD}^+$  azalması ve malonil CoA düzeyinin artması yağ asidi oksidasyonunu azaltmaktadır. Yüksek ATP ve NADH düzeyleri ile  $\text{NAD}^+$  azalması TCA döngüsünü inhibe etmektedir. Etanolün asetik aside oksidasyonu ile üretilen iki NADH solunum zincirinde okside edilerek hücrelerin enerji gereksinimi fazlasıyla karşılandığı için alkoliklerin karaciğerinde TCA döngüsü yavaşlamıştır. Yağ asidi oksidasyonunun azalması ve artmış yağ asitlerinin esterleşmesi sonucu trigliserit sentezi, VLDL salgılanması ve plazma trigliserit düzeyi artmaktadır. Özellikle yüksek insülin/glukagon oranı asetil CoA karboksilaz aktivitesini uyardığından yağ asidi sentezi de hızlanmaktadır.

Yüksek ATP ve NADH düzeylerine rağmen alkol, pirüvat ve oksaloasetatın glukoneogeneze kullanılmasını inhibe etmektedir. Tersinir laktat dehidrogenaz ve malat dehidrogenaz tepkimeleri ile laktat/pirüvat ve malat/oksalasetat oranlarını yüksek  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  oranı artırmakta ve kan laktat düzeyi artarken pirüvat ve oksaloasetat tüketilmektedir. Ağır fiziksel aktivite sonrası veya aç karnına alkol alan kişide karaciğer glikojen depoları tükendiğinden beklenenden daha önce hipoglisemi gelişmektedir.

Kronik alkolizmde oluşan doku hasarının çoğu, yüksek dozlarda alkol alındıktan sonra karaciğerde biriken ve kana salgılanan asetaldehitten kaynaklanmaktadır. Oldukça reaktif olan asetaldehit, amino gruplarına, nükleotidlere ve fosfolipitlere kovalent olarak bağlanmaktadır. Etkilenen proteinler arasında

hemoglobin, kalmodülin, ribonükleaz ve tubulin bulunmaktadır. Kalp ve diğer dokulardaki proteinler de karaciğerdeki proteinler kadar etkilenmektedir.

Asetaldehit, hepatik lipoprotein partiküllerinin oluşması için gerekli olan protein sentezinin ve proteinlerin tubuline bağımlı salgılanmasının azalmasına neden olmaktadır. Salgı mekanizmalarının bozulması sonucu, karaciğerde triaçilgliseroller ve proteinler birikmektedir. Yağ asidi oksidasyonunun inhibisyonu ile yüksek miktarlarda oluşan çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) kanda artmasına rağmen belirgin miktarlarda protein ve triaçilgliserolün karaciğerde biriktiği görülmektedir. Proteinlerin birikimi ile hepatositlere giren su, karaciğerin şişmesine ve hepatik yapı parçalanmasına yol açmakta ve portal hipertansiyon gelişmektedir. Asetaldehid takısının oluşması sonrasında lipit peroksidasyonu artmakta ve serbest radikal hasarı kalıcı hale gelmektedir. Doğrudan glutatyona bağlanan asetaldehid, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile hasar oluşturulmasına karşı glutatyonun koruyucu etkisini azaltmakta ve hidroksil radikali oluşumunu arttırmaktadır. MEOS uyarılması da serbest radikal oluşumunu hızlandırmaktadır (13-18).

Protein ve lipit hasarı, mitokondrinin NADH ve asetaldehid oksitleme kapasitesini azalttığı için asetaldehid, oluşan hasarın devam etmesine neden olmakta ve daha fazla asetaldehid birikmektedir. Yüksek NADH/NAD<sup>+</sup> oranı kronik alkolizmde laktik asidoz, ketoasidoz ve hipoglisemiye neden olmaktadır. Laktat ve keton cisimleri, böbrekler tarafından ürik asit atılımını etkilediği için hiperürisemi de görülmektedir. Kronik etanol tüketen bireylerin %20 kadarından daha azında hepatik siroz veya hepatik skar oluşmakta, fakat bu bireylerin önemli bir bölümünde alkolik karaciğer hastalığında görülen biyokimyasal değişiklikler görülmektedir. Etanol tüketiminden sonra hepatik fibroz gelişmesi sonucu fibroblastlarda uyarılan mitojenik lto hücrelerinin gelişimi, kollojen ve fibronektin üretiminin uyarılmasına neden olmaktadır. Fibroz oluşumuna aynı zamanda serbest radikal hasarı da katkıda bulunmaktadır. Hepatik siroz geliştikten sonra karaciğer fonksiyonunun pek çoğu kaybolmakta, üre oluşturma kapasitesinin değişmesi sonunda NH<sub>4</sub><sup>+</sup> birikmekte ve hepatik ensefalopati gelişmektedir. Karaciğerde serum albümin, kan pıhtılaşma proteinleri ve diğer serum proteinlerinin sentezi ve salgılanması azalmaktadır (14,15).

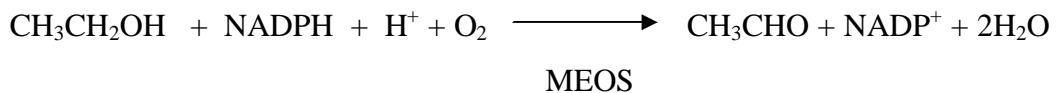
### 1.3. Alkol Metabolizması Reaksiyonları

Etanol sadece mayalar tarafından üretilmez. Aynı zamanda memelilerde de eser miktarda bulunabilir. Bağırsaklardaki bakteriyel fermantasyon memelilerdeki üretimin sadece bir yoludur. Ancak etanol aslında eksojen bir bileşiktir ve gastrointestinal yoldan kolayca emilirler. Emilen etanolün %2-10'u direk böbrek ve akciğerlerden elimine edilir. Geriye kalan kısım ise vücutta oksidize edilir. Bu oksidasyon işleminin başlıca merkezi karaciğerdir. Alkol karaciğerde üç ayrı enzim sistemi ile oksidize edilir. Bunlar; alkol dehidrogenazlar (ADH), mikrozomal etanol okside edici sistem (MEOS) ve katalaz (CAT)'ı içerir. ADH'lar sitoplazmada bulunur ve alkol metabolizmasındaki en etkin enzimlerdir. Alkolün asetaldehide dönüşümünü katalize ederler. ADH enziminin karaciğer dışında midede de bulunduğu bilinmektedir. Etanolün bir kısmı midede metabolize edilir ve bu da karaciğerin daha az hasar görmesine yardımcı olur.

Alkol dehidrogenazlar (ADH) sitoplazmada bulunur ve alkol metabolizmasındaki en etkin enzimlerdir. Alkol dehidrogenazın birkaç izoenzimi bulunur ve alkolün asetaldehide dönüşümünü katalize eder.



MEOS, düz endoplazmik retikulumda bulunur ve sitokrom P450 enzim ailesi tarafından okside edilir. Alkol ile uyarılan sitokrom P450, sitokrom P450 2E1 veya CYP2E1 olarak adlandırılır. CYP2E1 için  $K_m$  değeri alkol dehidrogenazdan çok daha yüksektir ( $K_m \text{ MEOS} \gg K_m \text{ ADH}$ ). Alkol dehidrogenaz enzimi bir iki kadeh alkol alımından sonra doygunluğa ulaşır. Fakat yüksek dozda alkol alındığında MEOS devreye girer ve bu sırada düz endoplazmik retikulum sayısında hızlı bir artış gözlenir.



Katalaz (CAT) enzimi peroksizomlarda lokalizedir ve alkol metabolizmasında majör bir rolünün olmadığına inanılmaktadır. Peroksizomlarda yerleşik olan CAT enziminin, in vitro olarak  $H_2O_2$  oluşturan sistem varlığında etanolü okside etme yeteneği vardır. CAT aktivitesini iki farklı kombinasyon örneğiyle açıklarsak;

**a) NADPH oksidaz ve CAT kombinasyonu**



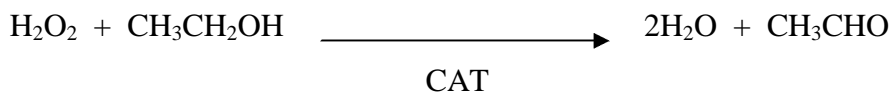
+



**b) Ksantin oksidaz ve CAT kombinasyonu**



+



Etanol oksidasyon işleminin aktivasyonunun sürekliliği üç mikrozomal komponent olan sitokrom P450, NADPH-sitokrom P450 redüktaz ve fosfolipitlerle sağlanır (13-14).

Etanolün CYP2E1 yoluyla tipik monooksijenaz mekanizması ile oksidasyonuna ek olarak, etanol karaciğer mikrozomlarında asetaldehide dönüşürken  $H_2O_2$  demir katalizörlüğünde degradasyonundan kaynaklanan  $\cdot OH$  radikali oluşur. Bu enzimatik olmayan yol hidroksietil radikalinin oluşmasından kısmen sorumlu olabilir, ara basamak etanol ve onun ürünü asetaldehid arasındadır. Bu etanolün  $\cdot OH$

yakalayıcısı olduğunu düşündürür. Diğer delil; bazı radikallerin üretiminin, okside ürünlerin sitokrom P450'ye bağlanabilme yeteneğine ve alkolün  $\alpha$  karbonundaki protonu yeterli reaktive etmesine bağlı olmasıdır. Benzer bir mekanizma 2-keto-4-thiomethylbutyric asit gibi mikrozomal etanol oksidasyonunu inhibe eden demir şelatörlerinin olması ile uyumludur. Mikrozomal etanol oksidasyonu in vivo şartlar altında nonhem demir ve endojen demir şelatörlerinin mevcudiyetini gerektirir. Bununla birlikte normal şartlar altında bu  $\cdot\text{OH}$  bağımlı mekanizmanın mikrozomal etanol oksidasyonu üzerinde minör katkısı vardır. Hidroksil radikalının kronik etanol alımından sonra NADPH'ın artması ve NADPH bağımlı süperoksit ve hidroksil radikali üretiminin artmasına rağmen etanol oksidize sistemin yeniden oluşumundaki aktiviteye katıldığı süperoksidi içermediği bulunmuştur.

En az iki mekanizma etanolün mikrozomal mekanizmasında rol alır. Daha az görüleni endojen  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'den oluşan fenton tipi reaksiyondan üretilen hidroksil radikalının üretimini içerir ve majör olan diğer yol sitokrom P450 bağımlı monooksijenasyon ve hidroksil radikalinden bağımsızdır. Etanol metabolizmasında CYP2E1, hidroksietil radikalının oluşumunda rol alır. Alkol bağımlı serbest radikaller, kronik etanol alımında CYP2E1 inhibitörlerine karşı antikor oluşumu ve CYP2E1'in indüksiyonunu izleyerek oluşurlar. Alkolün in vivo ve in vitro etkileri; bazı organların etanol bağımlı oksidan hasara karşı daha hassas olduğu görülmüştür. Pek çok doku aktivitesinin normal seyri sırasında ROS ve çiftlenmemiş elektron çiftleri içerir. Mitokondrial oksidatif fosforilasyonda  $\text{CO}_2$  yerine yaklaşık olarak %3-5 oranında ROS oluşur. Çeşitli enzimler, katekolaminler, prostaglandin ksantin oksidaz ve sitokrom P450'yi üreten lipooksijenazı metabolize eden monooksijenazlar yolu ile ROS üretilir. Kronik etanol alımı, alkol metabolizması sırasında ROS'u üreten P4502E1 enzimini indükler. Oksijen radikallerinin en reaktif olanı hücrel lipitleri, proteinleri ve DNA'yı reaktive edebilen hidroksil ( $\cdot\text{OH}$ ) radikalidir. Süperoksit radikali ve  $\text{H}_2\text{O}_2$  esas olarak hücrel proteinleri reaktive eder, lipitleri ve DNA'yı reaktive etmez. Hidrojen peroksit bununla beraber oldukça reaktif  $\text{OH}^{\cdot}$  radikallerini üreten metallerle reaktive olabilir (13,20).

Bütün dokular ROS'u nötralize etme kapasitesine sahiptir. Bu mekanizmalar süperoksidi ve  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'i suya çeviren SOD ve CAT'ı içerir. GSH ve GSSG çiftini içeren glutatyon antioksidan sistem olarak çalışır. Oksijen molekülünün

indirgenmesini sağlayan pentoz fosfat yolundaki NADPH'a bağımlıdır. Glutatyon redüktaz ve glutatyon peroksidaz bu döngünün selenyuma bağlı komponentleridir. GSH'nin hücresele seviyede redüksiyonu ve GSSG'nin artması hücre kültür sistemleri veya organ sistemlerinde oksidatif stresin arttığına işaret eder. Vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol) ve vitamin C (askorbik asit) vücuttaki antioksidan kapasitenin önemli diyetsele elemanlarıdır. Alkolün çeşitli organ sistemlerini zarar verdiğiine dair deliller vardır. Bazı organlar hasara diğerlerinden daha hassastır. Karaciğer kesin olarak zarar görür ve karaciğer hasarının mekanizması oksijen radikallerinin karaciğer hücreleri üzerine etkilerinden kaynaklanır. Pankreas ve mide de kronik etanol alımında hasar görülebilir ve gastrik hasar akut alkol alımı esnasında da ortaya çıkabilir. Beyin özellikle fetal gelişim sırasında alkolden zarar görebilir.

Bazı çalışmalar alkolün vitamin A metabolizmasını interfere ettiğini göstermiştir. İnsan ve hayvanlarda alkol tüketimi ile vitamin A tükenmektedir. Ayrıca  $\beta$ -karoten vitamin A'nın prekürsörüdür ve retinol vitamin A aktivitesini gösteren alkol formudur. Hem retinol hem alkol dehidrojenazlarla metabolize olur. Vitamin A'nın alkolik karaciğerde tükendiği gösterilmiştir.

### **1.3.2. Alkolün Karaciğer Hasar Mekanizmaları**

#### **1.3.2.1. Doğrudan Toksik Etkiler**

##### **1.3.2.1.1. Lipid ve Karbonhidrat Metabolizması Değişiklikleri**

Alkol oksidasyonu sonucunda  $NAD^+$ 'nin indirgenmesi ile ortaya çıkan fazla miktarda NADH, karaciğerde  $NAD^+$  bağımlı birçok prosesin etkilenmesine yol açar. Tri-açilgliserol sentezi artarken yağ asitlerinin beta oksidasyonu inhibe olur ve yağ asitleri esterifiye olarak trigliserid olarak depolanır. Bu süreç hepatik steatoz ile sonuçlanır. Ek olarak yüksek NADH/ $NAD^+$  oranı glukoneogenezde de bazı anahtar enzimlerin aktivitelerinin inhibisyonuna yol açar ve hipoglisemiyle sonuçlanır. Bu durum özellikle karbonhidrat malnutrisyonu olan alkoliklerde daha belirgindir (12).

### 1.3.2.1.2. Oksidatif Stres

Alkolün sitokrom P450 2E1 ile metabolize edilmesi sonucunda süperoksit ( $O_2^-$ ) ve hidroksil ( $OH^-$ ) gibi serbest oksijen radikalleri ortaya çıkarlar. Bu reaktif oksijen ürünleri özellikle hidroksil radikali, hücresel proteinler, lipidler ve DNA ile etkileşerek bir seri peroksidasyon reaksiyonu başlatır ve hücre zedelenmesi ile sonunda hücrenin ölümüne yol açarlar.

ADH sisteminin rol oynadığı alkol metabolizması da farklı bir yöntemle serbest oksijen radikalleri 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 süperoksit ve hidroksil radikallerinin oluşmasına neden olur. Ayrıca alkol metabolizması sonucunda ortaya çıkan asetaldehitin oksidasyonu sonucunda son ürün olarak oksijen radikalleri ortaya çıkarlar. Kronik alkol alımı sonucunda aktive olan nötrofiller ve kupffer hücrelerinin de oksijen radikalleri için ek birer kaynak oldukları bilinmektedir.

Alkol metabolizması sonucunda karaciğerde oluşan oksidatif stres, karaciğerin serbest oksijen radikallerinden kendini koruyamadığı durumlarda daha şiddetli hasara neden olmaktadır. Glutasyon oksidatif hasardan korunmak için anahtar rol oynayan protein olmayan bir tioldür. Kronik alkol tüketimi karaciğer vitamin A, E ve glutasyon rezervlerinin azalmasına yol açarak karaciğerin koruyucu antioksidan defans mekanizması üzerine negatif etki yapar ve alkolün yaptığı karaciğer hasarına katkıda bulunur (12).

### 1.3.2.1.3. Asetaldehit Etkisi

Asetaldehit (AA) karaciğerde doğrudan hepatoselüler hasar ve nekroza yol açabilecek yüksek reaktiviteye sahip bir maddedir. AA hücresel proteinlerin lizin rezidülerine bağlanarak AA-protein yapılarını oluşturur. Ayrıca tubüline de bağlanabilen AA hücrenin protein trafiğini etkileyerek hücrelerde şişmeye (balonlaşmaya) yol açar. Ayrıca AA-protein yapıların neoantijen olarak rol oynayarak immün sistemi aktive ettiği bilinmektedir (12).

#### **1.3.2.1.4. Fibrozis Oluşum Mekanizmaları**

Karaciğer fibrozisi kronik alkol kullanımının ciddi ve geri dönüşümsüz bir sonucudur. Fibrozis alkoliklerin sadece %10-15'inde görülmesine karşın, karaciğer hastalığı bulguları olan alkoliklerde %50 oranında karşılaşılan bir durumdur. Alkolik karaciğer fibrozisi fizyopatolojisi temelinde hepatik yıldız (stellate) hücrelerin aktivasyonu yatmaktadır. Daha önceleri İto hücreleri, yağ depolayan hücreler, perisinüzoidal hücreler ya da lipositler olarak adlandırılan yıldız hücreler normalde disse aralığında vitamin A depolanmasında önemli rol oynayan hücrelerdir. Toksik, infeksiyöz ya da alkolik karaciğer zedelenmesi sonucunda bu hücreler miyofibroblast benzeri hücrelere proliferasyon olmaktadır. Aktif hale gelen uydu hücreler karaciğerin kollojen sentezleyen esas hücreleri olup alkolik karaciğer hastalığına özgü perisinüzoidal fibrozis gelişiminden sorumludurlar.

Yıldız hücreleri in vivo aktif hale getirilen uyarılar tam olarak bilinmesede, AA ve AA-protein oluşumları ile "Transforming Growth Factor Beta" (TGF- $\beta$ )'nin laboratuvar ortamında bu uyarıları yaparak hücrelerin kollojen sentezlemesine yol açtıkları bilinmektedir. Alkol ile beslenen ratlarda Kupffer hücrelerinin IL-6 ve TNF- $\alpha$  ürettikleri, bu sitokinlerin de fibrozisi tetiklediği gösterilmiştir. Ek olarak aktif hale gelen uydu hücrelerinin TGF- $\beta$  üreterek kendi kendilerini uyardığı da gösterilmiştir (12).

#### **1.3.2.2. Alkolik Karaciğer Hastalığının Oluşumunda Etkili Ko-Faktörler**

Alkoliklerin küçük bir bölümünün ciddi karaciğer hastalığına yakalanmaları, alkolün yaptığı son organ hasarında etkili başka parametrelerin olabileceğini göstermektedir. Alkolik karaciğer hastalığı patogeneğinde etkili birçok ko-faktör olduğu belirtilmiştir.

##### **1.3.2.2.1. Herediter Faktörler**

ADH, sitokrom P450 2E1, aldehit dehidrogenaz (ALDH) enzimlerindeki polimorfizm alkolik karaciğer zedelenmesinde risk faktörü olarak incelenmektedir. ADH'yi kodlayan en az 3 değişik allel vardır. Yapılan çalışmalar ADH fenotip değişiklikleri kişiler arasında alkol eliminasyon hızında 3 ila 10 kat değişikliklere yol açabilmektedir. İlginç olarak alkolü hızlı elimine edenlerde karaciğer hastalığı



görülme riski daha yüksektir. Bunun tam aksi durum ALDH enzimi polimorfizminde görülmektedir; AA'yi yavaş elimine edenler karaciğer hastalığı gelişimi açısından daha fazla risk altındadırlar.

#### **1.3.2.2.2. Cinsiyet**

Kadınlar alkolik karaciğer hastalığına erkeklere göre daha yatkınlardır. Yapılan çalışmalar günde 80 gram alkol tüketen kadınların 10 yıl gibi bir sürede alkolik karaciğer hastalığının belirtilerini göstermeye başlamaktadırlar. Bazı yazarlar bu yatkınlığı kadınlardaki yavaş gastrik alkol metabolizmasına bağlamaktadırlar.

#### **1.3.2.2.3. Beslenme**

Alkolik karaciğer hastalığı nutrisyonel durum ile güçlü bir negatif ilişki içersindedir. Diyetel faktörlerin doğrudan olarak alkolik hasarın sebebi olmamalarına karşın alkolik karaciğer hastalığı gelişimini ve progresyonunu kolaylaştırdığı bilinmektedir. Malnutrisyon alkolik karaciğer zedelenmesine birkaç farklı yolla katkıda bulunur. Vitamin A ve E gibi antioksidan maddelerin kronik alkol kullanımı sonucunda azalmaları nedeniyle oksidatif stresin karaciğere verdiği hasar artmaktadır. Kronik alkol tüketimine bağlı olarak demirin barsaktan emilimi artar ve karaciğer demir depolarında artış olur. Demirinde oksidatif stres yoluyla karaciğer zedelenmesine yol açtığı bilinmektedir.

#### **1.3.2.2.4. Viral Hepatit**

Hepatit C virus (HCV) infeksiyonunun alkoliklerdeki karaciğer hasarına önemli katkıları olduğu bilinmektedir. Kabaca alkoliklerin %18 ila 25'inde HCV infeksiyonuna rastlanmakta ve HCV varlığının genellikle ilerlemiş karaciğer hastalığı ile birliktelik gösterdiği rapor edilmektedir. Alkol nedeniyle siroz olan hastaların %40'ında HCV infeksiyonu varlığı gösterilmiştir. Siroz olmayan hastalarda HCV infeksiyonu oranı ise %25 civarındadır. HCV ile birlikte olan AKH, daha genç yaşlarda ve daha az kümülatif alkol tüketimi ile ortaya çıkmaktadır. Yapılan çalışmalar alkolün HCV replikasyonunu arttırdığını göstermiştir

Hepatit B virus (HBV) infeksiyonu varlığında da kronik karaciğer hastalığı gelişme riski mutlaka vardır. Ancak HBV'nin etkisi sinerjistik olmaktan öte kendi

virulansına ya da bir başka deyişle kendine has karaciğer hasarı yapmasına bağlıdır (aditif etki). HCV+alkol daha ciddi bir kombinasyondur.

#### **1.3.2.2.5. Karaciğer Doku Demiri**

Karaciğer hastalığı olan alkoliklerde serum demir saturasyonunun artmış olduğu, karaciğer biyopsisinde de kantitatif demir düzeyinin 500 mg/gr kuru karaciğer ağırlığı'na kadar yükselebildiği bilinmektedir. Bu durum alkoliklerde artmış demir emilimi ve karaciğerde demir depolanması sonucunda olmaktadır. Alkol oksidasyonunda birçok reaksiyonu katalize eden demir sonuçta serbest radikal oluşumuna ve oksidatif hasara yol açmaktadır.

#### **1.3.2.2.6. Sigara ve Kahve İçimi**

Sigara içen alkoliklerin siroz olma riskleri içmeyenlere göre 3 kat artarken, günde 4 bardaktan fazla kahve içenlerin riski ise düşmektedir. Kahve ve sigaranın etki mekanizmaları bilinmemekle birlikte kahvenin etkisinin kafein üzerinden olmadığı savunulmaktadır. Çay içimi ise kahvenin yaptığı etkiyi göstermemektedir.

### **1.4. Ekstraselüler Matriks**

Ekstraselüler matriks genel olarak hücreleri saran, çevreleyen bir biyokimyasal ortam olarak tanımlanabilir. Ekstraselüler matriksin en önemli rolü dokuların kendilerine özgü mekanik, fiziksel ve kimyasal özelliklerini sağlamak ve hücrelerin tutunması ve migrasyonu için gerekli iskelet sistemini oluşturmaktır. Bu ortamın, sadece destek fonksiyonuna sahip olmayıp, dinamik bir sistem özelliğinde olduğu bilinmektedir. Hücre homeostazının sağlanması, hücreler arası sinyal iletimi, hücre büyüme ve çoğalmasının regülasyonu ve nörotransmisyon gibi dinamik olaylarda da ekstraselüler matriks önemli roller üstlenir (23).

Ekstraselüler matriksin yapısı, dokunun fonksiyonel gereksinimlerine bağlı olarak dokular arasında farklılık gösterir. Bu, gerek matriksi oluşturan komponentlerin çeşit ve oranlarındaki değişiklikler sonucunda, gerekse dokudaki dinamik olaylardaki lokal değişiklikler sonucunda sağlanır.

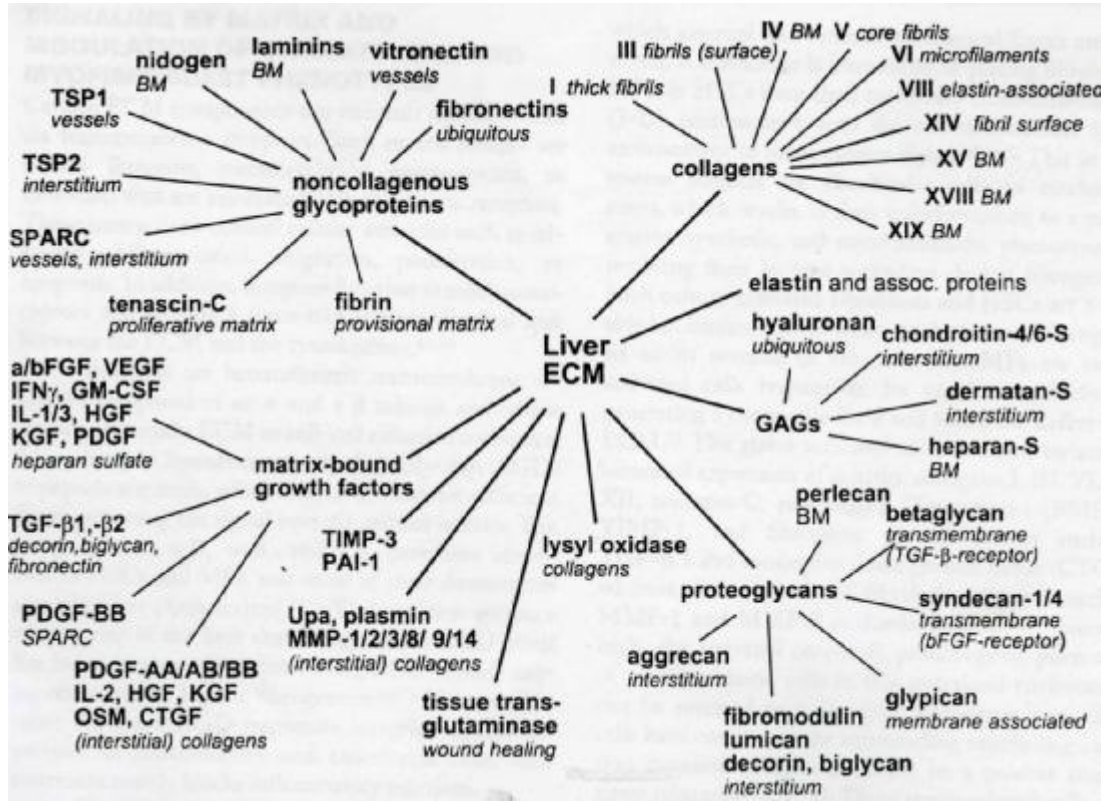
### 1.4.1. Hepatik Ekstraselüler Matriks

Subendotelyal Disse boşluğu, epitelyumu (hepatositleri) sinüzoidal epitelyumdan ayırır. Normal karaciğerde bu boşluk bir intersisyel ve bazal membran içerir. Bu sinüzoidal matriks fibriller kollojen tip I, III ve V, mikrofibriler kollojen VI, bazal membran kollojenler IV ve XVIII ve FACIT kollojen XIV'den bir miktar ve bir miktar küçük proteoglikan decorin, fibronektin, tenascin-C, laminin, nidojen, heperan sülfat proteoglikan ve diğerlerinden oluşur (Şekil.1.1.4.1.) . Bu düşük dansiteli ECM, rezidant karaciğer hücrelerinin (ör: hepatositler, stellate (yıldız) hücreleri, sinüzoidal endotelyum ve kupffer hücreleri) farklılaşmış fonksiyonlarını sürdürbilmesi için önemlidir (21). Yoğunluk karşılaştırmasında intersisyel ECM portal alanı, santral venleri ve karaciğer kapsülünü büyük ölçüde kapsar. Karaciğer fibrotik olurken, ECM'de anlamlı kantitatif değişiklikler olur, periportal ve perisinüzoidal boşlukta total kollojen ve nonkollojen komponentlerin içeriği on kat artar (22). Böylece, düşük dansiteli perisinüzoidal ECM, kollojen fibriller yığının birikmesi ile karakterize yüksek dansiteli matrikse dönüşür. Bu sürece hepatosit mikrovilinin kaybı ve endotelyal fenestranların kaybı eşlik eder. Genelde intersisyel perisinüzoidal matriks, hepatosit fraksiyonlarını uzlaştırır ve hepatik stellate hücreleri (HSCs) ve miyofibroblastların (MFs) aktivasyonuna yol açar.

Aktif HSCs ve MFs'lerin demsin ve glial fibriller asidik protein, gerçek ECM proteinleri ( tenascin, laminin, fibulin 2), proteaz P100, proteaz inhibitör  $\alpha$ 2-makroglobin, sitokinler ör: interlökin-6 (IL-6) veya mediyatörler ve reseptörleri (ör: endotelin A ve B reseptörleri) gibi sitoskeletal komponentlerinin ekspresyonuna göre farklılaşmış olabileceği düşünülüyor.

Aktive HSCs ve MFs, ECM moleküllerinin geniş bir spektrumunu eksprese eder ve sentetik kapasiteleri büyük ölçüde kantitatif ve kaltitatif olarak çevredeki fibrotik matriksi tanımlar. Bu hücreler aynı zamanda çoğu MMP'leri ve önemli inhibitörlerini (TIMP-1ve-2) salgılar. Küçük fakat lokal olarak önemli ECM fraksiyonu diğer karaciğer hücreleri özellikle, sinüzoidal ve portal endotel (kollojen IV > I, III ve VI; fibronektin, tenascin ve laminin), safra kanalı epiteli ve hepatositlerdir (fibronektin ve bazal membran kollojen XVIII).

Normal dokular içeren karaciğerde, matriks protein yıkılımı matriks metalloproteinazlar (MMPs) olarak adlandırılan bir enzim ailesi tarafından başlar (21).



Şekil.1.1.4.1. Karaciğer ECM molekülleri (21)

#### 1.4.2. Ekstraselüler Matriksin Komponentleri

Ekstraselüler matriks, temelde substantia fundamentalis içinde yüzen çözünmez protein liflerinden oluşmuştur. Ekstraselüler matrikste bulunan başlıca lifsel proteinler kollojen ve elastindir. Ekstraselüler matriks, çözünmeyen fibriller, mikrofibriller, çeşitli çözünebilir proteinler ve glikoproteinlerden oluşur. Kollojen, elastin ve temel maddenin doku bileşimindeki oranlarına göre bağ dokularının özellikleri değişmektedir (23).

### 1.4.2.1. Kollojen

Total vücut proteininin %30, toplam vücut ağırlığının ise %6 kadarını oluşturan kollojen, insan vücudunda en yaygın olarak bulunan proteindir. Kollojenin biyomedikal önemi ateroskleroz, karaciğer sirozu, romatoid artrit, osteoartrit gibi patolojilerde ortaya çıkmıştır.

Oldukça farklı özel bir sarmal yapıya sahip olan kollojenin temel yapısını oluşturan peptit zincirine  $\alpha$ -zinciri adı verilmektedir. Bu  $\alpha$ -zincir sarmalının her dönüşünde üç amino asit kalıntısı bulunmaktadır. Üç kollojen  $\alpha$ -sarmalının ( $\alpha$ -zincir) üst üste sarılarak meydana getirdiği süpersarmal yapıya kollojen üçlü sarmalı adı verilmektedir. Kollojenin diğer bir özelliği de yapısında yaklaşık %35 Gly, %11 Ala ve %21 Pro/HidroksiPro (Hy-Pro) bulunmasıdır. Bu amino asit kalıntıları kollojen yapısında genel olarak Gly-X-Pro veya Gly-X-HyPro üçlüleri halinde tekrarlanmaktadır. Burada X her hangi bir amino asidi belirtmekte ve  $\alpha$ -zincirinin zigzag yaptığı noktalarda Pro yer almaktadır (23).

Kollojen üçlü sarmal yapılarının bir araya gelerek oluşturdukları supramoleküler yapıya kollojen fibrilleri denir. Kollojen üçlü sarmalları ve bunların oluşturduğu kollojen fibrilleri çelikten daha kuvvetli bir gerilme gücüne sahiptirler. Kollojen üçlü sarmalları ve kollojen fibrillerin oluşması sırasında her polipeptit zinciri, paralelinde uzanan polipeptit zincirine diğer proteinlerde rastlanmayan özel kovalent bağlarla bağlanmaktadır. Lys, OH-Lys veya His amino asidi kalıntılarının R grupları arasında oluşan bu kovalent bağlar, yapıyı son derece dayanıklı hale getirmektedir.

#### 1.4.2.1.1. Kollojen Tipleri

Değişik kollojen alt birimlerinin (polipeptid zincirlerinin) birleşmesi sonucunda farklı kollojen tipleri ortaya çıkmaktadır. Tüm vücut kollojenleri içinde nicel olarak toplam kollojen miktarının %70 kadarını tip I, II ve III kollojenler oluşturmaktadır. Vücutta organlara destek veren bağ dokularındaki yapısal rolleri nedeniyle bu kollojenlere interstisyel kollojenler adı verilmiş fakat daha az miktarlarda bulunan ve değişik makromoleküler düzen gösteren kollojenlerin ortaya çıkması ile değerini kaybetmiştir. Fonksiyonları ile ilgili ayrıntılı bilgilerin elde edilmesine olanak vermediği için büyüklük ve fizikokimyasal özellikler yerine kollojenler, genetik

özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır. Kollojenlerin ekstraselüler matriksteki yapı, organizasyon ve işlevleri önem taşımaktadır. Genetik olarak tanımlanmış ondokuz adet kollojen (Tablo 1.4.2.1) tipinin farklı özellikleri bulunmakta ve sürekli olarak yeni tipleri eklenmektedir (23).

#### **1.4.2.1.2. Kollojen Yıkılımı**

Vücutta bulunan kollojenlerin büyük kısmının belirli bir yenilenme sürecinin olduğu ve en sağlam liflerin bile yavaş yavaş yeni sentezlenen liflerle değiştirildiği kanıtlanmıştır. Tip I, II ve III gibi fibriler kollojenlerin üçlü sarmal yapıları, proteinazların çoğuna dirençlidir. Matriks metalloproteinazlar adı altında toplanan geniş ekstraselüler matriks proteinazları ailesinin bir üyesi olan interstisyel kollojenaz (nötrofil kollojenaz), kollojen molekülünün amino ucuna yakın (molekülün ilk ¼'lük kısmı) bir yüzeye bağlanarak kollojen yıkılımını başlatmaktadır. Üçlü sarmal yapısındaki kollojen molekülüne etkili enzim, orijinal kollojen molekülünün %75 ve %25 kadarını taşıyan iki adet sarmal yapıda molekül açığa çıkarmaktadır. Sarmal yapıları dayanıklı olmayan bu küçük moleküllerin vücutta parçalanması ile elde edilen polipeptidler, proteazlar tarafından daha küçük peptidlere veya serbest amino asidlere yıkılmaktadırlar. Kollojenin üçlü sarmal yapı dışında kalan bölümlerini ise diğer proteinazların çoğunluğu (jelatinazlar, stromelizinler, serin proteinazlar, sistein proteinazlar, aspartik proteinazlar) yıkabilmektedir. Kollojen yapısında çapraz bağların artması, yıkılım hızını azaltmaktadır (23).

#### **1.4.2.2. Elastin**

Ekstraselüler matriksin lifsel proteini olan ve bilinen en az çözünen proteinlerden biri olan elastin, özellikle omurgalıların ligamanlarında ve büyük arterlerin çeperlerinde yüksek oranda yer almaktadır. En fazla ligamanlarda, büyük arter çeperlerinde ve setsellerinde bulunan elastin, az miktarda deride, tendonlarda ve gevşek bağ dokularında (akciğer plevrası ve parenkimi, bronşlar) bulunmaktadır. En önemli işlevi bulunduğu dokuya esneklik kazandırmak olan elastin, kollojenin biyomekanik tamamlayıcısı olarak kabul edilmiştir (23).

<b><u>TİP</u></b>	<b><u>POLİPEPTİD ZİNCİRLERİ</u></b>	<b><u>DOKU DAĞILIMI</u></b>
I	$\alpha 1(I), \alpha 2(1)$	Deri, kemik, tendon, ligaman, kornea
II nukleus	$\alpha 1(2)$	Kıkırdak, vitröz sıvı, anulus fibrozus, pulpozu
III	$\alpha 1(3)$	Fetal deri, tendon, aorta, kornea
IV	$\alpha 1(IV), \alpha 2(IV), \alpha 3(IV), \alpha 4(IV), \alpha 5(IV)$	Tüm bazal membranlar
V	$\alpha 1(V), \alpha 2(V)$	Deri, kemik tendon, kıkırdak (yaygın)
VI (yaygın)	$\alpha 1(VI), \alpha 2(VI)$	Deri, kemik, tendon, ligaman, kıkırdak
VII	$\alpha 1(VII)$	Deri, oral mukoza
VIII plasenta	$\alpha 1(VIII), \alpha 2(VIII)$	Descement membranı, embriyo kalbi, Kapilleri
IX	$\alpha 1(IX), \alpha 2(IX), \alpha 3(IX)$	Kıkırdak, vitröz sıvı
X	$\alpha 1(X)$	Hipertrofik ve mineralize kıkırdak
XI	$\alpha 1(XI), \alpha 2(XI), \alpha 3(XI)$	Kıkırdak
XII bağ dokular	$\alpha 1(XII)$	Tendon, ligaman gibi kollojen I içeren
XIII	$\alpha 1(XIII)$	Birçok dokuda yaygın
XIV	?	kollojen I içeren dokular
XV	?	Birçok dokuda yaygın
XVI	?	Birçok dokuda yaygın
XVII	?	Deri hemidesmozomları
XVIII	?	Birçok doku (karaciğer, böbrek)
XIX	?	Rabdomiyosarkom hücreleri

**Tablo.1.4.2.1.** Genetik olarak tanımlanmış kollojen tipleri (23)

Elastinin amino asid bileşiminin %90 kadarını apolar yan zincirler içeren amino asidler oluşturmaktadır. Glisin %27-31, pirolin ise %11-15 oranında bulunmaktadır.

Elastinin öncülü olan ve yapısında yaklaşık 800 amino asit kalıntısı bulunan tropoelastinin molekül ağırlığı 72kDa kadardır. Hücre dışına salgılanan tropoelastin ve yapısal glikoproteinler arasındaki elektrostik etkileşimler sonucu tropoelastin molekülleri mikrofibril dizilerinin arasında yer almakta ve çapraz kovalent bağlar oluşturarak elastine polimerleşmektedir.

İnterstisyel kollojenaz gibi birçok spesifik olmayan proteazlara karşı dayanıklı olan elastin, elastazlar adı verilen bir grup proteolitik enzim tarafından kolayca hidroliz edilmektedir.

### 1.4.2.3. Fibronektin

Ekstraselüler matriksin temel yapıştırıcı glikoproteinlerinden biri olan fibronektin, aynı zamanda plazmada çözünür formda bulunmaktadır. Her biri 230 kDa olan ve birbirlerine karboksil gruplu uçlarından iki adet disülfid köprüsü ile bağlı iki benzer alt birimden oluşmuştur (23).

Doku kültürlerinde veya jelatin kaplı yüzeylere hücrelerin yapışmasını sağlayan fibronektinin geniş biyolojik aktivite alanı bulunmaktadır: Embriyonik hücreler ile tümör hücrelerinin in vivo ve in vitro olarak göçünü ve profilerasyonunu başlattığı, hücre farklılaşmasını, hücrenin şekli ile hareketini ve hücre iskeletinin organizasyonunu kontrol ettiği gösterilmiştir. Ayrıca, yara iyileşmesi, homeostaz, metastaz ve doku ile organ gelişiminin kontrolünde rol oynamaktadır. Fibrinojen ve kollojenin makrofajlara bağlanması ve fibroblastların fibrin pıhtılarının retraksiyonunun düzenleyicisidir.

### 1.4.2.4. Proteoglikanlar

Hücreler arası madde, lifler ve liflerin içinde yüzdüğü temel madde veya substantia fundamentalisten oluşmaktadır. Substantia fundamentalisin temel bileşenleri olan proteoglikanların polisakkarid zincirlerine glikozaminoglikan adı verilmektedir. Hiyalüronik asid, 4- ve 6- kondrotin sülfatlar, dermetan sülfat (kondrotin sülfat B), heparin ve heparan sülfat ve keratan sülfat olmak üzere altı glikozaminoglikan sınıfı bulunmaktadır. Hiyalüronik asid dışında bütün glikozaminoglikanlar, protein zincirine kovalent olarak bağlanmıştır. Bağlantı bölgesinde –Galaktoz-Ksiloz-Serin bulunmaktadır.

## 1.5. Matriks Metalloproteinazlar (MMPs)

Ekstraselüler matriks (ECM) makro molekülleri, gelişim ve morfogenez esnasında gerekli hücre ortamının oluşturulmasında önemlidir (24-26). ECM yıkılımı, embriyonik gelişim, organ morfogenez, kemik yeniden şekillenmesi, apoptozis, ovulasyon, endometriyal siklus ve yara iyileşmesi gibi normal fizyolojik olaylarda ve artrit, ateroskleroz, anevrizma, nefrit, doku ülserleri ve karaciğer fibrozisi, gastrik ülser, fibrotik akciğer hastalıkları ve kanser gibi patolojik olaylarda önemli yer tutar (24,25,27,28). Matriks metalloproteinazlar (MMPs), fizyolojik pH'da ECM'in bütün



komponentlerini degrade edebilen çinko-bağlı endopeptidazlardır (28,29,31-33). MMP'lerin ekspresyonu sitokinler, büyüme faktörleri, hormonlar ve hücrel transformasyon aracılığıyla düzenlenir. Fizyolojik şartlarda MMP'lerin aktiviteleri transkripsiyon, prekürsör zimojenlerin aktivasyonu, spesifik ECM komponentleriyle etkileşim, spesifik doku inhibitörleri(TIMPs) ve endojen inhibitörler tarafından inhibisyonu seviyelerinde düzenlenir (31,32).

### 1.5.1. Metalloproteinazların Yapısı

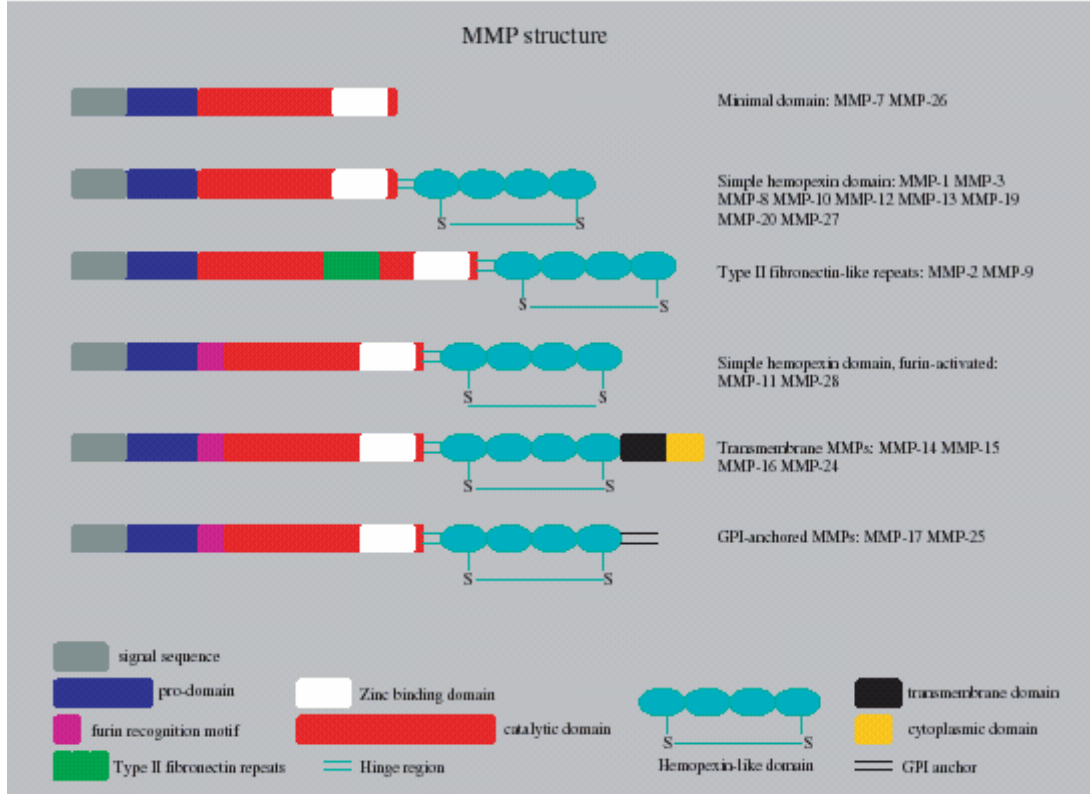
MMP'ler matriksinler olarak da adlandırılırlar. Tüm MMP'ler prepro- enzimler şeklinde sentezlenir ve sıklıkla inaktif pro-MMP'ler olarak sekrete edilirler. MMP'ler genellikle bir pro-domain, bir katalitik bölge ve hemopeksin domain'den meydana gelir (Şekil.1.5.1.1. MMP'lerin yapısı) (29,31,32,34).

Stres ve oksidatif stresi kesen sitokinler, hormonlar ve büyüme faktörleri MMP'leri üç düzeyde regüle ederler:

1. gen ekspresyonunun indüksiyonu,
2. latent proenzimlerin aktivasyonu,
3. MMP'lerin tanımlanan doku inhibitörleri (TIMP-1,-2,-3,-4) tarafından inhibisyonu (6),

Yaklaşık 80 amino asit içeren propeptid bölgesi, PRCGXPD sekansı içerir (36). Bu sekans içersindeki sistein, katalitik bölgedeki  $Zn^{+2}$ ,ye bağlanarak molekülün zimojen formda (pro-MMP) kalmasını sağlar (24,32,34).

Yaklaşık 170 amino asit içeren katalitik bölge,  $Zn^{+2}$  bağlayan HEXGHXXGXXH sekansı ve korunmuş bir metiyonin içerir (24,32). Bu sekansa ait tek bir amino asit bile mutasyona uğrarsa, enzim katalitik olarak inaktif hale gelir. Bunlara ek olarak yapısal bir çinko iyonu ve kalsiyum iyonu içerir. Bunlar enzimatik aktivitenin stabilitesi ve ekspresyonu için gereklidir (24).



**Şekil.1.5.1.1.** MMP'lerin yapısı (36)

Yaklaşık olarak 210 amino asit içeren hemopeksin benzeri bölge elipsoidal disk şeklindedir. Katalitik bölge tüm substratların yıkımında etkili olmasına rağmen, kollojenazlar üçlü heliks yapıdaki intersistiyel kollojeni yıkmak için hemopeksin benzeri bölgeye mutlak gereksinim gösterirler. Bu bölge ayrıca pro-MMP-2'nin hücre yüzeyinde MT1-MMP aracılığıyla aktivasyonu için gereklidir (24).

Prolinden zengin birleştirici peptid, katalitik ve hemopeksin benzer bölgeleri birleştirmektedir. Henüz özel bir fonksiyonu belirlenmemiştir.

MMP'ler hücreden veya plazma membranından salgılanırlar. Substrat spesifitesine, sekans benzerliğine ve domain organizasyonuna göre omurgalı MMP'leri 6 gruba ayrılabilirler.

### 1.5.2. Matriks Metalloproteinazlar Ailesinin Üyeleri

Matriks metalloproteinazlar ailesi altı gruba ayrılırlar. Şimdiye kadar yirmi beş tane MMP tanımlanmıştır (Şekil.1.5.2.a.).

### 1.5.2.1. Kollojenazlar

İnterstisyel kollojenaz (kollojenaz-1 veya MMP-1), nötrofil kollojenaz (kollojenaz-2 veya MMP-8), kollojenaz-3 (MMP-13) ve MMP-18 (Xenopus) bu gruptadır. MMP-18'in insanda homoloğu olan bir enzim tanımlanmamıştır. Bu enzimlerin anahtar özellikleri interstisyel kollojenaz I, II, III'ü N-terminalden üçüncü-dördüncü spesifik bölgede parçalayabilirler (26).

Kollojenaz-1 (MMP-1): Keratinositler, fibroblastlar, makrofajlar, kondrositler ve düz kas hücreleri tarafından sentezlenmektedir. Bu enzim tercihen tip III kollojen üzerinde etkilidir.

Kollojenaz-2 (MMP-8): Sadece polimorfonükleer lökositler tarafından sentezlenmektedir. Diğer kollojenazlardan farklı olarak intraselüler spesifik granüllerde depolanıp, inflamatuvar durumlarda salınırlar. Tip I kollojen degradasyonunda aktiftirler.

Kollojenaz-3 (MMP-13): Bu enzimin meme kanserinde, osteoartrit, romatoid artrit gibi dejeneratif eklem hastalıklarında sentezlendiği bulunmuştur. Özellikle tip II kollojen üzerinde etkilidir.

### 1.5.2.2. Jeletinazlar

Tip IV kollojenazlar olarak da adlandırılan bu grupta jeletinaz A (MMP-2, 72 kDa), jeletinaz B (MMP-9, 92 kDa) olmak üzere iki enzim bulunur (26). Bu enzimler denatüre kollojenler, fibronektin, elastin ve jelatinleri parçalayabilirler. Bu enzimler primer yapıları ve substrat spesifiteleri açısından birbirlerine benzerler fakat farklı genler tarafından kodlanırlar ve regülasyonları farklılık gösterir. Bu enzimler katalitik domain'de üç kez tekrar eden tip II fibronektin benzeri bölgeler içerirler. Bu bölgeler jelatin, kollojenler ve laminine bağlanır. MMP-2 tip II ve III kollojenleri parçalayabilirken MMP-9 parçalayamaz.

### 1.5.2.3. Stromelizinler

Stromelizin-1 (MMP-3) ve stromelizin-2 (MMP-10) benzer substrat spesifitesine sahiptir, fakat genel olarak MMP-3 daha yüksek proteolitik hıza sahiptir. Kuvvetli proteoglikanazlardır. Fibronektin, laminin, tenasin, kollojen tip IV, IX, X ve XI gibi

<b>Enzim</b>	<b>MMP</b>	<b>İnsan Kromozomu</b>
<b>Kollojenazlar</b>		
İnterstisyel kollojenaz; kollojenaz 1	MMP-1	11q22-q23
Nötrofil kollojenaz; kollojenaz 2	MMP-8	11q21-q22
Kollojenaz 3	MMP-13	11q22.3
Kollojenaz 4 (xenopus)	MMP-18	NA
<b>Jelatinazlar</b>		
Jelatinaz A	MMP-2	16q13
Jelatinaz B	MMP-9	20q11.2-q13.1
<b>Stromelizinler</b>		
Stromelizin 1	MMP-3	11q23
Stromelizin 2	MMP-10	11q22.3-q23
Stromelizin 3	MMMP-11	22q11.2
<b>Matrilizinler</b>		
Matrilizin 1	MMP-7	11q21-q22
Matrilizin 2	MMP-26	11p15
<b>Membran tip MMP'ler</b>		
MT1-MMP	MMP-14	14q11-q12
MT2-MMP	MMP-15	15q13-q21
MT3-MMP	MMP-16	8q21
MT5-MMP	MMP-24	20q11.2
MT4-MMP	MMP-17	12q24.3
MT6-MMP	MMP-25	16p13.3
<b>Diğerleri</b>		
Makrofaj elastaz	MMP-12	11q22.2-q22.3
İsimsiz	MMP-19	12q14
Enamelizin	MMP-20	11q22.3
XMMP (xenopus)	MMP-21	ND
CA-MMP	MMP-23	1p36.3
CMMP (gallus)	MMP-27	11q24
Epilizin	MMP-28	17q21.1

**Tablo.1.5.2.a.** MMP ailesinin üyeleri (26)

ekstraselüler matriks komponentlerini degrade ederler (26). ECM komponentlerini degrade etmesinin yanında, MMP-3 pro-MMP'lerin bir kısmını aktifler. MMP-11, stromelizin-3 olarak adlandırılır. Sekans ve substrat spesifitesi farklı olduğu için "diğer MMP" olarak gruplandırılır.

#### **1.5.2.4. Matrilizin**

Matrilizinler bir hemopeksin domain eksikliğiyle karakterizedirler. Matrilizin-1 (MMP-7) ve matrilizin-2 (MMP-26), endometaz olarak adlandırılır. ECM komponentlerinin yanında, MMP-7 pro- $\alpha$ -defensin, Fas-ligand, pro-tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$  ve E-cadherin gibi hücre yüzey moleküllerini işler. Matrilizin-2 (MMP-26) de ECM moleküllerinin bir kısmını parçalar.

#### **1.5.2.5. Membran Tip Metalloproteinazlar (MT-MMPs)**

Bu grupta bu güne kadar MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT4-MMP, MT5-MMP ve MT6-MMP olmak üzere tanımlanan altı üyesi vardır. Bunlardan dört tanesi tip I transmembran proteinleri (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-24), iki tanesi de glikozilfosfatidilinozitol (GPI) proteinlerdir. MT4-MMP hariç hepsi pro-MMP'yi aktive edebilir. Bu enzimler membrana bağlıdır. ECM moleküllerinin bir kısmını da yıkabilirler. MMT1-MMP tip I, II ve III kollojenler üzerine kollojenolitik aktiviteye sahiptir. MT1-MMP anjiyogenezde de önemli bir rol oynar. MT5-MMP beyine spesifiktir ve başlıca serebellumda ekspere edilir. MT5-MMP (MMP-25) hemen hemen periferel kan lökositlerinde, anaplastik astrostomalarda ve glioblastomalarda ekspere edilir (26).

#### **1.5.2.6. Diğer MMP'ler**

Yedi tane MMP yukarıdaki kategorilerde sınıflandırılmaz. Metalloelastaz (MMP-12) başlıca makrofajlarda eksprese edilir ve makrofaj migrasyonu için gereklidir. Elastinden başka birkaç proteini daha sindirir.

MMP-19, karaciğerden cDNA klonlanmasıyla tanımlandı.

Enamalizin (MMP-20), amelogenini parçalar, primer olarak diş minesinde lokalizedir.

MMP-22 ilk olarak tavuk fibroblastlarından klonlanmıştır.

MMP-23, sistein sıralı MMP olarak ta adlandırılır. Başlıca reproduktif dokulardan eksprese edilir.

MMP ailesine son eklenen epilizin veya MMP-28'dir. Başlıca keratinositlerden eksprese edilir. Sağlam ve hasarlı derilerde ekspresyon düzeninin doku homeostazı ve yara iyileşmesi şeklinde olduğu düşünülüyor

### 1.5.3. Pro-MMP Aktivasyonu

MMP'ler zimojenler olarak sentezlenir ve salınırlar, proteolitik aktivasyonları için bir N-terminal propeptidin parçalanması gerekir (37).

Proenzimin aktivasyonu önemli bir kontrol basamağıdır. Aktivasyonun gerçekleşebilmesi için propeptid domaindeki sisteinin sülfidril yan grubu ile katalitik domainde bulunan  $Zn^{+2}$ 'nin etkileşiminin bozulması gerekir. Bu etkileşimin bozulması enzime proteaz aktivitesi kazandırır (31).

MMP'ler proteinazlar veya tiol modifiye edici ajanlar (4-amino fenil merkürük asetat, HgCl, N-etilmalemid) okside glutasyon, sodyumdodesil sülfat (SDS), katotropik ajanlar ve reaktif oksijenler gibi kimyasal ajanlar tarafından aktive edilebilirler. Düşük pH ve sıcaklıkta aktivasyona yol açabilir.

En önemli in vivo proteolitik aktivatör plazmin olarak görülmekte, bunun yanında serin proteazlar tarafından da aktive edilebilirler. Birçok oksidant özellikle reaktif oksijen türleri proteolitik bir yolla MMP'leri aktive edebilirler (37).

Plazminin, proMMP-1, proMMP-7, proMMP-9, proMMP-10 ve proMMP-13'ü aktive ettiği yayınlanmıştır.

### 1.5.4. İntraselüler Aktivasyon

Çoğu MMP'ler hücrelerden sekrete edilir ve ekstraselüler ortamda aktive edilirler. Fakat istisna olarak Pei ve Weiss proMMP-11 (stromelizin-3)'in intraselüler olarak furin tarafından aktive edildiği gösterdiler (26). ProMMP-11 propeptidin sonunda C-terminalde furin tanıma sekansı KX(R/K)R'ye sahiptir.

### 1.5.5. Endojen MMP İnhibitörleri

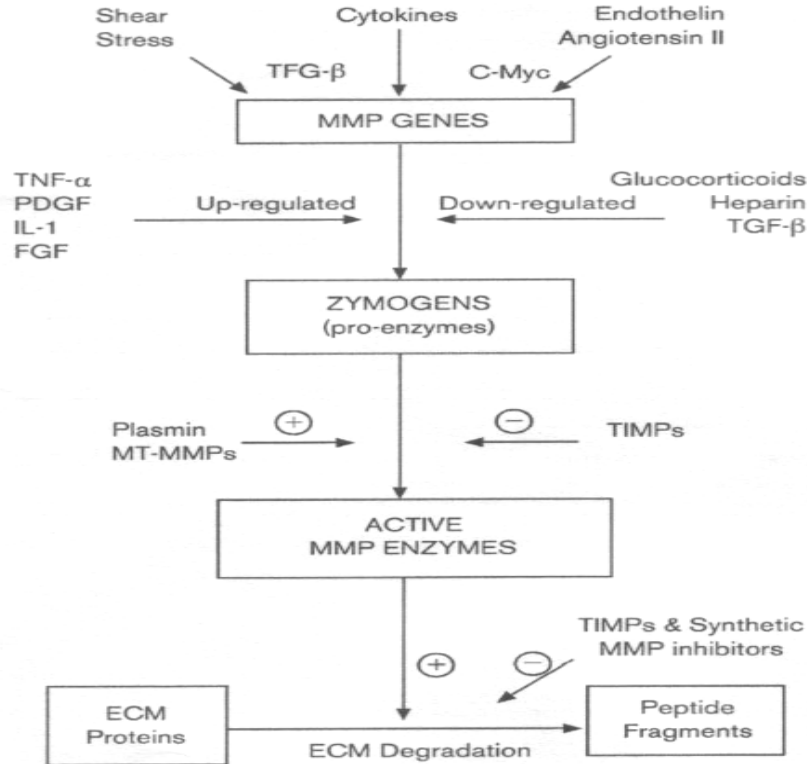
Doku İnhibitör Matriks Metalloproteinazlar (TIMPs), normal konnektif doku metabolizmasının regülasyonu için gerekli, MMP'lere 1:1 stokiometrik olarak bağlanan, spesifik inhibitörlerinin bir ailesidir (28,32,38). Omurgalılarda dört TIMP (TIMP-1, -2, -3, -4) tanımlanmıştır ve ekspresyonları gelişim ve doku remodelling'i sırasında düzenlenir. Patolojik durumlar dengesiz MMP aktiviteleriyle ilgilidir. TIMP'ler doğrudan MMP aktivitesinin seviyesini etkilediği için TIMP düzeylerindeki değişiklikler de önemlidir.

TIMP'ler (21-29 kDa) sırasıyla N- ve C- terminallerinde  $\approx 125-65$  amino asit ve üç tane korunan disülfid bağı içerir. N-terminal domaini ayrı bir birim gibi katlanır ve MMP'leri inhibe etme yeteneğindedir (Şekil.1.5.5.1).

TIMP-1 mezenşimal hücreler ve makrofajları içeren çoğu konnektif doku tipleri tarafından sentezlenirler (31). Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda TIMP-1'in MT1-MMP inhibisyonunu gerçekleştirememesi hariç bütün MMP'leri inhibe etmiştir.

Plazmadaki  $\alpha$ -makroglobinler gibi proteinler de genel endopeptidaz inhibitörleridir (24,27,31). Çalışmalarda MMP-1,  $\alpha_2$ -makroglobin ile TIMP-1'den kolayca reaksiyona girdiği gösterilmiştir.

Bir serin proteazı olan doku faktör pathway inhibitör-2, MMP'leri inhibe eden diğer bir inhibitördür. Prokollojen C-terminal proteinaz enhancer proteinin C-terminal fragmenti MMP-2'yi inhibe eder. Membran bağlı  $\beta$ -amiloid prekürsör proteininin salgılanan formunun da MMP-2'yi inhibe ettiği yayınlanmıştır. MMP-2 glioma hücreleri üzerine anti-invaziv etkisi olan akrep toksini klorotoksin tarafından inhibe edilir. Bunlara rağmen bu proteinler tarafından MMP'lerin inhibisyon mekanizmaları bilinmemektedir.



Şekil.1.5.5.1. MMP'lerin aktivasyonu ve inhibisyonu (31)

### 1.5.5.1. TIMP'lerin Biyolojik Fonksiyonları

MMP inhibe edici aktivitelerinin yanında TIMP'lerin farklı biyolojik özellikleri de vardır. TIMP-1 ve TIMP-2 eritroid potansiyeli artırıcı aktiviteye ve hücre büyüme-ilerleme aktivitelerine sahiptir.

TIMP-1, -2, ve -3'ün fazla ekspresyonu tümör büyümesini azaltır. TIMP-2, basic fibroblast growth faktör aracılığıyla endotelial hücre büyümesini inhibe eder.

TIMP-3 bazı tümör hücreleri için proapoptik aktiviteye sahiptir. TIMP-1 ve TIMP-2 antiapoptik aktiviteye sahiptir.

### 1.5.6. Matriks Metalloproteinaz-9 (MMP-9)

MMP ailesinin üyelerinden birisi olan MMP-9 (EC 3.4.24.35), jelaenaz B olarak da adlandırılır. Çinko-bağımlı, kalsiyuma ihtiyaç duyan metalloproteinazdır (39). Karaciğerde majör olarak kupffer hücreleri tarafından salgılanırlar (16). Jelatinlere ilaveten tip IV ve V kollojenleri degrade edebilirler. MMP-9'un biyolojik fonksiyonları fetal membran rüptürü, yara iyileşmesi bunun yanında patolojik olarak



romatoid artrit, ateroskleroz, kardiyomiyopati, abdominal aortik anevrizma (39) ve karaciğer fibrozunda (40) rol oynarlar. Çoğu MMP'ler gibi MMP-9 latent zimojenler olarak salgılanır.

Yapısal olarak MMP-9 propeptid, katalitik ve karboksi terminal hemopeksin bölge içerir. Propeptid enzimi inaktif halde tutar (proMMP-9, 92 kDa). ProMMP-9'un aktif MMP-9 (83 kDa)'a aktivasyonu propeptid bölgenin, enzimin konformasyonel değişikliğine neden olan proteolitik parçalanmasıdır.

Sitokinlerin (IL-1, -2, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  ve transforming factor beta) MMP-9 aktivasyonunu arttırdığı biliniyor (39).

## 2.MATERYAL VE METOD

### 2.1. Denekler

Bu çalışmada 38 adet, 3-3,5 aylık 280-320 g ağırlığında erkek Sprague-Dawley ratlar 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 (12saat/12saat ışık/karanlık siklusu, 25-28 °C ortam ısısı).

Ratlar aşağıdaki gibi 4 gruba ayrıldı;

1. Kontrol grubu (n=6): Bu gruba herhangi bir uygulama yapılmadı. yiyebildikleri kadar yem ve içebildikleri kadar su içmelerine izin verildi.

2. Alkol Grubu (n=7): 30 gün boyunca intra gastrik (I.g) yöntemle etanol (EtOH) verilerek alkolün kronik etkilerine maruz bırakıldı. EtOH distile suda %80 (v/v) dilüe edilerek 1 ml/gün verildi. EtOH verilmeden önce ratların 10-12 saat açlığı sağlandı ve EtOH verildikten 1 saat sonra yemleri verildi.

3. Vitamin E Grubu (n=7): 1 ay (30 gün) boyunca I.g yöntemle 100 mg/kg/gün vitamin E verildi. Vitamin E, serum fizyolojik (%0,09 izotonik çözelti) ile birlikte total 1 ml. olarak verildi. E vitamini verilmeden önce ratların 10-12 saat açlığı sağlandı vitamin E verildikten bir saat sonra yemleri verildi. Hayvanlara sınırsız yeme ve içme izni verildi.

4. Vitamin E + EtOH Grubu (n=5): 30 gün boyunca I.g yöntemle 100 mg/kg/gün vitamin E verildikten 2 saat sonra %80 (v/v) EtOH'den 1 ml verildi. EtOH verildikten bir saat sonra yemleri verildi.

Tüm gruplardan 30. günün sonunda doku örnekleri alındı. Operasyon öncesi ratlar yaklaşık 12 saat aç bırakıldılar. Alfamin intraperitoneal (I.p) olarak uygulandı. Ratlar sırtüstü yatırılarak operasyon masasına dört ekstremitelerinden tespit edildiler. Ratlar dekapite edildikten sonra karaciğerleri alınıp buz soğukluğundaki serum fizyolojik ile yıkandı ve analiz saatine kadar -20 °C'de saklandı. Rat karaciğerleri pH'sı 7.4 olan fosfat tamponu kullanılarak (1 gr doku + 9 ml tampon) Ultra Turrax homojenizatör (IKA T18 Basic, Wilmigton, NC) ile homojenize edildi ve UP 50 H ultraschallprozessor (TUV) (Berlin) model sonikatör kullanılarak sonike edildi.

Homojenatlar 5000 rpm (+4 °C)'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar numune olarak kabul edildi. Süpernatantlardan MDA, SOD, GSH, Karbonil, SH ve proMMP düzeyleri çalışıldı.

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

Doku pro-matriks metalloproteinaz-9 düzeyleri Trinity (Biotech Captia Reader) model ELISA cihazında rat spesifik R&D System Inc. (Minneapolis, USA) kiti kullanılarak ölçüldü.

Tüm spektrofotometrik ölçümlerde, Shimadzu UV-1601 spektrofotometresi kullanıldı.

Tüm kimyasal maddeler SIGMA Chemical Co. (St. Louis, USA)'dan temin edildi.

E vitamini olarak Evigen amp ( Aksu Farma, İST.) kullanıldı.

## 2.2. Biyokimyasal Analiz

### 1.2.1. Karaciğer MDA Düzeylerinin Ölçümü

Karaciğer MDA düzeyleri Ohkawa ve ark. yöntemine göre ölçüldü (41).

#### 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:

Süpernatant 0,5'er ml (500 µl) alınarak her birinin 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 Bütonol: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. MDA düzeyleri dokuda 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

### 2.2.2. Karaciğer Protein Karbonil Grupları Tayini

Karaciğer protein karbonil grupları Levine ve ark. modifiye spektrofotometrik metoduna göre çalışıldı (42).

#### 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:**

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.

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

**2.2.3. Karaciğer -SH Grupları Tayini**

Karaciğer -SH grupları Koster ve ark. spektrofotometrik metoduna göre belirlendi (43).

**Prensip:**

Protein SH grupları, DTNB tarafından indirgenir ve disülfid bağı oluşturarak bir kromofor (5-merkapt-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 absorpsansı 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.

**2.2.4. Karaciğer GSH Düzeylerinin Ölçümü**

Karaciğer GSH düzeyleri spektrofotometrik olarak Beutler yöntemi ile belirlendi (44).

**Prensip:**

Dokudaki GSH'ın SH grupları bir disülfid kromojeni olan 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoikasit (DTNB)'i indirgemesi ile sarı renkli bir bileşik oluşur. Bu bileşiğin 412 nm dalga boyunda ölçülen absorpsansı 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:**

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  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  çözeltisi ve 0,5 ml 40 mg/dl DTNB (%1'lik sitrat içerisinde çözülen) ile

muamele edilerek oluşan 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.

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

$C_N$ : Numunenin Konsantrasyonu

$C_S$ : Standardın Konsantrasyonu

$A_N$ : Numunenin Absorbansı

$A_S$ : Standardın Absorbansı

### 2.2.5. Karaciğer SOD Aktivitelerinin Ölçümü

Karaciğer SOD aktiviteleri Winterbourn ve ark. spektrofotometrik metoduna göre çalışıldı (45).

#### Prensip:

Yöntemin esasını oksijen ve fotoredüksiyonla indüklenen 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:

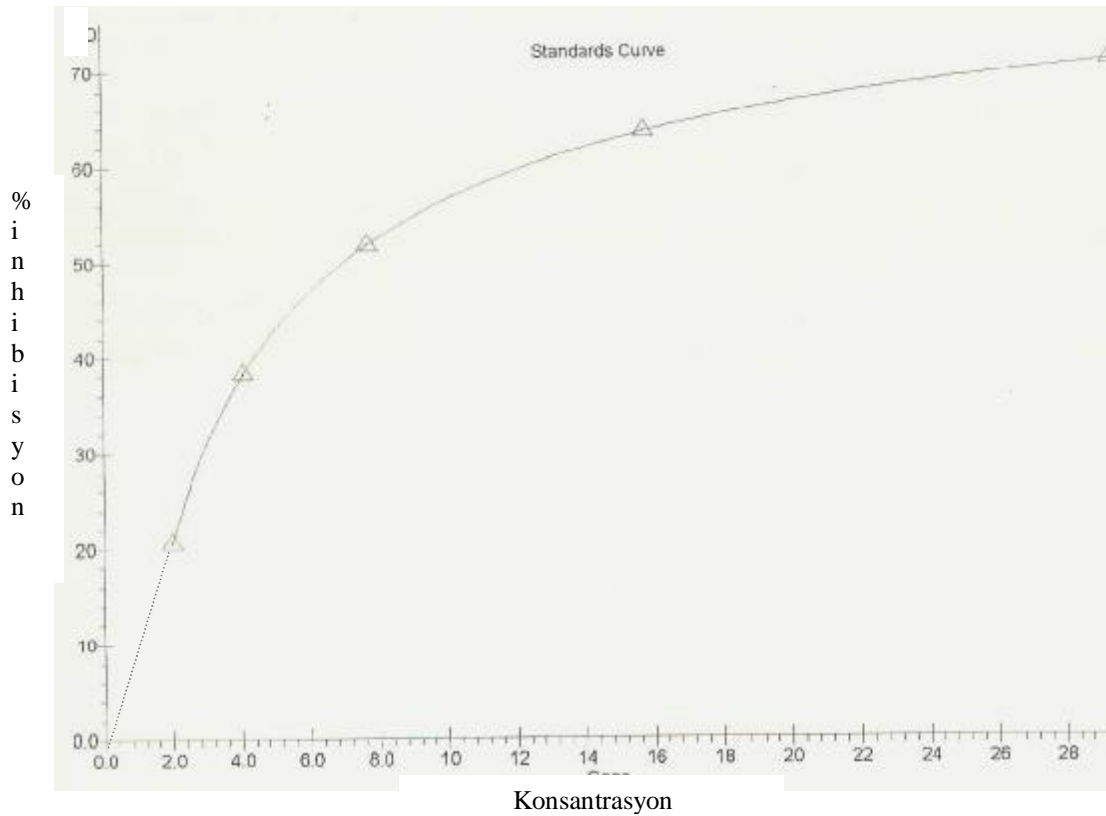
Süpernatanttan 50 µl alınıp üzerine 200 µl EDTA+NaCN eklendi. Ardından 100 µl NBT, 2,6 ml fosfat tamponu ve 50 µl riboflavin eklendikten sonra 15 dakika kutu içinde florasan ışığına maruz bırakıldı. Oluşan rengin absorbansı Shimadzu UV-

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

### 2.2.6. Doku Matriks Metalloproteinaz Konsantrasyonlarının Ölçülmesi

ProMMP-9, kantitatif sandwich enzim immunoasay tekniği ile ölçüldü. Ölçümler 450 nm'de yapıldı.



**Reaktifler**

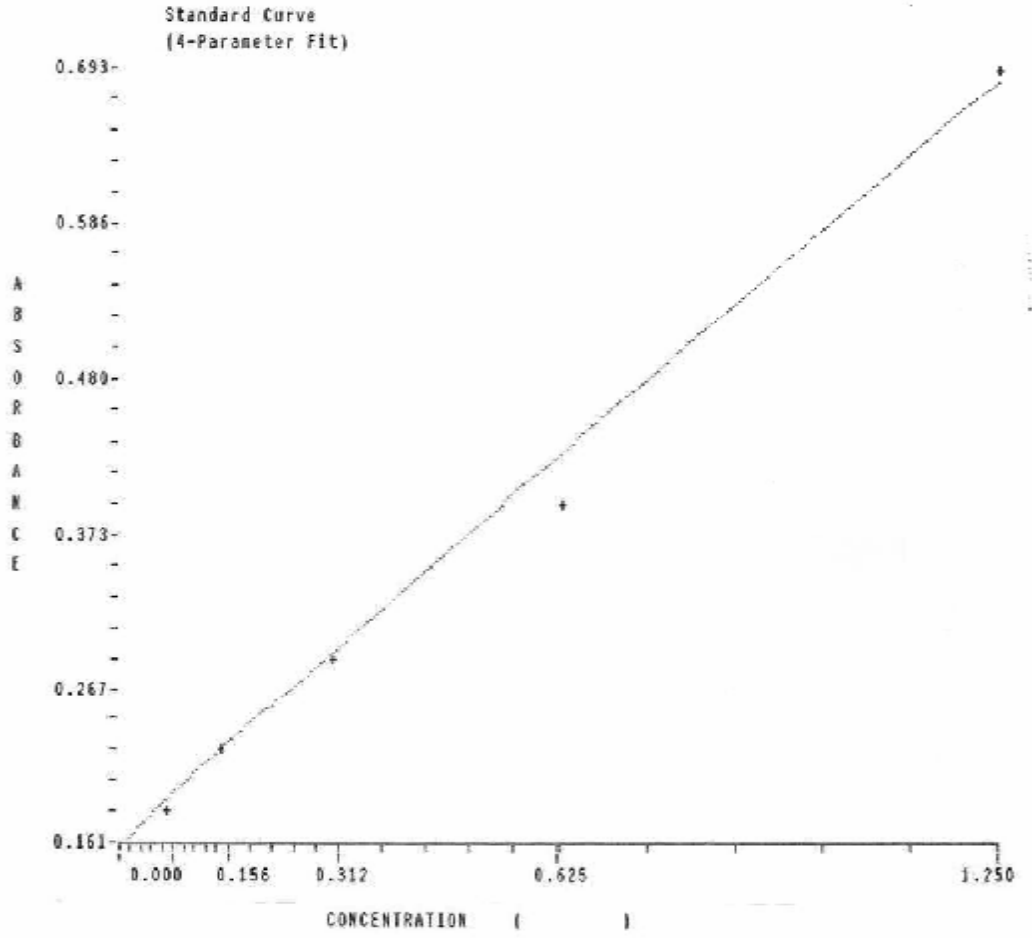
- Rat pro-MMP-9 Microplate- Mouse pro-MMP-9'a spesifik monoklonal antibody ile kaplı 96'lık microplate.
- Rat pro-MMP Conjugate
- Rat pro-MMP Standard
- Rat pro-MMP Control
- Assay Diluent RD1-34
- Calibratör Diluent RD5-10
- Wash Buffer Concentrate
- Color Reagent A
- Color Reagent B
- Stop Solution
- Plate Covers

**Örnek hazırlanması**

Numuneler 50 kat dilue edildi. Numunelerden 10µl alındı üzerine +490µl Calibratör Diluent RD5-10 eklendi.

**Çalışma prosedürü**

1. Bütün numuneler oda sıcaklığına alındı.
2. Her kuyucuğa 50 µl Assay Diluent eklendi.
3. Her kuyucuğu ortasına 50 µl standart, kontrol ve numuneler eklendi. Plate kapatılarak oda sıcaklığında shaker üzerinde 2 saat inkübe edildi.
4. Her kuyucuk aspire edildi ve 4 kere yıkandı.
5. Her kuyucuğa 100 µl Conjugate eklendi ve oda sıcaklığında shaker üzerinde 2 saat inkübe edildi.
6. Her kuyucuk aspire edildi ve 4 kere yıkandı.
7. Her kuyucuğa 100 µl Substrate Solution eklendi. Oda sıcaklığında ışıktan korunarak 30 dakika inkübe edildi.
8. Her kuyucuğa 50 µl Stop Solution eklendi.
9. 450 nm optik dansite de okutuldu.



Şekil 2.2.5.1. ProMMP-9 standart grafiği

### 2.3. İstatistiksel Analiz

Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma (SD) 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.

### 3. BULGULAR

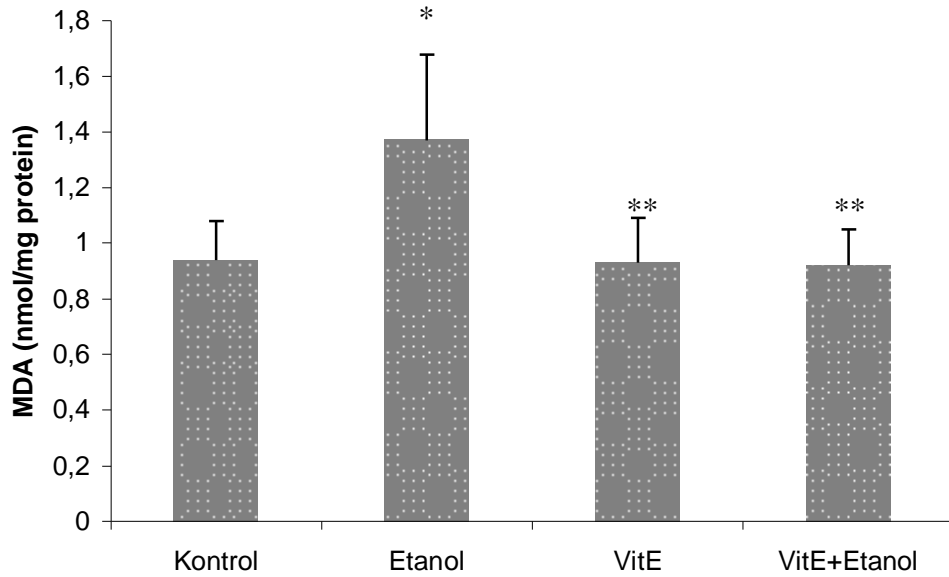
#### 3.1. Karaciğer MDA Düzeyleri

MDA değerleri tablo.3.1.1 ve şekil.3.1.1’de görüldüğü gibi etanol alan grupta kontrol ile kıyaslandığında yükselmiş bulundu ( $p<0.05$ ). VitE grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. Etanol öncesi VitE verilmesi MDA düzeyini etanol alan grup ile kıyaslandığında anlamlı olarak düşürmüştür ( $p<0.05$ ).

**Tablo 3.1.1.** Karaciğer MDA düzeyleri

Gruplar	MDA (nmol/mg protein) (ortalama±standart sapma)
Kontrol	0.94±0.14
Etanol	1.37±0.31
VitE	0.93±0.16
VitE+Etanol	0.92±0.13

**Karaciğer MDA düzeyleri**



**Şekil 3.1.1.** Karaciğer MDA düzeylerinin karşılaştırılması.

\*  $p<0.05$  kontrol grubu ile kıyaslandığında

\*\*  $p<0.05$  Etanol grubu ile kıyaslandığında

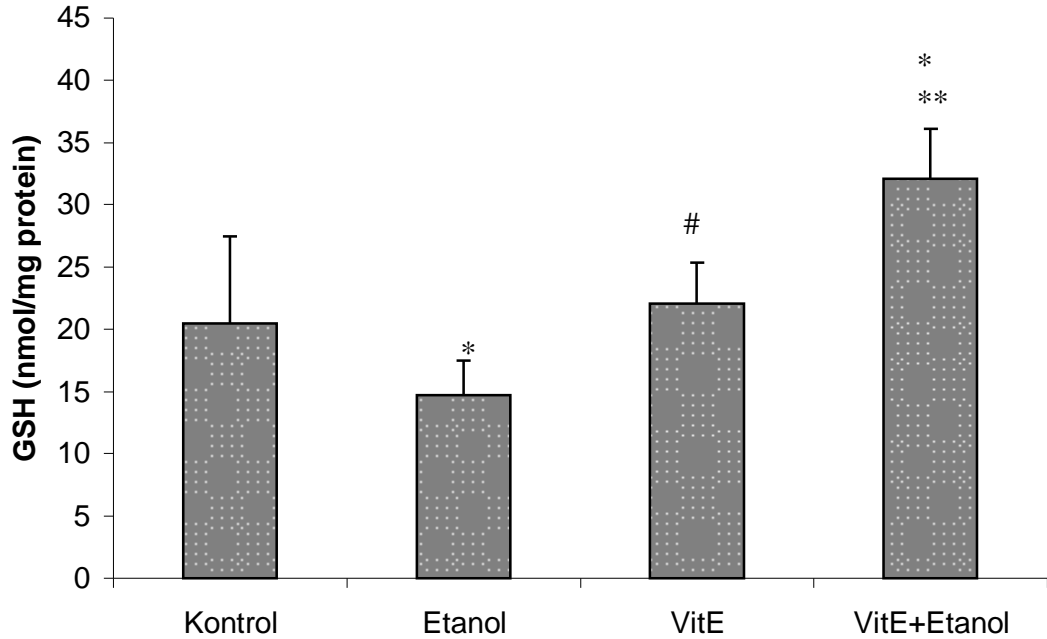
### 3.2. Karaciğer GSH Düzeyleri

GSH düzeyleri, tablo.3.2.1 ve şekil.3.2.1'de görüldüğü gibi etanol alan grupta, kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı olarak azalmış bulundu ( $p<0.05$ ). E vitamini verilmesi GSH düzeylerini tek başına etkilemez iken etanol öncesi verilmesi etanolün azalttığı GSH'yı anlamlı olarak artırmıştır ( $p<0.001$ ).

**Tablo.3.2.1.** Karaciğer GSH düzeyleri

Gruplar	GSH (nmol/mg protein) (ortalama±standart sapma)
Kontrol	20.46±6.98
Etanol	14.75±2.77
VitE	22.05±3.30
VitE+Etanol	32.10±3.99

**Karaciğer GSH düzeyleri**



**Şekil 3.2.1.** Karaciğer GSH düzeylerinin karşılaştırılması.

\*  $p<0.05$  kontrol grubu ile kıyaslandığında

\*\*  $p<0.05$  Etanol grubu ile kıyaslandığında

#  $p<0.001$  Etanol grubu ile kıyaslandığında

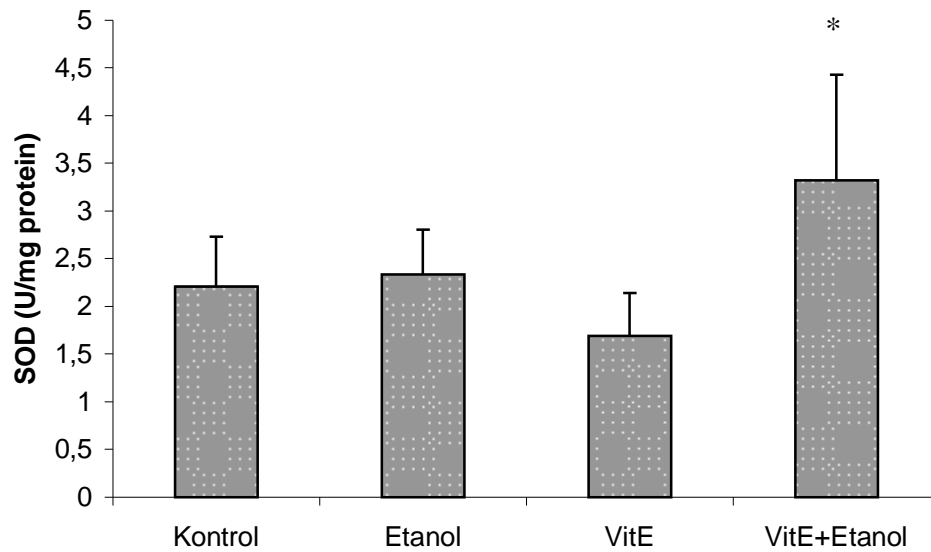
### 3.3. Karaciğer SOD Aktiviteleri

Etanol verilmesi tablo.3.3.1 ve şekil.3.3.1’de görüldüğü gibi SOD aktivitelerinde anlamlı bir değişikliğe yol açmamıştır. Etanol ile E vitamini verilmesi SOD düzeyini artırsa da istatistiksel olarak kontrol grubu ile bir fark yaratmamıştır.

**Tablo 3.3.1.** Karaciğer SOD aktiviteleri

Gruplar	SOD (U/mg protein) (ortalama±standart sapma)
Kontrol	2,21±0,52
Etanol	2,33±0,52
VitE	1,62±0,45
VitE+Etanol	3,32±1,11

### Karaciğer SOD Aktiviteleri



**Şekil 3.3.1.** Karaciğer SOD aktivitelerinin karşılaştırılması.

\*  $p < 0.05$  VitE grubu ile kıyaslandığında

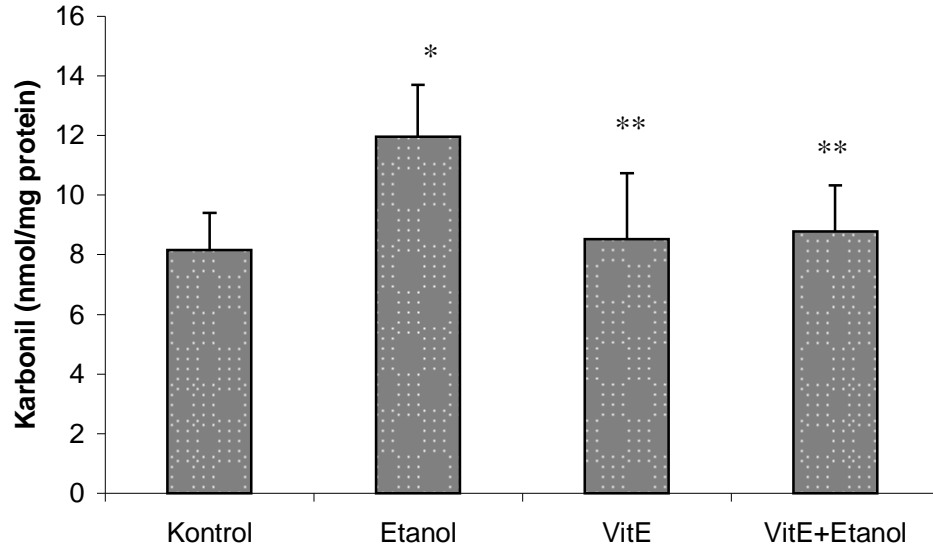
### 3.4. Karaciğer Protein Karbonil Düzeyleri

Karbonil düzeyleri, tablo.3.4.1 ve şekil.3.4.1’de görüldüğü gibi etanol alan grupta, kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı olarak artmıştır ( $p<0.05$ ). E vitamini verilmesi Karbonil düzeylerini tek başına etkilemez iken etanol öncesi verilmesi etanolün arttırdığı Karbonili anlamlı olarak azaltmıştır ( $p<0.05$ ).

**Tablo 3.4.1.** Karaciğer Karbonil düzeyleri

Gruplar	Karbonil (nmol/mg protein) (ortalama±standart sapma)
Kontrol	8.16±1.23
Etanol	11.95±1.74
VitE	8.51±2.22
VitE+Etanol	8.77±1.56

### Karaciğer Karbonil düzeyleri



**Şekil 3.4.2.** Karaciğer Karbonil düzeylerinin karşılaştırılması.

\*  $p<0.05$  Kontrol grubu ile kıyaslandığında

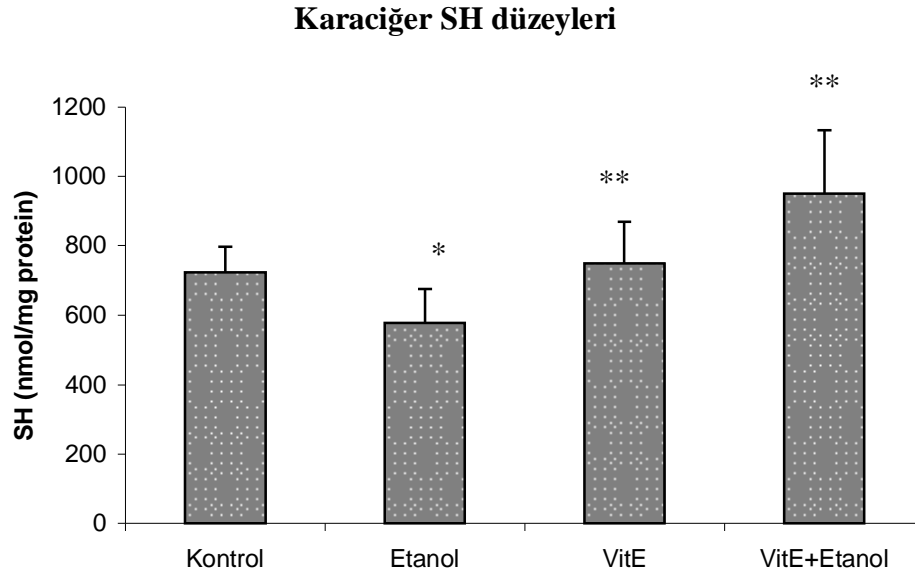
\*\*  $p<0.05$  Etanol grubu ile kıyaslandığında

### 3.5. Karaciğer SH düzeyleri

SH düzeyleri, tablo.3.5.1 ve şekil.3.5.1'de görüldüğü gibi etanol alan grupta, kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı olarak azalmış bulundu ( $p<0.01$ ). E vitamini verilen grup ile etanol öncesi E vitamini verilen grupta SH düzeyleri, etanol alan grup ile kıyaslandığında anlamlı olarak artmış bulundu ( $p<0.01$ ). Kontrol grubu ile etanol öncesi E vitamini verilen grup kıyaslandığında ise SH düzeylerinde istatistiksel anlamlılık bulunamamıştır.

**Tablo 3.5.1.** Karaciğer SH düzeyleri

Gruplar	SH (nmol/mg protein) (ortalama±standart sapma)
Kontrol	724±23
Etanol	577±98
VitE	750±119
VitE+Etanol	950±183



**Şekil 3.5.1.** Karaciğer SH düzeylerinin karşılaştırılması.

\*  $p<0.01$  Kontrol grubu ile kıyaslandığında

\*\*  $p<0.01$  Etanol grubu ile kıyaslandığında

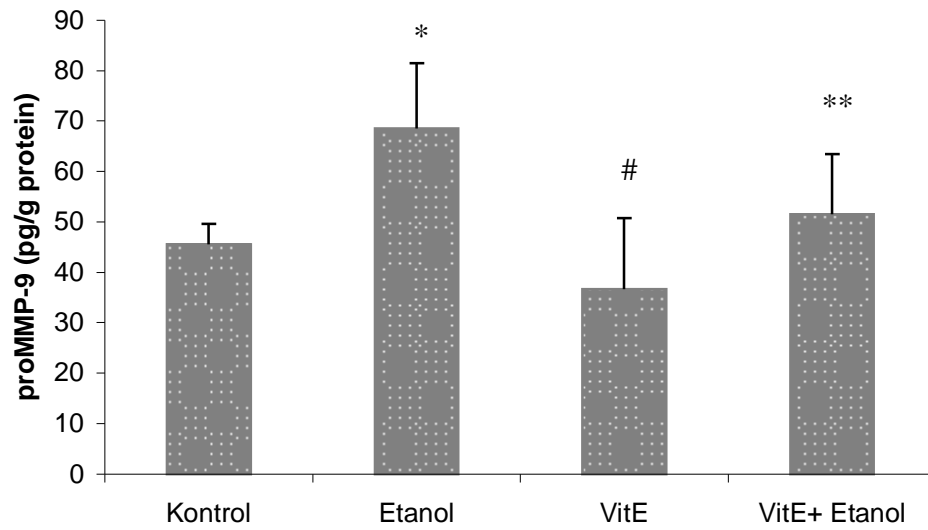
### 3.6. Karaciğer proMMP-9 Düzeyleri

ProMMP-9 düzeyleri, tablo.3.6.1 ve şekil.3.6.1’de görüldüğü gibi etanol alan grupta, kontrol ile kıyaslandığında anlamlı olarak artmış bulundu ( $p<0.01$ ). E vitamini verilmesi proMMP-9 düzeylerini tek başına etkilemez iken etanol öncesi verilmesi, etanolün arttırdığı proMMP-9’u anlamlı olarak azaltmıştır ( $p<0.05$ ).

**Tablo 3.6.1.** Karaciğer proMMP-9 düzeyleri

Gruplar	proMMP-9 (pg/g protein) (ortalama±standart sapma)
Kontrol	45.55±4
Etanol	68.48±13
VitE	36.72±14
VitE+Etanol	51.50±12

### Karaciğer proMMP-9 düzeyleri



**Şekil 3.6.1.** Karaciğer proMMP-9 düzeylerinin karşılaştırılması.

- \*  $p<0.01$  Kontrol grubu ile kıyaslandığında
- \*\*  $p<0.05$  Etanol grubu ile kıyaslandığında
- #  $p<0.01$  Etanol grubu ile kıyaslandığında



#### 4. TARTIŞMA

Biyomembranlarda PUFA'ların peroksidasyonu sıklıkla ROS'a maruz kalması ile oluşur ve hücre fonksiyon değişimi veya hücre ölümüne yol açabilir. Lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden olan MDA oksidan hasarı değerlendirmede sıklıkla kullanılan bir markıdır.

Yapmış olduğumuz çalışmada, etanolün karaciğer MDA düzeylerinde artışa yol açtığını bulduk. Alkolün hem kimyasal hem de fiziksel olarak hücre membran hasarına yol açtığı bilinmektedir. Primer hepatosit rat kültürlerinde etanol metabolizmasının serbest MDA düzeylerini dolayısıyla lipid peroksidasyonunu arttırdığı gözlenmiştir. Ma ve ark. 4-hidroksinonenal gibi lipid peroksidasyon ürünlerinin fibrozisi sitümüle ettiğini göstermişlerdir (46).

Rajagopal ve ark. yaptıkları çalışmada etanol verilen ratların karaciğerinde TBARS ve hidroperoksidaz düzeylerinin anlamlı yükseldiğini göstermişlerdir (47). Dupont ve ark. ise oksidatif stres belirteçleri ve CYP2E1 aktivitesi arasındaki ilişkiyi araştırdıkları 40 alkolik hastada, oksidize plazma proteinleri , lipid peroksidleri ve anti-MDA antikörlerinin kontrol grubuna göre yüksek olduğunu bulmuşlardır (48). Bu çalışmalar bizim çalışmamızda elde ettiğimiz bulguları desteklemektedir.

GSH, karaciğerde genetik bilgiye ihtiyaç duymadan sentezlenebilen bir tripeptiddir. Glutamik asid, sistein ve glisin aminoasidlerinden meydana gelmiştir. Çok önemli bir antioksidan olan GSH, serbest radikaller ve peroksidlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Bunun dışında, proteinlerdeki -SH gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı muhafaza eder. Böylece, fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller.

GSH vücudumuzda antioksidan defans sürecini düzenlemede merkezi bir rol oynayan protein olmayan tioldür. Redoks ve detoksifikasyon reaksiyonlarıyla normal hücre yapı ve fonksiyonunu koruyucu etkisi gösterilmiştir. Bu çalışmada, etanolün rat karaciğer dokularında GSH düzeylerini anlamlı olarak azalttığını gördük. Alkol verilmesinin öncesinde E vitamini verilmesinin, alkolün azalttığı GSH düzeylerini arttırdığını gösterdik. Rajagopal ve ark. da alkol verilen ratların doku GSH düzeylerinin azaldığını göstermişlerdir. Etanolün karaciğerden GSH kaybını

indüklediğini ve hepatik içeriği azalttığını ileri sürmüşlerdir. GSH'nın bu düşük düzeyleri, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> temizleyicisi antioksidan bir enzim olan glutatyon peroksidazın kullanımının artması nedeniyle olabileceğini açıklamışlardır (47).

Kronik alkole maruz kalan hayvanların ve alkoliklerin karaciğerinde önemli miktarda 1-OH etil serbest radikali oluşmaktadır. OH etil radikali kovalent olarak moleküllere bağlanabildiği gibi GSH havuzunu tüketerek ve diğer hücresel tiyollerle etki gösterebilmektedir. Bu şekilde hücre içi GSH havuzunun tüketimi ve hücrel redoks eşitliğinin bozulmasına yol açarak ROS oluşumuna katkı da bulunur (49).

Protein karbonil içeriği proteinlerin serbest radikal aracılı modifikasyonunun bir markırıdır (50). Proteinlerin oksidatif hasarına, protein karbonil rezidülerinin artışı eşlik eder. Proteinler hücrel metabolizmanın düzenlenmesi için gereklidir ve proteinlerin hasar görmesi hücre metabolizmasının ve fonksiyonunun değişimine ve bunun sonucunda hücre ölümü ile sonuçlanmasına yol açabilir (51). Çalışmamızda karbonil düzeyleri, etanol verilen grupta kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı olarak artmış bulundu. E vitamini verilmesi Karbonil düzeylerini tek başına etkilemez iken etanol öncesi verilmesi etanolün arttırdığı Karbonil düzeyini anlamlı olarak azaltmıştır.

Yapılan çalışmalar, alkol tüketiminin karaciğer ve karaciğer dışı dokularda oksidatif stresi indükleyerek lipid peroksidasyonuna yol açtığı, bu durumun kompleks ve interaktif bir süreç olduğu ileri sürülmektedir. Genellikle karaciğerde meydana gelen etanol metabolizmasının erken fazında tam oksidasyon ile açığa çıkan oksijen ve NO radikalleri, asetaldehit artışı hücre içi redoks durumunu belirgin olarak değiştirmektedir.

Ayrıca etanol ve başlıca metaboliti asetaldehitin metabolize olamadığı diğer dokularda ROS'un oluşumuna yol açabildiği ve bu dokularda prooksidan etki sonucu alkolle ilişkili toksisite ve hasardan sorumlu olabileceği ileri sürülmektedir (52,55). Etanolün metabolizması sırasında karaciğerde aktivitesi oldukça artan ksantin oksidaz (XO), kendisi serbest radikal oluşumuna yol açabildiği gibi, asetaldehit metabolizması da XO veya aldehit oksidaz aracılığı ile serbest radikaller üretebilme potansiyeline sahiptir. Kronik alkol üretiminde daha aktif hale geçen mikrozomal P450 2E1 enzim sistemi ve katalaz yolunun da, O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve 1-OH etil radikali gibi

serbest radikallerin üretimi ile ilişkili olduğu ve serbest radikal üretimini artırdıkları bilinmektedir (56).

Organizmada ROS'un hasar oluşturuıcı etkilerine karşı antioksidan savunma sistemleri gelişmiştir. Normal koşullarda bu toksik türlerin hasar oluşturuıcı etkileri antioksidanlarla sınırlandırılmaktadır ve böylece oksidatif hasara bağlı olarak ortaya çıkan doku hasarı en aza indirilmektedir. Bütün dokular oksijen radikallerini bir yere kadar nötralize etme kapasitesine sahiptirler. Bu mekanizmalar sırasıyla süperoksid anyonunu hidrojen perokside, hidrojen peroksidi suya çeviren SOD ve katalazı içerir. Bunlara ek olarak glutatyon çifti-GSH ve GSSG- bir mekanizma ile okside molekülleri redükte ederek antioksidan sistem vazifesi görür ve hekzozmonofosfat yolundan sağlanan NADPH'ye ihtiyaç duyar. GSH'ın hücresele düzeylerinin azalması, GSSG düzeylerinin artması (GSH/GSSG oranı) hücre kültür ve organ sistemlerinde oksidatif stresin belirtisi olarak kullanılır.

Ancak serbest radikaller belirli bir düzeyin üzerinde oluşur ve antioksidanlar yetersiz kalırsa söz konusu serbest radikaller hücrenin yapı elamanları olan protein, lipid, karbonhidrat, nükleik asitler ve enzimleri bozarak zararlı etkilere yol açarlar.

Total protein SH içeriği enzimatik olmayan bir antioksidan göstergesi olup, SH içeren proteinler serbest radikallerin önemli hedefleridir (51). Çalışmamızda karaciğer SH düzeylerini, etanol alan grupta kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda anlamlı olarak azalmış bulduk.

Çalışmamızda, etanol verilmesi karaciğer SOD aktivitelerinde anlamlı bir değişikliğe yol açmamıştır. Etanol ile E vitamini verilmesi SOD düzeyini artırsa da istatistiksel olarak kontrol grubu ile bir fark yaratmamıştır. Rajagopal ve ark. yaptıkları çalışmalarda  $O_2^{\cdot-}$  ve  $\cdot OH$  iyonlarını temizlemeye yardımcı olan SOD enzimini alkol verilen grupta düşük bulmuşlar. Bu düşüşün nedeni olarak yüksek reaktif oksijen radikallerinin birikmesine bağlamışlar (47). Suresh ve ark. alkolün anlamlı lipid peroksidasyonuna neden olduğunu SOD ve vitamin E'nin azaldığını gösterdiler (57). Sergen ve ark. Primer rat hepatosit kültürlerinde lipid peroksidasyonunun arttığını SOD'un bir saatlik inkübasyon süresinde arttığını fakat daha sonra önemli derecede azaldığını gösterdiler (58).

Günümüzde, bağ dokusu hücreleri arasında yer alan ve "ECM" olarak tanımlanan kompartmanın, sadece destek fonksiyonuna sahip olmayıp, dinamik bir

sistem özelliğinde olduğu bilinmektedir. Bu dinamizmde, bir taraftan ECM komponentlerinin birbirleriyle etkileşimi ve bir takım sinyallerin iletimi rol oynarken, diğer bir taraftan, bu ECM komponentleri sürekli bir yapım ve yıkım geçirmektedir. Sözü geçen olaylar, normal düzeylerde seyrettiği sürece bazı fizyolojik durumların temelini oluşturmakla beraber, dengelerin bozulması halinde birtakım patolojilerin gelişmesine katkıda bulunmaktadır.

Normal karaciğer ECM'nin başlıca komponentleri tip I, III, IV, V ve VI kollojenler olup diğer kollojen tipleri de az miktarda bulunur. Normal karaciğerde, bu matriks proteinleri matriks yıkan enzimler tarafından yenilenir ve matriks komponentlerinin kontrollü depozisyonunu sağlarlar. ECM yıkan enzimler ailesinden MMP'ler en önemlileridirler, kolektif olarak MMP'ler ECM'nin bütün komponentlerini yıkarlar (59).

MMP'ler  $Zn^{+2}$  ve  $Ca^{+2}$  bağımlı endopeptidazlar olup nötral pH'da aktiftirler. Gerçek fonksiyonlarının ECM'nin "remodelling" olduğu düşünülüyor (60). MMP'ler üç düzeyde regüle edilirler: a) Gen ekspresyonunun indüklenmesi b) Latent proenzimlerin aktivasyonu, c) Metalloproteinazların tanımlanan doku inhibitörleri (TIMP) tarafından inhibisyonu.

Karaciğer fibrozu, matriks proteinleri özellikle tip I ve III kollojenin karaciğer hasarına cevap olarak net birikiminin sonucu olarak meydana gelir. Karaciğer fibrozunun temelini HSC'lerin miyofibroblast benzeri aktivasyonu oluşturur. Bunun sonucunda fibrozu karakterize eden intersiyel kollojen gibi matriks proteinlerinin sentezi artar. Sinüzoidal ve perisinüzoidal boşluk fibrozun olduğu alandır bu da, hepatositlerin aktivasyonunu kötü yönde etkileyebilir. MMP/TIMP'lerin ekspresyonu ve oranı hepatik fibroz sırasında ECM remodelling'i için anahtar faktörlerdir. Alkol sonunda hepatik fibrozu oluşturmak üzere çeşitli sitokinlerin üretilmesi ve çoğalması için HSC'leri aktive edebilir. Çalışmaların çoğu hepatik fibrozun formasyonu ve sürecinin MMP/TIMP ile bağlantılı olduğunu açıklamaktadır (61). Kupffer hücreleri aktive olduktan sonra sitokin ve reaktif oksijen radikali üretir (62).

Hepatik fibroz, gelişen konnektif doku sentezi ve matriks proteinlerinin yıkımını azalması arasındaki dengesizliğin bir sonucudur ve ECM'nin depozisyonunda net bir artış vardır. MMP'ler bu görüşte önemli bir rol oynarlar çünkü, aktiviteleri ECM yıkımından büyük ölçüde sorumludur. Rukkumani ve ark.

MMP'lerin ekspresyonunun alkol alanlarda arttığını gözlemlemişlerdir (63). Milani (64), Herbst (65), Winwood (66) ve ark. normal karaciğerde, in situ hibridizasyon çalışmalarında intersisyel kollojenaz (MMP-1), jeletinaz A (MMP-2), jeletinaz B (MMP-9), stromelizin 1 (MMP-3)'in ekspresyonlarının düşük olduğunu bulmuşlardır. Sağlıklı dokularda normal olarak MMP'lerin aktivitesi düşüktür fakat patolojik süreçlerde bazı MMP'lerin ekspresyonları ve aktiviteleri artar (67). Çalışmamızda, proMMP-9 düzeyleri, etanol alan grupta kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı olarak artmış bulundu. E vitamini verilmesi proMMP-9 düzeylerini tek başına etkilemez iken etanol öncesi verilmesi, etanolün arttırdığı proMMP-9'u anlamlı olarak azaltmıştır.

Kwon ve ark. yaptıkları çalışmada MMP-9 düzeylerinin hepatoselüler karsinoma için kullanışlı olmadığını fakat alkolik karaciğer sirozu için bir marker olabileceğini belirtmişlerdir (59). Nunez ve ark. Kronik HCV (hepatit C virüsü) enfeksiyonunda hücre içi MMP-9'un fazla ekspresyonunun hepatik fibrozun ilerlemesi ile ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir (68). Wang ve ark. dimetilnirtazamin (DMN) ile oluşturdukları karaciğer fibrozunda MMP-9 aktivitesini anlamlı artmış olarak bulmuşlardır (69).

Oksidatif stres, MMP'leri ve kollojen sentezinin etkileyerek ECM'nin önemli bir düzenleyicisi olabilir. Siwik ve ark. kardiyak fibroblastları kullanarak in vitro yaptıkları çalışmada ROS'un direkt etkisine ek olarak kollojen sentezini azalttığını göstermişlerdir. In vitro kardiyak fibroblast ortam şartlarında ROS'un latent proMMP'lerin direkt aktivasyonuna sebep olduğu gösterilmiştir. Siwik ve ark. SOD'u inhibe ederek yaptıkları çalışmalarda kollojen sentezinin azaldığını ve MMP aktivite düzeylerinin arttığını bulmuşlardır (70). Gunang-Fu ve ark. yaptıkları çalışmalarda MMP-9 ekspresyonunun dört hafta alkol uygulanan ratlarda artış gösterdiğini, dokuzuncu haftada azaldığını ve onbirinci haftada tekrar normal seviyelerine döndüğünü bulmuşlar ve hepatik fibroz sırasında MMPs/TIMPs oranının ve ekspresyonunun ekstraselüler matriks remodelling'i için anahtar faktörler olduğunu belirtmişlerdir (71).

Antioksidan savunmanın 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 (72). Antioksidan aktivitesi en yüksek olan tokoferol  $\alpha$ -tokoferoldür. Hücre membranları ve plazma lipoproteinleri, lipitte eriyebilen bir molekül olan alfa tokoferole sahiptir (73). Coundary ve ark. ratlarda yapmış oldukları çalışmalarda alkol uygulamasından sonra GSSG ve non-enzimatik antioksidan olan vitamin E'nin azaldığını göstermişlerdir (74).

Alfa tokoferol molekülünün kimyasal olarak aktif kısmı, fenolik OH grubuna sahip olan aromatik halkasıdır ve antioksidan özelliği bu gruptan kaynaklanır. Fenolik OH grubunun H atomu kolaylıkla ayrılabilirdiği için peroksidasyon sonucu oluşan lipid peroksil radikalleri bir yağ asidi yan zinciri yerine bu antioksidanla reaksiyona girer.

Kronik alkol tüketiminin karaciğer vitamin A, E ve GSH rezervlerinin azalmasına yol açarak karaciğerin koruyucu antioksidan defans mekanizması üzerine negatif etki yaptığını ve alkolün yaptığını karaciğer hasarına katkıda bulunduğunu, E vitamininin MDA ve karbonili azalttığı gösterilmiştir. Rukkumani ve ark. ratlarda yaptıkları alkol çalışmalarında TBARS'ın arttığını bulmuşlardır (63). Clot ve ark. alkol kullanan hastalar üzerinde yaptıkları çalışmalarda lipid peroksidasyonunun arttığını plazma alfa-tokoferol ve eritrosit glutatyon düzeylerinin düştüğünü rapor etmişlerdir (75). Koch ve ark. kronik alkol alımının karaciğer mitokondri ve mikrozomal fraksiyonlarında vitamin E içeriğinin anlamlı azaldığını, lipid peroksidasyonunun oluştuğunu ve sonunda etanolün indüklediği oksidatif stresin meydana geldiğini bulmuşlardır (76). Bu çalışmada E vitamini verilmesi, alkolün artırdığı oksidatif hasarı ve proMMP-9 düzeylerini azaltırken, antioksidan konsantrasyonlarını da artırmıştır.

## 5. SONUÇ

Sonuç olarak yapmış olduğumuz çalışmada, etanolün karaciğerde lipid peroksidasyonunu ve proMMP-9 düzeylerini artırdığını ve karaciğer antioksidan düzeylerini azalttığını bunun sonucunda karaciğer harabiyetini arttırdığını gözlemledik. Etanolün indüklediği karaciğer hasarında ROS'un proMMP düzeylerini arttırabileceğini ve bu şekilde karaciğeri fibroza götürebileceğini düşünmekteyiz. Bir antioksidan olan vitamin E'nin ROS'un etkisini azaltarak antioksidan savunmayı arttırdığını ve azalan ROS düzeyleri sonucunda proMMP düzeylerini azaltarak karaciğer hasarını önlemede önemli bir etken olduğunu ve serbest oksijen radikallerinin proMMP düzeyleri üzerine etkili olduğunu düşünmekteyiz.

**REFERANSLAR**

1. 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.
2. Yalın A.E., Yalın S., Yıldız Ş.M., Yüzbaşıoğlu S., Aksoy K. (2001) Eritrosit Membran Proteinlerine Serbest Radikallerin Etkisi. *Türk Biyokimya Dergisi* **26**, 123-129.
3. Meram İ., Köylüoğlu O., Tarakçıoğlu M. (2001) E Vitamini ve Klinik Önemi. *İbni Sina Tıp Dergisi* **6**, 66-72.
4. Akkuş İ. (1995) Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. *Mimozayayınları* Konya.
5. Theret N., Musso O., L'Helgoualc'h A., Clement C. (1997) Activation of Matrix Metalloproteinase-2 from Hepatic Stellate Cells Requires Interactions With Hepatocytes. *Am J of Pathol* **150**, 51-58.
6. Iredale J.P. (1997) Tissue Inhibitors of Metalloproteinase in Liver Fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* **29**, 43-53.
7. Ninomiya T., Yoon S., Nagano H. et al. (2001) Significance of Serum Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors on the Antifibrogenetic Effect of Interferon-Alpha in Chronic hepatitis C Patients. *Intervirology* **44**, 227-231.
8. Han Yuan-Ping, Nien Yih-Dar, Garner W.L. (2002) Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -induced Proteolytic Activation of Pro-matrix Metalloproteinase-9 by Human Skin Is Controlled by Down-regulating Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 and Mediated by Tissue-associated Chymotrypsin-like Proteinase. *J Biol Chem* **277**, 27319-27327.
9. Siess H. (1991) Oxidative stress: From basic research to clinical application. *Am J Med* **91**, 31-38.
10. Omara F.O., Blakley B.R. (1993) Vitamin E Is Protective against Iron Toxicity and Iron-Induced Hepatic Vitamin E Depletion in Mice. *J Nutr* **123**, 1649-1655.



11. 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.
12. 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.
13. Lieber C. S. (1999). Mikrosomal Ethanol-Oxidizing System (MEOS): The First 30 Years (1968-1998). *Alcohol Clin Exp Res* **23**, 991-1007.
14. Oktay G. (2002). Alkol ve metabolizması (ed). In: Onat T., Emerk K., Sözmen E. T.(eds) *İnsan Biyokimyası 975-8624-20-02 İstanbul Palme Yayıncılık*.
15. Lieber S. C. (2003). CYP2E1: from ASH to NASH. *Hepatology* **28**, 1-11.
16. Celec P., Peter J., Lucia S. Et al (2003). Effects of anabolic steroids and antioxidant vitamins on ethanol induced tissue injury. *Life Sci* **74**, 419-434.
17. Cederbaum I. A. (2003). Iron and CYP2E1-dependent oxidative stress and toxicity. *Alcohol* **30**, 115-120.
18. Albano E., Samuel W. F., Magnus I. S. (2003). Hydroxyethyl Radicals in Ethanol Hepatotoxicity. *Div. of Molecular Toxicology, Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institute, Box* **210**, 171-186.
19. Ateş E. Varderele E. (2003). Alkolik karaciğer hastalığı.(eds). Dilek O. N. *Karaciğer* ISBN:975-7150-72-X Cilt II Uyum Ajans.
20. Cederbaum I. A., Wu D. et al (2003). Alcohol, Oxidative Stress, and Free Radical Damage. *Alcohol ResHealth* **27**, 277-284.
21. Scuppan D., Ruehl M., Somasundaram R., Hahn E.G. (2001) Matrix as a Modulator of Hepatic Fibrogenesis. *Semin Liver Dis* **21**, 351-372.
22. Scuppan D. (1990) Structure of ekstrasellular matrix in normal and fibrotic liver: collogens and glycoproteins. *Semin Liver Dis* **10**, 1-10.
23. Güner G. (2002). Ekstrasellüler Matriks Yapısı ve Metabolizma Bozuklukları (ed). In: Onat T., Emerk K., Sözmen E. T.(eds) *İnsan Biyokimyası 975-8624-20-02 İstanbul Palme Yayıncılık*.
24. Nagase H., Woessner J.F. (1999) Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem* **274**, 21491-21494.

25. Curry T.E., Osteen K.G. (2003) The Matrix Metalloproteinase System: Changes, Regulation, and Impact throughout the Ovarian and Uterine Reproductive Cycle. *Endocr Rev* **24**, 428-465.
26. Visse R., Nagase H. (2003) Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. *Circ Res* **92**, 827-839.
27. Brown P.D. (1998) Matrix metalloproteinase inhibitors. *Breast Cancer Treat* **52**, 125-136.
28. Vu T.H., Werb Z. (2000) Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* **14**, 2123-2133.
29. Bosman F.T., Stamenkovic I. (2003) Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol* **200**, 423-428.
30. Lauer-Fields J.L., Juska D., Fields G.B. (2002) Matrix Metalloproteinases and Collagen Catobolism. *Biyopolimers* **66**, 19-32.
31. Donnelly R., Collinson D.J., Manning G. (2003) Hypertension, matrix metalloproteinases and target organ damage. *J Hypertens* **21**, 1627-1630.
32. Kugler A. (1999) Matrix Metalloproteinases and Inhibitors. *Anticancer Res* **19**, 1589-1592.
33. Paarsons S.L., Watson A., Brown P.D., Collins H.M., Steele R.J.C. (1997) Matrix metalloproteinases. *Bri J Surg* **84**, 160-166.
34. Massova I., Kotra L. P., Fridman R., Mobashery S. (1998) Matrix metalloproteinase: structures, evolution, and diversification. *Faseb J.* **12**, 1075-1095.
35. Parks W.C., Shapiro S.D. (2001) Matrix metalloproteinases in Lung biology. *Respir Res* **2**, 10-19.
36. Stamenkovic I. (2003) Eksracellular matrix remodelling: The role of matrix metalloproteinases. *J Pathol* **200**, 448-464.
37. Lois M., Brown A.S., Moss I.M., Roman J., Gudiot D.M. (1999) Ethanol Ingestion Increases Activation of Matrix Metalloproteinases in Rat Lung During Acute Endotoxemia. *Am J Respir Crit Care Med* **160**, 1354-1360.
38. Kossakowska A.E., Edwards D.R., Lee S.S. et al. (1998) Altered Balance Between Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Experimental Biliary Fibrosis. *Am J Pathol* **153**, 1895-1902.

39. Chua P.K., Melish M.E., Yu Q., Yanagihara R., Yamamoto K.S., Nerurkar V.R. (2003) Elevated Levels of Matrix Metalloproteinase 9 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1 during the Acute Phase of Kawasaki Disease. *Clin Diagn Lab Immunol* **10**, 308-314.
40. Arthur M.J.P. (2000) Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **279**, 245-249.
41. Okhawa H, Ohishi N, Yagi K. (1979) Assay for Lipid Peroxidase in Animal Tissues By Thiobarbituric Acid Reaction. *Anal Biochem* **95**, 351-358.
42. Levine R.L., Garland D., Oliver C.N., (1990) Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins. *Method Enzymol* **186**, 464-478.
43. Koster J.F., Biemond P., Swaak J.G. (1986) Intracellular and Extracellular Sulphydryl Levels in Romatoid Arthritis. *Ann Rheum Dis* **45**, 44-46.
44. Beutler E., Robson M.J., Buttensieser E. (1957) The Glutathione Instability of Drug Sensivity Red Cells. *J Lab Med* **49**, 84.
45. 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.
46. Ma X., Svegliati-Baroni G., Poniachik J., Baraona E., Lieber C.S. (1997) Collagen synthesisby liver stellate cells is released from its normal feedback regulation by acetaldehyde-induced modification of the carboxyl-terminal propeptideof procollagen. *Alcohol Clin Exp Res* **21**, 1204-1211.
47. Rajagopal S.K., Manickham P., Periyasamy V., Namasivayam N. (2003) Activity of Cassia auriculata leaf extract in rats with alcoholic liver injury. *J Nutr Biochem* **14**, 452-458.
48. Dupont I., Bodenez P., Berthou F., Simon B., Bardou L.G., Lucas D. (2000) Cytochrome P-450 2E1 activity and oxidative stres in alcoholic patients. *Alcohol Alcohol* **35**, 98-103.
49. Armutcu F., Gürel A., Kurtman S., Mungan A.G., Ünalacak M. (2003) Alkol Alışkanlığı Olanlarda Lipid Peroksidasyonu ve Serum Demir Parametreleri. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi* **1**, 61-67.
50. Kahraman A., Erkasap N., Köken T., Serteser M., Aktepe F., Erkasap S. (2003) The antixidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions. *Toxicology* **183**, 133-142.

51. Abraham P., Wilfred G., Ramakrishna B. (2002) Oxidative damage to the hepatocellular proteins after chronic ethanol intake in the rat. *Clinica Chimica Acta* **325**, 117-125.
52. Normdann R. (1994) Alcohol and antioxidant systems. *Alcohol Alcohol* **29**, 513-522.
53. Ishii H., Kurose I., Kato S. (1997) Pathogenesis of alcoholic liver disease with particular emphasis on oxidative stress. *J Gastroenterol Hepatol* **12**, 272-282.
54. Mira L., Maia L., Barreira L., Manso C.F. (1995) Evidence for free radical generation due to NADH oxidation by aldehyde oxidase During ethanol metabolism. *Arc Biochem Biophys* **186**, 421-431.
55. Normdan R., Ribiere C., Rouach H. (1990) Ethanol-induced lipid peroxidation and oxidative stress in extrahepatic tissues. *Alcohol Alcohol* **25**, 231-237.
56. Poli G. (2000) Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Mol Aspects Med* **21**, 49-98.
57. Suresh M.V., Sreeranjit Kumar C.V., Lal J.J., Indira M. (1999) Impact of massive ascorbic acid supplementation on alcohol induced oxidative stress in guinea pigs. *Toxicol Lett* **104**, 221-229.
58. Sergen O., Morel I., Chevanne M., Cillard P., Cillard J. (1995) Oxidative stress induced by ethanol in rat hepatocyte cultures. *Biochem Mol Biol Int.* **35**, 575-583.
59. Kwon O.S., Lim D.Y., Kwon K.A. et al. (2003) Clinical Usefulness of Plasma Activities of Gelatinase ( Matrix Metalloproteinase-2 and 9) in Chronic Liver Disease. *Korean J Hepatol* **9**, 222-230.
60. Vu T.H., Werb Z. (2000) Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* **14**, 2123-2133.
61. Xu G., Li P., Wang X. et al. (2004) Dynamic changes in the expression of matrix metalloproteinase and their inhibitors, TIMPs, during hepatic fibrosis induced by alcohol in rats. *World J Gastroenterol* **10**, 3621-3627.
62. Lieber C.S. (2004) Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol* **34**, 9-19.

63. Rukkumani R., Aruna K., Varma P.S., Menon V.P. (2004) Curcumin influences hepatic expression patterns of matrix metalloproteinases in liver toxicity. *Ital J Biochem.* **53**, 61-66.
64. Milani S., Herbest H., Scuppan D., Groppane S.C., Pellegrini G et al. (1994) Differential expression of Metalloproteinase-1 and -2 genes in normal and fibrotic human liver. *Am. J. Pathol.* **144**, 528-537.
65. Herbest H., Heinrichs O., Scuppan D., Milani S., Stein H. (1991) Temporal and spatial patterns of transin/stromelysin RNA expression following toxic injury in rat liver. *Virchows Arch. B Cell. Pathol.* **60**, 295-300.
66. Winwood P.J., Scuppan D., Iredale J.P., Kawser C.A., Docherty A.J.P., Arthur M.J.P. (1995) Kupffer cell-derived 95-kDa type IV colloganase/geletinase B: characterization and expression in cultured cells. *Hepatology* **22**, 304-315.
67. Wainwright C.L. (2004) Matrix metalloproteinases, oxidative stress and the acute response to acute myocardial ischemia and reperfusion. *Curr Opin Pharmacol* **4**, 132-138.
68. Nunez O., Fernandez-Martinez A., Majano P.L. et al. (2004) Increase in intrahepatic cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 expression in association with progressive liver disease in chronic hepatitis C virus infection: role of viral core and NS5A proteins. *Gut.* **53**, 1665-1672.
69. Wang X.B., Liu P., Tang Z.P. (2004) The role of changes of MMP-2,9 activity in the development of liver fibrosis in rats. *Zhounghua Gan Zang Bing Za Zhi.* **12**, 267-270.
70. Siwik D.A., Colucci W.S., (2004) Regulation of Matrix Metalloproteinases by Cytokines and Reactive Oxygen/Nitrogen Species in the Myocardium. *Heart Fail Rev* **9**, 43-51.
71. Xu G., Li P., Wang X. et al. (2004) Dynamic changes in the expression of matrix metalloproteinase and their inhibitors, TIMPs, during hepatic fibrosis induced by alcohol in rats. *World J Gastroenterol* **10**, 3621-3627.
72. Abudu N., Miller J.J., Attaelmannan M., Levinson S.S. (2004) Vitamins in human arteriosclerosis with emphasis on vitamin C and vitamin E. *Clin Chim Acta* **339**, 11-25.

73. Ozaras R., Tahan V., Aydin S., Uzun H., Kaya S., Senturk H. (2003) N-Acetylcysteine attenuates alcohol-induced oxidative stress in the rat. *World J Gastroenterol* **9**, 125-128.
74. Coudray C., Richard M.J., Faure H, Favier A. (1993) Blood and liver lipid peroxide status after chronic ethanol administration in rats. *Clin Chim Acta.* **15**, 35-45.
75. Clot P, Tabone M., Arico S., Albano E. (1994) Monitoring oxidative damage in patients with liver cirrhosis and different daily alcohol intake. *Gut.* **35**, 1637-1643.
76. Koch OR., De Leo M.E., Borello S., Palombini G., Galeotti T. (1994) Ethanol treatment up-regulates the expression of mitochondrial manganese superoxid dismutase in rat liver. *Biochem Biohys Res Commun.* **30**, 1356-1365.

